



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102598006 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201080051501. 2

(22) 申请日 2010. 11. 11

(30) 优先权数据

61/261, 109 2009. 11. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 05. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/056387 2010. 11. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/060174 EN 2011. 05. 19

(73) 专利权人 贝克曼考尔特公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 陆久留 子华·王

安东尼奥·阿雷瓦洛·雷耶斯

埃里克·艾伦·古斯塔夫森

约翰·史蒂文·赖利

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 彭里

(51) Int. Cl.

G06F 19/26(2006. 01)

G06T 11/20(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0030637 A1, 2003. 02. 13,

US 2003/0030637 A1, 2003. 02. 13,

WO 2009/018000 A1, 2009. 02. 05,

CN 101018872 A, 2007. 08. 15,

US 2002/0171646 A1, 2002. 11. 21,

审查员 周亚楠

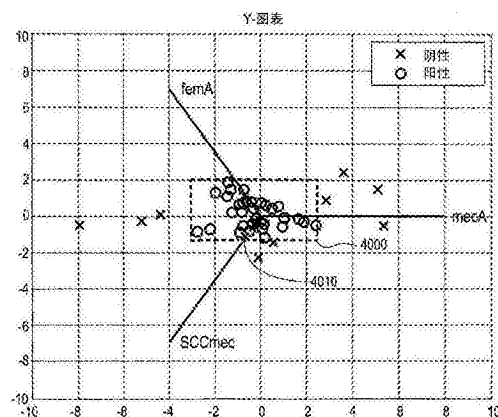
权利要求书2页 说明书16页 附图6页

(54) 发明名称

用于使用图表检测生物状态的存在的系统和
方法

(57) 摘要

基于 MRSA 阳性样品应当大致具有相同复制数的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的事实, 使用用于识别样品中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的系统和方法。这些系统和方法可以进一步在 2 维图表上同时呈现三个化验, 图表的每个轴相隔 120 度。根据一个实施例, Y 图表被用于 2 维显示。如果给定的样品具有 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的类似读数, 那么样品的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的测量复制数可以靠近起点标绘, 而不管样品的绝对的化验读数。借助于这个转换, 边界函数可以被限定, 该边界函数可用于区分 MRSA 阳性样品与 MRSA 阴性样品。



1. 一种用于判定样品中的生物学实体的存在的方法,其特征在于,所述方法包括:
检测所述样品中的至少三个标靶的量;以及

通过在数字计算机上执行调用算法来判定所述样品中的所述生物学实体的所述存在,其中,所述调用算法使用与至少三个遗传因子关联的测量值作为输入,并且将它们组合以形成矢量,将所述矢量与包含起点的2维Y图表上的边界函数相比,并且如果所述矢量在所述边界函数之内,那么所述生物学实体存在,如果所述矢量不在所述边界函数之内,那么所述生物学实体不存在,并且其中,与所述生物学实体关联的矢量比不与所述生物学实体关联的矢量更靠近所述起点。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述至少三个遗传因子包含 mecA、SCCmec 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列,而且其中所述调用算法在所述2维Y图表上,将 mecA、SCCmec 和所述金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测量组合作为矢量 $\vec{p}$ 。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,通过公式限定所述矢量 $\vec{p}$:

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

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述至少三个遗传因子包含 mecA、SCCmec 和 femA。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物学实体包括 MRSA。

6. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,进一步包含在显示器上显示所述Y图表。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,通过矩形门函数、圆形门处理、神经网络或高斯分布函数来限定所述边界函数。

8. 如权利要求1到7中任一项所述的方法,其特征在于,从一组已知样品产生所述边界函数,其中对于所述一组已知样品中的每个样品,MRSA的存在是已知的。

9. 一种用于判定样品中的生物学实体的存在的系统,其特征在于,所述系统包括:

测量模块,用于检测与所述样品中的至少三个遗传因子关联的值;

存储模块,用于存储来自所述测量模块的检测值;

处理模块,用于执行调用算法,其中所述调用算法使用所述至少三个遗传因子的所述检测和测量值作为输入,并且将它们组合以形成矢量,将所述矢量与包含起点的2维Y图表上的边界函数相比,并且如果所述矢量在所述边界函数之内,那么所述生物学实体存在,如果所述矢量不在所述边界函数之内,那么所述生物学实体不存在,

并且其中,与所述生物学实体关联的矢量比不与所述生物学实体关联的矢量更靠近所述起点。

10. 如权利要求9所述的系统,其特征在于,所述值是所述至少三个标靶的量。

11. 如权利要求9所述的系统,其特征在于,所述至少三个遗传因子包含 mecA、SCCmec 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列,而且其中所述调用算法在所述2维Y图表上,将 mecA、SCCmec 和所述金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的所述检测量组合作为矢量 $\vec{p}$ 。

12. 如权利要求11所述的系统,其特征在于,通过公式限定所述矢量 $\vec{p}$:

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

13. 如权利要求 9 所述的系统,其特征在于,所述测量模块包括实时 PCR 设备。

14. 如权利要求 11 所述的系统,其特征在于,进一步包含用于显示所述 2 维 Y 图表的显示器。

15. 如权利要求 9 到 14 中任一项所述的系统,其特征在于,通过矩形门函数、圆形门处理、神经网络或高斯分布函数来限定所述边界函数。

16. 一种用于产生模型的方法,所述模型能够用于判定未知样品中的生物学实体的存在,其特征在于,所述方法包括:

检测已知样品中的至少三个遗传因子的所述存在和值;

在数字计算机上对所述已知样品中的每个样品执行调用算法,其中,所述调用算法产生矢量,而且对于每个矢量,使用所述至少三个遗传因子的所述检测值作为输入,其中一些矢量与所述生物学实体关联,并且一些矢量不与所述生物学实体关联;

在包含起点的 2 维 Y 图表上标绘所述矢量;以及

产生边界函数,所述边界函数将与所述生物学实体关联的所述矢量和与所述生物学实体不关联的所述矢量分离,并且其中,与所述生物学实体关联的矢量比不与所述生物学实体关联的矢量更靠近所述起点。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,通过使用矩形门函数、圆形门处理、神经网络或高斯分布函数来限定所述边界函数。

18. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,进一步包含显示所述 2 维 Y 图表。

19. 如权利要求 16 到 18 中任一项所述的方法,其特征在于,所述至少三个遗传因子包含 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列,而且其中所述调用算法在所述 2 维 Y 图表上,将 *mecA*、*SCCmec* 和所述金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测量组合作为矢量 $\vec{p}$ 。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,通过公式限定所述矢量 $\vec{p}$:

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

用于使用图表检测生物状态的存在的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 这个申请是非临时的,而且要求在 2009 年 11 月 13 日美国临时专利申请第 61/261,109 号,名称为“用于使用图表检测生物状态的存在的系统和方法”(代理机构标签号 021594-010300US),为了所有的目的,通过引用在此被全部结合。

背景技术

[0003] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)涉及伴有包含医院暴发的严重后果的感染,而且对各种各样的抗生素显现抵抗力,因此限制了治疗选择。与 MRSA 关联的保健有特殊的临床重要性,因为它不但对所有的青霉素和头孢菌素有显著的交叉抗性,而且还对多个其它通常使用的抗生素有典型的抗药性。MRSA 感染的治疗通常需要更加昂贵的以及常常更加有毒性的抗生素,这通常被用作最后的防线。因此,MRSA 的迅速检测对于治疗以及感染控制措施两者来说在临床上至关重要。

[0004] 由于 MRSA 可能常常与多个其它相关的细菌相互移植的事实,MRSA 的检测进一步是复杂的,多个其它相关的细菌包含甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)、耐甲氧西林血浆凝固酶阴性葡萄球菌(MR-CoNS)和/或甲氧西林敏感血浆凝固酶阴性葡萄球菌(MS-CoNS)。

[0005] 在临床微生物学实验室中用于 MRSA 的检测的传统方法涉及将来自样品的细菌进行培养作为第一步骤,用于 MRSA 与 MSSA 以及 MR-CoNS 的隔离和区分。这个方法是消耗时间的,而且需要最少 20 到 24 小时,直至知道结果为止。

[0006] 对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的检测以及将它与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)区分,许多基于分子的方法已经被出版。一个这样的方法靶向 MRSA、葡萄球菌盒(*Staphylococcus cassette*)染色体的 *mecA* 基因(SCCmec,担负甲氧西林耐药性)以及金黄色葡萄球菌的矿泉基因的两个分离区域(美国专利 5,702,895, Sinsimer 等人,临床微生物学的期刊(*Journal of Clinical Microbiology*),2005 年 9 月,45854591)。使用这个方法的 MRSA 的清楚的检测被非金黄色葡萄球菌菌株的相互存在所阻碍,非金黄色葡萄球菌菌株诸如是还持有用于甲氧西林耐药性的 *mecA* 基因的耐甲氧西林血浆凝固酶阴性葡萄球菌(MR-CoNS)(Becker 等人,临床微生物学的期刊(*Journal of Clinical Microbiology*),2006 年 1 月,p229-231)。

[0007] 更近来的分子的方法对于 SCCmec 以及金黄色葡萄球菌基因组的侧翼区域(flanking region)利用引物以及探针(美国专利 6,156,507, Huletsky 等人,临床微生物学的期刊(*Journal of Clinical Microbiology*),2004 年 5 月,p1875-1884)。SCCmec 是可动遗传因子,可动遗传因子携带 *mecA* 基因,并且在 *orfX* 基因的 3' 端插入在特异性位点 *attB_{sc}*。SCCmec 的左末端邻接有 *attB_{sc}* 的无 *orfX* 侧,同时 SCCmec 的右末端邻接有 *attB_{sc}* 的 *orfX* 侧(Ito 等人, *Antimicrob. Agent Chemother.* 2001, 45, p1323-1336; Ito 等人, *Antimicrob. Agent Chemother.* 2004, 48, p2637-2651, Noto 等人, *J. Bacteriol.* 2008, 190:1276-1283)。这个方法从 SCCmec/*orfX* 接点的检测来推断 *mecA* 基因的存在。当已

经有描述的许多不同类型的 SCCmec 时,这个方法需要多个引物的使用。这个方法还受到由没有包含 mecA 基因的 SCCmec 盒的存在所引起的假阳性结果(Farley 等人,临床微生物学的期刊(Journal of Clinical Microbiology),2008 年 2 月, p743-746) 以及由新出现的 SCCmec 类型没有被化验覆盖所引起的假阴性结果(Heusser 等人, Antimicrob. Agent s Chemother. 2007 年 1 月, p390-393)。

[0008] 另一个方法利用跨越不同的 SCCmec 类型的高同源性的区域中的一个引物以及侧翼金黄色葡萄球菌 DNA 中的一个引物(Cuny 等人, Clin. Microbiol Infect 2005 ;11 : 834-837, 欧洲专利 1529847B1)。这个方法也经受假阳性,因为随着引物包围这个区域,同样引发 MSSA 的概率是高的。

[0009] 最后,已经描述一种方法,使用特异性抗体以及磁性颗粒对于金黄色葡萄球菌进行积极地选择(Francois 等人,临床微生物学的期刊(Journal of Clinical Microbiology),2003 年 1 月, p254-260 ;欧洲专利 1, 370, 694B1)。这个方法使金黄色葡萄球菌富足,但是需要三个引物 / 探针组的使用以便积极地识别 MRSA 并且降低检测 CoNS 的可能性。该方法需要离心步骤以及分离溶菌步骤以便恢复核酸。

[0010] 市场上可买到的 MRSA 化验靶向 SCCmec 右末端接点以及 orfX。五个不同类型以及很多亚型的 SCCmec 已经被识别,并且新的 SCCmec 亚型的出现的潜力是高的。此外,来源于 MRSA 的 MSSA 可能保留一部分 SCCmec 序列,而没有 mecA 基因是可能的。因此,靶向具有 orfX 的 SCCmec 右末端接点的化验可能给出伴随 MRSA 衍生出的 MSSA 的假阳性结果,以及伴随 MRSA 携带新的紧急的 SCCmec 型 / 亚型的假阴性结果。

[0011] 如此,当前用于 MRSA 的检测的方法是麻烦的、消耗时间的,而且对于常规的临床和监督目的是不可靠的。因此,存在有开发化验的需要,该化验快速、简单、可靠而且能够从包含 MSSA 和 / 或 MR-CoNS 的其它相关的细菌检测和同时区分 MRSA。

发明内容

[0012] 本发明的实施例涉及用于检测样品中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的系统和方法,样品可能另外包含甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)、耐甲氧西林血浆凝固酶阴性葡萄球菌(MR-CoNS),和 / 或细菌的其它菌株。本发明的其它实施例可能更一般地涉及用于使用图表和边界函数来分析生物学实体的系统和方法。

[0013] 本发明的一个实施例指向用于判定样品中的生物学实体的存在的方法。该方法包括检测样品中的至少三个遗传因子的量。通过在数字计算机上执行调用算法来判定样品中的生物学实体的存在。该调用算法使用与至少三个遗传因子关联的测量值(例如,量)作为输入,并且将它们组合以形成矢量,将该矢量与 2 维图表上的边界函数相比。如果该矢量在边界函数之内,那么生物学实体存在,而且如果该矢量不在边界函数之内,那么生物学实体不存在。

[0014] 本发明的另一个实施例指向用于判定样品中的生物学实体的存在的系统。该系统包括能够检测样品中的至少三个遗传因子的值(例如,量)的测量模块、以及存储来自测量模块的检测值(例如,量)的存储器。该系统还包括计算机可读介质,该计算机可读介质包含具有用于执行调用算法的计算机可读代码,其中,调用算法使用至少三个遗传因子的检测和测量值(例如,量)作为输入,并且将它们组合以形成矢量。将该矢量与 2 维图表上的边界

函数相比。如果该矢量在边界函数之内,那么生物学实体存在,而且如果该矢量不在边界函数之内,那么生物学实体不存在。该系统还包括处理器,该处理器在计算机可读介质上执行计算机可读代码,以便判定样品中的生物学实体的存在。

[0015] 所述发明的另一个实施例指向包含用于调用算法的代码的计算机可读介质。该调用算法使用与至少三个遗传因子关联的检测和测量值(例如,量)作为输入,并且将它们组合以形成矢量。将该矢量与 2 维图表上的边界函数相比。如果该矢量在边界函数之内,那么生物学实体存在,而且如果该矢量不在边界函数之内,那么生物学实体不存在。

[0016] 发明的另一个实施例指向用于产生模型的方法,该模型可用于判定未知样品中的生物学实体的存在。该方法包括检测在已知样品中的至少三个遗传因子的存在和值(例如,量),以及对于已知样品中的每个样品在数字计算机上执行调用算法,其中调用算法产生矢量,而且使用至少三个遗传因子的检测值(例如,量)作为每个矢量的输入。一些矢量与生物学实体关联,以及一些矢量与生物学实体不关联。该方法进一步包括在 2 维图表上标绘矢量,以及产生将与生物学实体关联的矢量和与生物学实体不关联的矢量分离的边界函数。

[0017] 根据一个实施例,公开一种对于判定样品中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的存在的方法。该方法使样品经受将暴露存在于样品中的任何细菌的核酸的条件。接下来,样品可以被扩增,而且可以检测样品中的至少 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌(SA)特异性靶基因序列的存在和量。然后通过数字计算机上执行调用算法来判定样品中的 MRSA 的存在。该调用算法可以使用 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测和测量量作为输入,以判定 MRSA 是否存在于样品中。当样品中的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测量与通过选择的边界函数限定的近似相等时,调用算法可用于判定 MRSA 存在于样品中。

[0018] 根据一个实施例,公开一种对于判定样品中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的存在的系统。该系统可以包含许多部件。比如,该系统可以包含测量模块,在样品已经经受将暴露存在于样品中的任何细菌的核酸的条件之后,该测量模块能够扩增和检测样品中的至少 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的存在和量。该系统可以进一步包含存储器,该存储器可以存储来自测量模块的检测量。该系统还可以包含计算机可读介质,该计算机可读介质包含具有对于执行调用算法的指令的计算机可读代码。该调用算法可以使用 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测和测量量作为输入,以判定 MRSA 是否存在于样品中。当样品中的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测量与通过选择的边界函数限定的近似相等时,调用算法可用于判定 MRSA 存在于样品中。该系统还可以包含处理器,该处理器可以在计算机可读介质上执行计算机可读代码,以便判定样品中的 MRSA 的存在。

[0019] 根据另一个实施例,公开一种计算机可读介质。计算机可读介质可以包含用于调用算法的代码,该调用算法可以判定样品中的 MRSA 的存在。该调用算法可以使用 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测和测量量作为输入,以判定 MRSA 是否存在于样品中。当样品中的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测量与通过选择的边界函数限定的近似相等时,调用算法可用于判定 MRSA 存在于样品中。通过使样品经受将暴露存在于样品中的任何细菌的核酸的条件、以及扩增和检测样品中的至少 *mecA*、*SCCmec* 和所述金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的存在和量,获得 *mecA*、*SCCmec* 和

金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测和测量量。

[0020] 根据又一个实施例,公开一种用于产生模型的方法,该模型可用于判定未知样品中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的存在。该方法可以包含使一组已知样品经受将暴露存在于已知样品中的任何细菌的核酸的条件。对于该组已知样品中的每个样品,MRSA 的存在或不存在是已知的。然后该方法可以扩增和检测所述已知样品中的至少 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌(SA)特异性靶基因序列的存在和量。然后该方法可以在数字计算机上对于已知样品中的每个样品执行调用算法。该调用算法可以使用 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的检测和测量量作为输入。最后,该方法可以产生模型,该模型可用于判定 MRSA 是否存在于未知样品中。可以从针对已知样品执行的调用算法的输出产生该模型,而且可以通过选择的边界函数来限定该模型,该选择的边界函数限定 MRSA 阳性和 MRSA 阴性样品之间的边界。

[0021] 在这个公开中,这些实施例以及其它实施例稍后将被更详细地描述。

附图说明

[0022] 图 1 显示说明在根据一个实施例的方法中采取的步骤的流程图。

[0023] 图 2 显示说明在根据本发明的一个实施例的方法中采取的步骤的流程图。

[0024] 图 3-5 显示说明根据本发明的实施例的来自各种阳性和阴性样品的调用算法的输出图。

[0025] 图 6 是可用于执行本发明的各种实施例的系统的方框图。

具体实施方式

[0026] 各种实施例公开了用于基于 MRSA 阳性样品可以大致具有相同复制数的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的事实,来识别样品中的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的系统和方法。这些系统和方法可以进一步在 2 维图表上同时呈现三个化验,图表的每一个轴相隔 120° 的角度。根据一个实施例,Y 图表被用于 2 维显示。如果给定的样品具有 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的类似值,那么样品的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的测量的复制数可以标绘为非常靠近起点,而不管样品的绝对的化验读数。借助于这个转换,边界函数可以被限定,该边界函数可用于区分 MRSA 阳性样品与 MRSA 阴性样品。

[0027] 在这个公开中使用的所有科学和技术术语具有本领域中通常使用的含义,除非另有说明。如在这个公开中使用的,以下的词或短语具有指定的含义。

[0028] 如在此使用的,“边界函数”可以是用于判定数据是与生物学状态关联还是与生物学状态不关联的数学函数。通过使用神经网络、代价函数等等,可以以包含手工的任何适当的方式产生边界函数。边界函数还可以由包含椭圆形、矩形、圆形等等的任何适当的形状或线条来表示。边界函数还可以是在形状上有规律的或无规律的。

[0029] 如在此使用的,“矢量”可以涉及来源于一个以上的分量的值,每个分量具有至少方向和典型的标量。

[0030] 如在此使用的术语“遗传因子”可以涉及在本发明的方法中作为靶标是有用的所关心的基因组中的子序列。在一些实施例中,遗传因子是开放解读框或基因,诸如例如葡萄

球菌中的 *orfX*、*femA* 或 *mecA*。遗传因子还可以是可能或不可能包含 *mecA* 基因的可动遗传因子,诸如葡萄球菌盒染色体、SCCmec。

[0031] 在此,术语“SCCmec”、“SCCmec 序列”和“SCCmec 盒”被可替交地使用,以涉及被称为葡萄球菌盒染色体的遗传因子,该遗传因子携带 *mecA* 基因并且被插入如 Ito 等人 (2001, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:1323-1336) 中描述的葡萄球菌基因组中。

[0032] 在这个申请中,SCCmec 插入位点被称为“*orfX*-ISS/*attBsc*”。插入位点基因的 3' 端,在此指的是“*orfX*”。发生 SCCmec 插入的染色体位点指的是“*attBsc*”。在插入位点的特异性序列在这里指的是“*orfX*-插入位点序列(*orfX*-ISS)”或“*attBsc* 核心区域”。已知这个序列在金黄色葡萄球菌中是高保存的序列(Ito 等人, *Antimicrob. Agent Chemother.*, 2001, 45, p323-1336, Noto 等人, *J. Bacteriol.*, 2008, 190 :1276-1283)。

[0033] 在插入金黄色葡萄球菌的 *orfX*-ISS/*attBsc* 区域之后,SCCmec 左末端接点区域被称为 MRSA-LE 并且右末端接点区域被称为 MRSA-RE。在左末端接点中,SCCmec 序列与 *attBsc* 的无 *orfX* 侧邻接。在右末端接点中,SCCmec 序列与 *attBsc* 的 *orfX* 侧邻接。*OrfX*-ISS/*attBsc* 区域被详细地描述在 Ito 等人中(2001, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1323-1336 ;Ito 等人, *Antimicrob. Agent Chemother.*, 2004, 48, p2637-2651, Noto 等人, *J. Bacteriol.*, 2008, 190 :1276-1283) 以及美国专利第 6,156,507 号中,所有都通过引用被结合在此。如果 SCCmec 插入不存在,那么 *orfX*-ISS/*attBsc* 区域是不间断的。如果 *orfX*-ISS/*attBsc* 区域被识别作为完整的通过扩增方法论,那么这表示 SCCmec 盒没有被插入。然而,没有 *orfX*-ISS/*attBsc* 区域的扩增不表示 *mecA* 基因存在。已知在 SCCmec 盒变得被插入之后,可能失去 *mecA* 基因。因此即使没有 *mecA*,SCCmec 盒仍然可以防止 *orfX*-ISS/*attBsc* 区域的扩增。

[0034] “低聚核苷酸”是具有两个以上的核苷酸亚基共价连接在一起的核苷聚合体。低聚核苷酸通常是大约 10 到大约 100 核苷酸。核苷酸亚基的糖类基团可以是核糖、脱氧核糖或它们的改性派生物,诸如 OMe。核苷酸亚基可以通过诸如磷酸二酯键合、改性键合的键合或通过不防止低聚核苷酸与它的互补靶核苷酸序列杂交的非核苷酸部分被结合。改性键合包含其中标准磷酸二酯键合被诸如硫代磷酸酯键合、磷酸甲酯联接或中性的肽键代替的那些键合。含氮碱基类似物还可以是对应于本发明的低聚核苷酸的成分。“靶核苷酸”是包含靶核苷酸序列的核酸。“靶核苷酸序列”、“靶核苷酸序列”或“靶序列”是可以被杂交到互补低聚核苷酸的特异性脱氧核糖核苷酸或核苷酸序列。

[0035] 如在此使用的,术语“探针”指的是能够杂交到所关心的靶核苷酸的低聚核苷酸。作为探针通过互补碱基对结合到所关心的靶核苷酸的结果,杂交出现。一个本领域的技术人员将理解,依据杂交条件的严格性,探针将典型地基本上使缺乏完全互补的靶序列与探针序列形成化学键。探针可以与适当的标签或报道基因部分(reporter moiety) 关联,以使探针(以及因此它的靶)可以被检测、目测、测量和 / 或测定。

[0036] 如在此使用的,术语“引物”指的是用于引发核酸综合物的低聚核苷酸。引物通过互补碱基对与模板杂交,并且因此用于发起复制。以与以上对于探针的描述的同样方式出现杂交。在 PCR 中,使用两个引物:典型地与双链核酸分子的有义链杂交的“正向引物”以及典型地与分子的反义链杂交的“反向引物”。

[0037] 如在此使用的,术语“PCR”指的是用于通过在没有使用活体的情况下的 DNA 的酶

的复制,在较长的双链 DNA 分子之内的短的 DNA 序列(通常 50 到 600 个碱基)的指数式扩增的技术(Mullis 等人,MethodsEnzymol. 1987 ;155 :335-50)。其它体外扩增技术可被用于本发明,而且对于那些技术人员是众所周知的。这些方法例如包括连接酶链式反应(LCR)、核酸序列扩增法(NASBA)、链置换扩增法(SDA)、转录介导扩增法(TMA)、分支 DNA (bDNA) 以及滚环扩增技术(RCAT)。

[0038] 在此使用的术语“实时 PCR”指的是 PCR 的类型,在每个扩增循环之后,当实时积聚在反应中时,扩增的 DNA 被量化(Heid 等人,Genome Research,19966 (10):986-994)。用于实现实时 PCR 的许多探针化学处理对于那些技术人员来说是众所周知的。一个通常使用的方法是TaqMan®化验(参见,例如,美国专利第 5,210,015 号;第 5,487,972 号;以及第 5,804,375 号)。可以使用并且可以被商业上采购的其它实时 PCR 探针包含 FRET 引物、Molecular Beacons、Scorpion 引物®、Amplifluor 引物®、LUX 引物®、Eclipse®以及 Ultimate 探针®。对于实时 PCR 技术的综述,参见Bustin 等人,J. Mol. Endocrin,34 :597-601 (2005)。

[0039] 如在此使用的,术语“多重 PCR”指的是 PCR 的类型,其中,超过一个组的引物被包含在反应中,该反应允许两个以上的不同的标靶在单个反应试管中被扩增。术语“多重 PCR”还指的是多个引物以及探针被使用,但只有一个标靶被扩增的 PCR。在一个实施例中,本发明的多重 PCR 是实时 PCR。

[0040] 如在此使用的,“生物学状态”可以涉及来源于病人的样品的特殊的生物学状态。在大多数情况下,生物学状态涉及样品是否包含特殊的生物学实体,例如,标靶疾病生物体或与疾病关联的患者细胞。例如,一个生物学状态可以是包含 MRSA 细菌的样品,同时另一个生物学状态可以是不包含 MRSA 细菌的样品。在其它实例中,生物学状态可以涉及样品是否包含癌细胞。

[0041] 本发明的一个实施例涉及用于检测样品中的 MRSA 的化验,该样品可以包含 MRSA、MSSA、MR-CoNS 或其它细菌。本发明的实施例利用用于同时扩增和检测多个遗传因子(例如,标靶)的组合的多重 PCR。

[0042] 根据一个实施例,标靶 DNA 的初始量通过 PCR 阈值循环(Ct)被测量。例如,对于要被分析的反应,确定限定的信号阈值。达到这个信号阈值所需的循环数(Ct)被确定,用于标靶核酸以及用于参考或标准核酸。靶分子的绝对的或相对的复制数可以根据对于标靶核酸获得的 Ct 值与参考核酸相比来确定。因此 Ct 值与初始标靶 DNA 的量成反比,参见 Heid 等人,1996,Genome Research 6 (10):986,用于通过引用在此结合的 Ct 值的全部讨论。可以采用其它数学方法,其考虑基于在一个识别方法期间扩增的基因的预定设置量或数量的指征的特殊的靶基因的初始量的外推法。

[0043] 在一个实施例中,本发明指向判定样品中的 MRSA 的存在的方法,所述方法包括使样品暂时并且在条件下经受实时 PCR,以便产生扩增产物的水平,该扩增产物的水平足以通过荧光被检测,而且指示样品中的一个以上的 MRSA 特异性标靶序列的初始水平。

[0044] 在另一个实施例中,利用一组引物(正向和反向)以及探针进行扩增。可以利用在它的 5' 端的荧光报道基因分子以及在它的 3' 端的猝灭分子标明该探针。该猝灭分子防止信号从荧光报道基因分子的发射。探针杂交到正向和反向引物杂交的区域之间的标靶序列的区域。随着聚合酶沿着探针已经杂交的链移动,探针的 5' 端通过聚合酶的外切核酸酶活

度被劈开,因此允许由于猝灭部分的分离引起的荧光信号的发射。

[0045] 在具体的实施例中,本发明的探针可以包含双标签的荧光探针,双标签的荧光探针包括荧光的报道基因(荧光基团)和荧光的或非荧光的猝灭剂分子。本发明的实施例的荧光团可以在任何位置被附接到探针,包含在 5' 末端、3' 末端或任何末端的内部。在本发明的实施例中,荧光团和猝灭剂分别被附接到探针的 5' 和 3' 末端。荧光团的实例包括但不限于 FAM、ROX、HEX、NED、Cy5、Texas Red、Calfluor Red、CalFluor Orange、Quasar 670、Quasar 705。猝灭剂的实例包括但不限于 TAMARA、Blackhole 猝灭剂 BHQ-1, BHQ-2。

[0046] 在另一个实施例中,本发明提供一种利用三个标靶化验来检测和区分 MRSA 与 MSSA、MR-CoNS 或其它细菌的方法,其中,化验中使用的标靶包含 *mecA* 基因序列、金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列和 *SCCmec* 基因序列。在具体的实施例中,金黄色葡萄球菌特异性靶基因是 *femA*。在以下的描述中,*femA* 常常被明确地提及作为金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列;然而,根据各种实施例,其它金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列同样可以被使用。然而,可用于判定 MRSA 的存在的其它标靶可以包含 *orfX*。

[0047] 各种实施例无须使用传统的阳性-阴性或德耳塔方法,以便判定 MRSA 的存在。代替地,基于 MRSA 阳性样品大致具有相同的 *mecA*、*femA* 和 *SCCmec* 的复制数的事实,使用一个方法。当 *mecA*、*femA* 和 *SCCmec* 的复制数以大致等份存在时,可以表现出样品中的 MRSA 的存在。在本发明的实施例中,可以使用化验调用算法来分析 *mecA*、*SCCmec* 和 *femA* 的 Ct 值。这个调用算法可以进一步在 2 维图表上同时呈现三个化验,2 维图表中的线相隔 120 度。这个图表可以指的是 Y 图表,因为表示 *mecA*、*SCCmec* 和 *femA* 的测量量的图表的三个轴中的每个轴看起来像 2 维图表上的“Y”。如果样品具有类似的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的读数,那么样品的 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的测量复制数将靠近图表的起点标绘,而不管样品的绝对的化验读数。借助于这个转换,矩形门方法可以足以区分 MRSA 阳性和阴性样品。其它适当的方法可以使用圆形门函数、神经网络或高斯分布函数。以下提供其他的细节。

[0048] 图 1 图解根据一个实施例的可用于构造模型的步骤,该模型可用于判定 MRSA 是否存在于样品中。该模型中的边界函数可以基于 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的测量量,使 MRSA 阳性样品与 MRSA 阴性样品分离。

[0049] 在更多的通称中,本发明的一个实施例指向用于产生模型的方法,该模型可用于判定未知样品中的生物学实体的存在。该方法包括检测在已知样品中的至少三个标靶的存在和量以及对于已知样品中的每个样品在数字计算机上执行调用算法,其中调用算法产生矢量,以及将至少三个标靶的检测量使用作为每个矢量的输入。一些矢量与生物学实体关联,以及一些矢量不与生物学实体关联。该方法进一步包括在 2 维图表上标绘矢量,以及产生使与生物学实体关联的矢量和与生物学实体不关联的矢量分离的边界函数。

[0050] 在步骤 1000,选择数量的已知样品经受暴露样品中的细菌的核酸的条件。关于这点,已知样品是其中已经知道样品是否应当对于 MRSA 测试阳性或阴性的样品。如此,已知样品可以被用于构造可以判定以后的未知样品是否也包含 MRSA 的模型。虽然详细地描述 MRSA,但是当然,其它适当的生物学实体的存在可以在本发明的其它实施例中被检测。

[0051] 对于使样品经受暴露样品中的核酸的条件,有许多不同的方式。例如,如本领域中众所周知的,样品可以使它的温度上升,从而使 DNA 的链分离。同样可以使用用于暴露样品

中的核酸的其它众所周知的手段。

[0052] 在步骤 1010, 对于每个已知样品, 检测诸如 *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的至少三个标靶的存在和量。在一些实施例中, 可以为每个所关心的标靶测量 Ct 值。根据一个实施例, 金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列是 *femA*。有许多不同的方式来从样品测量基因。例如, 多重 PCR 可用于为每个测量标靶测量 PCR 阈值循环 (Ct)。其它测量技术同样可以被使用。

[0053] 确定的 Ct 值可用于产生 Y 图表。然而, 在 Y 图表的产生之前, 可以进行预筛选处理。在预筛选处理中, 如果系统没有检测到三个标靶基因序列中的任何一个, 那么该样品被认为是 MRSA 阴性的, 而且将不被显示在 Y 图表中。在一个实施例中, 如果 *mecA*>35、*femA*>32、或 *SCCmec*>32, 那么样品被认为是阴性的。在另一个实施例中, 如果 *mecA*>30、*femA*>30 或 *SCCmec*>30, 那么样品被认为是阴性的。在一些实施例中, 在样品经受得住这个预筛选处理之后, 该样品将被标绘在 Y 图表上, 并且利用该 Y 图表被分析。预筛选处理中使用的阈值可以取决于仪器和样品制备。

[0054] 在步骤 1020, 调用算法可以被应用于来自每个已知样品的每个测量标靶。根据一个实施例, 调用算法可以使用 Y 图表。

[0055] 根据一个实施例, 对于每个已知样品, 该调用算法产生中间矢量, 该中间矢量可以被投射在 2 维图表上, 该 2 维图表可以是 Y 图表。该中间矢量可以是三个单位矢量的总和, 该三个单位矢量彼此相隔 120 度, 而且通过从步骤 1020 获得的 *mecA*、*femA* 和 *SCCmec* 被加权。根据一个实施例, 矢量的总和可以由公式表示:

[0056] $\vec{p} = mecA * e^{0i} + femA * e^{\frac{2}{3}\pi} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi}$, 其中 $\vec{p}$ 是中间矢量。*femA* 可以由通用变量“SA” (表示与金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列关联的值) 代替。根据其它实施例, 同样可以使用用于表示测量标靶的多少相对量的其它类似的手段。

[0057] 在步骤 1030, 在步骤 1020 期间对于每个已知样品产生的中间矢量可以被分析, 以便产生可用于判定未知样品是否包含 MRSA 的模型。根据一个实施例, 使用已知样品的中间矢量, 选择边界函数, 而且限定该边界函数的参数。该边界函数可用于判定 MRSA 是在未知样品中还是不在未知样品中。

[0058] 根据一个实施例, 可以在所有测量的已知样品的 Y 图表上施行聚类分析, 从而将 MRSA 阳性和阴性样品分离。聚类分析可以将阳性样品聚合在一起, 因为 *femA*、*mecA* 和 *SCCmec* 是单个复制标靶, 而且在 MRSA 阳性样品中这些标靶应当是相等的份数。数学上, 这意指如果样品是 MRSA 阳性, 那么它在 Y 图表上的中间矢量应当靠近起点。如此, 诸如包围阳性样品的矩形区域的简单的边界函数可用于聚集位于 Y 图表的起点周围的阳性样品。阴性样品可能被分散在这个边界之外。根据一个实施例, 简单的矩形方框可用于分离 Y 图表上的阳性和阴性样品。可以使用来自已知样品的测量来调节该矩形方框的边界。例如, 神经网络算法可以被使用以帮助限定该方框的边界。其它实施例可以选择更复杂的边界函数或使用其它手段来调节选择的边界函数的系数。如上所述, 可以使用其它方法 (例如, 圆形门处理、神经网络或高斯分布函数) 来产生边界函数。

[0059] 图 2 图解根据一个实施例的可用于判定 MRSA 是否存在于样品中的步骤。如在此使用的, 未知样品指的是不知道 MRSA 是否存在于其中的样品。图 2 中的步骤可以使用模型, 诸如使用来自图 1 的步骤产生的模型, 来判定未知样品是否包含 MRSA。未知样品可以具有

各种测量的标靶,而且通过分析从未知样品的测量标靶产生的中间矢量相对于模型的边界函数存在于哪里,这些测量可用于检测 MRSA 的存在。

[0060] 在更多的通称中,本发明的实施例指向用于判定样品中的生物学实体的存在的方法。该方法包括检测样品中的至少三个标靶的值(例如,量)。通过在数字计算机上执行调用算法来判定样品中的生物学实体的存在。该调用算法使用至少三个标靶的测量值(例如,量)作为输入,并且将它们组合以形成矢量,该矢量与 2 维图表上的边界函数相比较。如果该矢量在边界函数之内,那么生物学实体存在,以及如果该矢量不在边界函数之内,那么生物学实体不存在。

[0061] 在步骤 1100,未知样品经受暴露样品中的细菌的核酸的条件。同样可以在步骤 1100 使用在构造模型的同时在步骤 1000 期间使用的相同的技术。

[0062] 在步骤 1110,从未知样品测量至少三个标靶, *mecA*、*SCCmec* 和金黄色葡萄球菌特异性靶基因序列的 Ct 值。在步骤 1010 期间使用的相同的技术可用于实现步骤 1110。

[0063] 此时,如上所述的类似的预筛选处理可用于去除很可能不与 MRSA 关联的样品。

[0064] 在步骤 1120,用于构造模型的调用算法可以被应用于来自未知样品的测量标靶。例如,可以使用在步骤 1020 使用的相同的函数来从未知样品产生中间矢量。

[0065] 在步骤 1130,判定 MRSA 是否存在于未知样品中。根据一个实施例,这可以通过将对于未知样品产生的中间矢量与从已知样品产生的边界函数进行比较来实现。如果对于未知样品的中间矢量落在标明阳性 MRSA 样品的边界之内,那么可以判定 MRSA 存在于未知样品中。如果对于未知样品的中间矢量落在标明阳性 MRSA 样品的边界之外,那么可以判定 MRSA 不存在于未知样品中。

[0066] 本发明的实施例是特别有利的。以下注意,本发明的实施例在识别样品中的 MRSA 上是特别有用的,不管 MRSA 常常可能与多个其它相关的细菌相互移植的事实。

[0067] 通过以下说明的例子进一步论证本发明的各种实施例。实例经由说明被提供,并且不意欲以任何方式限制所述发明。

[0068] 说明性的实例 1

[0069] 样品制备

[0070] 659 个样品被收集和分析,以形成根据一个实施例的可以使用的模型。样品是已知样品,即,已知 MRSA 是否存在于每个样品中。对于每个样品收集两个药签。然后这两个药签对于 MRSA 被单独培养。如果来自两个药签的培养结果一致,那么这个样品被认为是有效的。

[0071] 然后每个有效的已知样品被放置在样品缓冲剂试管中,样品缓冲剂试管具有 1ml 的 Tris、pH8.0,以及 1mM EDTA、pH8.0。该样品缓冲管以 3000rpm 被涡旋 40 秒,以从药签头逐出细菌。然后 500 μ L 的细菌悬浮液(即,包含细菌悬浮液的样品缓冲剂)被转移到新的试管中。

[0072] 然后,10 μ L 的处理控制日常存储液(Process Control Working Stock)被添加到新的试管中。10 μ L 的细胞壁消化酶同样被添加到新的试管中。在简短的涡旋之后,试管在 70° C 被培育 5 分钟。然后使用 Agencourt VirNA 提取试剂盒(Extraction Kit)提取细菌性的 DNA。

[0073] 然后,通过将 188 μ L 的溶菌缓冲剂、1.0 μ L 的 polyA RNA(10 μ g/ μ l)以及 100 μ l

的蛋白酶 K (20mg/ml) 混合在一起制备预混合物(在 10mM Tris pH8.0、50% 甘油、5mM 氯化钙中)。

[0074] 该预混合物然后被添加到试管,以 1700RPM 涡旋 10 秒,然后在 70° C 的水浴槽中培育 5 分钟。

[0075] 在试管被冷却到室温之后,575 μ L 的 100% 异丙醇以及 10 μ L 的凝固缓冲剂(涂有羧基的顺磁性的颗粒)被添加到该试管,并且该试管以 1700RPM 被涡旋 10 秒。

[0076] 然后该试管在室温下被培育 2 分钟,然后被放置在微量离心管磁体上 6 分钟,以捕获磁性颗粒。上清液被吸出,而没有妨碍磁性颗粒。然后试管被去掉磁体,并且 500 μ L 的冲洗缓冲剂(3.3M 硫氰酸胍,1.7%v/v TritonX-100,167.5mM 柠檬酸钠)被添加。

[0077] 该试管以 1700RPM 被涡旋 10 秒,然后被放回在磁体上 4 分钟。上清液被吸出并且丢弃。试管被去掉磁体并且 900 μ L 的 75% 的乙醇被添加。该试管然后以 1700RPM 被涡旋 10 秒,放回在磁体上 6 分钟并且上清液被吸出。75% 乙醇冲洗重复总共两次冲洗。允许磁性颗粒在室温下在磁体上干燥 15 分钟。

[0078] 为了洗提 DNA,25 μ L 的核酸酶自由水被添加到干燥的颗粒。该试管被短暂地涡旋,然后在 70° C 被培育 5 分钟。然后试管被放回在磁体上 1 分钟。洗提的核酸被用于 PCR 分析。

[0079] PCR 反应混合物设置

[0080] PCR 试剂首先被解冻然后在以下步骤期间被保持为准备就绪。在 96 孔板(行 A 和 H,列 1 和 12)上不使用边缘孔。每个 PCR 板使用一个阳性和 1 阴性控制。

[0081] 然后,为了所需量的样品和控制,制备反应混合物。基于 12 个反应的增量,制备反应混合物。

[0082] 以下容量被添加到 2.0ml 的聚丙烯试管:300 μ L 的 5xPCR 反应缓冲剂(每个反应所需的容量 $\times$ 13),108.33 μ L 的 6x 低聚混合物(每个反应所需的容量 $\times$ 13),2.6 μ L 的 1M MgCl₂ (每个反应所需的容量 $\times$ 13),31.2 μ L 的 1 单位 / μ L UDG (每个反应所需的容量 $\times$ 13),20.8 μ L 的 12.5mM dNTP(每个反应所需的容量 $\times$ 13),1.82 μ L 的 40 单位 / μ L DNA 聚合酶(每个反应所需的容量 $\times$ 13),以及 95.25 μ L H₂O (每个反应所需的容量 $\times$ 13)。

[0083] 反应混合物以每个孔 30 μ L 容量被等分到 Stratagene 的 96 孔 PCR 板中。20 μ L 的 SPRI-TE 提取的 DNA 样品被添加到单个孔中。20 μ L 的阴性控制液被添加到具有核酸酶自由水的单个孔中。20 μ L 的阳性控制液被添加到单个孔中。然后,通过使用设置为 45 μ L 的吸管将混合物向上和向下吸 10 次,产生样品和反应混合物。然后,制备的 PCR 板利用光学粘合盖(Optical Adhesive Cover)被密封,然后以 3000rpm 被离心 3 分钟。

[0084] 模型产生和分析

[0085] 该板然后被装载到 Stratagene Mx3005P qPCR 仪器上。板中使用的孔被选择,并且为了荧光数据收集而选择以下染料:CY5、HEX、ROX、FAM。最后,以下循环条件被指定:4'@37° C (1x);1'@95° C (1x);5''@91° C-->10''@62° C-->25''@58° C (50x)。一些监视的靶被表示在以下的表 1 中。

表 1

femA	正向引物	femA-3 正向引物	GACCGTTATAATTCTATGGTGTAGTGG
	反向引物	femA-3 反向引物	GTCACCAACATATTCAATAATTTGAGC
	TapMan 探针	femA-sa-探针	ACAGAAAGATGCTGAAGATGCTGGTGT
mecA	正向引物	mecA-2 正向引物	GCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGA
	反向引物	MecA-2 反向引物	GCCTATCTCATATGCTGTTCCTGT
	TapMan 探针	mecAprobe	AGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCA
S.felis (IC)	10正向引物	Sfforwardnew	TGCCAATGTAGATAGTCTTCCAGA
	10反向引物	sfireversenew	AAGTGCCCAAGAAGAATGAGTGG
	10探针	fsfelis	ACCGCCACCATTATTACGTACAGCTG
SCCmec	正向引物	OrDX-1SS/attBScs for-1	TGAGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTG
	正向引物	OrDX-1SS/attBScs for-2	TGCGGGTTGTGTTAATTGAACAAGTG
	反向引物	mecII512-1-sccmec- 3	TCACTTTTTATCTTCAAAGATTGAGC
	反向引物	引物 11-1-sccmec- 7	AAATTGCTACTAAAGAGGATATGGAACCATC
	反向引物	引物 12-sccmec-8	CTCTGCTTTATATTATAAAATTACGGCTG
	反向引物	newtypeiii-1- sccmec-14	CGTATGATATTGCAAGGTATAATCCAATATTTC
	反向引物	typeIVc-sccmec-2	CTTGAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAAC
	反向引物	NEWPRIMERS	TGAGCTTTTCCACTOCCATTTCITCCAAA
	反向引物	SCCmec-4nV	GCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATAC
	反向引物	SCCmec-3n	CATTCAATCATOCACCCCTAAACTTAATCTTC
	反向引物	SCCmec-5n	TATGGAAATCCATCTCTACTTATTGTTTCTTC
	反向引物	SCCmec-6n	AATATTTCATATATGTAATTCCTCCACATCTC

[0086]

[0087]

反向引物	SE-7-11	CTATTTCTGTAACTTAAAAACCTTTTCTTCC
反向引物	SE-17	CCGTATGATTCATATTAATGAATCATACGGAGG
反向引物	SE-13	CTTCTTATGAAATGTCITTTTTCACTIATCC
TapMan 探针	orfX 探针-2	ATGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAAYGCTC
TapMan 探针	ORFX 探针-1	ACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTC
TapMan 探针	ORFX 探针	ACGCCCTCTCCTCGCATAATCTTAAATGCTC

[0088] 在以上的表中,用于 SCCmec 的探针具有与 SCCmec 的右末端互补的序列。

[0089] 在其它实施例中,序列和 / 或长度基本上相同的其它引物和探针可被用于本发明的实施例中。

[0090] 首先,所有的样品孔和阳性控制孔连同阈值一起被选择。然后进行数据分析。PCR 阈值然后以 FAM、HEX、ROX 和 CY5 的顺序被记录和放置在化验调用算法文件中。收集的用于样品的阈值对应于每个样品中的 mecA、femA 和 SCCmec 的量。

[0091] 如同图 1 中图解的实施例,对于每个样品产生中间矢量。每个中间矢量是三个单位矢量的总和,该三个单位矢量彼此相隔 120 度,而且分别通过 mecA、femA 和 SCCmec 值被加权。使用的公式是: $\vec{p} = mecA * e^{0i} + femA * e^{\frac{2}{3}\pi} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi}$, 其中 $\vec{p}$ 是中间矢量。在图 3 中显示当标绘在 2 维 Y 图表上时有多少这些样品出现的图例。

[0092] 如可以在图 3 中看出的,从 MRSA 阳性样品产生的中间矢量通常具有它们的端点聚集在图表的起点周围。与此相反,MRSA 阴性样品通常具有它们的中间矢量的端点存在于更加远离起点的位置。

[0093] 图 4 显示简单的矩形方框 4000 如何可以被用作边界函数以分离阳性和阴性样品。使用 659 个样品作为用于模型的基础,矩形方框的左、右、顶部和底部边缘是在 -3、2.5、2 和 -1.3。不使用简单的矩形来聚集样品,更复杂的方法可以被应用于其它模型。例如,可以通过函数来限定边界,然后使用神经网络来调整该函数。同样,边界并非必需是矩形;更复杂的几何结构可以更好地适合其它模型中的已知样品。

[0094] 然后使用新产生的模型分析已知样品,以测试模型如何准确地分类已知样品。如上所述,对于每个已知样品计算中间矢量并且将该矢量与边界函数进行比较的基于 Y 图表的调用算法对于 659 个样品引起 5 个假阴性(FN)和 0 个假阳性(FP)。更靠近地查看 5 个 FN,该 5 个 FN 揭示 5 个样品中的 3 个样品具有没有 Ct 值的至少一个化验(Ct=40)。这不当伴随阳性样品发生。因此,这 3 个样品没有被认为是可靠的测试点。如此,在去除这 3 个 FN 之后,剩下 2 个 FN 和 0 个 FP。这些假阴性中的一个在图 4 中在 4010 处被突出。

[0095] 与此相反,应用于已知样品的参考方法(BD Geneohm™ MRSA 化验)产生 3 个 FN 和 9 个 FP。如此,与参考方法相比,新的 MRSA 调用算法显示 FP 中的明显减少,而没有增加 FN。

[0096] 说明性的实例 2

[0097] 样品制备

[0098] 199 个 Nasal 药签被收集并且存储在 Stuart 传送介质中。药签头被去除,而且每个药签头被转移到 2ml 的样品悬浮液试管中,该样品悬浮液试管具有基于样品缓冲剂的

1200 μL 的 Tris, 该样品缓冲剂具有 10mM Tris pH8.0 以及 1mM EDTA, pH8.0 ~ 100mg 的 1mm 氧化锆 / 硅质颗粒。通过以 3000rpm 的速度涡旋样品试管至少 15 秒, 药签头上的细菌被逐出。

[0099] 然后药签头从样品试管被无菌地去除, 并且被传送到具有 1ml 的 Trypic Soy broth (TSB) 以及 6.5%NaCl 的 15ml 细菌培养试管中。接种过的细菌试管被传送到 37° C 的孵育箱中, 并且以 200rpm 的速度摇动, 被整夜培育。

[0100] 然后确定金黄色葡萄球菌和 / 或 MRSA 的存在或不存在。10 μL 的每一个整夜培养液在 BBL™ CHROMagar MRSA 以及 BBL™ CHROMagar 金黄色葡萄球菌板上被划线。来自每个试管的 1200 μL 样品溶液中的 500 μL 然后经受如 Agencourt VirNA 试剂盒方案描述的 DNA 分离过程。简单地说, 这个过程开始于大量 CFU S. 猫属(felis) 细菌(或大量没有 CFU 的 S. 猫属) 作为处理控制。10 单位的消色肽酶(Achrompeptidase) 被添加到每个试管, 很好地混合, 并且在 70° C 的水浴槽中培育 4 分钟。然后包含 188 μL 的溶菌缓冲剂的 289 μL 的新鲜制备的溶菌溶液、1.0 μL 的多聚腺苷酸(PolyA) (600ug/ml)、以及 100 μL 的蛋白酶 K (6.4mg/ml) 被添加到每个样品中并且被很好地混合。然后每个样品被培育, 其次被允许冷却 2 分钟。然后, 10 μL 的磁性颗粒和 575 μL 的 100% 异丙醇被添加, 并且通过涡旋被很好地混合。反应含量被允许在室温下培育 5 分钟, 然后, 通过将样品试管放置在磁体架子上 6 分钟来收集磁性颗粒, 从而将磁性颗粒与样品溶液分离, 直到溶液变得清澈。

[0101] 接下来, 上清液被吸出样品, 同时注意在吸出期间不去除任何颗粒。500 μL 的清洗缓冲剂被添加到样品中并且为了混合而涡旋 10 秒。然后试管在磁体上被培育 4 分钟(或直到清澈)。然后上清液被再次吸出样品。然后, 900 μL 的新鲜制备的 75% 乙醇被添加并且试管被涡旋 10 秒。然后试管在磁体上被培育, 直到清澈。然后上清液再次被吸出样品, 并且再一次重复乙醇清洗。然后颗粒在磁体上被干燥 15-25 分钟。当颗粒的环开始破裂时, 样品被洗提。试管被去掉磁体, 并且 25 μL 的核酸酶自由水被添加以便洗提 DNA。然后样品被涡旋以便混合。然后试管在 70° C 被培育 5 分钟。试管被放回到磁体上并且被培育 1 分钟。然后洗提液被传送到干净的试管用于 PCR 扩增。

[0102] PCR 引物和探针, PCR 循环条件

[0103] 列举在主要混合物(Master mix)表中的试剂被制备就绪。根据总的反应数, 可以通过简单地将标明容量的试剂在 DNA/RNase- 自由试管中添加在一起, 制备充足的 Master 混合物。试管可以被涡旋以便混合, 然后保持就绪用于以后的使用。20 μL 的每个洗提液被添加到 Mx3000P 96- 孔 PCR 板(非边缘的) (Stratagene, Cat#401333) (一个洗提液, 一个孔)。30 μL 主要混合物被添加到填充有洗提液的每个孔中, 然后通过轻轻地上上下下吸 8 次以上(多通道可能是有用的) 而被混合。该板利用 MicroAmp™光学粘合剂膜(采用的生物学系统) 被紧密地覆盖, 然后在进入 PCR 机器之前, 以 1100xg 被离心 3 分钟。

[0104] Stratagene MX3005P 仪器上的 PCR 循环条件设置如下: 4' @37° C (1x); 1 分钟 @95° C (1x); 15 秒 @95° C → 10 秒 @62° C → 30 秒 @58° C (40x)。一些被监视的标靶是如上所述的。

[0105] 模型产生和分析

[0106] 如先前以第一说明性的实例所描述的, 每个标靶的阈值被输出和输入到调用算法中。

[0107] 因为在这个实例中的已知样品没有以与第一实例严格相同的方法被收集,所以对于第二实例,在 Y 图表算法中的矩形方框的左、右、顶部和底部边缘被发现是 -4、5.5、3 和 4。这个在图 5 中被图解。当使用该模型重新处理该已知样品时,发现 3 个假阳性和 4 个假阴性。这表示超过得到 11 个假阳性和 2 个假阴性的 Cephied Xpert[®] MRSA 参考方法的改进。

[0108] 图 6 是可用于执行本发明的一个实施例的计算机系统 300 的方框图。计算机系统 300 具有多个输入模块。测量模块 301 用于测量样品中的选择标靶。根据被选择为测量标靶响应的测量方法,这个测量模块可以在本发明的不同的实施例之间变化。例如,根据一个实施例,测量模块可以实施关于样品的 PCR 分析。测量模块可以通过至少一部分典型的实时 PCR 设备的工作部件被具体化。同样显示的是标准键盘 302 和鼠标 303。计算机系统 300 还包含计算机内的各种典型的计算机部件。这些部件包含系统总线 304,一个以上的磁盘驱动器 305, RAM 306 以及处理器 307。根据本实施例的准确的特性,还可以存在其它部件。图 5 还显示监视器 308,监视器 308 允许信息被显示给系统的用户。

[0109] 在本发明的一个实施例中,样品被放置在测量模块 301 中,在测量模块 301 中,样品被处理,而且来自样品的选择标靶的量被测量。然后这个信息沿着系统总线 304 被传送到计算机系统中,而且使用处理器 307,适当的调用算法可以被应用于反应数据。处理器 307 执行以实现调用算法的指令被存储在诸如 RAM 306 或磁盘驱动器 305 的计算机可读介质上。调用算法还可以被存储在前述的介质上。然后调用算法的输出可以被显示在监视器 308 上。例如,如果调用算法使用 2 维 Y 图表经由中间矢量来图示三个标靶的测量的量,那么中间矢量的终点可以被显示在监视器 308 上。本发明的替换的实施例可以经由其它通信手段信息输出。例如,计算机系统可以使用打印机来打印 Y 图表,或在网络上将 Y 图表发送给另一个计算机。然后来自测量的样品的信息被用于帮助构造模型或判定样品是否包含 MRSA。

[0110] 本发明涉及的,对于本领域的技术人员将明显的是,在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明可以以除了以上具体公开的那些形式之外的形式被具体化。因此,如上所述本发明的特殊的实施例被认为是说明性的,而不是限制性的。本发明的范围如附加的权利要求书所阐明,而不是被局限于包含在上文描述中的实例。

[0111] 在这个申请中描述的软件成分、步骤或函数可以被实现作为软件代码,通过一个以上的处理器使用任何适当的计算机语言,诸如,例如 Java, C++ 或使用例如传统的或目标定向技术的 Perl,来执行软件代码。软件代码可以被存储作为计算机可读介质(例如,非暂时的计算机可读介质)上的一系列的指令或命令,计算机可读介质诸如是随机存取存储器(RAM),只读存储器(ROM),诸如硬盘驱动器或软磁盘的磁性介质,或诸如 CD-ROM 的光学介质。任何这样的计算机可读介质还可以存在于单个计算的设备上或之内而且可以存在于系统或网络之内的不同的计算的设备上或之内。

[0112] 本发明的一些实施例可以作为软件或硬件或两者相结合的控制逻辑被实现。控制逻辑可以被存储在信息存储介质中,作为多个指令,多个指令适于引导信息处理装置以施行本发明的实施例中公开的一组步骤。基于在此提供的公开和教导,普通的本领域的技术人员的个人将领会其它途径和 / 或方法来实现本发明。

[0113] 任何“一”、“一个”、“该”的叙述打算意指“一个以上”,除非具体地有相反的标明。

[0114] 参考文献

[0115] K.Becker、I.Pagnier 等 人。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*, 2006 年 1 月, p229-231。

[0116] C.Cuny 和 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.

[0117] C.Cuny 和 W.Witte。Method for detecting methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)。欧洲专利申请 EP1529847A1, 11.05.2005。

[0118] P.Francois、D.Pittet 等 人。Rapid detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003 年 1 月, p254-260。

[0119] K.Hiramatsu、T.Ito 等 人。Method of identifying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or methicillin-resistant coagulase negative staphylococci。美国专利 6,156,507, 2000 年 12 月 5 日。

[0120] A.Huletsky、R.Giroux 等人。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*, 2004 年 5 月, p1875-1884。

[0121] H.Matsunaga、K.Tsukumo 等人。Method and kit for detecting methicillin resistant *Staphylococcus aureus*。美国专利 5,702,895, 1997 年 12 月 30 日。

[0122] J.Schrenzel 和 P.Francois。Method for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*。美国专利申请公报 US2004/0241824A1, 2004 年 12 月 2 日。

[0123] D.Sinsimer、S.Leekha 等人。Use of a multiplex molecular beacon platform for rapid detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*。 *Journal of Clinical Microbiology*, 2005 年 9 月, p4585-4591。

[0124] K.Mckernan、E.Gustafson 等 人。Methods of isolating nucleic acids using multifunctional group coated solid phase carriers。美国专利申请公报 US2006/0177836A1, 2006 年 8 月 10 日。

[0125] J.Farley、P.Stamper 等 人。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*, 2008 年 2 月, p743-746。

[0126] R.Heusser、M.Ender 等人, Mosaic *Staphylococcal* Cassette Chromosome mec

Containing Two Recombinase Loci and a New mec Complex, B2. Antimicrob. Agents Chemother. 2007 年 1 月, p390-393。

[0127] T. Ito、Y. Katayama 等 人。Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agent Chemother. 2001 年, 45:p1323-1336。

[0128] C. Heid、J. Stevens 等 人, Real time quantitative PCR. Genome Research, 19966(10):986-994。

[0129] K Mullis 和 F Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987 年 ;155:335-50。

[0130] T. Ito、X. Ma 等人, Novel Type V Staphylococcal Cassette mec Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, ccrC. Antimicrob. Agent Chemother. 2004 年, 48:P2637-2651。

[0131] M. Noto、B. Kreiswirth 等人, Gene Acquisition at the Insertion Site for SCCmec, the Genomic Island Conferring Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus, J. Bacteriol. 2008 年, 190:1276-1283。

[0132] 整个这个申请各种公报被参考。为了所有的目的, 这些公报的公开通过引用, 以它们的全部在此被结合到这个申请中。均没有被承认是现有技术。

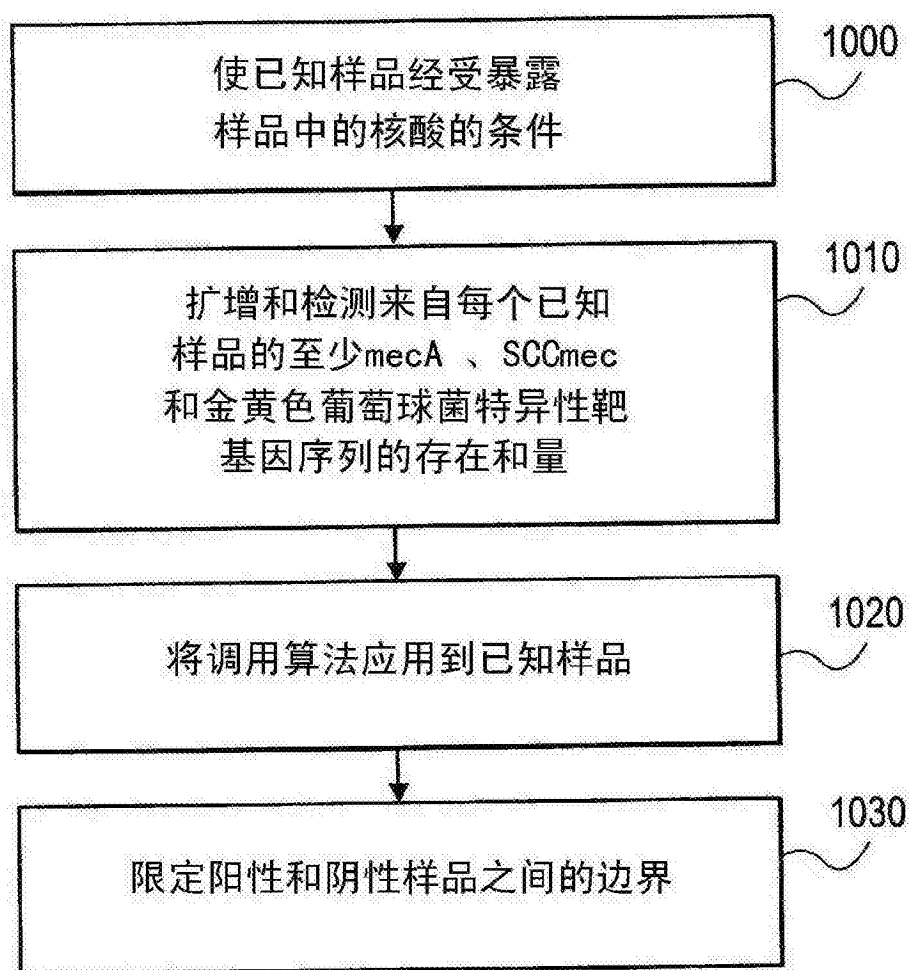


图 1

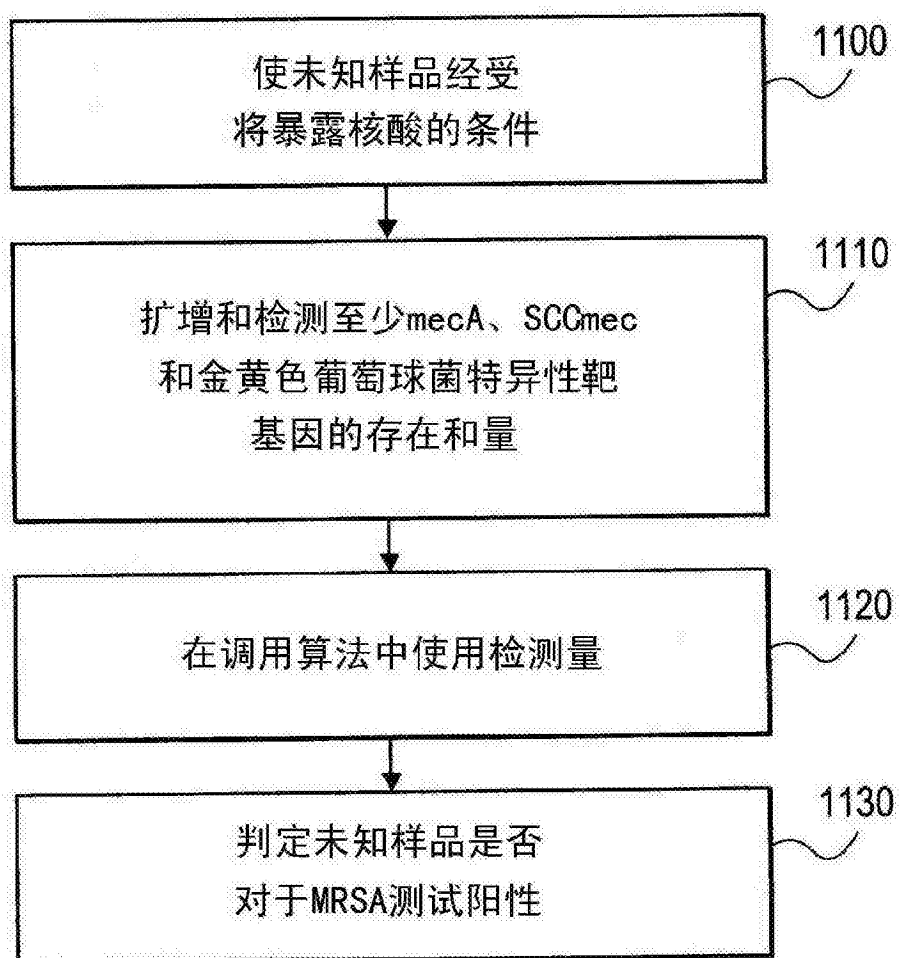


图 2

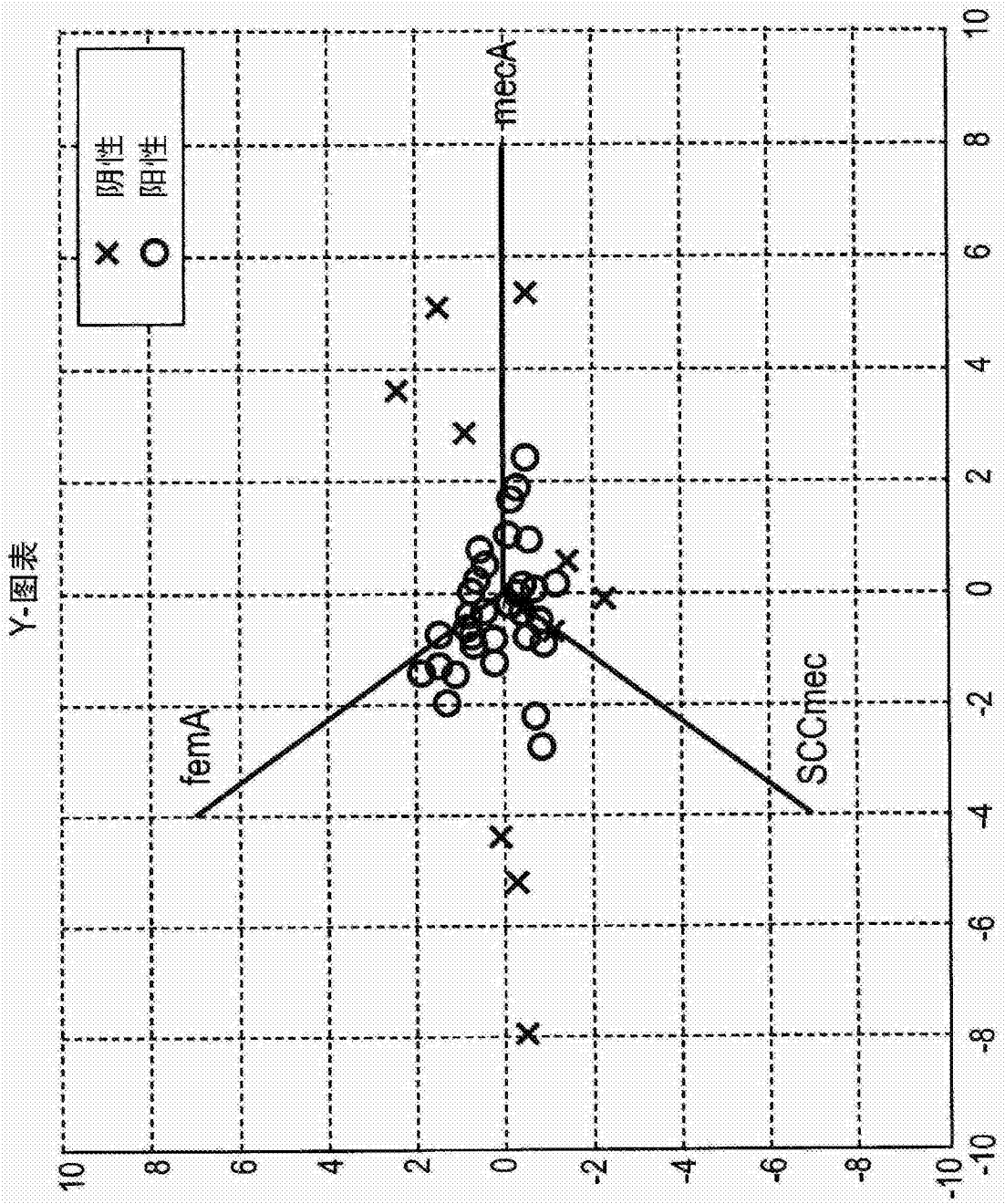


图 3

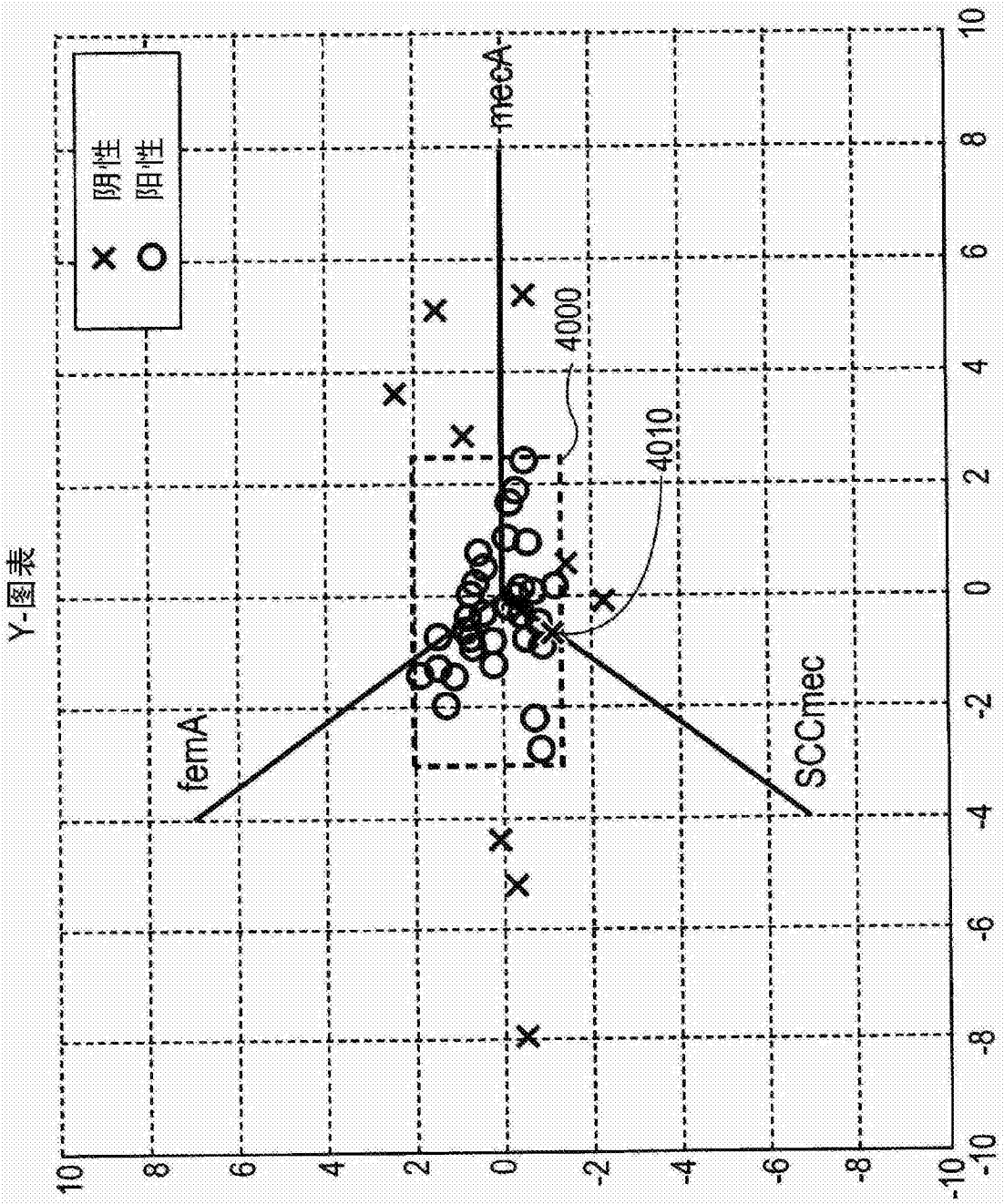


图 4

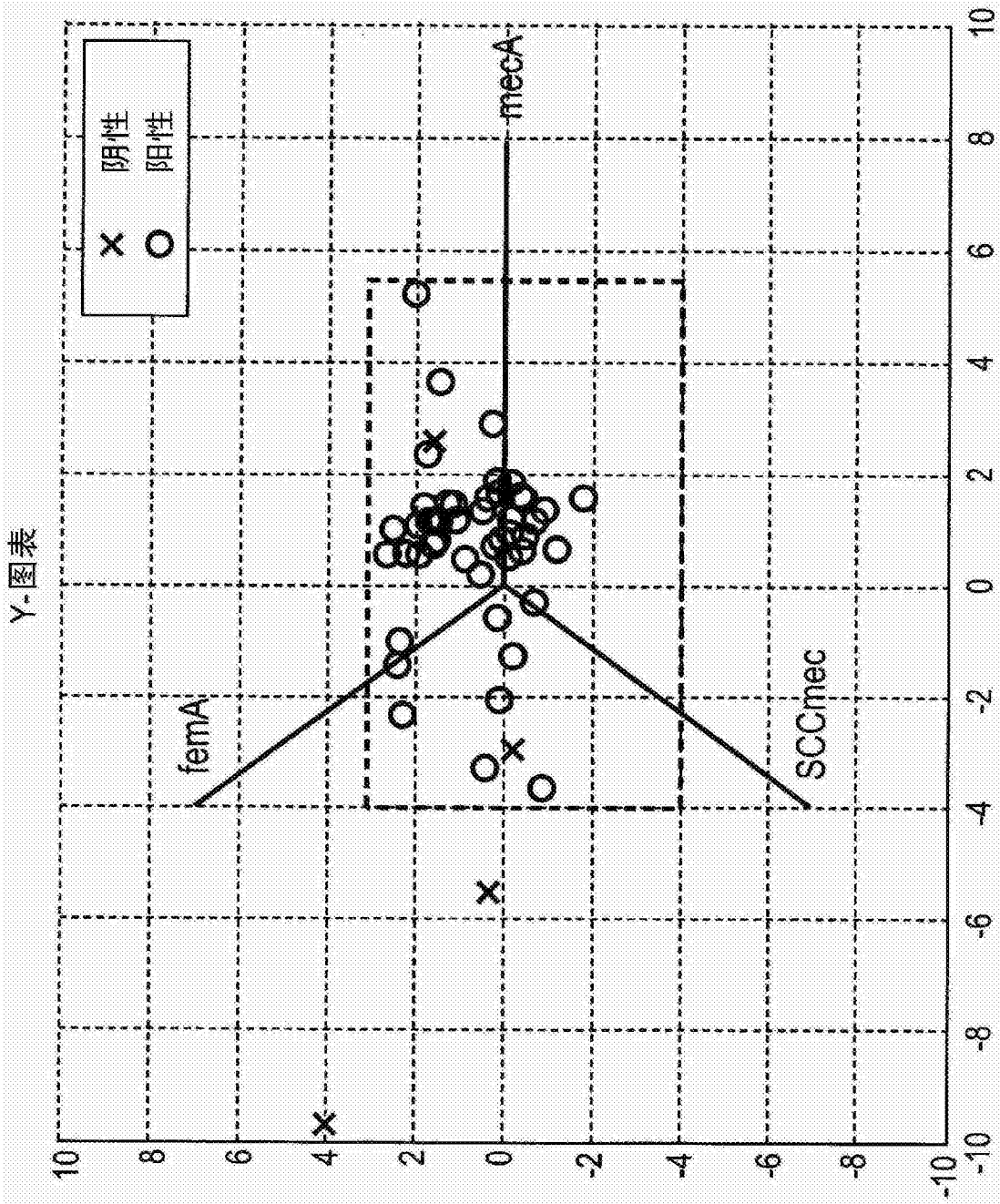


图 5

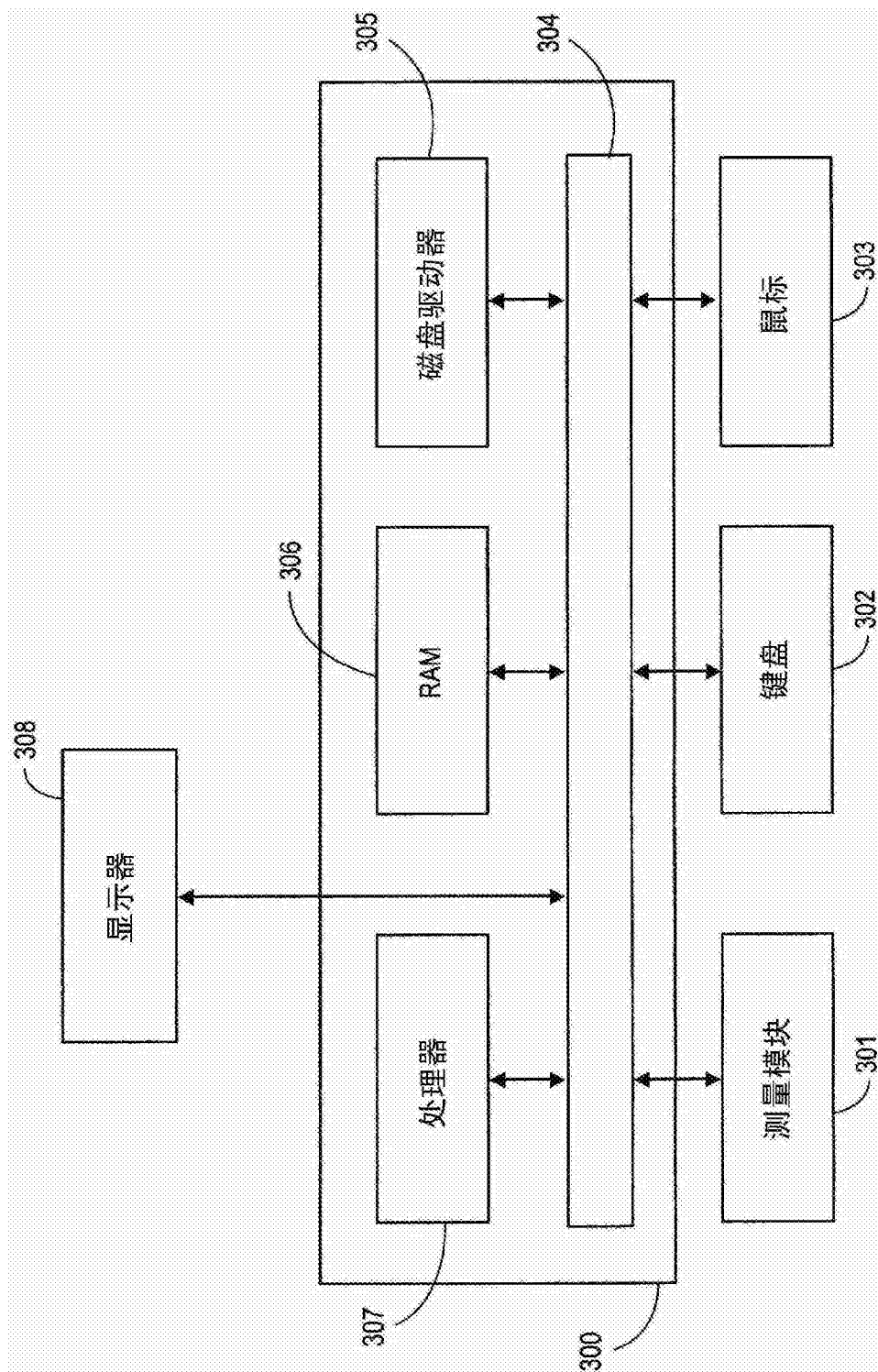


图 6