

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033790**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.26

(21) Номер заявки
201400824

(22) Дата подачи заявки
2012.12.19

(51) Int. Cl. **G01N 21/00** (2006.01)
G01N 21/25 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ СПЕКТРАЛЬНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В КУЛЬТУРЕ

(31) **61/577,131**

(32) **2011.12.19**

(33) **US**

(43) **2015.10.30**

(86) **PCT/IL2012/050534**

(87) **WO 2013/093913 2013.06.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОПТИКУЛ ДИАГНОСТИКС ЛТД.
(IL); ОПТИКУЛ ДИАГНОСТИКС
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Гэннот Галлия (US), Ледерман Дрор
(IL), Моинуддин Хассан (US), Гэннот
Израэль (IL)**

(74) Представитель:
Прозоровский А.Ю. (RU)

(56) **WO-A1-2010076801**
WO-A2-2010041251
US-A1-20030097059
US-A1-20110143332
**GOFF et al. The Solution to the Cytological
Paradox of Isomorphy" J. Cell. Biol.; 1987; Vol. 104;
pg. 739-738; p 741, col 2, para 2; FIG 7b**
US-A1-20110294202
WO-A1-2011063086
US-A1-20110007309
US-A-6075594
US-A1-20040254474
US-A1-20110184654
US-A1-20110178721
US-A1-20100291618
US-A1-20100136609

(57) Раскрывается спектроскопический способ для спектроскопического обнаружения и идентификации бактерий в культуре. Способ включает в себя построение по меньшей мере одного набора данных, который может включать спектр, интерференционную картину или картину рассеяния культивированного образца, предположительно содержащего указанные бактерии. Набор данных корректируется на наличие воды в образце, спектральные признаки извлекаются с помощью анализа главных компонентов, а функции классификации получены с использованием алгоритма обучения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, например для дифференциации MRSA из MSSA, используется мультимодальный анализ, в котором идентификация бактерий выполнена на основе спектра образца, интерференционной картины, используемой для определения толщины клеточной стенки, и рассеяния, используемого для определения шероховатости клеточной стенки. Также раскрыт один вариант устройства для осуществления способа, который включает в себя несколько анализаторов образцов.

B1**033790****033790****B1**

Ссылка на предшествующие заявки

Приоритет изобретения испрашивается по дате подачи первоначальной заявки США № 61/577131, поданной 19 декабря 2011 года, которая раскрывается здесь во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Данная группа изобретений относится к способам идентификации микроорганизмов в культуре с помощью средств спектроскопии. В частности, оно относится к средствам и способам идентификации микроорганизмов в культуре, которые основываются на разносторонних спектроскопических измерениях клетки, а не отдельных химических показателей клетки, а также предусматривают дополнение другими средствами и методами измерения на основе светового излучения, такими как интерферометрия.

Предпосылки создания изобретения

Идентификация микроорганизмов, особенно обнаружение устойчивых к антибиотикам бактерий, имеет большое значение в медицинской области. Хорошо известно, что медицинские учреждения прилагают большие усилия для предотвращения заражения пациентов вторичными заболеваниями, вызванными бактериями из окружающей среды и особенно устойчивыми к антибиотикам бактериями.

Широко используемый способ определения устойчивых к антибиотикам бактерий и чувствительных к антибиотикам бактерий используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) непосредственно на образце или после культивирования образца. Такой способ описан, например, в патенте US № 4683202. Другой метод заключается в выявлении протеом, т.е. различных белков, выраженных в геноме.

Способы, основанные на ДНК, для универсального бактериального исследования путем обнаружения общих бактериальных патогенов, также известны в данной области техники, например, из публикации заявки US 2005/0042606.

Обнаружение жизнеспособных бактерий в биологических образцах путем воздействия на бактериальные культуры, полученные из образцов, имеющих известный диапазон хозяев, раскрыто в публикации к РСТ заявке WO 90/04041.

Проблема этих способов заключается в том, что они обычно занимают значительное количество времени (как правило, по крайней мере, час) для получения результата и могут быть выполнены только квалифицированным профессионалом. Один из возможных подходов к решению этих проблем может быть использование спектроскопических способов, которые по своей природе быстрее, чем эти способы. Некоторые спектроскопические способы идентификации бактерий, не характерные для устойчивых к антибиотикам штаммов, уже известны в данной области.

Например, публикация WO 98/41842 к международной заявке РСТ раскрывает систему для обнаружения комплексов антител бактерий способом спектроскопии комбинационного рассеяния. Образец для испытания на присутствие бактерий помещают в среду, содержащую антитела, прикрепленные к поверхности для связывания с конкретными бактериями для образования антигена - комплекса антител. Аналогичным образом резонансное комбинационное обратное рассеяние предлагается в качестве способа идентификации бактерий в патенте US № 4847198. В этих способах наличие в спектре комбинационного рассеяния маркеров, связанных с конкретными видами бактерий, рассматривается как указание на присутствие этих бактерий.

В патенте US № 6379920 раскрывается спектроскопический способ для обнаружения и идентификации определенных бактерий в биологическом образце, для которого, как утверждается, не требуется культивирование. Способ включает в себя получение спектров биологической пробы из неинфицированного пациента для использования в качестве эталона, изымаемое эталон из спектров, возможно, инфицированной пробы, и сравнение полученного в результате спектра областей отпечатков пальцев с эталонными спектрами известных бактерий (Науманн и др., Энциклопедия аналитической химии, R.A. Meyers (ред.) (P.A. Меерс), стр. 102-131, John Wiley & Sons Ltd., Чичестер, 2000) написали об использовании FTIR спектроскопии для обнаружения и классификации бактерий в сухих образцах. Живые микроорганизмы были выявлены с помощью FTIR и около-инфракрасной FT-Raman спектроскопий. Другие способы включают использование флуоресцентной спектроскопии или комбинации вышеуказанных способов спектроскопии.

Ни один из источников предшествующего уровня техники не обеспечивает достаточно достоверной точности определения конкретных штаммов микроорганизмов, поскольку не предусматривает средства и способ, которые могут оперативно обнаружить, с высокой точностью определить и тонко различить устойчивые к антибиотикам бактерии и чувствительные к антибиотикам конкретные штаммы бактерий. Известные решения не позволяют оценить микроорганизмы в образце культуры по всему комплексу взаимосвязанных физико-химических характеристик микроорганизмов. Кроме того, ни один из опубликованных литературных источников предшествующего уровня техники не описывает средства и способы, которые устраняют при этом влияние интерференции воды, содержащейся в образце в экспериментальном сигнале, чтобы обеспечить более чувствительное и точное обнаружение бактерий в целом и устойчивых к антибиотикам бактерий в частности.

Таким образом, давно назрела необходимость в средствах и способах для быстрого, чувствительного и точного обнаружения и идентификации микроорганизмов на пластине пробы (образца) с первичной культурой без использования дополнительных реагентов или сложной подготовки пробы, в частности

средств и способов, которые могут тонко дифференцировать чувствительные к антибиотикам бактерии из устойчивых к антибиотикам бактерий.

Сущность изобретения

Изобретение, раскрытое здесь, предназначено для удовлетворения этой давно назревшей потребности. Изобретение раскрывает способ и устройство для спектроскопической идентификации микроорганизмов в культуре. В частности, способ, раскрытый здесь, включает в себя этапы удаления артефактов в спектре, возникших из-за воды, использует анализ основных компонентов для получения спектральных особенностей, представляющих интерес, и использует алгоритм обучения, такой как метод способ классификации RANDOM FOREST (СЛУЧАЙНЫЕ ЛЕСА) для классификации спектральных подписей. Способ также включает в себя шаги для выделения устойчивых к антибиотикам бактерий, например метициллин-устойчивого *Streptococcus aureus* (MRSA), из бактерий, чувствительных к антибиотикам, например метициллин-чувствительного *Streptococcus aureus* (MSSA), с использованием многомодального облучения, которое соединяет в себе спектроскопию чтобы определить по меньшей мере одну химическую характеристику бактерий в пробе с помощью интерферометрии для определения толщины клеточной стенки бактерий. Способ позволяет сделать обоснованный вывод о присутствии в образце конкретных штаммов обнаруженных типов микроорганизмов, подтверждаемый комплексом взаимосвязанных химических и физических характеристик, включая тонкое многостороннее исследование чувствительности этих штаммов микроорганизмов к тем или иным конкретным антибиотикам с доверительной точностью, недоступной для известных технических решений.

Сущность изобретения в части способа заключается в том, что способ спектрального обнаружения и идентификации микроорганизмов в культуре включает

формирование базы модельных спектров известных патогенных микроорганизмов в качестве базы данных программного алгоритма обучения;

приготовление по меньшей мере одного биологического образца, предположительно содержащего микроорганизмы, подлежащие определению,

культивирование биологического образца с получением образца культуры;

перемещение образца культуры в ячейку;

воздействие на указанный образец культуры световым излучением от источника света;

изучение по меньшей мере части светового излучения UV, поступающего от образца культуры в результате указанного воздействия на него, с получением набора данных в виде выделенных спектральных признаков: спектра поглощения VIS и спектра отражения UV-VIS, а также диаграммы рассеяния и интерференционной картины, полученных после указанной стадии воздействия;

в соответствии полученным набором данных производят определение химической и физических характеристик образца культуры, а также анализ присутствия и дифференциальную идентификацию микроорганизмов в образце культуры с помощью упомянутого алгоритма обучения;

при этом для установления химической характеристики микроорганизмов используют спектр, в отношении которого производится первоначальная обработка набора спектральных признаков путем выполнения по меньшей мере одного этапа, выбранного из группы:

(а) коррекция набора данных, обусловленная присутствием воды в образце культуры,

(б) вычитание базовой линии,

(в) снижение помех и

(г) выделение интересующей спектральной области, в результате чего получают скорректированный набор данных;

с последующим анализом полученного скорректированного набора спектральных признаков для классификации типов микроорганизмов, присутствующих в образце культуры;

а для установления физических характеристик микроорганизмов в образце той же культуры используют из набора его спектральных признаков диаграмму рассеяния и интерференционную картину, в отношении которых производится обработка выделенного набора спектральных признаков путем выполнения по меньшей мере одного этапа из группы:

оценка шероховатости клеточной стенки присутствующих микроорганизмов по найденной диаграмме рассеяния и классификация шероховатостей стенки клетки для определения тем самым штаммов микроорганизмов, присутствующих в указанном образце культуры,

оценка толщины клеточной стенки присутствующих микроорганизмов по указанной интерференционной картине и классификация толщины клеточной стенки для определения тем самым штаммов микроорганизмов, присутствующих в указанном образце культуры;

после чего делают вывод о присутствии в образце конкретных штаммов обнаруженных типов микроорганизмов, характеризующихся указанными химическими и физическими характеристиками, а также о чувствительности этих штаммов микроорганизмов к тем или иным антибиотикам.

Предпочтительно, образец культуры представляет собой мазок на отражающей поверхности зеркала.

Предпочтительно, перемещение указанных образцов культуры предусматривает передачу каждого из образцов культуры к измерительной ячейке отсека многокомпонентного анализатора.

Предпочтительно, способ предусматривает приготовление нескольких образцов культуры; передачу каждого из образцов культуры к отдельной измерительной ячейке отсека множественного анализатора и воздействие на каждый указанный образец световым излучением от источника света с последующим получением отдельного набора данных в виде выделенных спектральных признаков для каждого из каждого из образцов культуры.

Предпочтительно, воздействие на образец культуры световым излучением от источника света предусматривает взаимодействие указанного образца со светом, полученным от источника света, выбранного из группы, включающей источник света комбинационного спектрометра FTIR и лазер, и предусматривает построение набора данных в виде выделенных спектральных признаков из группы: спектры инфракрасного поглощения и отражения, спектр комбинационного рассеяния, спектры поглощения и отражения в ультрафиолетовом и видимом свете (UV-VIS); и предусматривает построение спектра комбинационного рассеяния (Raman spectrum).

Предпочтительно, способ предусматривает построение инфракрасного спектра поглощения, при этом на этапе первоначальной обработки включает выделение спектрального диапазона, выбранного из группы диапазонов: $850\text{--}1000\text{ см}^{-1}$; $990\text{--}1190\text{ см}^{-1}$; $1180\text{--}1290\text{ см}^{-1}$; $1235\text{--}1363\text{ см}^{-1}$; $1300\text{--}1350\text{ см}^{-1}$; $1500\text{--}1800\text{ см}^{-1}$; $1550\text{--}1650\text{ см}^{-1}$; $1720\text{--}1780\text{ см}^{-1}$; $2800\text{--}3050\text{ см}^{-1}$; $2836\text{--}2995\text{ см}^{-1}$; и $3000\text{--}3300\text{ см}^{-1}$.

Предпочтительно, коррекция набора данных, обусловленная присутствием воды в образце культуры, включает стадию, выбранную из группы, состоящей из (а) выполнения простой фильтрации путем вычитания из упомянутого набора данных набора данных среднего числа других наборов данных; (b) вычитание набора контрольных данных из указанного набора данных; и (с) выполнениями адаптивной фильтрации с использованием эталонного опорного сигнала, для получения оптимального снижения вклада воды в спектр образца культуры.

Предпочтительно, способ реализуется с использованием по меньшей мере одного из следующих условий:

стадия первоначальной обработки указанных данных включает уменьшение шума с помощью по меньшей мере одного метода, выбранного из группы, состоящей из методов линейной фильтрации, адаптивной фильтрации, использования фильтр Савицкого-Голея, а также низкочастотной фильтрации и спектрального вычитания;

стадия первоначальной обработки выполняется с использованием метода главных компонент (PCA), который включает получение первых и вторых производных из указанного набора данных; и получение двух коэффициентов для каждой из полученных производных;

набор спектральных признаков содержит спектральные признаки, выбранные из группы, состоящей из пика корреляции, пиковой длиной волны, высоты пика, ширины пика, сечения пика, площади пика, а по меньшей мере один из коэффициентов многочлена аппроксимирующей кривой определяется как общая сумма участков под крайней мере двумя пиками сигнала с кодированием с линейным предсказанием (LPC) среднего значения сигнала, значения дисперсии сигнала, асимметрии значительности, пикового значения, гауссова набора параметров (μ , σ , A_i , коэффициента интенсивности пика, вейвлет (wavelet) коэффициенты и их производные;

метод отбора признаков выбран из группы, состоящей из последовательного отбора признаков и генетического алгоритма;

указанная стадия классификации осуществляется на основе параметров подгонки, полученных с помощью алгоритма обучения на основе признаков, имеющих минимальный порог значимости;

а упомянутый алгоритм обучения выбран из группы алгоритмов машинного обучения, состоящей из классификатора Байеса опорных векторов (SVM), линейных дискриминантных функций, линейного дискриминанта Фишера, C4.5 дерева решений, К-ближайшего соседа, взвешенной К-ближайшего соседа, иерархическая алгоритма кластеризации, при этом алгоритма обучения включает в себя ансамбль классификатор, использующий метод скрытой марковской модели гауссовского модели смеси (GMM), метод К-средних алгоритм кластеризации, метод кластеризации Уорда, метод минимума наименьших квадратов, и нейронную сеть алгоритмов.

Предпочтительно, способ включает в себя алгоритм обучения использует алгоритм машинного обучения Random forest, разработанный Брейманом и Катлер.

Предпочтительно, способ реализуется при условиях:

указанные микроорганизмы включают устойчивых к антибиотикам и антибиотикам чувствительны штаммы одного вида микроорганизмов;

по меньшей мере один набор данных содержит спектр, интерференционную картину, и диаграмму рассеяния; причем указанный способ реализуется в следующей последовательности:

определяют по меньшей мере одну химическую характеристику микроорганизмов в образце культуры в соответствии со спектром отражения;

оценивают толщину клеточной стенки микроорганизмов в образце культуры в соответствии с интерференционной картиной;

оценивают шероховатость клеточной стенки микроорганизмов образца культуры в соответствии с диаграммой рассеяния; и,

осуществляют классификацию на основе результатов анализа указанных спектра отражения, интерференционной картины и диаграммы рассеяния.

Сущность изобретения в части устройства заключается в том, что устройство для обнаружения и спектроскопической и идентификации микроорганизмов в культуре содержит

источник (200) света;

отсек (220) образца (230) культуры;

многокомпонентный анализатор, включающий в себя множество отсеков (220), каждый из которых имеет

входное отверстие;

выходное отверстие, ориентированное в соответствии с входным отверстием;

ячейку (222);

средства размещения в ячейке (222) образца (230) культуры, предположительно содержащего микроорганизмы, подлежащие определению, с возможностью оптического соединения с указанным источником (200) света; коммутационное устройство (фиг. 5, 6), выполненное с возможностью направлять свет (210) в отсек (220) через указанное входное отверстие либо к указанной ячейке (222), либо к указанному выходному отверстию без входа в ячейку (222);

детектор (260) для измерения отраженного света (250) после взаимодействия света (210), излучаемого источником (200) света с образцом (230) культуры;

средства управления и электронной связи источника (200) света и упомянутого детектора (260) для управления сбором данных; и

средства (3000) анализа для проведения предварительной обработки и классификация собранных данных.

Предпочтительно, коммутационное устройство выбирают из группы, состоящей из

подвижного качающегося зеркала (240) с возможностью перемещения между первым положением, в котором свет, попадающий в отсек (220) через входное отверстие, отражается от зеркала (130) в ячейке (222), и вторым положением, в котором свет (210), попадающий в отсек (220) через указанное входное отверстие, проходит к выходному отверстию без ввода в ячейку (222); и оптический переключатель складных зеркал (223).

Предпочтительно, многокомпонентный анализатор содержит

параболическое зеркало (221);

светонаправляющее (фиг. 5, 6) средство для источника (200) света, расположенное таким образом, что выход указанного источника (200) света падает на параболическое зеркало (221);

коммутационное соединительное устройство (фиг. 5, 6) для направления света (210) из многоместного отсека (220) ячеек (222) в детектор (260);

средство для исследования образца культуры, расположенное таким образом, что по меньшей мере часть света (210) проходит от указанного источника (200) света к указанному параболическому зеркалу (221) с помощью поворотных зеркал (223), а затем отражается от параболического зеркала (221) и падает на образец (230) культуры таким образом, что свет (250), отраженный на указанное параболическое зеркало (221) от образца культуры, будет направлен на следующее место вне расположения этого от указанного образца культуры; причем множество n поворотных зеркал (223) расположены таким образом, что свет (250), отраженный от указанного образца (230) на параболическое зеркало (221), направляется на одно из поворотных зеркал (223); при этом в диапазоне от $m=1$ до $n-1$, свет, падающий на поворотное зеркало (223) с номером m , будет отражаться обратно параболическим зеркалом (221) на указанный образец (230) культуры, а свет, отраженный от этого образца (230) культуры, будет отражаться от параболического зеркала к $(m+1)$ -му поворотному зеркалу (223);

а для $m=n$, свет, отраженный от указанного поворотного зеркала (223), будет направлен на световод (240).

Предпочтительно, упомянутое множество n поворотных зеркал (223) расположены попарно по окружности.

Предпочтительно, источник (200) света представляет собой источник (200) света, выбранный из группы, состоящей из источника света комбинационного спектрометра FTIR; источника лазерного излучения.

Таким образом, в соответствии с настоящей группой изобретений реализуется способ спектроскопического обнаружения и идентификации штаммов микроорганизмов в культуре, при этом указанный способ реализуется с помощью предлагаемого устройства в следующей последовательности.

1) Получение по крайней мере одной пробы культуры, предположительно содержащей указанные микроорганизмы; передача указанной пробы культуры в ячейку для пробы; взаимодействие указанной пробы со светом, полученным от источника света; измерение по меньшей мере части указанного света, оставшегося после указанной стадии взаимодействия; получение по меньшей мере одного набора данных для указанного измеряемого света, причем набор данных содержит по меньшей мере один тип набора данных, выбранных из группы, состоящей из спектра поглощения, спектра отражения, спектра флуоресценции, картины рассеяния, и интерференционной картины.

2) Если упомянутый набор данных является спектром отражения: предварительная обработка указанных данных устанавливается посредством выполнения по меньшей мере одного шага, выбранного из группы, состоящей из: (a) коррекция указанного набора данных для сигналов в связи с наличием воды в пробе с культурой, (b) удаление фона, (c) уменьшение шума, и (d) извлечение интересующей спектральной области, в результате чего получают скорректированный набор данных; извлекают интересующие спектральные характеристики из скорректированного набора данных с помощью метода анализа основных компонентов (РСА) и выделения наибольших собственных значений или компонентов, полученных из анализа главных компонентов, как признаков, в результате чего получают набор спектральных признаков, затем классифицируют извлеченные спектральные признаки с помощью способа, который включает алгоритм обучения, таким образом, определяется, присутствуют или нет указанные микроорганизмы в указанной пробе культуры.

3) Если упомянутый набор данных является интерференционной картиной: оценивают толщину клеточной стенки указанных микроорганизмов из указанной интерференционной картины; и классификация указанной толщины клеточной стенки позволяет определить, присутствуют ли указанные штаммы микроорганизмов в указанной пробе культуры.

4) Если получен набор данных в виде диаграммы (картины) рассеяния: оценки клеточной стенки шероховатости указанных микроорганизмов из указанного картина рассеяния; и классификации штамма указанной клетки производится по шероховатости стенки, таким образом, определения, присутствуют ли указанные штаммы микроорганизмов в указанной пробе культуры.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, в котором упомянутый этап получения образца предусматривает: получение биологического образца культуры; культивирование указанной биологической пробы с получением таким образом культурного образца; и распределение (мазок) колонии на поверхности. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения после стадии культивирования следует этап выбора множества колоний. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанный биологический образец находится в форме, выбранной из группы, состоящей из твердой формы и в жидкой формы. В некоторых предпочтительных случаях осуществления настоящего изобретения указанный биологический образец выбран из группы, состоящей из продуктов чихания, слюны, слизи, желчи, мочи, вагинальном секрете, среднего уха аспирации, гной, плевральный выпот, синовиальную жидкость, абсцессы, полости тампонами, сыворотки, крови и спинномозговой жидкости. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанная стадия культивирования указанного биологического образца включает культивирование указанного биологического образца в чашке с агаром в течение от 12 до 24 ч. В некоторых предпочтительных случаях осуществления настоящего изобретения указанный этап содержит этап смазывания (нанесения мазка) на поверхности, чтобы покрыть площадь диаметром 2,5 см. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, указанная стадия включает смазывание на отражающей поверхности зеркала. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, в котором указанная отражающая поверхность выполнена из золота.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа по любому из указанных выше, в котором упомянутый этап передачи указанных культивированного образца в измерительную ячейку включает передачу указанных культивированного образца на несколько ячеек.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа по любому из указанных выше, в котором указанный этап получения по меньшей мере одного образца культуры, предусматривающий получение множества образцов культуры; упомянутый этап передачи указанных образцов культуры в измерительные ячейки содержит передачу каждого из упомянутого множества образцов культуры к измерительной ячейке, расположенной в отдельном отсеке множественного анализатора; и указанный этап построения набор данных включает в себя построение отдельно наборов данных для каждого из упомянутого множества образцов.

В некоторых предпочтительных случаях осуществления настоящего изобретения каждый отсек упомянутого множественного анализатора отсека содержит входную апертуру; выходное отверстие в соответствии с указанным входным отверстием; и переключающее устройство, способное направлять свет, попадающий в упомянутый отсек через указанную входную апертуру в указанную ячейку или в указанную выходную апертуру без ввода указанную ячейку. В некоторых предпочтительных случаях осуществления настоящего изобретения упомянутое устройство переключения является подвижным зеркалом откидной с возможностью перемещения между первым положением, в котором свет, попадающий в указанный отсек через указанный входной апертуры, отражается от указанного зеркала в указанной ячейке (клетке), и вторым положением, в котором свет, попадающий в упомянутом отсеке через указанное входное отверстие, проходит в указанное выходное отверстие без ввода в указанную ячейку. В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения упомянутое устройство переключения представляет собой оптический коммутатор. В частных случаях осуществления настоящего изобретения указанный переключатель выполнен на основе оптического волокна.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанное устройство служит для прохода в ячейки. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобре-

тения, которые включают множественные ячейки, элемент содержит параболическое зеркало; светосводящие средства для сходящегося на выход указанного источника света, расположенные таким образом, что выход указанного источника света падает на указанное параболическое зеркало; свет соединительные средства для направления света из нескольких частот в ячейки и детектор; образец для проведения такой стадии предусматривает средство для проведения пробы, указанная стадия реализуется таким образом, что по меньшей мере часть света, проходящего от указанного источника света к указанному параболическому зеркалу с помощью указанных сводящих свет средств, а затем отражается от параболического зеркала и падает на образец, зафиксированный к удерживающему средству таким образом, что свет, отраженный на указанное параболическое зеркало, от указанного образца будет направлен на места, отличные от указанного образца; и множество n складных зеркал расположены таким образом, что свет, отраженный от указанного образца указанным параболическим зеркалом будет падать на одно из указанных складывающихся зеркал; для $m=1$ до $n-1$, света, падающего на m -ное поворотное зеркало, будет отражаться обратно на параболическое зеркало так, что оно будет отражать на указанный образец, и так, что свет, отраженный от указанного образца, будет отражаться от параболического зеркала $k(m+1)$ -й поворотного зеркала; и $M=N$, свет, отраженный от указанного складного зеркала, будет направлен на указанные оптические соединительные средства. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения упомянутое множество n складных зеркал расположены попарно по окружности круга. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения упомянутое множество n складных зеркал состоит из семи пар зеркал.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, отличающегося тем, что источник света содержит источник света в спектрометре FTIR.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, отличающегося тем, что источник света содержит источник света с помощью спектрометра комбинационного рассеяния.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, отличающегося тем, что источником света является лазер. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанный лазер, выбранный из группы, состоящей из диодных лазеров, волоконных лазеров и квантовых каскадных лазеров.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, отличающегося тем, что указанный этап построения набор данных включает в себя построение спектра, выбранного из группы, состоящей из инфракрасного спектра поглощения, инфракрасного спектра отражения, спектре комбинационного рассеяния, УФ спектр поглощения -VIS и UV-VIS спектр отражения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанная стадия построения набора данных включает в себя построение инфракрасного спектра поглощения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, в котором упомянутый этап построения набор данных включает в себя построение инфракрасного спектра, указанный этап предварительной обработки включает выявление спектрального диапазона, выбранного из группы, состоящей из интервалов от $850-1000\text{ см}^{-1}$; от $990-1190\text{ см}^{-1}$; от $1180-1290\text{ см}^{-1}$; от $1235-1363\text{ см}^{-1}$; от $1300-1350\text{ см}^{-1}$; от $1500-1800\text{ см}^{-1}$; от $1550-1650\text{ см}^{-1}$; от $1720-1780\text{ см}^{-1}$; от $2800-3050\text{ см}^{-1}$; от $2836-2995\text{ см}^{-1}$; и около $3000-3300\text{ см}^{-1}$.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, в котором упомянутый этап коррекции упомянутого набора по наличию воды, культивирование образца культуры включает стадию, выбранную из группы, состоящей из: (а) простой фильтрации путем вычитания из указанного набора данных набора данных, построенную усреднением от других наборов данных; (б) вычитания набора ссылок из указанного набора данных; и (с) выполнения адаптивной фильтрации по схеме адаптивной фильтрации с использованием опорного сигнала для получения оптимального снижения вклада сигнала воды в спектр образца культуры.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, в котором упомянутый этап предварительной обработки указанных данных включает уменьшение шума с помощью по меньшей мере одного метода, выбранного из группы, состоящей из линейной фильтрации, адаптивной фильтрации, использования фильтра Савицкого-Голея, низкий фильтрации верхних частот и спектрального вычитания.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, в котором указанная стадия с использованием метода РСА включает получение первого и второго производных указанного набора данных; с получением двух коэффициентов для каждого полученных производного.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, в котором указанный набор извлеченных спектральных признаков содержит спектральные признаки, выбранные из группы, состоящей из пика корреляции, пиковой длиной волны, высоты пика, ширины пика, пика кросс раздела, площади пика, по крайней мере один из коэффициентов многочлена оборудованную кривой, общая сумма площадей под по меньшей мере двух пиков сигнала,

линейное кодирование с предсказанием (LPC), среднее значение сигнала, значение дисперсии сигнала, асимметрии значение, эксцесс значение, гауссова набор параметров (μ , σ , A_i), пик отношения интенсивностей, вейвлет-коэффициенты и их производные.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, в котором указанный алгоритм обучения выбирают из группы, состоящей из Байеса классификатору, опорных векторов (SVM), линейный дискриминантами функции, линейный дискриминант Фишера, C4 0,5 алгоритм дерево, К-ближайший сосед, взвешенная К-ближайший сосед, иерархический алгоритм кластеризации, алгоритм обучения, который включает в себя ансамбль классификатор, который использует методы, разработанные Breiman и Катлер, скрытой марковской модели гауссовского модели смеси (GMM), К-средние алгоритм кластеризации, алгоритм кластеризации Уорда, минимум наименьших квадратов, и нейросетевых алгоритмов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения указанный алгоритм обучения включает в себя ансамбль классификатор, который использует методы, разработанные Breiman и Катлер.

Еще одной задачей настоящего изобретения раскрывает способ, как определено в любом из указанных выше, в котором упомянутый этап классификации выполняется на основании параметров примера, полученного с помощью указанного алгоритма обучения на основе функций, которые имеют минимальный порог значимости. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанный минимальное пороговое значение представляет собой 95% доверительный предел. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанное минимальное пороговое значение определяется путем статистического теста, выбранного из группы, состоящей из группы: χ^2 , тест Вилкоксона, и Т-тест Стьюдента. Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа, как определено в любом из указанных выше случаях, в котором возможные микроорганизмы включают бактерии, выбранные из группы, состоящей из *Staphylococcus*; *Staphylococcus* коагулянтно отрицательный; *Staph. aureus*, *Streptococcus* spp.; *Streptococcus viridans* group; *Enterococcus* spp.; *Corynebacterium* spp.; *Aerococcus* spp.; *Micrococcus* spp.; *Peptostreptococcus* spp.; *Lactococcus* spp.; *Leuconostoc* spp.; *Tothia* spp.; *Gemella* spp.; *Alcaligenes* spp.; *Alternaria* spp.; *Flavobacterium* spp.; *Bacillus* spp.; *Achromobacter* spp.; *Acinetobacter* spp.; *Acinobacillus* spp.; *Alcaligenes* spp.; *Campylobacter* spp.; *Edwardiella* spp.; *Ehrlichia* spp.; *Enterobacter* spp.; *Ewingella* spp.; *Flavobacteria*; *Hafnia* spp.; *Klebsiella* spp.; *Kluyvera* spp.; *Legionella* spp.; *Moraxella* spp.; *Morganella* spp.; *Neisseria* spp.; *Pasteurella* spp.; *Prevotella* spp.; *Proteus* spp.; *Providencia* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Rahnella* spp.; *Salmonella* spp.; *Serratia* spp.; *Shigella* spp.; *Sphingobacterium* spp.; *Vibrio* spp.; *Yersinia* spp.; *Neisseria* spp.; *Kingella* spp.; *Cardiobacterium*; non *Tuberculosis mycobacteria* (NTB), *Mycobacterium tuberculosis*; and *Mycobacterium avium*.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа по любому из указанных выше, предусматривающего, что возможные микроорганизмы включают бактерии, выбранные из группы, состоящей из *Staph.aureus*; *Staph.epidermidis*; *Staph.haemolyticus*; *Staph.lugdunensis*; *Staph.intermedius*; *Staph.hominis*; *Staph.simulans*; *Staph.warneri*; *Staph.saccharolyticus*; *Staph.Capitis*; all other coag. Neg. *Staphylococcus*; *Strep.pyogenes* Gr A; *Str.agalactiae* gr B; *Strep*; *Streptococcus* gr G; *Streptococcus* gr C; *Streptococcus* gr F; *Streptococcus* gr B; *Streptococcus* gr D; *Strep. constellatus*; *Strep. intermedius*; *Strep.acidominimus*; *Strep.bovis*; *Strep.anginosus*; *Strep.mutans*; *Strep.salivarius*; *Strep.sanguis*; *Strep.thermophilus*; *Strep.mitis*; *Strep.equi/equisim*; *Strep.viridans*; *Enterococcus faecalis*; *Enter.faecium*; *Enter.casseliflavus*; *Enter.gallinarum*; *Enter.avium*; *Enter.durans*; *List.monocytogenes*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Micrococcus luteus*; *Micrococcus roseus*; *Aerococcus viridans*; *Bacillus Cereus*; *Acinetobacter haemolyticus*; *Acinetobact. baumannii*; *Acinetobact. junii*; *Acinetobacter Iwoffii*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; *Aeromonas veronii*; *Bacter.thetaiotaomicron*; *Bacter.distasonis*; *Bacter.stercoris*; *Bacter.uniformis*; *Bacteroides fragilis*; *Bacteroides ovatus*; *Bacteroides vulgatus*; *Burkholderia cepacia*; *Campylobacter coli*; *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter amalonaticus*; *Citrobacter braakii*; *Citrobacter diversus*; *Citrobacter farmeri*; *Citrobacter freundii*; *Citrobacter koseri*; *Citrobacter sedlakii*; *Citrobacter youngae*; *Clostridium botulinum*; *Clostridium difficile*; *Clostridium perfringens*; *Clostridium sordellii*; *Clostridium tetani*; *E.coli*; *Enterobact.cancerogenus*; *Enterob.agglomerans*; *Enterob.gergoviae*; *Enterob.intermedium*; *Enterob.sakazakii*; *Enterobact.aerogenes*; *Enterobact. cloacae*; *Escherichia hermanni*; *Kl.ornithinolytica*; *Kl.planticola*; *Kleb.pneumoniae*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella ozaenae*; *L.pneumophila*; *Morax.catarrhalis*; *Morganella morganii*; *Prev.melaninogenica*; *Prevotella bivia*; *Prevotella disiens*; *Prevotella oralis*; *Proteus mirabilis*; *Proteus penneri*; *Proteus vulgaris*; *Provi.rustigianii*; *Providencia rettgeri*; *Providencia stuartii*; *Pseud.aeruginosa*; *Pseud.alcaligenes*; *Pseud.fluorescens*; *Pseud.mendocina*; *Pseud.testosteroni*; *Pseudomonas diminuta*; *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas stutzeri*; *Salm. paratyphi A*; *Salm.paratyphi B*; *Salmonella enterica*; *Salmonella group B*; *Salmonella group C*; *Salmonella group C1*; *Salmonella group C2*; *Salmonella group D*; *Salmonella typhi*; *Serr.liquefaciens*; *Serratia ficaria*; *Serratia fonticola*; *Serratia marcescens*; *Serratia odorifera*; *Serratia odorifera 1*; *Serratia plymuthica*; *Serratia rubidaea*; *Shigella boydii 1*; *Shigella flexneri*; *Shigella sonnei*; *Stenotr. maltophilia*; *Vibrio Parahaemolyticus*; *Vibrio Vulnificus*; *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Neisseria meningitidis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *N.sicca*; *N.subflava*; *Neisseria elongata*; *Eikenella corrodens*; *Branhamella catarrhalis*; *Bordetella pertussis*; *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus parainfluenzae*; *Kingella* spp.; *Cardiobacterium* spp.; *Chromobacterium violaceum*; *M.tuberculosis*; *Mycobact.avium*; *Mycob.fortuitum*; *Mycob.simiae*; all other non TB *Mycobac-*

teria; N.T.M; Actinomyces naeslundii; Actinomyces meyeri; Nocardia spp.; Brucella spp.; Cryptococcus neoformans; and Cryptococcus spp. (non neoformans); Streptococcus pneumonia; устойчивые к β лактамазе и макролидам, группы Streptococcus viridians устойчивые к β лактамазе и аминогликозидам, Enterococci устойчивые к ванкомицину и тейкопланину и обладающие высокой устойчивостью к пенициллинам и аминогликозидам, Staphylococcus aureus, чувствительный к метициллину, другим β -лактамам, макролидам, линкозамидам и аминогликозидам, устойчивым к макролидам, макролидоустойчивым стрептококкам групп В, С и G, коагулазо-отрицательным стафилококкам, устойчивым к лямбугам, аминогликозидам, макролиды, линкозамиды и гликопептиды, мультирезистентные штаммы Listeria и corynebacterium, Peptostreptococcus и clostridium (например, C.Difficile), устойчивые к лактамазе, β -пенициллинам и макролидам, гемофильному гриппу, устойчивые к Pseudomonas Aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, пневмонии Klebsiella, устойчивый к антибиотикам, и пневмонии Klebsiella чувствительные к антибиотикам, аминогликозидам и макролидам.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа по любому из указанных выше, предусматривающего, что микроорганизмы включают микроорганизмы, выбранные из группы, состоящей из дрожжей и грибов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, указанные микроорганизмы выбирают из группы, состоящей из Candida SPP.; Aspergillus SPP.; Fusarium SPP.; и Penicillium SPP. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, указанные микроорганизмы выбирают из группы, состоящей из Candida albicans; Candida glabrata; Candida krusei; Candida parapsilosis; Candida tropicalis; Aspergillus fumigatus; Aspergillus flavus; Aspergillus niger; and Aspergillus terreus.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание способа по любому из указанных выше, в котором указанный по меньшей мере один набор данных включает в себя спектр, интерференционную картину и картину рассеяния. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные микроорганизмы, устойчивые к антибиотикам, и штаммы одного вида бактерий; чувствительные к антибиотикам указанного спектра, используются для определения по меньшей мере одной химической характеристики бактерий в отношении указанного образца; указанная интерференционная картина используется, чтобы оценить толщину клеточной стенки бактерий в указанном образце; указанная диаграмма рассеяния используется для оценки шероховатости клеточной стенки бактерий в пределах указанного образца; а этап классификации включает классификацию результатов всех указанных показателей спектра, с учетом интерференционной картины и диаграммы рассеяния.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения штаммами, устойчивыми к антибиотикам, являются штамм метициллин-устойчивый золотистый стафилококк и штамм антибиотик чувствительный, в частности метициллин-чувствительный золотистый стафилококк.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства для спектроскопического обнаружения и идентификации микроорганизмов в культуре, при этом устройство содержит источник света; средства для проведения пробы с ячейкой для образца культуры, предположительно содержащего указанные микроорганизмы, причем образцы культуры находятся в оптическом соединении с источником света; а также детектор для измерения характеристик света в результате взаимодействия света, излучаемого указанным источником света и указанного образца; средство управления в электронной связи с упомянутым источником света и упомянутым детектором для управления сбором данных; и средство анализа для выполнения предварительной обработки указанных данных, анализа указанных данных, и классификации указанных данных.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства, в котором указанный отсек для образцов содержит несколько ячеек.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства, как определено в любом из указанных выше случаев реализации, в котором указанный отсек для образцов содержит несколько ячеек, а анализатор, содержит несколько отсеков. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения каждый отсек упомянутого множественного анализатора имеет камеру, которая содержит входное отверстие; выходное отверстие располагаемое в соответствии с указанным входным отверстием; ячейки и подвижное зеркало с возможностью перемещения между первым положением, в котором свет, попадающий на указанный отсек через указанное входное отверстие (апертуру), отражается от указанного зеркала в указанной ячейке, и вторым положением, в котором свет, попадающий в указанный отсек через указанное входное отверстие (апертуру), проходит к указанному выходному отверстию без ввода у казанные ячейки. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления устройства указанная ячейка является многопроходной ячейкой.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления устройства, как определено выше, в котором устройство содержит многопроходную ячейку, указанная многопроходная ячейка содержит параболическое зеркало; средство сближения света для схождения выходного сигнала упомянутого источника света и расположенное таким образом, что упомянутый выход упомянутого источника света падает на упомянутое параболическое зеркало; средство световой связи для направления света от многопроходной ячейки к детектору; средство удерживания образца для удержания образца, причем указанный узел расположен так, что по меньшей мере часть света, проходящая от упомянутого источника света, к упомяну-

тому параболическому зеркалу через упомянутое средство схождения света и затем отражается от упомянутого параболического зеркала, будет падать на образец, зафиксированный к упомянутому узлу через указанное средство удерживания образца таким образом, что свет, отраженный на указанном параболическом зеркале от указанного образца, будет направлен в другое место, отличное от указанного образца; а множество n складных зеркал расположены таким образом, что свет, отраженный от указанного образца, до упомянутого параболического зеркала будет падать на одно из указанных складных зеркал; при $m=1$ до $n-1$, отражение света на m -м складном зеркале будет отражено обратно в указанное параболическое зеркало, так что оно будет затем отражено на указанном образце и такое, что свет, отраженный от указанного образца, будет отражен от упомянутого параболического зеркала к $(m+1)$ -му складному зеркалу; и при $m=n$ свет, отраженный от упомянутого m -го складного зеркала, будет направлен к указанному световому соединительному средству. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения указанное множество n складывающихся зеркал расположены попарно по окружности круга. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения указанное множество n складывающихся зеркал содержит семь пар зеркал.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства, как определено в любом из указанных выше случаев реализации, в котором упомянутый источник света испускает свет в диапазоне длин волн, выбранном из группы, состоящей из УФ, видимого, ИК, ближнего ИК, среднего ИК-диапазона, дальнего ИК, СВЧ и терагерца.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства, как определено в любом из указанных выше случаев реализации, в котором источник света содержит источник света спектрометра FTIR.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства, как определено в любом из указанных выше случаев реализации, в котором источник света в котором источник света содержит источник света Raman (рамановского) спектрометра.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание устройства, как определено в любом из указанных выше случаев реализации, в котором источником света является лазер. В некоторых предпочтительных случаях осуществления настоящего изобретения указанный лазер выбран из группы, состоящей из диодных лазеров и квантовых каскадных лазеров.

Краткое описание чертежей

Теперь изобретение будет описано со ссылкой на чертежи.

На фиг. 1 представлены спектры образца, показывающие коррекцию спектра для сигналов из-за наличия воды;

на фиг. 2 - примеры спектров с указанием спектральных особенностей, определенных анализом компонентов;

на фиг. 3 - блок-схемы, иллюстрирующие этапы в одном предпочтительном варианте осуществления способа, раскрытого в данном документе;

на фиг. 4 - блок-схема устройства для осуществления способа, описанного в данном документе;

на фиг. 5 - схематическая иллюстрация одного варианта осуществления устройства для осуществления способа, раскрытого в данном документе;

на фиг. 6 - подробная иллюстрация пути света через образец отсека нескольких частот типа, известного в данной области техники, используемой в устройстве, раскрытом в данном документе;

на фиг. 7 - схематическое изображение установки интерферометрии в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 8 - схематическая иллюстрация установки для измерения рассеяния света в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 9 - схематическая иллюстрация с многими секциями анализатора в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 10 - инфракрасные спектры поглощения двух различных видов бактерий;

на фиг. 11-22 - дополнительные инфракрасные спектры поглощения различных видов бактерий, определенные в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, раскрытого в данном документе;

на фиг. 23 приведены графики результатов в PCA пространства, иллюстрирующие возможность различать разные виды бактерий способом, описанным в данном документе.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

В последующем описании будут описаны различные аспекты настоящего изобретения. Для целей объяснения конкретные детали изложены для того, чтобы обеспечить полное понимание настоящего изобретения. Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что существуют другие варианты осуществления изобретения, которые отличаются в деталях, не затрагивая основную сущность группы изобретений. Таким образом, каждое изобретение группы не ограничивается тем, что показано на рисунке и изложено в описании, а объем прав определяется самым широким толкованием указанных притязаний изложенных в прилагаемой формуле изобретения.

В используемом здесь термин "примерно" понимается как отклонение на 25% выше или ниже но-

минальной величины.

Используемый здесь термин RANDOM FORESTS в целом относится к алгоритму обучения, включающему в себя классификатор ансамбля, который использует методы, разработанные Брейманом и Катлером, и, в частности, алгоритм, реализованный в коммерчески доступном программном пакете RANDOM FORESTS.

Способ, описанный здесь, включает стадии получения ферментированного образца, предположительно содержащего по меньшей мере один заранее определенный вид микроорганизма, передачу образца к измерительной ячейке, воздействие образца со светом от заранее заданного источника света, построение набора данных, такие как спектр или интерференционная картина, и классификации набора данных, таким образом, определения, имеются ли или нет микроорганизмы в культивируемых образцах культуры. В случае, когда набор данных представляет собой спектр, этапу окончательной классификации набора данных предшествует предварительная обработка набора данных, которая предусматривает по меньшей мере один из следующих этапов: коррекции спектра на присутствие воды, удаление базовой линии, фильтрации или извлечения интересующей области спектра и стадию выделения спектральных особенностей, представляющие интерес с помощью Анализа основных компонентов (PCA). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения классификация набора данных спектра осуществляется с помощью интеллектуального программного алгоритма обучения. Обучение осуществляется на так называемой обучающей выборке имеющейся информации для последующего применения полученной конфигурации на тестовой выборке. В наиболее предпочтительных вариантах алгоритм обучения представляет собой ансамбль классификатор, который использует метод случайной подпространства и состоит из множества деревьев решений, который формирует классификацию для классификации отдельных деревьев решений. В наиболее предпочтительных вариантах используется коммерчески доступное программное обеспечение алгоритма обучения, которое реализует метод случайных лесов (RANDOM FORESTS).

Поскольку объем базы доступных данных известных бактерий и соответствующих спектров постоянно увеличивается, заявляемый способ в дальнейшем способен обеспечить увеличение точности результатов.

Хотя в предпочтительных вариантах осуществления для получения набора данных используется инфракрасная спектроскопия поглощения, способ раскрытый в данном описании, носит общий характер и может быть использован с любой соответствующей формой спектроскопии. Неограничивающие примеры других спектроскопических методов, которые можно использовать в способе, раскрытом в данном документе, включают в себя метод инфракрасной отражательной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, флуоресцентной спектроскопии, УФ-видимой абсорбционной спектроскопии, а также UV-VIS отражательной спектроскопии.

В одном предпочтительном варианте осуществления способа используется следующий протокол подготовки пробы (образца). Во-первых, биологический образец собирают. Образец может быть либо в твердой или жидкой форме. Не ограничивающие примеры видов биологических образцов, которые могут быть исследованы с помощью раскрытого здесь способа, включают продукты чихания, слюну, слезы, желчь, мочу, вагинальные выделения, среднего уха аспират, гной, плевральный выпот, синовиальную жидкость, тампоны из полости абсцесса, из сыворотки, кровь и спинномозговая жидкость.

Микроорганизмы, содержащиеся в образце, культивируют. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения образец культивируют с помощью чашки Петри. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения образец культивируют с кровяным агаром, как правило от 12 до 24 ч. Осуществление анализа каждого вида микроорганизма желательно проводить после того, как культура микроорганизма проверена на чистоту. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения микроорганизмы затем переносят в отсек образца, выбирая множество колоний (обычно около четырех колоний выбраны для каждого выполняемого измерения) с использованием одноразового ватного тампона и смазывания на поверхность, чтобы покрыть область диаметром 1 дюйм. Затем образец переносят в ячейку (кювету).

В предпочтительных вариантах осуществления способа образец переносят в отсек для образцов, содержащий многопроходную (многоместную) ячейку. В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения образец переносится в многопроходную ячейку, подробно описанную ниже. В вариантах осуществления, в которых используется этот тип многопроходной ячейки, образец намазывается в центре зеркала, помещенного в ячейку с несколькими проходами. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения поверхность зеркала выполнена из золота.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения несколько образцов анализируют одновременно, а в предпочтительных вариантах осуществления, в которых выполняется множественный анализ образца, образец переносят в одном отсеке многоместного анализатора образца. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения множественный анализатор проба типа описан подробно ниже. В типичных вариантах осуществления изобретения несколько полученных спектров усредняются. Например, с использованием коммерчески доступного спектрометра и управления программным обеспечением, можно получить 64 спектра поглощения в течение 1 с.

Затем образец облучают от источника света. В качестве источника света может быть любой тип источника, известного в данной области техники, которые могут производить тип набора данных, требуемого для анализа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения свет (после взаимодействия с образцом культуры) используется, чтобы создать спектр. В качестве неограничивающего примера возможно, если набор данных представляет собой инфракрасный (ИК) абсорбционный спектр отражения или любой источник инфракрасного света, который охватывает диапазон длин волн для желаемого использования. Источник ИК может быть источником широкополосного света коммерчески доступного ИК-спектрометра, или это может быть перестраиваемый узкополосный источник, такой как лазерный диод или квантовый каскадный лазер (QCL). В качестве еще одного неограничивающего примера, если необходимо получить спектр комбинационного рассеяния или флуоресценции, можно использовать узкополосный источник, такой как лазерная или фильтрованная лампа. Необходимо измерить один из взаимосвязанных спектров: спектр поглощения VIS или спектр отражения UV-VIS, источником света может быть любой источник ультрафиолетового и видимого света, известный в данной области техники, который подходит для измерения спектра UV-VIS.

Затем свет направляется от источника к образцу и из образца после одного или нескольких проходов к детектору, где свет измеряется и анализируется. Детектором может быть любой подходящий тип детектора, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых облучающий свет получается из источника коммерчески доступного спектрометра FTIR или FT-Raman, используемым детектором является детектор, поставляемый со спектрометром. В предпочтительных вариантах раскрытого здесь способа, в котором свет, измеренный спектрометром, используется для построения спектра, спектр подвергается предварительной обработке до анализа для получения скорректированного спектра.

В предпочтительных вариантах осуществления способа, раскрытых в данном описании, в котором свет измеряется с помощью спектрометра, используемого для построения спектра, спектр подвергается предварительной обработки перед анализом с целью получения скорректированного спектра.

В предпочтительных вариантах осуществления способа предварительная обработка включает в себя такое исправление, как корректировка спектра сигналов из-за присутствия воды в образце. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения поправка на присутствие воды осуществляется с использованием по меньшей мере одного из трех методов. В некоторых вариантах осуществления выполняется спектральное вычитание, при котором из измеряемого спектра вычитается спектр воды, нормированный на интенсивность измеренного спектра. В других вариантах осуществления для каждого образца используется простой фильтр, в котором для каждого образца создается и вычитается среднее из спектров множества других выборок. В других вариантах осуществления коррекция для сигналов из-за присутствия воды осуществляется с помощью адаптивной фильтрации с использованием эталонного сигнала для получения оптимального снижения вклада сигнала воды в качестве измеренного спектра образца. Алгоритмы спектрального вычитания, простой фильтрации и адаптивной фильтрации хорошо известны в данной области техники, и можно использовать любой подходящий коммерчески доступный алгоритм или программное обеспечение. Теперь делается ссылка на фиг. 1, который показывает как измеренный спектр до коррекции сигналов из-за воды (фиг. 1A), и тот же спектр после выполнения коррекции (фиг. 1B).

В предпочтительных вариантах осуществления способа предварительная обработка дополнительно включает в себя выполнение коррекции базовой линии по измеренному спектру. Способы осуществления коррекции базовой линии хорошо известны в данной области, и может быть использован любой подходящий способ, известный в данной области техники.

В предпочтительных вариантах осуществления способа, раскрытого в настоящем изобретении, предварительная обработка дополнительно включает в себя уменьшение шума. В данной области техники известны многочисленные методы уменьшения шума в спектре. Неограничивающие примеры таких способов, предложенных изобретателями как входящие в объем изобретения, включают в себя линейную фильтрацию, адаптивную фильтрацию, использование фильтра Савицкого-Голея, фильтрацию нижних частот, спектральное вычитание или любую их комбинацию.

Поскольку интересующая спектральная информация часто встречается только в ограниченной части спектра, в предпочтительных вариантах осуществления способа, раскрытого в изобретении, он включает в себя этап выделения интересующей спектральной области. В качестве неограничивающих примеров в различных вариантах осуществления, в которых набор данных, полученный из образца, представляет собой колебательный спектр, представляющая интерес спектральная область может быть спектральным диапазоном, выбранным из группы, состоящей из интервалов от $850\text{--}1000\text{ см}^{-1}$; от $990\text{--}1190\text{ см}^{-1}$; от $1180\text{--}1290\text{ см}^{-1}$; от $1235\text{--}1363\text{ см}^{-1}$; от $1300\text{--}1350\text{ см}^{-1}$; от $1500\text{--}1800\text{ см}^{-1}$; от $1550\text{--}1650\text{ см}^{-1}$; от $1720\text{--}1780\text{ см}^{-1}$; от $2800\text{--}3050\text{ см}^{-1}$; от $2836\text{--}2995\text{ см}^{-1}$; и около $3000\text{--}3300\text{ см}^{-1}$.

После предварительной обработки спектральные особенности, представляющие интерес, извлекаются из скорректированного набора данных (спектра) путем анализа основных компонентов (PCA). Можно использовать любой метод анализа основных компонентов, известный в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления способа, раскрытого в настоящем изобретении, опреде-

ляются первая и вторая производные спектра, из каждого из которых определяются по меньшей мере два коэффициента, т.е. получается всего по меньшей мере четыре коэффициента. Другие анализы, в которых получены более высокие производные или большее или меньшее количество коэффициентов, рассматриваются изобретателями как входящие в объем изобретения. Теперь делается ссылка на фиг. 2, в котором представлены два образца спектра со стрелками, указывающими спектральные особенности, уникальные для проанализированных видов бактерий. Эти спектральные особенности являются неограничивающими примерами спектральных признаков, которые извлекаются из спектров с помощью РСА. На рисунке представлены два образца спектров и особенности, выделенные из спектров, обозначенных стрелками. Неограничивающие примеры спектральных признаков, которые могут быть извлечены из спектра и использованы для определения наличия определенного типа бактерии в образце, включают пиковую корреляцию, пиковую длину волны, высоту пика, ширину пика, пиковое сечение, площадь пика по меньшей мере один из коэффициентов приложенной полиномиальной кривой, общая сумма площадей под по меньшей мере двумя пиками сигнала, линейное предсказательное кодирование (LPC), среднее значение сигнала, значение дисперсии сигнала, значение асимметрии, пиковые значения интенсивности, вейвлет-коэффициенты и их производные значения, гауссовское множество параметров (μ , σ , A_i).

После предварительной обработки выделенные спектральные признаки классифицируются, определяя, действительно ли представляющие интерес микроорганизмы присутствуют в образце. Классификация выполняется с использованием алгоритма, выбранного из группы, состоящей из контролируемого обучения, машинного обучения или алгоритмов распознавания образов. Неограничивающие примеры алгоритмов классификации, которые могут быть использованы с описанным здесь способом, включают классификатор Байеса, вектор-носитель поддержки (SVM), линейные дискриминантные функции, линейный дискриминант Фишера, дерево алгоритмов C4.5, ближайший сосед K, взвешенный K-ближайший сосед, иерархический алгоритм кластеризации, RANDOM FORESTS, скрытая марковская модель, Гауссовская модель смеси (GMM), K-средний алгоритм кластеризации, алгоритм кластеризации Уорда, минимальные квадраты и алгоритмы нейронной сети. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения используется алгоритм RANDOM FORESTS. Все эти алгоритмы обучения начинаются с протокола обучения для создания базы данных спектральных признаков, связанных с известными типами микроорганизмов.

Затем эта база данных сохраняется, и затем классификация неизвестного образца выполняется на основе результатов сравнения алгоритма изучения спектральных признаков, полученных из образца, с результатами спектральных признаков, полученных в учебной процедуре. В некоторых вариантах осуществления изобретения параметры посадки выбираются так, что классификация выполняется на основе признаков, которые имеют заданный порог минимальной значимости. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения этот порог минимальной значимости является доверительным пределом 95%. Неограничивающие примеры тестов статистической значимости для определения того, проходит ли конкретная функция, полученная с помощью СПС, с предопределенным порогом значимости, включают χ^2 , тест Уилкоксона и t-тест Стьюдента.

Обратимся теперь к фиг. 3, на которой представлена блок-схема последовательности операций, иллюстрирующая этапы в одном предпочтительном варианте раскрытого здесь способа, фиг. 3А в общих чертах иллюстрирует этапы способа.

Как обсуждалось выше, метод делится на три фазы: обучение (1000), память (2000) и тестирование (3000). Этап обучения включает в себя получение по меньшей мере одного набора данных для заданного количества известных типов микроорганизмов (1010), за которым следует предварительная обработка наборов данных (1020) для получения исправленных наборов данных и извлечения признаков (1030). Как только процедура обучения будет завершена, извлеченные функции будут сохранены во время фазы памяти. На рисунке показаны три неограничивающих примера бактериальных типов (2010, 2020, 2030), модельные спектры которых используются в качестве базы данных для процесса принятия решений. Фазы обучения и памяти не ограничиваются каким-либо конкретным количеством известных микроорганизмов. На этапе тестирования образец, предположительно содержащий один или несколько конкретных типов микроорганизмов, используется для создания набора данных, как описано выше (3010). Измеренный спектр подвергается предварительной обработке (3020), и спектральные характеристики извлекаются из скорректированного спектра (3030), как обсуждалось выше. Затем выполняется алгоритм классификации (3040) со ссылкой на результаты, полученные в фазе памяти 2000. Наконец, решение принимается на основе результатов алгоритма классификации относительно наличия или отсутствия подозрительного микроорганизма. На фиг. 3В представлена более подробная блок-схема этапов фазы тестирования для трех неограничивающих примеров бактерий, предположительно присутствующих в образце.

Поскольку метод предполагает использование алгоритма обучения, его можно использовать в нескольких разных ситуациях. Неограничивающие примеры, в которых может быть применен описанный здесь способ, включают в себя определение того, что конкретный предопределенный тип микроорганизма присутствует или нет в культивированном образце; определение того, что определенный предопределенный тип микроорганизма присутствует или отсутствует в культивированном образце в присутствии одного или нескольких других типов микроорганизмов; и определение того, что образец содержит мик-

роорганизмы и идентификацию типа или штаммов присутствующего микроорганизма или подтверждение того, что присутствующие микроорганизмы не соответствуют ни одному из типов в базе данных. Неограничивающие примеры типов бактерий, которые могут быть обнаружены и идентифицированы методом, описываемым здесь, включают *Staphylococcus* коагулазо отрицательный; *Staph. aureus*, *Streptococcus* spp.; *Streptococcus viridans* group; *Enterococcus* spp.; *Corynebacterium* spp.; *Aerococcus* spp.; *Micrococcus* spp.; *Peptostreptococcus* spp.; *Lactococcus* spp.; *Leuconostoc* spp.; *Tothia* spp.; *Gemella* spp.; *Alcaligenes* spp.; *Alternaria* spp.; *Flavobacterium* spp.; *Bacillus* spp.; *Achromobacter* spp.; *Acinetobacter* spp.; *Acinobacillus* spp.; *Alcaligenes* spp.; *Campylobacter* spp.; *Edwardsiella* spp.; *Ehrlichia* spp.; *Enterobacter* spp.; *Ewingella* spp.; *Flavobacteria*; *Hafnia* spp.; *Klebsiella* spp.; *Kluyvera* spp.; *Legionella* spp.; *Moraxella* spp.; *Morganella* spp.; *Neisseria* spp.; *Pasteurella* spp.; *Prevotella* spp.; *Proteus* spp.; *Providencia* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Rahnella* spp.; *Salmonella* spp.; *Serratia* spp.; *Shigella* spp.; *Sphingobacterium* spp.; *Vibrio* spp.; *Yersinia* spp.; *Neisseria* spp.; *Kingella* spp.; *Cardiobacterium*; non Tuberculosis mycobacteria (NTB), *Mycobacterium tuberculosis*; and *Mycobacterium avium*.

Метод также может быть использован для обнаружения и идентификации дрожжей и грибов. Неограничивающие примеры типов дрожжей и грибов, которые могут быть обнаружены и идентифицированы описанным здесь способом, включают *Candida* spp.; *Aspergillus* spp.; *Fusarium* spp.; и *Penicillium* spp. Неограничивающие примеры отдельных видов дрожжей и грибов, которые могут быть обнаружены и идентифицированы описанным здесь способом, включают *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida krusei*; *Candida parapsilosis*; *Candida tropicalis*; *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus niger*; и *Aspergillus terreus*.

В дополнение к спектру измеряется интерференционная картина или картина рассеяния. Это особенно полезно для идентификации бактерий различиями в их физических, а не чисто химических характеристиках. В качестве неограничивающего примера можно использовать интерференционные картины, генерируемые при облучении образца монохроматическим светом, для оценки толщины клеточной стенки или клеточной мембраны, а картины рассеяния можно использовать для оценки шероховатости стенки ячейки с использованием хорошо известных методов анализа в уровне техники.

В качестве неограничивающего примера варианта осуществления способа, раскрытого в настоящем изобретении, который включает в себя построение и анализ наборов данных, отличных от спектров, сообщается, что клеточная стенка, устойчивая к метициллину - золотистого стафилококка (MRSA) толще, чем метициллин-чувствительного золотистого стафилококка (MSSA). См. Kawai M. et al., "Толщина стенки клетки: возможный механизм устойчивости акрифлавина в резистентном к метициллину стафилококке *Aureus*", J. Med. Microbiol. 2009, 58 (Pt 3), 331-336, который включен в настоящее описание посредством ссылки. Сообщалось также, что шероховатость клеточной стенки MRSA отличается от шероховатости клеточной стенки MSSA; см., например, Wilkinson B.J. et al., "Состав клеточной стенки и связанные с ней свойства штаммов штамма *Staphylococcus Aureus*, резистентных к метициллину", J. Bacteriol. 1978, 136, 976-82, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

Таким образом, в рамках изобретения предлагается мультимодальный метод для определения антибиотикорезистентности от чувствительных к антибиотикам штаммов одного вида бактерий. В качестве неограничивающего примера этот метод можно использовать для выделения MRSA из MSSA. В этих вариантах осуществления этап построения по меньшей мере одного набора данных включает в себя построение спектра, интерференционной картины и картины рассеяния. Спектр анализируют, как подробно описано выше, чтобы подтвердить присутствие интересующей бактерии (например, *Staphylococcus aureus*).

Интерференционная картина получается путем пропускания света от источника света до образца и рассеянного света от образца с помощью интерферометра (в предпочтительных вариантах используется интерферометр Маха-Цандера), с пролучением интерференционной картины для определения толщины клеточной стенки микроорганизмов в образце культуры. Измерением толщины клеточной стенки в образце, по сравнению с известными значениями толщины клеточных стенок микроорганизмов, определяют устойчивые к антибиотикам микроорганизмы и чувствительные к антибиотикам микроорганизмы в образце, которые классифицированы как антибиотик устойчивые к антибиотикам или чувствительные (например, MRSA или MSSA) в соответствии с измеренной толщиной клеточной стенки. Способ включает измерение пространственного распределения света заданной длины волны рассеянного от бактериальных клеток в образце. С использованием диаграммы рассеяния шероховатость клеточной стенки бактерий оценивают с использованием аналитических методов, известных в данной области техники, и измеряют шероховатость по сравнению с известными шероховатостью клеточных стенок штаммов микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам и антибиотикам чувствительных бактерий (например, MRSA и MSSA), в результате соответственно классифицируются штаммы микроорганизмов в образце культуры.

В объем настоящей группы изобретений также входит раскрытие устройства для проведения измерений, используемых в способе, раскрытом в настоящем изобретении. Теперь делается ссылка на фиг. 4, на которой представлена схематическая иллюстрация основных компонентов такого устройства 20. Устройство содержит источник 200 света; отсек для образца 220 для удержания образца 230; средство 240 для пропускания света 210 от источника к образцу 230; детектор для измерения света, рассеянного и/или

передаваемого образцом после облучения образца светом источника 250; и средство для пропускания света из отсека для образца в детектор 260.250; и средство для передачи света от образца отсека к детектору 260.

Источником 200 источника света может быть любой источник света, известный в технике, подходящий для создания желаемого типа набора данных (спектр, интерференционная картина, картина рассеяния и т.д.). В различных вариантах осуществления изобретения источник света излучает свет в частотном диапазоне, выбранном из группы, состоящей из ультрафиолетового, видимого, инфракрасного, ближнего ИК, среднего ИК-диапазона, инфракрасного, микроволнового и терагерцового излучения. В зависимости от типа требуемого набора данных источник света может быть широкополосным или монохроматическим, а также монохроматическим, фиксированным или настраиваемым. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых набор данных представляет собой ИК-спектр, источником света является стандартный широкополосный инфракрасный источник света, такой как тот, который содержится в коммерчески доступных ИК-спектрометрах (например, globar или Nernst glower). В некоторых других вариантах осуществления, в которых набор данных представляет собой спектр, источником света является перестраиваемый лазер. Неограничивающие примеры перестраиваемых лазеров, подходящих для использования с описанным здесь устройством, включают в себя перестраиваемые диодные лазеры и квантовые каскадные лазеры. В вариантах осуществления, в которых используется интерферометрия, источником света может быть любой, по существу, монохроматический источник света, известный в данной области для таких измерений (например, лампа, связанная с фильтром или монохроматором, лазером и т.д.).

Теперь делается ссылка на фиг. 5, которая схематически иллюстрирует устройство в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения. В этом варианте осуществления, в котором набор данных представляет собой ИК-спектр, используют источник 200 света и детектор 260 коммерчески доступного ИК-спектрометра. Свет 210 из источника выходит из спектрометра FTIR, попадая на сферическое зеркало 240, которое фокусирует свет и направляет его в отсек 220 для внешних образцов. В показанном варианте осуществления отсек для образцов 220 представляет собой многопроходную ячейку типа, описанного в патенте US № 20120002199, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. В показанном конкретном варианте осуществления внешний отсек для образцов представляет собой многопроходную ячейку, которая обеспечивает множество взаимодействий с образцом 230. Свет направляется к детектору с помощью ряда зеркал 250a, расположенных внутри камеры для образцов, которые направляют свет на образец и после нескольких проходов, внешних по отношению к отсеку для образцов, к сферическому зеркалу 250b, который фокусирует свет на детекторе 260. В показанном варианте осуществления используется детектор, снабженный спектрометром FTIR, но любой детектор, подходящий для обеспечения желаемых данных, может использоваться и размещаться в любом месте, удобном для оператора устройства.

Многопроходная ячейка 220, показанная на фиг. 5, содержит параболическое зеркало 221; этап 222, содержащий средство удерживания образца для удержания образца 230, причем указанная ступень расположена так, что по меньшей мере часть света, проходящая от источника света к упомянутому параболическому зеркалу через упомянутое средство схождения света и затем отражается от упомянутого параболического зеркала, будет сталкиваться с образцом, прикрепленным на указанную стадию через указанное средство удерживания образца и так, чтобы свет, отраженный от указанного параболического зеркала от указанного образца, направлялся в другое место, отличное от указанного образца; и множество n складных зеркал 223, расположенных таким образом, что свет, отраженный от указанного образца, до упомянутого параболического зеркала будет падать на одно из указанных складных зеркал; при $m=1$ до $n-1$, отражение света на m -м складном зеркале будет отражено обратно в указанное параболическое зеркало, так что оно будет затем отражено на указанном образце и такое, что свет, отраженный от указанного образца, будет отражен от упомянутого параболического зеркала к $(m+1)$ -му складному зеркалу; и при $m=n$ свет, отраженный от упомянутого m -го складного зеркала, будет направлен к указанному световому соединительному средству. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения $n=14$ (т.е. имеется семь пар складных зеркал). Теперь делается ссылка на фиг. 6, в котором более подробно показано расположение зеркал, которые приносят свет от источника 200 через многопроходную ячейку к детектору 260.

Теперь делается ссылка на фиг. 7A, которая иллюстрирует типичный вариант осуществления 10 установки для выполнения измерения помех. Используется интерферометр Маха-Цандера 100. Свет из источника 200 (в предпочтительных вариантах осуществления свет состоит из, по существу, монохроматического источника, такого как лазер, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления используется видимый или NIR-диодный лазер) проходит через интерферометр на образец 230, который находится на зеркале 130. Затем отраженный свет возвращается обратно в интерферометр и на элемент детектора 260. Образец сканируется с помощью сканера ху 150. Полученная таким образом интерференционная картина будет зависеть от толщины стенки ячейки и будет отличаться для образца, содержащего бактерии с более толстыми стенками клеток (фиг. 7B), чем для образца, содержащего бактерии с более тонкими стенками клеток (фиг. 7C).

Теперь делается ссылка на фиг. 8, на которой представлена схематическая иллюстрация варианта 20 осуществления установки для проведения измерений рассеяния. Источник монохроматического света 200 (например, диодный лазер) производит выходной свет на заданной длине волны в видимом/ближнем ИК диапазоне. Детектор 260 в этом варианте осуществления содержит массив детекторов, расположенных в полукруге, на фиксированном расстоянии внутри камеры. Держатель 270 лазера и детектора может иметь возможность перемещаться горизонтально с использованием средства 150 сканирования x-y, которое позволит сканировать большую часть поверхности образца. Детекторы отправляют данные на анализ программного обеспечения, которое используется для создания графика рассеяния. График рассеяния даст дополнительные данные, позволяющие определять такие физические характеристики, как шероховатость стенки клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения несколько образцов анализируются в одной партии. В этих вариантах осуществления отсек 220 для образцов содержит анализатор множественных выборок. Теперь делается ссылка на фиг. 9, который схематично представляет один вариант осуществления такого анализатора с несколькими образцами. Анализатор множественных выборок содержит множество ячеек для образцов, в каждую из которых помещается один образец. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения источник 200 света представляет собой перестраиваемый лазер, такой как квантовый каскадный лазер. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения источник света настраивается в диапазоне длин волн 8-12 мкм. Спектральная область, представляющая интерес, измеряется путем сканирования источника света по желаемому диапазону длин волн. Свет от источника направляется через входное отверстие в контролируемое зеркало с переворачиванием, которое направляет луч к образцу. Если зеркало-зеркало перемещается в другое положение, свет проходит через второе отверстие в следующий отсек для образцов. Лазерный луч, который является направленным и коллимированным, обеспечивает гораздо меньшее сходящееся зеркало, чем источник FTIR, показанный на фиг. 5 выше. В анализаторе с несколькими отсеками луч расширяется, чтобы покрыть всю площадь области зеркал оптического элемента; поскольку световой поток коллимируется, индивидуальное отделение меньше, чем в корпусе FTIR. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения используется многопроходная ячейка. После взаимодействия с образцом свет направляется на детектор. Сигнал, поступающий на детектор как функция выходной длины волны источника света, записывается и сохраняется, а спектр формируется из измерений на каждой длине волны.

Примеры

Следующие неограничивающие примеры приведены для иллюстрации различных случаев осуществления изобретения для того, чтобы один из обычных специалистов в данной области техники мог его использовать.

Пример 1.

Каждый тип бактерий имеет уникальную спектральную подпись. Хотя многие типы бактерий имеют сходные спектральные сигнатуры, все же существуют некоторые спектральные различия, которые обусловлены различными белками на клеточной мембране и различиями в структуре ДНК/РНК. Теперь делается ссылка на фиг. 10, где представлены типичные ИК-спектры (нормализованная абсорбция в зависимости от энергии в см^{-1}) двух разных видов бактерий, *Enterobacter aerogenes* (фиг. 10A) и *Enterobacter cloacae* (фиг. 10B). Как можно видеть из чертежей, в то время как два спектра в целом сходны по структуре, можно видеть различия в деталях, и эти различия достаточно велики, чтобы обеспечить возможность дифференциации между двумя видами с использованием описанного здесь метода.

Пример 2.

Ссылка делается на фиг. 11-22, в которых представлены дополнительные примеры спектров ИК-поглощения (нормализованная абсорбция как функция энергии в см^{-1}) различных видов бактерий. В некоторых случаях уникальные особенности спектра обозначены стрелками. Виды бактерий и количество штаммов каждого вида, однозначно идентифицированных по спектрам, суммированы в табл. 1. Как можно видеть из рисунков, способ, раскрытый здесь, способен не только различать разные виды бактерий, но и между разными штаммы одного вида бактерий.

Таблица 1

Номер Фиг.	Виды бактерий	Количество штаммов
11	<i>E. coli</i>	1
12	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
13	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
14	<i>Enterococcus faecalis</i>	2

15	<i>Enterococcus faecium</i>	1
16	<i>Klebsellia pneumoniae</i>	6
17	<i>Proteus mirabilis</i>	1
18	<i>Pseud. aeruginosa</i>	3
19	<i>Serratia marcescens</i>	3
20	<i>Staph. aureus</i>	1
21	<i>Staph. epidermidis</i>	1
22	<i>Str. agalactiae gr. B</i>	1

Пример 3.

Следующие примеры иллюстрируют примеры *in vitro*, чтобы обеспечить способ различать различные виды бактерий.

Во-первых, на этапе обучения система была введена с образцами каждой бактерии в базе данных, на основе которой была оценена статистическая модель для каждой бактерии и сохранена в памяти. Этот процесс привел к нескольким статистическим моделям, каждый из которых представляет собой тип бактерий. На этапе тестирования системе были представлены "новые" образцы, т.е. образцы, которые он никогда не видел раньше, а также выполнялся анализ и обработка данных. Система сравнивала каждый образец бактерий с каждой из моделей, сохраненных в памяти на этапе обучения. Для каждой модели была присвоена оценка правдоподобия. Модель, которая предоставила максимальный балл, была выбрана в качестве решения о классификации. Теперь делается ссылка на фиг. 23, в котором представлены два примера идентификации бактерий в соответствии с раскрытым здесь способом. Представлены графики в пространстве возможностей PCA. ИНЖИР. 23А показан график, дающий результаты для *E.coli* и *Strep group A*, и фиг. 23В показан график, показывающий результаты пневмонии *Klebsellia* и MRSA. В обоих случаях дифференциация между двумя тестируемыми бактериями очевидна.

Пример 4.

Способ, раскрытый в настоящем описании, был использован для определения 10 видов бактерий. Во всех случаях были сделаны как минимум 10 измерений. Табл. 2 показывает матрицу разброса для десяти видов тестируемых бактерий; количество измерений указано в скобках.

Таблица 2

True \ Recog.	Acin. baumannii	E-coli	Enter. cloacae	Enter. Faecalis	Enter. Faecium	Prot. mirabilis	Pseud. Aeruginosa	Staph. Epidermidis	Staph. Aureus	Strep. Pyogenes
Acin. baumannii	73.9% (17)	3.2	21.1	0	12.9	0	0	0	0	0
E-coli	0	80.6% (25)	0	0	0	3.8	0	0	0	1
Enter. cloacae	17.4	3.2	63.2% (12)	0	0	0	0	0	0	0
Enter. Faecalis	0	3.2	0	100% (30)	3.2	0	3.7	0	0	0
Enter. Faecium	8.7	0	0	0	83.9% (26)	0	0	0	0	0
Prot. mirabilis	0	3.2	0.0	0	0	46.2% (12)	18.5	0	0	0
Pseud. Aeruginosa	0	3.2	15.8	0	0	46.2	78.8% (42)	0	0	0
Staph. Epidermidis	0	0	0	0	0	0	0	68.2% (15)	0	0
Staph. Aureus	4.3	3.2	0	0	0	3.8	3.8	0	100% (47)	0
Strep. Pyogenes	0	0	0	0	0	0	0	31.8	0	96.0% (95)

Система дает среднюю правильную классификационную оценку 84,1% (средняя частота ошибок составила 15,9%). Оценки классификации были ниже для классов с меньшим количеством данных в базе данных (например, *Enterobact. Cloacae* и *Prot. Mirabilis*). Относительно небольшое количество данных в этих случаях привело к менее эффективному обучению на этапе программного обучения. Эффективность метода достигается при проведении достаточного количества измерений, чтобы обеспечить обработку и тонко дифференцировать различные типы исследуемых бактерий. Способ позволяет сделать обоснован-

ный вывод о присутствии в образце конкретных штаммов обнаруженных типов микроорганизмов, подтверждаемый комплексом взаимосвязанных химических и физических характеристик, включая тонкое многостороннее исследование чувствительности этих штаммов микроорганизмов к тем или иным конкретным антибиотикам с доверительной точностью, недоступной для известных технических решений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ спектрального обнаружения и идентификации микроорганизмов в культуре, включающий

формирование базы модельных спектров известных патогенных микроорганизмов в качестве базы данных программного алгоритма обучения;

приготовление по меньшей мере одного биологического образца, предположительно содержащего микроорганизмы, подлежащие определению;

культивирование биологического образца с получением образца культуры;

перемещение образца культуры в ячейку;

воздействие на указанный образец культуры световым излучением от источника света;

изучение по меньшей мере части светового излучения, поступающего от образца культуры в результате указанного воздействия на него, с получением набора данных в виде выделенных спектральных признаков: спектра поглощения и спектра отражения, а также диаграммы рассеяния и интерференционной картины, полученных после указанной стадии воздействия;

в соответствии с полученным набором данных производят определение химической и физических характеристик образца культуры, а также анализ присутствия и дифференциальную идентификацию микроорганизмов в образце культуры с помощью упомянутого алгоритма обучения;

при этом для установления химической характеристики микроорганизмов используют спектр, в отношении которого производится первоначальная обработка набора спектральных признаков путем выполнения по меньшей мере одного этапа, выбранного из группы:

(а) коррекция набора данных, обусловленная присутствием воды в образце культуры,

(б) вычитание базовой линии,

(в) снижение помех и

(г) выделение интересующей спектральной области, в результате чего получают скорректированный набор данных,

с последующим анализом полученного скорректированного набора спектральных признаков для классификации типов микроорганизмов, присутствующих в образце культуры,

а для установления физических характеристик микроорганизмов в образце той же культуры используют из набора его спектральных признаков диаграмму рассеяния и интерференционную картину, в отношении которых производится обработка выделенного набора спектральных признаков путем выполнения по меньшей мере одного этапа из группы:

оценка шероховатости клеточной стенки присутствующих микроорганизмов по найденной диаграмме рассеяния и классификация шероховатостей стенки клетки для определения тем самым штаммов микроорганизмов, присутствующих в указанном образце культуры,

оценка толщины клеточной стенки присутствующих микроорганизмов по указанной интерференционной картине и классификация толщины клеточной стенки для определения тем самым штаммов микроорганизмов, присутствующих в указанном образце культуры;

после чего делают вывод о присутствии в образце конкретных штаммов обнаруженных типов микроорганизмов, характеризующихся указанными химическими и физическими характеристиками, а также о чувствительности этих штаммов микроорганизмов к тем или иным антибиотикам.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец культуры представляет собой мазок на отражающей поверхности зеркала.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что перемещение указанных образцов культуры предусматривает передачу каждого из образцов культуры к измерительной ячейке отсека многокомпонентного анализатора.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что он предусматривает приготовление нескольких образцов культуры; передачу каждого из образцов культуры к отдельной измерительной ячейке отсека многокомпонентного анализатора и воздействие на каждый указанный образец световым излучением от источника света с последующим получением отдельного набора данных в виде выделенных спектральных признаков для каждого из нескольких образцов культуры.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что воздействие на образец культуры световым излучением от источника света предусматривает взаимодействие указанного образца со светом, полученным от источника света, выбранного из группы, включающей источник света комбинационного спектрометра FTIR и лазер, и предусматривает построение набора данных в виде выделенных спектральных признаков из группы: спектры инфракрасного поглощения и отражения, спектр комбинационного рассеяния, спектры поглощения и отражения в ультрафиолетовом и видимом свете; и предусматривает построение спектра

комбинационного рассеяния.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что предусматривает построение инфракрасного спектра поглощения, при этом на этапе первоначальной обработки включает выделение спектрального диапазона, выбранного из группы диапазонов: $850-1000\text{ см}^{-1}$; $990-1190\text{ см}^{-1}$; $1180-1290\text{ см}^{-1}$; $1235-1363\text{ см}^{-1}$; $1300-1350\text{ см}^{-1}$; $1500-1800\text{ см}^{-1}$; $1550-1650\text{ см}^{-1}$; $1720-1780\text{ см}^{-1}$; $2800-3050\text{ см}^{-1}$; $2836-2995\text{ см}^{-1}$ и $3000-3300\text{ см}^{-1}$.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что коррекция набора данных, обусловленная присутствием воды в образце культуры, включает стадию, выбранную из группы, состоящей из: (а) выполнения простой фильтрации путем вычитания из упомянутого набора данных набора данных среднего числа других наборов данных; (б) вычитания набора контрольных данных из указанного набора данных и (в) выполнения адаптивной фильтрации с использованием эталонного опорного сигнала для получения оптимального снижения вклада воды в спектр образца культуры.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что он реализуется с использованием по меньшей мере одного из следующих условий:

стадия первоначальной обработки указанных данных включает уменьшение шума с помощью по меньшей мере одного метода, выбранного из группы, состоящей из методов линейной фильтрации, адаптивной фильтрации, использования фильтра Савицкого-Голея, а также низкочастотной фильтрации и спектрального вычитания;

стадия первоначальной обработки выполняется с использованием метода главных компонент (РСА), который включает получение первых и вторых производных из указанного набора данных и получение двух коэффициентов для каждой из полученных производных;

набор спектральных признаков содержит спектральные признаки, выбранные из группы, состоящей из корреляционной обработки длины волны пика, высоты пика, ширины пика, сечения пика, площади пика, по меньшей мере одного из коэффициентов многочлена аппроксимирующей кривой, определяемого как общая сумма участков под по крайней мере двумя пиками сигнала с кодированием с линейным предсказанием (LPC) среднего значения сигнала, значения дисперсии сигнала, асимметрии значительности, пикового значения, гауссова набора параметров (μ , σ , A_i), коэффициента интенсивности пика, вейвлет коэффициентов и их производных;

метод отбора признаков выбран из группы, состоящей из последовательного отбора признаков и генетического алгоритма;

указанная стадия классификации осуществляется на основе параметров подгонки, полученных с помощью алгоритма обучения на основе признаков, имеющих минимальный порог значимости,

а упомянутый алгоритм обучения выбран из группы алгоритмов машинного обучения, состоящей из классификатора Байеса опорных векторов (SVM), линейных дискриминантных функций, линейного дискриминанта Фишера, C4.5 дерева решений, К-ближайшего соседа, взвешенной К-ближайшего соседа, иерархического алгоритма кластеризации, при этом алгоритм обучения включает в себя ансамбль классификаторов, использующий метод скрытой марковской модели, гауссовскую модель смеси (GMM), алгоритм кластеризации К-средних, метод кластеризации Уорда, метод минимума наименьших квадратов и нейронную сеть алгоритмов.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что алгоритм обучения использует алгоритм машинного обучения СЛУЧАЙНЫЙ ЛЕС.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что

указанные микроорганизмы включают устойчивые к антибиотикам и чувствительные к антибиотикам штаммы одного вида микроорганизмов;

по меньшей мере один набор данных содержит спектр, интерференционную картину и диаграмму рассеяния; причем указанный способ реализуется в следующей последовательности:

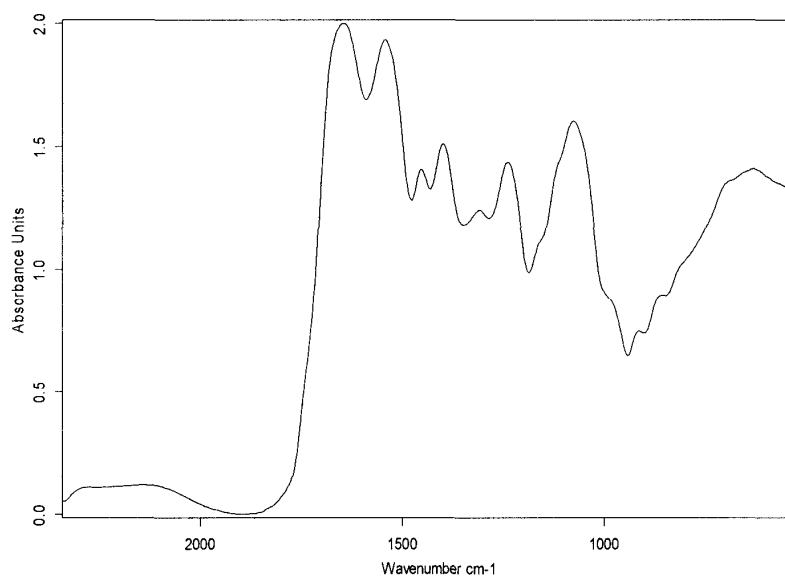
определяют по меньшей мере одну химическую характеристику микроорганизмов в образце культуры в соответствии со спектром отражения;

оценивают толщину клеточной стенки микроорганизмов в образце культуры в соответствии с интерференционной картиной;

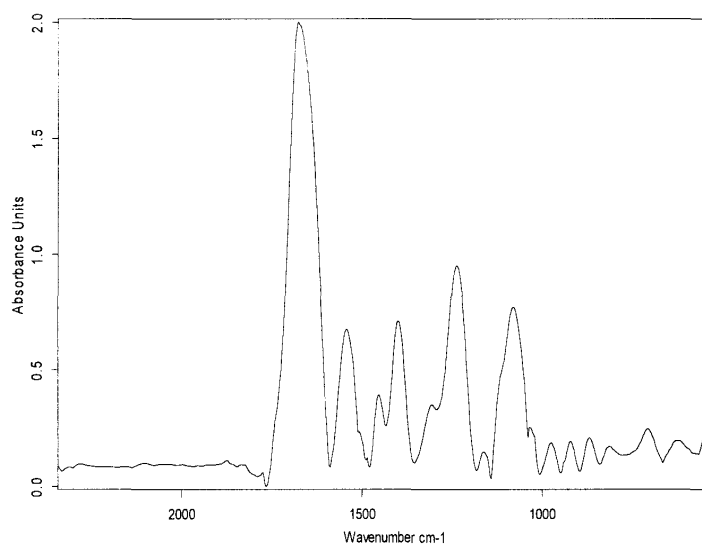
оценивают шероховатость клеточной стенки микроорганизмов в образце культуры в соответствии с диаграммой рассеяния и

осуществляют классификацию на основе результатов анализа указанных спектра отражения, интерференционной картины и диаграммы рассеяния.

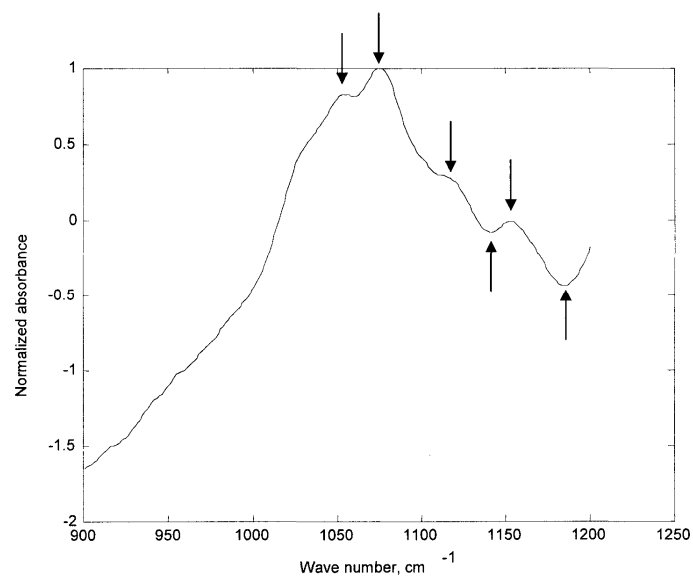
033790



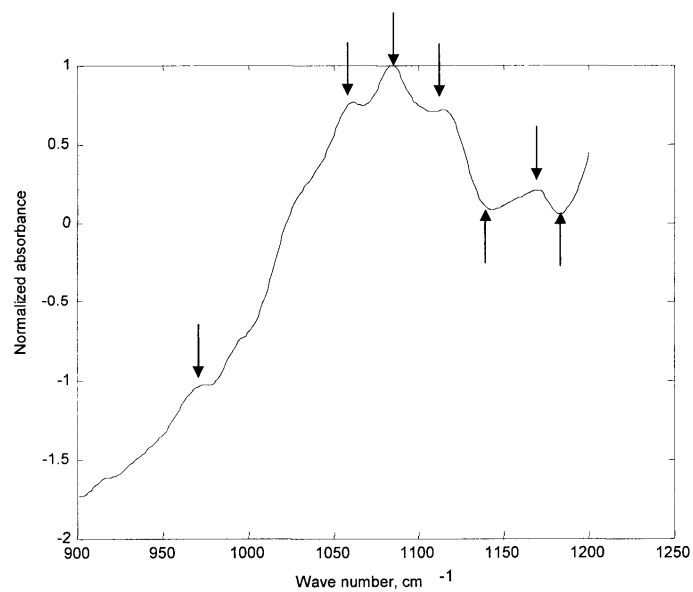
Фиг. 1А



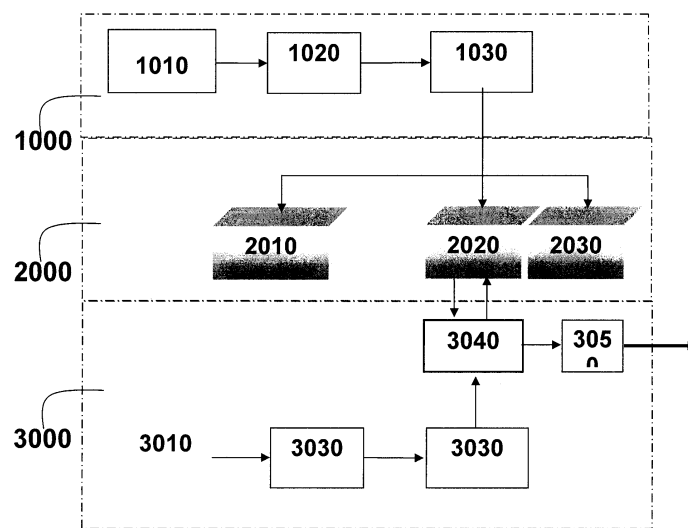
Фиг. 1В



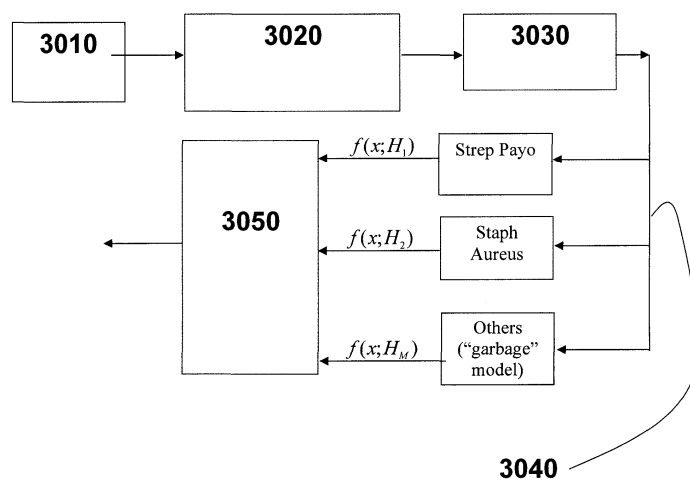
Фиг. 2А



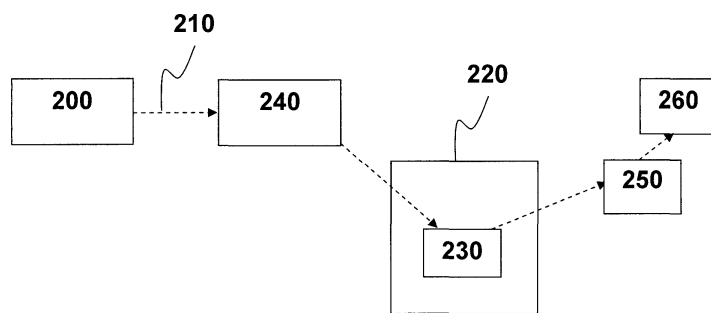
Фиг. 2В



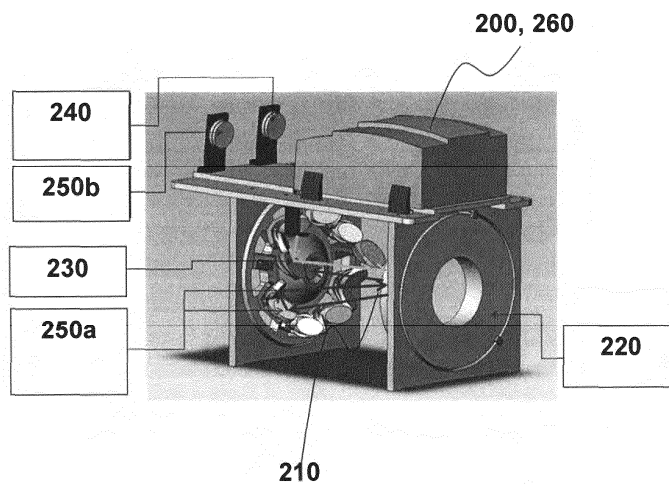
Фиг. 3А



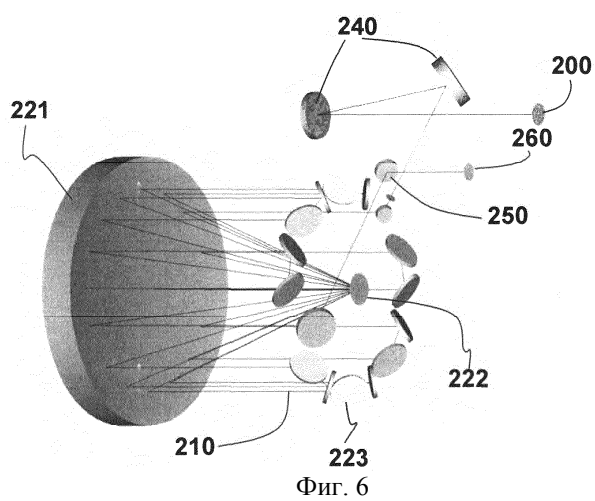
Фиг. 3В



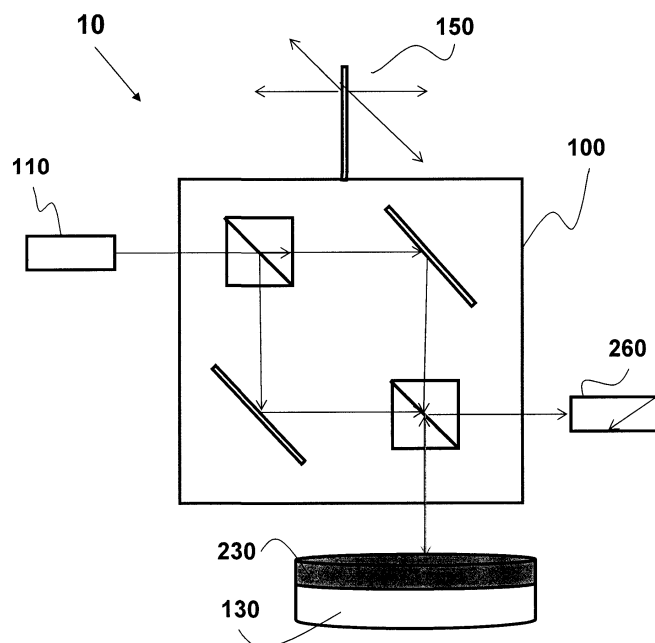
Фиг. 4



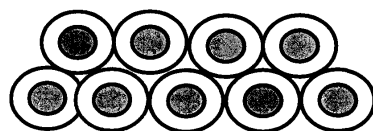
Фиг. 5



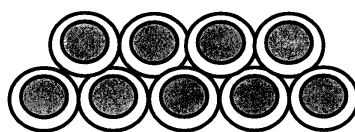
Фиг. 6



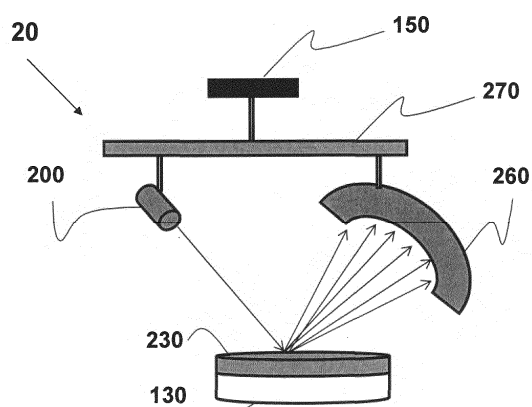
Фиг. 7А



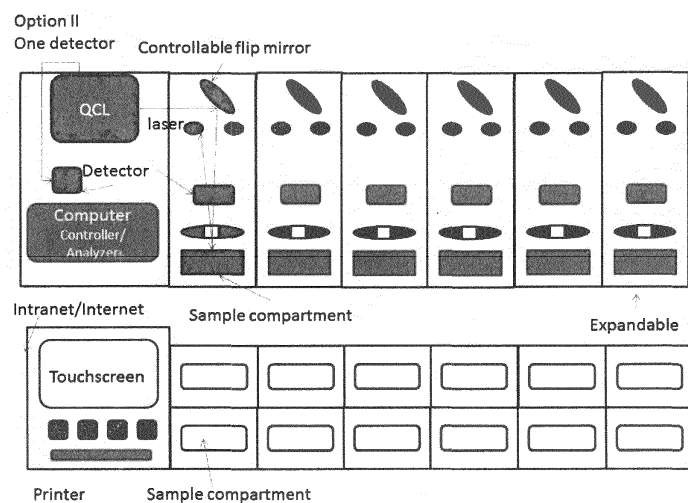
Фиг. 7В



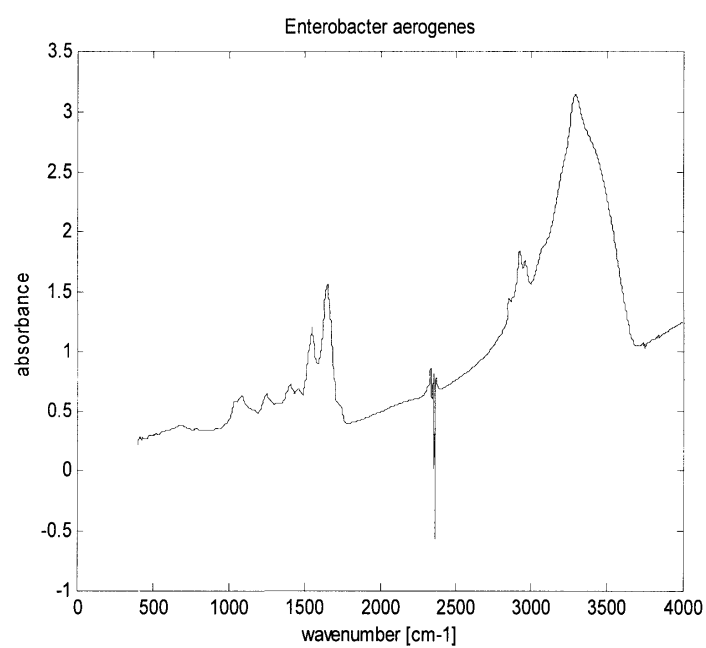
Фиг. 7С



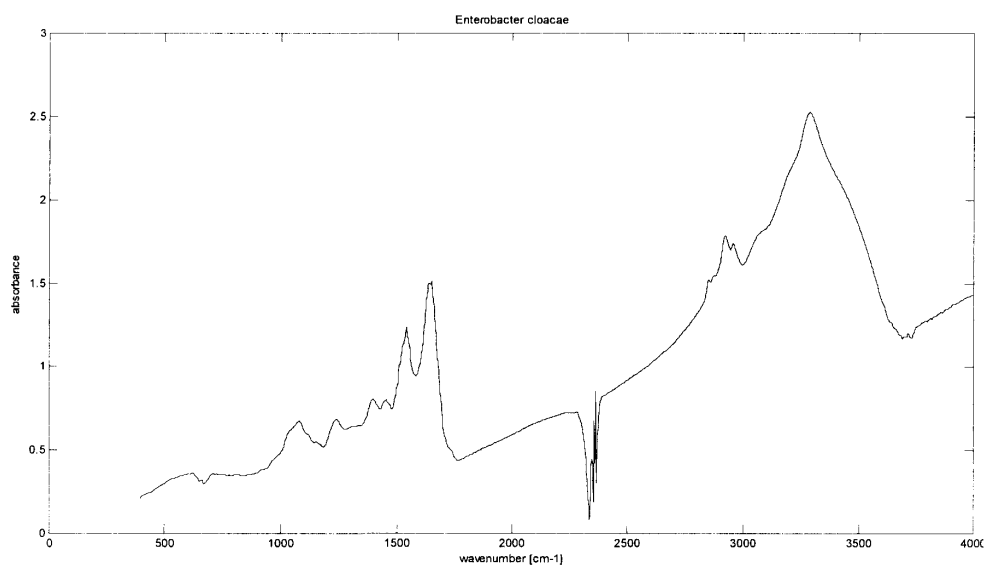
Фиг. 8



Фиг. 9

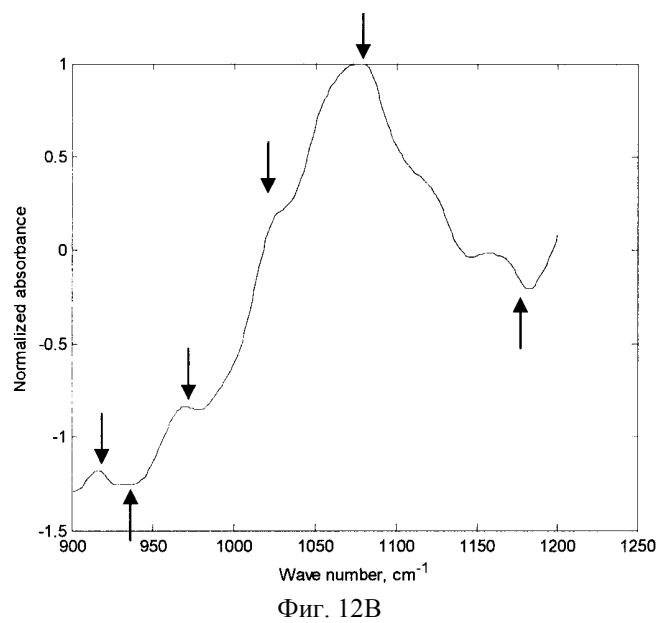
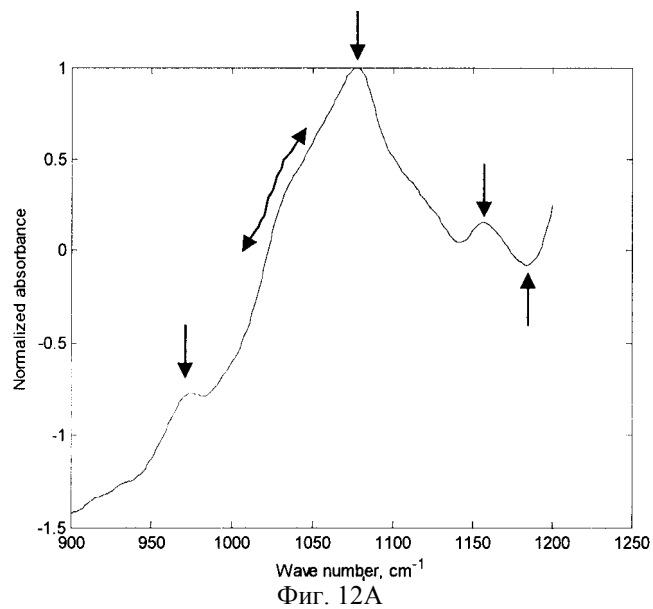
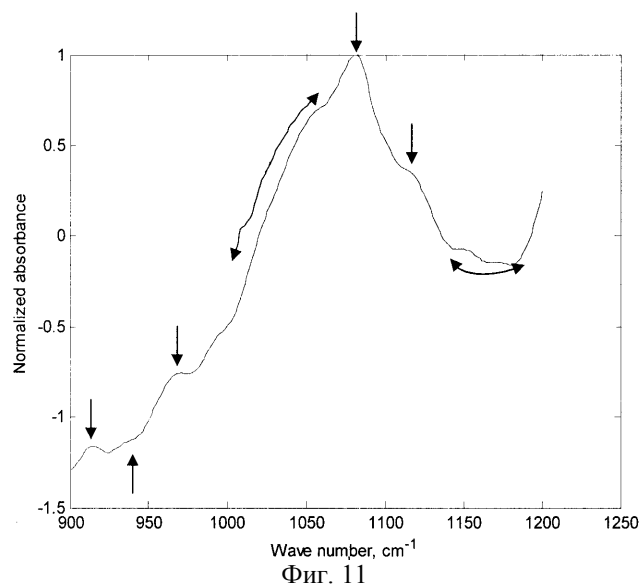


Фиг. 10А

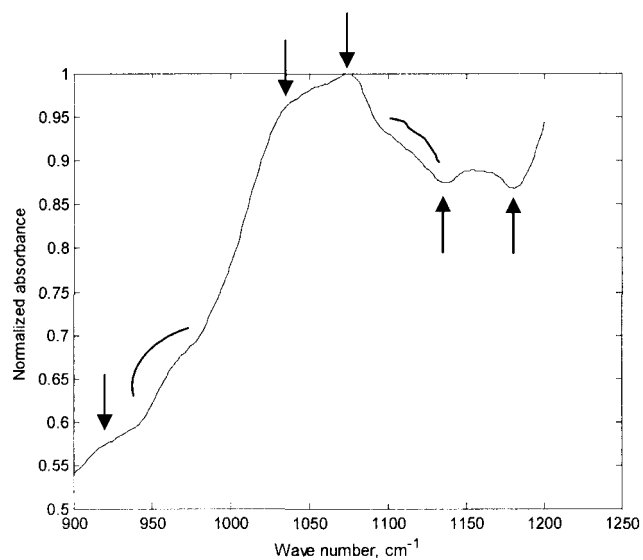


Фиг. 10В

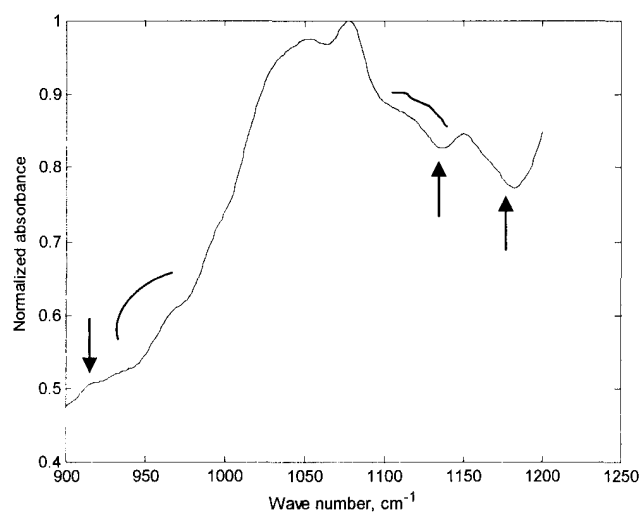
033790



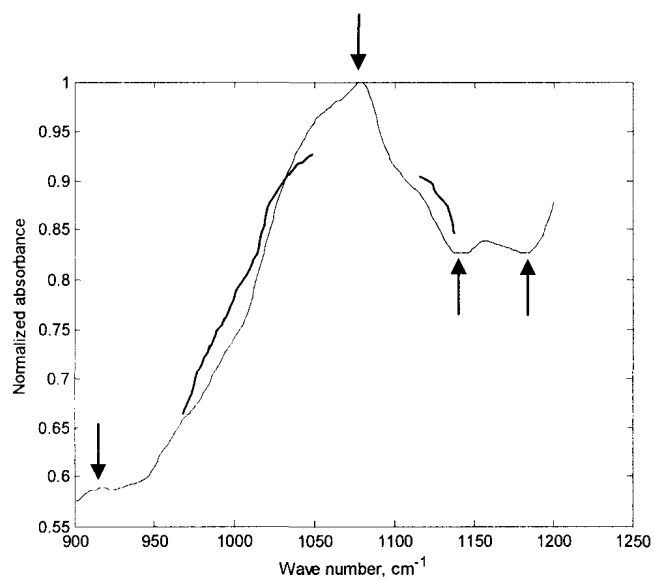
033790



Фиг. 13А

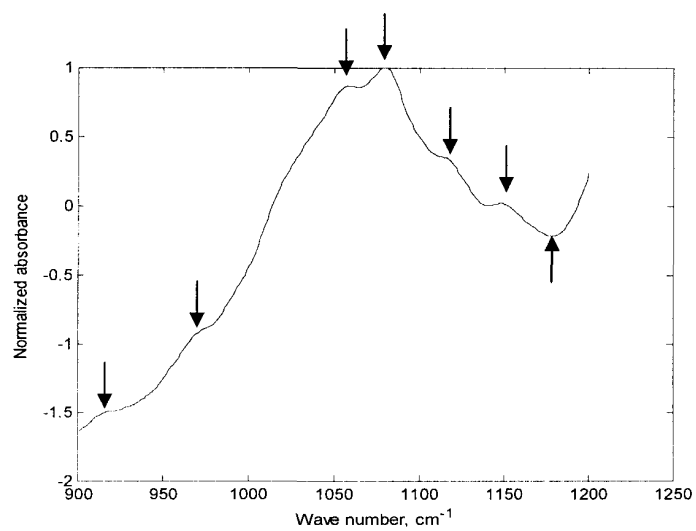


Фиг. 13В

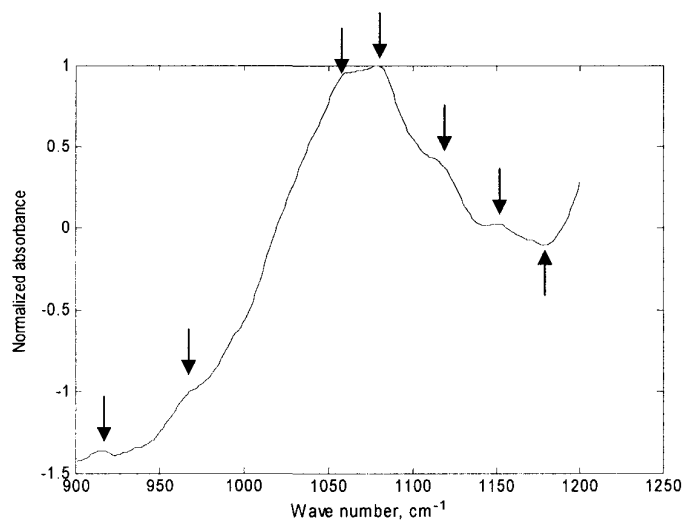


Фиг. 13С

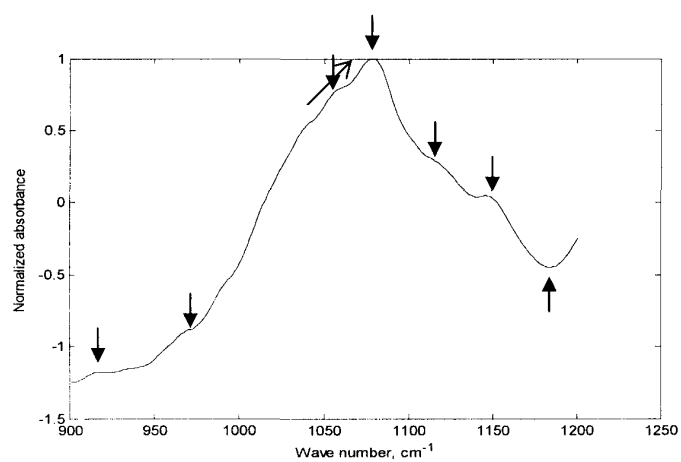
033790



Фиг. 14А

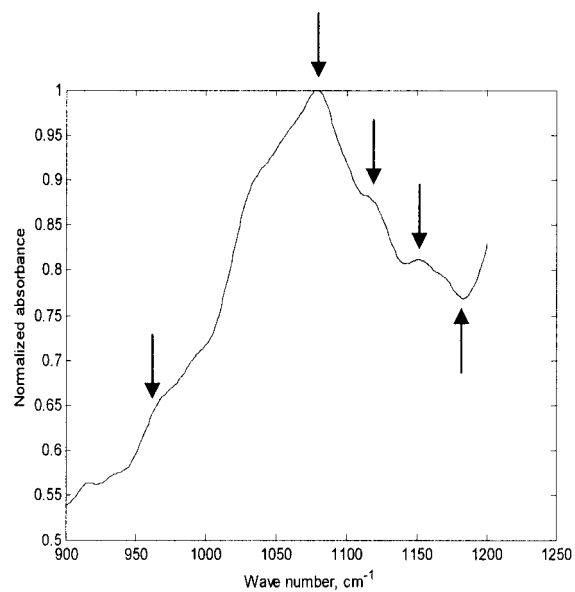


Фиг. 14В

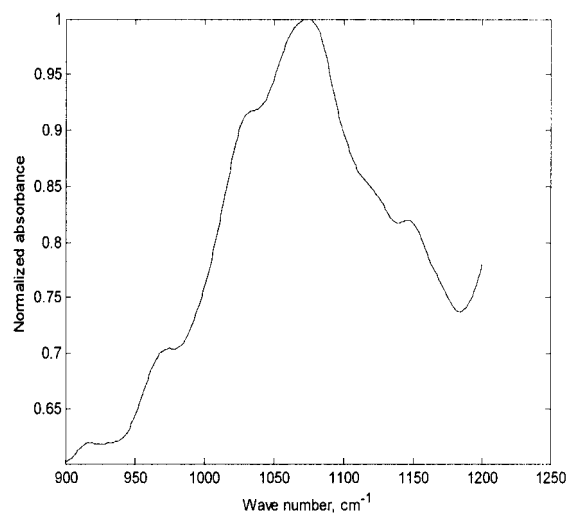


Фиг. 15

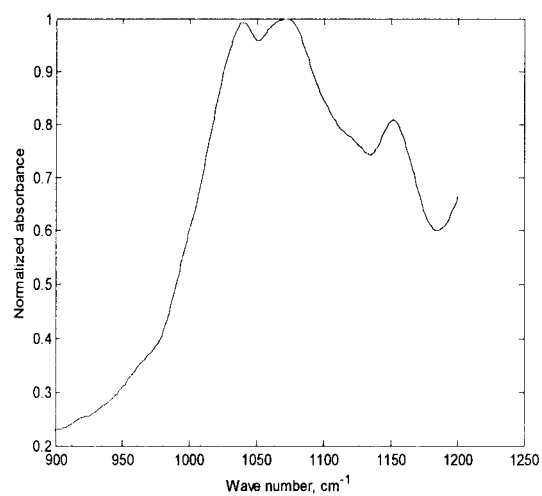
033790



Фиг. 16А

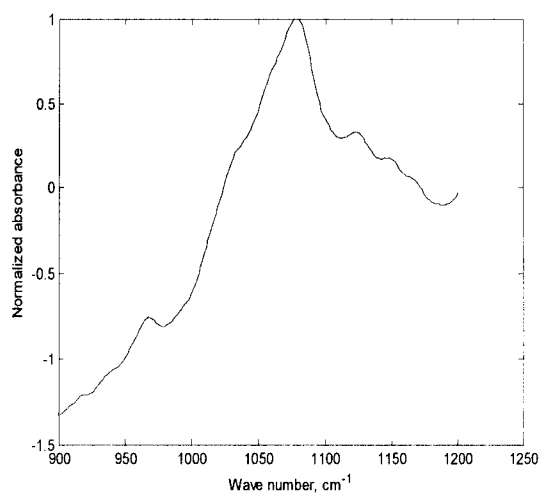


Фиг. 16В

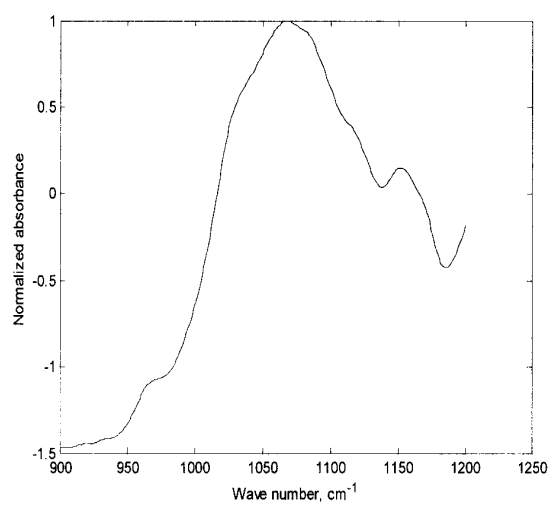


Фиг. 16С

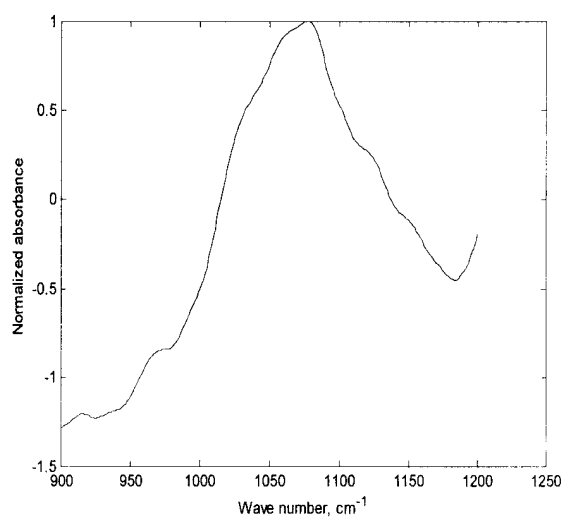
033790



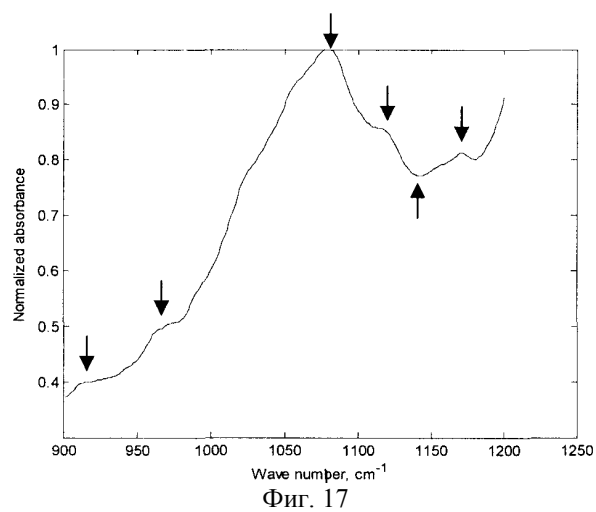
Фиг. 16D



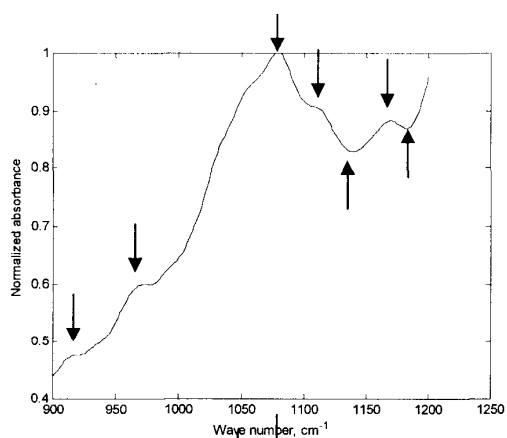
Фиг. 16E



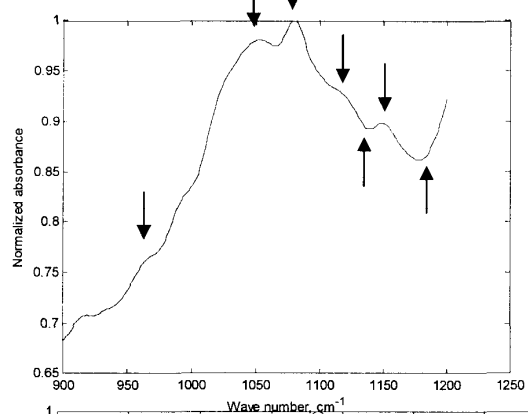
Фиг. 16F



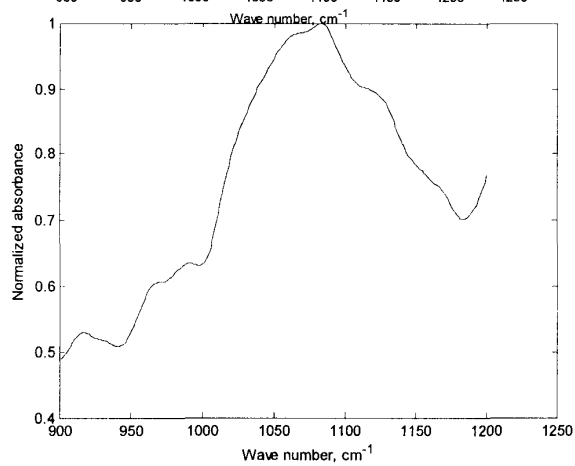
Фиг. 17



A



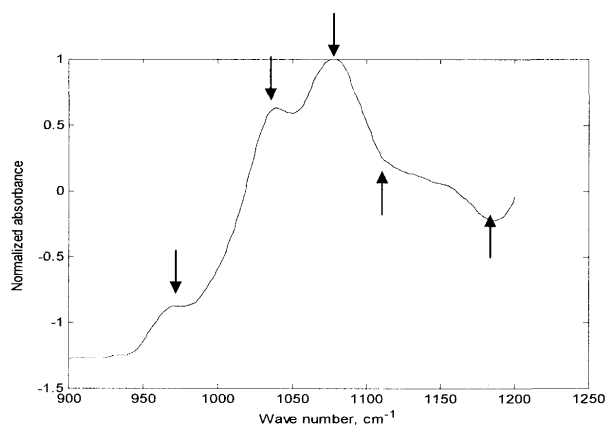
B



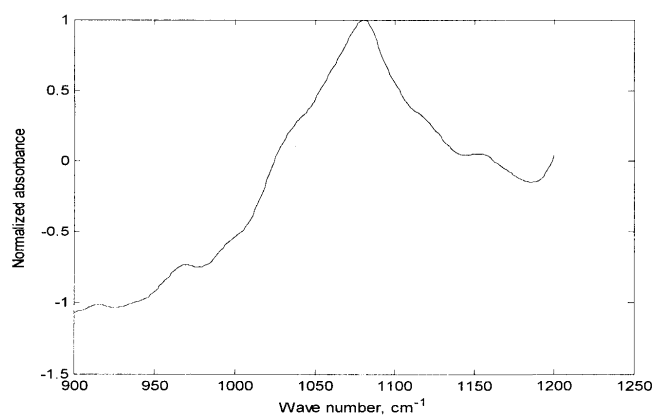
C

Фиг. 18А-С

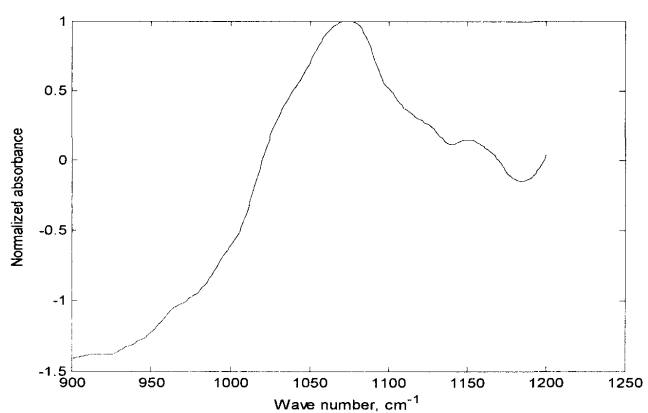
033790



A

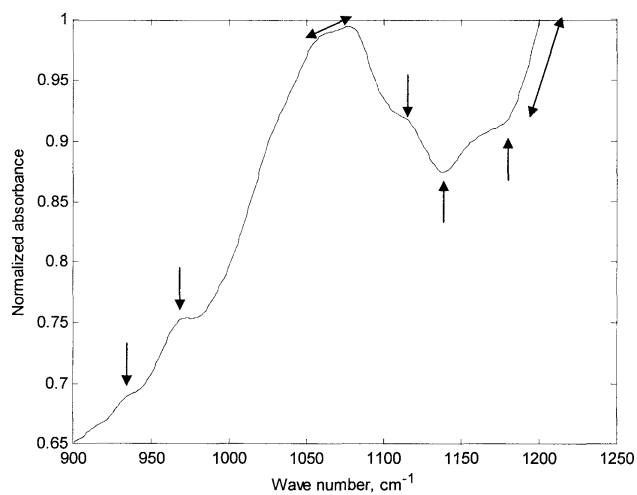


B

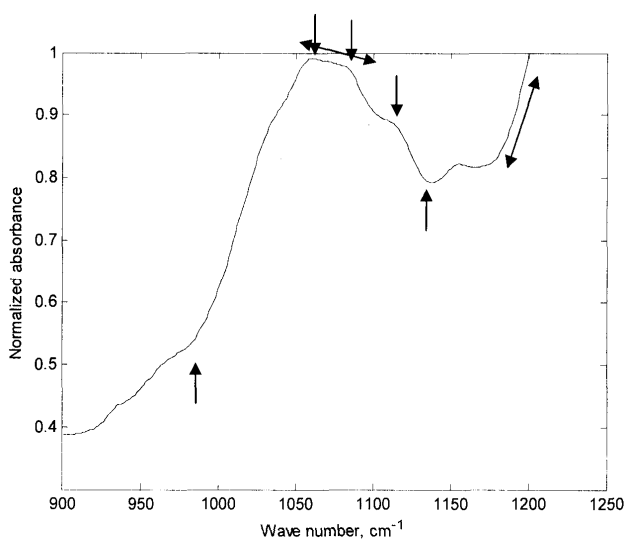


C

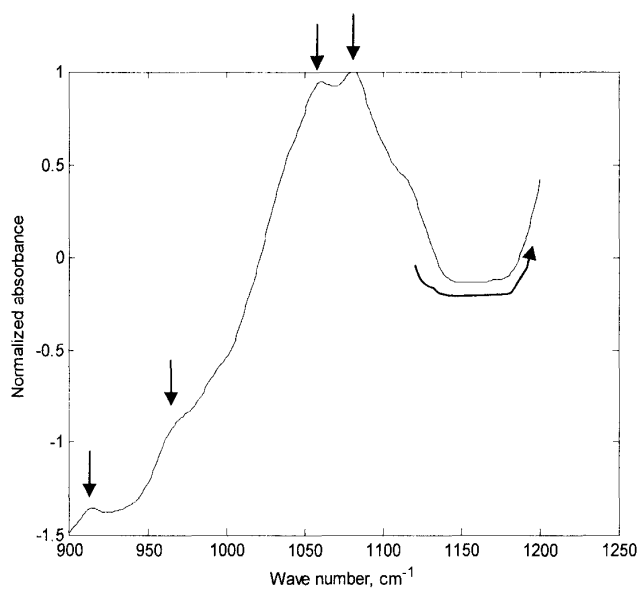
Фиг. 19А-С



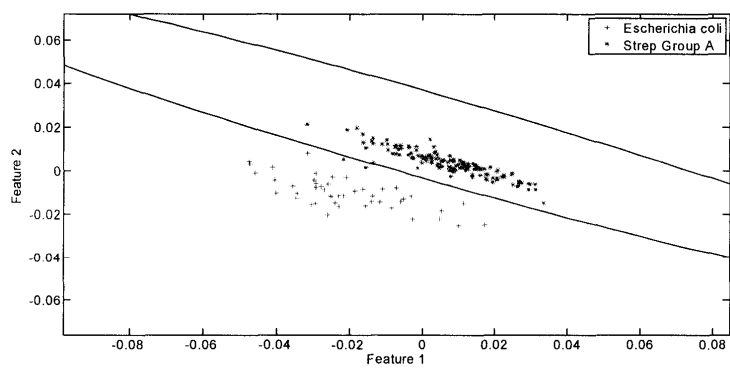
Фиг. 20



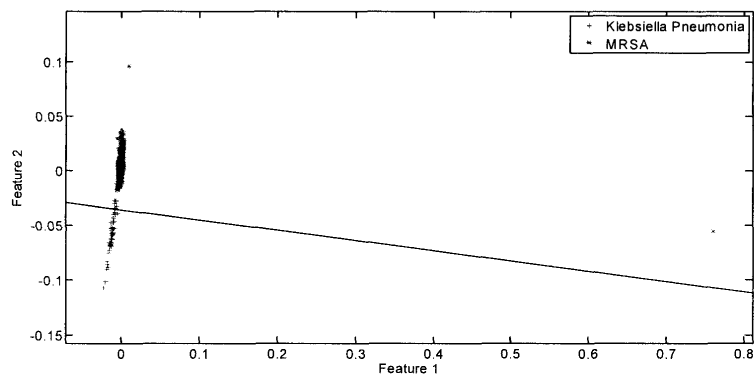
Фиг. 21



Фиг. 22



A



B

Фиг. 23А-В

