

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392827

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.13

(51) Int. Cl. C12Q 1/18 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.05

(54) ПРОДУКТЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ И МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

(31) 63/170,838

(32) 2021.04.05

(33) US

(86) PCT/IB2022/053170

(87) WO 2022/214965 2022.10.13

(71)(72) Заявитель и изобретатель:

ТЕЦ ВИКТОР ВЕНИАМИНОВИЧ;
ТЕЦ ГЕОРГИЙ ВИКТОРОВИЧ (RU)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к способам гибкой регуляции клеточного роста эукариотических и прокариотических клеток. В конкретных вариантах реализации регуляция роста эукариотических и микробных клеток происходит путем контроля их взаимодействия с факторами окружающей среды, питательными средами, добавками к средам и дополнениями.



202392827

A1

A1

202392827

Продукты для регуляции роста эукариотических и микробных клеток

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] В настоящем изобретении предложены новые автоматизированные системы, тест-системы, способы приготовления тест-систем для контроля и регулирования роста эукариотических и прокариотических клеток, регулирования взаимодействия микроорганизмов с физическими, химическими, биологическими, экологическими факторами, включая антимикробные агенты, и контроль микробного разнообразия. Также предложены способы и средства для выделения ранее некультивируемых бактерий и грибов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Сегодня одним из важнейших вопросов для различных областей медицины, ветеринарии и биологии является способность контролировать и регулировать рост эукариотических и микробных клеток и их реакцию на внешнюю среду и клеточное разнообразие *in vitro*. Способность к гибкой регуляции клеточного роста является ключевым фактором для применения в различных процессах, начиная с лабораторной практики, включая идентификацию ранее некультивируемых микроорганизмов, выбор эффективных химиотерапевтических агентов и биопроизводство. Такая модуляция *in vitro* роста эукариотических и микробных клеток требует точной модуляции взаимодействия клеток с факторами окружающей среды, питательными условиями, добавками к средам, факторами роста, способности готовить высокоиндивидуализированные среды с запрограммированным составом по отношению к объекту выращивания, исследования, позволяющее контролировать взаимодействие микроорганизмов и эукариотических клеток с физическими, химическими, биологическими факторами окружающей среды, изменять скорость роста различных еще не культивируемых бактерий и/или грибов в смешанных микробных сообществах и их взаимодействия с факторами хозяина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ниже описаны различные неограниченные аспекты и варианты осуществления изобретения.

[0003] Способ культивирования ранее некультивируемых микроорганизмов; получения микроорганизмов с желаемыми свойствами; направленной селекции интересующих микроорганизмов с неограничивающими примерами грамположительных, грамотрицательных, палочек, кокков, коккобацилл, вибрионов, нитевидных микроорганизмов, спирохет.

- [0004] Способ культивирования ранее некультивируемых бактерий с последовательностью 16s рРНК, показывающей <97% достоверной идентификации, выращенных на питательной среде в виде чистой или смешанной бактериальной культуры.
- [0005] Биотехнологические продукты, содержащие бактерии и/или грибы и/или вирусы.
- [0006] Биотехнологические продукты, содержащие аэробные и/или анаэробные бактерии.
- [0007] Биотехнологические продукты ПП и ММ, представляющие собой бактерии и/или грибы.
- [0008] Биотехнологические продукты, содержащие бактерии и/или грибы (включая первичные патогены и/или микробные модуляторы) из группы, состоящей из бактерий, грибов (т.е. дрожжи, плесени), простейших, с неограничивающими примерами бактерий и грибов (*Pseudomonadales*, *Aeromonadales*, *Legionellales*, *Pasteurellales*, *Vibrionales*, *Burkholderiales*, *Alphaproteobacteria*, *Spirochaetia*, *Lactobacillales*, *Bacillales*, *Enterobacterales*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia*, *Myxomycota*, *Oomycota*, *Zygomycota*), с неограничивающими примерами *Aeromonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Burkholderia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Chlamydomonada*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Treponema*, *Ureaplasma*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Talaromyces*, *Sporothrix*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Saccharomyces*.
- [0009] Способ, где микроорганизмы анализируются до и после или вместе с ПЦР, транскриптомным анализом, метагеномным секвенированием и другими генетическими, биохимическими, микробиологическими способами (например, окрашивание, микроскопия).
- [00010] Биотехнологические продукты, включающие антибиотики, отобранные с помощью тест-системы, используемой для выбора антибиотиков, которые могут нормализовать состояние пациентов (неограничивающий пример - пациенты в критическом состоянии) и улучшить такие параметры, как бактериальная и/грибковая нагрузка в месте инфекции, бактериальная и/грибковая нагрузка в органах, не являющихся местом инфекции, бактериальная и/грибковая нагрузка в крови и других биологических жидкостях, провоспалительные маркеры, объем воздуха, выдохнутого в течение первой секунды

(ОФВ), лихорадка, отеки, токсемия, выживаемость, количество и длительность госпитализации и/или лечения антибиотиками, и/или уменьшение времени пребывания в отделении интенсивной терапии и/или уменьшение времени после начала применения антибиотиков и/или разрешения инфекционного процесса и/или уменьшение времени, необходимого для заживления ран, и/или времени применения антибиотиков и/или времени применения антибиотиков широкого спектра действия в течение первых 96 ч и/или с 4 по 28 день применения выбранного антибиотика, изменение количества бактерий и грибов, выделенных из места инфекции и или других частей макроорганизма.

[00011] Биотехнологические продукты, включающие в себя выбранные антимикробные агенты, используемые для эмпирической терапии и/или адаптации текущей противомикробной терапии.

[00012] Биотехнологические продукты, включающие в себя выбранные антимикробные агенты, используемые для профилактики

[00013] Биотехнологические продукты, включающие в себя выбранные антимикробные агенты, используемые в течение первых 2,5 часов после нанесения в виде покрытия материала.

[00014] Биотехнологические продукты, включающие в себя выбранные антимикробные агенты, используемые в течение первых 4 ч после нанесения в виде покрытия материала.

[00015] Биотехнологические продукты, включающие в себя выбранные антимикробные агенты, используемые для преодоления резистентности, толерантности, видовой устойчивости, устойчивости, связанной с биопленочной формой существования, замедленным ростом и персистенцией.

[00016] Биотехнологические продукты, включающие в себя перситеры, выбираемые из *P.aeruginosa*, *Klebsiella*, *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella spp*,

[00017] Способ лечения инфекций, вызванных бактериями и/или грибами, которые образуют смешанные биопленки

[00018] Способ лечения инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, а также лечения и/или профилактики рецидивирующих инфекций.

[00019] Способ фаговой терапии.

[00020] Биотехнологические продукты, включающие в себя антимикробные агенты и/или нуклеазы и/или другие дополнительные вещества, добавляемые непосредственно к биообразцу и/или среде, культивируемому при различных магнитных условиях.

[00021] Способ анализа микробного роста и/или Первичный патоген (ПП) и/или Микроорганизм-Модулятор (ММ), проводимый путем анализа метаболизма, появления или отсутствия микробного роста смешанных микробных культур и/или анализа морфологии, размера, цвета, биохимических, электрических и других характеристик смешанных бактериальных сообществ или сред, на которых они растут.

[00022] Способ анализа роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ, проводимый путем анализа метаболизма, появления или отсутствия роста микроорганизмов до заранее определенного порога.

[00023] Способ, где ПП и ММ растут на плотной питательной среде.

[00024] Устройство, включающее в себя диагностическую систему в виде многолуночных планшетов.

[00025] Способ и устройства, создающие условия, при которых экспрессия генов устойчивости к антибиотикам ПП аналогична таковой в месте инфекции, причем неограничивающий пример – регуляция посредством ММ.

[00026] Способ, где питательная среда дополнительно обогащается органическими компонентами из очага инфекции.

[00027] Биотехнологические продукты, включающие в себя биообразцы с добавлением буфера (например, воды, фосфатносолевого буфера, раствора NaCl, питательной среды, биологического материала от одного и того же субъекта), гомогенизации (например, вихревой), фильтрации (например, включают этап фильтрации через фильтр с размером пор 0.8, 1.0, 1.2 микрометра для выделения микроорганизмов).

[00028] Способ, где тестируемые биообразцы хранятся при комнатной температуре и/или при +4, и/или замораживаются до обработки.

[00029] Способ, где одновременно анализируется воздействие от 1 до 10 000 различных антимикробных агентов и их комбинаций и/или модификаций на микроорганизмы одного и того же биообразца.

[00030] Способ, где антибиотики добавляются на основе моделирования и симуляции фармакокинетики (ФК)/фармакодинамики (ФД) в организме млекопитающих, оптимизируя эффективность назначенной схемы приема антибиотиков.

[00031] Способ, где антимикробные агенты добавляются в питательную среду в концентрациях, соответствующих различным ФК/ФД параметрам в месте инфекции и/или в системном кровообращении и/или в органе-мишени.

[00032] Способ, где исследуемые вспомогательные вещества и/или антимикробные вещества вносятся в питательную среду до культивирования микроорганизмов и/или одновременно и/или после и/или добавляются к биообразцам.

[00033] Способ, где эффективность антибиотиков против ПП и/или ММ оценивается в течение 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24 или от 24-48ч, 48-120ч после нанесения.

[00034] Способ, где питательные среды, используемые для культивирования бактерий и/или грибов, включая ПП и/или ММ, содержат агар, витамин В12, аскорбиновую кислоту, нитрат аммония, сульфат аммония, экстракт говядины, альфа-кетоглутарат, экстракт говяжьего сердца, пчелиные продукты, биотин, Vitone H Plus, гидролизаты тканей животных, хлорид кальция, кукурузный крахмал, L-цистеин, декстрозу, дигидрофосфат калия, D-маннитол, сульфат железа, фолиевая кислота, желатин, глюкоза, ЧС1, магний, хлор, сульфат магния, сульфат марганца, ниацин, никотинамид, пара-аминобензойная кислота, панкреатический гидролизат казеина, панкреатический гидролизат желатина, пантотеновая кислота, пантотенаты, пептический гидролизат животных тканей, пептон, сульфат калия, протеоз-пептон, рибофлавин, хлорид натрия, растворимый крахмал, крахмал, сахароза, тиамин, трис, триптический гидролизат говяжьего сердца, триптон, дрожжевой экстракт, сульфат цинка, ACES-буфер, хлорид калия, тиогликолевая кислота, микологический пептон (ферментативный гидролизат казеина и животных тканей), компоненты мясного бульона, эритроциты, цельная кровь, а также ее составляющие, аминокислотный пептон, гидролизат белка, настои и экстракты, факторы роста, полученные из крови, сыворотка, дрожжевой экстракт, витамины, НАД, сахар, спирты, углеводы, фосфаты, ацетаты, цитраты, минеральные соли и металлы, фосфат, сульфаты, кальций, железо, селективные агенты, химикаты, антимикробные препараты и красители, индикаторные красители, феноловый красный, нейтральный красный, уплотняющие агенты, агар, желатин, альгинат, силикагель, вода, сыворотка, фосфатно-солевой буфер, галактоза.

[00035] Способ, где тест-система после внесения биодобавок культивируется при температуре от 27°C до 42°C

[00036] Способ, где подбираются активные против смешанной культуры ПП и ММ антибиотики, а комбинированная тест-система позволяет найти эффективные антибиотики узкого спектра действия, которые, хотя и активны исключительно против грамположительных бактерий, оказываются активными и против грамотрицательных бактерий и/или, когда антибиотики, активные исключительно против грамотрицательных бактерий, оказываются активными против грамположительных бактерий.

[00037] Устройство, представляющее собой автоматизированную систему, позволяющую автоматически изготавливать тест-систему в соответствии с

индивидуальными запросами врачей, которая может включать набор любых антибиотиков и их концентраций в зависимости от очага инфекции и состояния пациента.

[00038] Устройство, представляющее собой автоматическую систему, имеющую запас питательных сред, планшетов с различным количеством лунок, добавок к средам и различные антибиотики, используемые в клинической практике.

[00039] Устройство, представляющее собой автоматическую систему, которая может заранее подготовить тест-системы, которые будут использоваться чаще всего, и позволит хранить их при соответствующей температуре и влажности.

[00040] Способ, где анализ "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков микробного роста осуществляется с использованием агаровой поверхности и проводится при (i) определенном фиксированном расстоянии между образцом и камерой, (ii) использовании определенной длины волны, (iii) определенном диаметре рассеивания и (iv) определенном угле между тест-системой и камерой.

[00041] Способ, где анализ определения "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ проводится невооруженным глазом.

[00042] Способ, где для анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов и/или ПП используются фото- и/или видеокамеры.

[00043] Способ, где для анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов и/или ПП используются фото- и/или видеокамеры с экспозицией от ISO от 50 до 12800 и выдержкой от до 30 секунд.

[00044] Способ, где для анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов и/или ПП используется специальное программное обеспечение для модификации фото- и/или видеоданных.

[00045] Способ, где анализ "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков микробного роста и/или ПП и/или ММ проводится при увеличении от 0.1x до 1000x.

[00046] Способ, где анализ "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков микробного роста и/или ПП и/или ММ проводится с использованием фиксированного расстояния между образцом и детектором (т. е. камерой), неограниченные примеры которого составляют 4-5 см, 7-10 см, 12-18 см.

[00047] Способ, где анализ "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков микробного роста и/или ПП и/или ММ проводится, избегая бликов на поверхности носителя или микробных колоний.

[00048] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ в одной и той же лунке проводится в течение времени, при этом изображение делается в любом диапазоне от 1 до 300 минут.

[00049] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ в нескольких лунках проводится в течение времени, причем анализ проводится в любом диапазоне от 1 до 300 минут и может быть проанализирован невооруженным глазом и/или с помощью программного обеспечения для визуализации и/или искусственного интеллекта.

[00050] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ и или отсутствия роста микроорганизмов в одной и/или нескольких лунках проводится постоянно с помощью видеозаписи.

[00051] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ в одной и той же лунке проводится в течение определенного времени, при этом изображение может делаться в любом диапазоне от 1 до 48 часов.

[00052] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ в нескольких лунках проводится в течение определенного времени, причем анализ может проводиться в любом диапазоне от 1 до 48 часов и может быть проанализирован невооруженным глазом и/или с помощью программного обеспечения для визуализации и/или искусственного интеллекта.

[00053] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ в одной и той же лунке проводится в течение определенного времени с помощью флуоресцентных красителей, добавленных в среду или биопробу, и последующего ее культивирования на среде, дополненной антимикробными агентами, для визуализации наличия метаболизма, появления или отсутствия роста микроорганизмов путем измерения уровня интенсивности флуоресценции.

[00054] Способ, где анализ роста микроорганизмов и/или ПП и/или ММ в одной и той же лунке проводится путем измерения уровней интенсивности флуоресцентного излучения, определяемого с помощью антител или изотопных индикаторов.

[00055] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов невооруженным глазом путем сравнения роста между разными временными точками и/или разными антибиотиками и/или смесью антибиотиков и/или отсутствием антибиотиков.

[00056] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов с помощью оптических приборов, т. е.

микроскопа с увеличением (1x, 1.5x, 2x -10x 10x-40x, 40x-1000x) со специальными красителями или без них.

[00057] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков микробного роста с помощью метаболомного анализа веществ внеклеточного матрикса.

[00058] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов с фотографическим сравнением роста между различными временными точками и/или различными антибиотиками и/или смесью антибиотиков и/или отсутствием антибиотиков.

[00059] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов с помощью видео, сравнивающего рост между различными временными точками и/или различными антибиотиками и/или смесью антибиотиков и/или отсутствием антибиотиков.

[00060] Устройство, представляющее собой тест-систему как микрофлюидное устройство

[00061] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится с использованием специфических красителей для обнаружения роста микроорганизмов.

[00062] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков микробного роста с помощью машинного обучения и/или алгоритмов искусственного интеллекта и/или алгоритмов прогнозирования.

[00063] Способ, где исследование антимикробной активности вещества, добавленного в агар, проводится на основе анализа "появления", "прогрессирования" или отсутствия признаков роста микроорганизмов с использованием различных считывающих устройств, причем неограничивающими примерами являются 3D, динамические, отражающие свет и сенсорные технологии, использование света с определенной длиной волны.

[00064] Способ, где для изучения роста микроорганизмов используются специальные метки, неограничивающим примером которых являются ДНК-метки к ПП и/или ММ.

[00065] Способ, где эффект антибиотиков для подавления роста бактерий изучается от 2 до 18 часов

[00066] Автоматизированное устройство для изготовления питательных сред и культивирования микроорганизмов, внесения добавок в питательные среды, а также способы их использования, отличающиеся тем, что они позволяют индивидуально изготавливать среды с запрограммированными составами применительно к объекту исследования, контролировать взаимодействие микробов с факторами окружающей среды, изменять интенсивность роста различных, в том числе еще не культивированных бактерий и грибов, в составе смешанных биопленок, изменять скорость роста микробов, определять действие на них антибиотиков, а также устройства и способы регистрации результатов этих действий.

[00067] Устройство для выращивания микроорганизмов, обеспечивающее автоматизированный процесс приготовления питательной среды с определенными параметрами, нанесения биообразцов на среду, обработки биообразцов при определенной температуре и/или магнитном поле и/или содержании CO₂ и анализа данных для выявления особенностей роста микроорганизмов.

[00068] Устройство, представляющее собой автоматическую систему представляющую собой специальную станцию, способную на основе маркировки на планшете определять базовые/сырые данные данной тест-системы, поддерживать условия и температуру, необходимые для роста микроорганизмов/клеток, и периодически сканировать зонды для регистрации наличия и/или отсутствия и/или изменения роста.

[00069] Устройство, представляющее собой автоматизированную систему, оснащенную записывающим устройством, которое позволяет определить наличие роста, проанализировать эти данные и сформулировать рекомендации по использованию antimicrobial агентов для лечения конкретного пациента с последующей отправкой информации врачу.

[00070] Способ, где питательная среда, используемая для культивирования микроорганизмов (т.е. первичных патогенов и/или модуляторов микроорганизмов), дополнительно дополнена или имеет внутренние и внешние части и/или покрытия, используемые для изменения магнитного, электрического и/или электромагнитного поля, в качестве неограниченных примеров можно привести использование фольги, металлов, металлических покрытий, металлических коробок, металлических боксов, специальных оболочек, мю-металла, магнитного экранирования, компонентов с никель-железными компонентами, материалов с ферромагнитным сплавом и т.д. для изменения магнитного и/или электромагнитного поля, влияющего на рост микроорганизмов.

[00071] Способ, где бактерии и/или грибки из очага инфекции могут быть сконцентрированы из биообразцов (неограниченными примерами которых являются кровь,

цереброспинальная жидкость, асцит) перед посевом на тест-систему с помощью различных способов, неограничивающими примерами которых являются центрифугирование, и/или разведение с добавлением дополнительной части биообразцов, питательной среды, буфера.

[00072] Способ, где для приготовления тест-систем различной конструкции и/или культивирования микроорганизмов с использованием питательных сред, средовых добавок и факторов роста, способов их использования, отличающихся тем, что возможны создание специализированных сред с определенным составом для оптимального состояния объекта исследования и/или регуляция, контроль взаимодействия микроорганизмов и эукариотических клеток с физическими, химическими, биологическими факторами окружающей среды, и/или изменение скорости роста различных неограниченных примеров еще не культивируемых бактерий, грибов в составе смешанных микробных сообществ, изменение и/или усиление роста микроорганизмов и/или их синтетической активности, и/или определение влияния на них антимикробных агентов для выбора эффективных и/или неэффективных антимикробных агентов и/или их комбинаций, в том числе с как можно более узким спектром действия и/или с наиболее высоким профилем безопасности и/или наиболее дешевых и/или с определенным путем введения, активных против (1) микроорганизмов с лекарственной устойчивостью и/или (2) существующих персистеров или персистеров, которые могут образовываться в ходе антибиотикотерапии инфекции и/или (3) спорообразующих бактерий, (4) рецидивирующих инфекций, проводимый одновременный анализ комбинированного действия антимикробных препаратов на основной патоген (ПП) и модуляторы микроорганизмов (ММ), а также устройства и способы учета результатов этих действий, где указанный образец включает по меньшей мере один из группы, включающую в себя жидкости, воду, пищу, напитки, биологические жидкости, ткани, микробные зонды, фармацевтические препараты, ткани и жидкости млекопитающих, воздух, почву, смывы с поверхности, мазки и любую их комбинацию для использования в биофармацевтическом производстве, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, биоинженерии, разработке и открытии лекарств, экологии, исследовании космоса, космических технологиях, для людей с измененными метаболическими параметрами, которые изменяют фармакокинетику и фармакодинамику лекарств у взрослых и/или детей, в частности.

[00073] Устройство, представляющее собой автоматическую или полуавтоматическую станцию/комплекс для подготовки тест-систем различной конструкции с индивидуальными запрограммированными свойствами, набора антимикробных веществ и различных добавок в различных концентрациях и комбинациях, маркировки всех деталей и свойств конечного

продукта и создания его электронного паспорта, подготовки тестируемого материала для засева тест-систем, проведения посева тестируемого материала на тест-систему, обеспечения роста микроорганизмов с различной толерантностью к кислороду в заданных условиях, контроля роста микробов, учета результатов этого роста и/или результатов эффективности антибиотиков, а также внесения результатов в базу данных и/или отправки их по указанному адресу/назначению.

[00074] Устройство, где блок регистрации автоматической или полуавтоматической станции/комплекса учитывает результаты роста микроорганизмов в тест-системе и/или результаты эффективности антимикробных препаратов и добавляет результаты в базу данных и/или отправляет их по указанному адресу/назначению.

[00075] Устройство, отслеживающее рост и/или учитывающее результаты этого роста и/или результаты эффективности антибиотиков через определенные промежутки времени с помощью неограниченных примеров цифровой фотографии, регистрации в видимом и/или ультрафиолетовом и/или красном спектрах и/или компьютерных изображений с неограниченным примером расчета значений градаций серого и вычисления гистограмм, и/или фотометрии, и/или колориметрии и/или проводимости/электрического сопротивления среды.

[00076] Устройство, включающее в себя тест-систему, в которую встроены датчики, позволяющую различными способами отслеживать состояние отдельных клеток, которое меняется в зависимости от присутствия и характера роста и метаболизма микроорганизмов

[00077] Устройство, где контроль роста микроорганизмов на поверхности среды осуществляется под углом от 1 до 10 и/или от 10 до 30 и/или 30-45 и/или 45-90 градусов к детектирующему датчику.

[00078] Устройство, включающее в себя тест-систему, содержащую градиенты концентрации каждого антимикробного агента в одной зоне и/или в виде отдельных изолированных зон, отражающие их фармакокинетику в определенных тканях и органах от нуля до максимального количества.

[00079] Устройства, включающие в себя биорегулируемые Tetz-инкубаторы и/или CO₂-инкубаторы и/или термостатические комнаты для культивирования бактерий и/или грибов и/или клеток, которые позволяют контролировать и/или регулировать геомагнитное поле и/или электромагнитное воздействие и/или изменения геомагнитной активности и/или изменения магнитного поля Земли.

[00080] Устройства, включающие в себя инкубаторы, контейнеры (неограниченными примерами которых являются ферментеры, баки, биореакторы), конверты, пакеты, лабораторная посуда, лабораторные принадлежности имеют корпус/детали из металла,

обеспечивающего заданную степень защиты, и/или их комплексы с диэлектриками (например, пластик или бумага, комбинации медных камер с цинком и асбестом).

[00081] Устройства, включающие в себя инкубаторы, контейнеры (неограниченными примерами которых являются ферментеры, резервуары, биореакторы), конверты, пакеты, лабораторная посуда, лабораторные принадлежности, культуральные пластины, имеющие оболочку/компоненты из фольги и/или их комплексов с диэлектриками.

[00082] Устройства, включающие в себя инкубаторы, контейнеры (неограниченными примерами которых являются ферментеры, резервуары, биореакторы), конверты, пакеты, лабораторная посуда, лабораторные принадлежности, культуральные пластины, имеющие оболочку/компоненты из мю-металла и/или фольги и/или их комплексов с диэлектриками.

[00083] Устройства, где мю-металл используется для изменения и/или усиления микробного роста и/или синтетической активности и/или секреции и/или экспрессии генов с неограниченными примерами природных и/или модифицированных и/или полученных эукариотических или прокариотических продуцентов молекул и/или белков, представляющих интерес, систем экспрессии белков, фаговый дисплей и систем сверхэкспрессии рекомбинантных белков для использования в неограниченных примерах медицины, биотехнологии, биопроизводства, пищевой промышленности.

[00084] Устройства, включающие в себя инкубаторы, контейнеры (неограниченными примерами которых являются ферментеры, резервуары, биореакторы), конверты, пакеты, лабораторная посуда, лабораторные принадлежности, культуральные пластины, имеющие оболочку/часть из мю-металла и/или фольги и/или их комплексов с диэлектриками для культивирования клеток, используемые для анализа окружающей среды, экологии с неограниченными примерами геомагнитных изменений, магнитного поля и/или волн, радиации.

[00085] Устройства, где добавки и факторы роста для питательных сред и обработки биообразцов по пункту 1, позволяют регулировать рост различных микроорганизмов, включая те, которые находятся в смешанных микробных сообществах, путем добавления рибавирина (от 0.1 -1000.0 мкг/мл), ацикловира (от 0.1 -1000.0 мкг/мл), оротата лития от 0.1 -1000.0 мкг/мл), оротата калия (от 0.1 -1000.0 мкг/мл), производных 2-хлор-5-фенил-5Ч-пиримидо[5',4':5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4-ол (от 0.1 -1000.0 мкг/мл), нуклеаз (неограниченные примеры: ДНКаза (от 0.1 -1000.0 мкг/мл) и/или РНКаза (от 0.1 -1000.0 мкг/мл), ингибиторов транскриптазы и/или интегразы и/или ингибиторов протеаз, неограниченные примеры: невирапин, этравирин, ламивудин, тенофовир, абакавир, ралтегравир (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл), которые могут быть использованы для модуляции роста микроорганизмов и/или синтетической активности и/или секреции и/или экспрессии

генов, изменения соотношения роста различных микроорганизмов, включая влияние на *Firmicutes*, *Gracilicutes* *Mollicutes*, кислотоустойчивые бактерии, дрожжи, плесень и культуры эукариотических клеток.

[00086] Устройства, где питательная среда используется для ускоренного роста грибов (дерматофитов, дрожжей, плесневых грибов), неограниченными примерами которых являются *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Talaromyces*, *Sporothrix*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Saccharomyces*, *Saprolegnia*, *Erysiphe*, *Clavicens*, *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Shoem*, *Helmintosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Absidia*, *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Risopus*, *Eurotium*, включая комбинированный рост различных грибов и/или бактерий в смешанных микробных сообществах, которые можно обнаружить во внешней среде, почве, воде, книгах, предметах искусства, объектах, связанных с людьми, животными растениями, грибами, вызывающими заболевания млекопитающих и растений, включающих: картофельный отвар от 0.1 до 500 мл; настой из кукурузной муки от 0.1 до 100 мл; овсяной муки от 10 до 350 мл; сердечно-мозговой бульон от 0.001 до 100.0 г; картофельно-морковного отвара от 10 до 350 мл; декстрозы/глюкозы 40 г; пептона 10 г; сахарозы от 0.001 до 100.0 г; целлобиозы, от 0.001 до 100.0 г; дрожжевого экстракта от 0.001 до 20.0 г; мальтозы от 0.001 до 100.0 г; NaNO_3 от 0.001 до 10.0 г; K_2CPO_4 от 0.001 до 10.0 г; MgSO_4 от 0.001- 10.0 г; KCl от 0.001 до 10.0 г; FeSO_4 от 0.001 до 40.0 г; Zn SO_4 от 0.001 до 5,0 г; MnCl_2 от 0.001 до 5,0 г, Твин 80 от 0.001 до 10 мл, тиамин от 0.001 до 5,0 мг, биотин от 0.001 до 4,0 мг; агар от 0 до 100 г, производные оротата от 0.001 до 500 г; эритроциты от 0 до 100 мл, антибиотики для подавления роста бактерий (такие как хлорамфеникол, цефалоспорины, тетрациклин).

[00087] Способ, где тест-система используется для экспресс-выявления грибов (дерматофитов, дрожжей, плесеней), неограниченными примерами которых являются *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Talaromyces*, *Sporothrix*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Saccharomyces*, *Saprolegnia*, *Erysiphe*, *Clavicens*, *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Shoem*, *Helmintosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Absidia*, *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Risopus*, *Eurotium*,

[00088] Способ, где для экспресс-отбора антибиотиков, эффективных против грибов, противогрибковые агенты выбираются из неограниченных примеров производных азола (кетоконазол, флуконазол, изавуконазол, итраконазол, позаконазол и вориконазол), эхинокандины (анидулафунгин, каспофунгин, аминокандин, микафунгин), аллиламинов

(тербинафин, нафтин, толнафтат), полиенов (нистатин, амфотерицин В), флуцитозина, ибрексафунгерпа, антисептиков, дезинфицирующих средств.

[00089] Способ, где тест-система позволяет одновременно выращивать максимальное количество и/или разнообразие неродственных микроорганизмов, присутствующих в месте инфекции, что позволяет регистрировать ранний рост микроорганизмов различными способами и определять эффективность использования антимикробных препаратов, добавляемых в среду благодаря их действию на микробный(е) модулятор(ы), контролирующей в месте инфекции свойства основного патогена(ов), путем культивирования биообразцов и/или бактерий и/или грибов на среде с неограниченными примерами, такими как: агар с солями желчных кислот, тиосульфат-цитратный агар с сахарозой и смесью желчных солей, агар с желчью, эскулином и азидом, кровяной агар, шоколадный агар, угольный кровяной агар, сердечный бульон, циклосерин-фруктозный агар, циклосерин-яично-желточный агар, солевой яично-желточный агар, щелочной яично-желточный агар, кровяной сахарный агар, среда Флетчера, среда МакКонки, агар маннит-солевой, сывороточная среда Хисса, среда Лёффлера, агар Мюллера-Хинтона, питательный агар, мясо-пептонный бульон, непитательный агар, пептонная вода, среда Пайка, анаэробно стерилизованная среда, среда Робертсона, полужидкий агар, среда для кампилобактерий, бульон Хайна, триптон соевый бульон, тиогликолевый бульон, минимальная среда, агар из кукурузной муки, картофельно-декстрозный агар, соковый агар, дрожжевой экстракт, агар с экстрактом солода, агар сальмонелла шигелла, агар гектоеновый, бульон Фразера, DMEM, фетальная телячья сыворотка, налидиксовая кислота, фосфатно-солевой буфер, тетратионатный бульон, агара Сабуро, LB бульон, LB агар, колумбийский бульон, колумбийский агар, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, бруцелла-агар, водный агар, агар Эмерсона, подкисленный агар с кукурузной мукой, картофельно-морковный агар, солодовый агар, и их комбинации.

[00090] Способ, где для получения чистой культуры культивированных и некультивированных микроорганизмов используют тест-систему по пунктам 1 и 2, в которой микроорганизмы субкультивируют из зон и/или лунок, содержащих и/или не содержащих антимикробные агенты.

[00091] Способ, где анализ признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. первичного патогена и/или микроорганизмов-модуляторов) проводится путем визуального осмотра (т.е. невооруженным глазом, микроскопом), или путем обнаружения изображения с неограниченными примерами: фотографии, видео, компьютерных изображений, фотометрии, колориметрии с неограниченным примером расчета значений серого и

вычисления гистограмм, с или без автоматической программы и/или алгоритма ИИ и/или программного обеспечения; способы распознавания и обработки изображений, спектрофотометрия, сканеры, лазеры, с неограниченными примерами, когда анализ поверхности носителя проводится при (i) определенном фиксированном расстоянии между образцом и камерой (ii) используется определенная длина волны, (iii) определенный угол между тестовой системой и камерой (с неограниченным примером от 1 до 10 и/или от 10 до 30 и/или 30-45 и/или 45-90 градусов угол к детектирующему датчику); осуществляется путем сравнения фотоизображений одних и тех же лунок, дополненных интересующим антимикробным средством в течение определенного периода времени или любых их комбинаций, и/или сравнения с ростом в других лунках, и/или сравнения с заранее определенным порогом роста.

[00092] Способ, где результаты, полученные тест-системой, позволяют получить данные об эффективности антимикробных агентов в кратчайшие сроки на основе попарного сравнения роста микроорганизмов в одних и тех же лунках за различные периоды времени, когда эффективность антибиотика оценивается путем мониторинга признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. основного патогена и/или модуляторов микроорганизмов) в течение определенного периода времени или любых комбинаций в неограниченных примерах перечисленных ниже периодов времени от: от 0 до 1 часа, от 0 до 2 часов, от 1 часа до 2 часов, от 0 часов до 3 часов, от 1 часа до 3 часов, от 2 часов до 3 часов, от 0 часов до 4 часов, от 1 часа до 4 часов, от 2 часов до 4 часов, от 0 часов до 5 часов, от 1 часа до 5 часов, 2ч до 5ч, 3ч до 5ч, 0ч до 6ч, 1ч до 6ч, 2ч до 6ч, 3ч до 6ч, 4ч до 6ч, 0ч до 8ч, 1ч до 8ч, 2ч до 8ч, 3ч до 8ч, 4ч до 8ч, 0ч до 9ч, 1ч до 9ч, 2ч до 9ч, 3ч до 9ч, 4ч до 9ч, 5ч до 9ч, 0ч до 12ч, 1ч до 12ч, 2ч до 12ч, 4ч до 12ч, 8ч до 12ч, 0ч до 18ч, 1ч до 18ч, 2ч до 18ч, 4ч до 18ч, 6ч до 18ч, 0ч до 24ч, 1ч до 24ч, 2ч до 24ч, 4ч до 24ч, 12ч до 36ч, 24ч до 36ч.

[00093] Способ, где эффективность антибиотика оценивается путем мониторинга признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. основного патогена и/или микроорганизмов-модуляторов) на агаре в лунках, содержащих интересующий антибиотик, в различные временные точки, включая фиксированное время 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 часов роста.

[00094] Способ, где биообразцы помещают в тест-систему с добавлением в среду антимикробных агентов в концентрациях (меньше максимальной концентрации в месте инфекции), соответствующих средней концентрации антимикробных агентов, достижимой в месте инфекции и/или системном кровообращении в различные временные точки после введения антимикробных агентов, неограниченными примерами которых являются:

концентрация антимикробного препарата от 0 до 1 часа (C0-1ч), C1-2ч, C0-2ч, C1-2ч, C0-3ч, C1-3ч, C2-3ч, C0-4ч, C1-4ч, C2-4ч, C3-4ч, C0-5ч, C1-5ч, C2-5ч, C3-5ч, C4-5ч, C0-6ч, C1-6ч, C2-6ч, C3-6ч, C4-6ч, C5-6ч, C0-7ч, C1-7ч, C2-7ч, C3-7ч, C4-7ч, C5-7ч, C0-12ч, C2-12ч, C4-12ч, C6-12ч, C8-12ч, C0-24ч, C6-24ч, C12-24ч.

[00095] Способ, где тест-система содержит среду, дополненную антимикробным(и) препаратом(ами), концентрация которого(ых) выбрана из значений, которые могут быть достигнуты в месте инфекции в течение времени, достаточного для элиминации и/или подавления роста микроорганизмов (неограниченные примеры времени в пределах 30 минут, 2 часов, 3 часов).

[00096] Способ, где модели эффективности антибиотиков создаются с различными вероятностями.

[00097] Способ, где тест-система позволяет максимально быстро (неограничительный пример - от 2 до 6 ч) выбрать антибиотик, который избирательно активен против определенных бактерий и/или грибов в микробной смеси.

[00098] Способ, где концентрации антибиотиков, добавляемых в тест-систему, выбираются на основе особенностей фармакокинетики, которая зависит от способа введения антибиотика индивидууму, неограниченные примеры: топически, энтерально, перорально, парентерально, ингаляционно, интраназально, ректально, вагинально.

[00099] Способ, где антибиотики в тест-системе выбираются для лечения бактериальных и/или грибковых инфекций, неограниченными примерами которых являются инфекции уха, синусов, бронхит, боль в горле, легочные инфекции (пневмония, муковисцидоз, хроническая обструктивная болезнь легких, туберкулез, микобактериоз, гистоплазмоз, бластомикоз, бронхоэктазы, абсцессы, эмпиема) инфекции кожи и мягких тканей (диабетическая раневая инфекция, ожоги, раны, укусы, импетиго, целлюлит/рожистое воспаление, фолликулит, абсцесс кожи, фурункул, карбункул, некротизирующие инфекции мягких тканей), гинекологические инфекции, родовые инфекции, офтальмологические инфекции, инфекции ротоглотки, инфекции желудочно-кишечного тракта (отравления, язвенные колиты, воспалительные заболевания кишечника), менингит, сепсис, фунгемиа, системный микоз, онихомикоз, инфекции мочевыводящих путей, заболевания, передающиеся половым путем, вульвовагинальный кандидоз, у людей с нормальным или нарушенным иммунным ответом, инфекции, вызванные *Burkholderia spp.*, в том числе у детей и пациентов, перенесших трансплантации легких, инфекции, связанные с персистирующими микроорганизмами и/или вызванные спорообразующими микроорганизмами, и/или рецидивирующие инфекции.

[000100] Способ, где в тест-системе используются культуральные среды и антибиотики (взятые в разных концентрациях), которые позволяют выделить ранее некультивируемые микроорганизмы (ПП и/или ММ) из смешанных сообществ.

[000101] Способ, где антимикробный эффект лекарственных агентов и/или препаратов оценивается против смешанных микробных сообществ (с неограниченными примерами микробных сообществ биообразцов) для (1) сравнительного анализа с активностью других препаратов (2) выбора популяции пациентов для клинических испытаний (3) оценки эффективности действия на людей и животных.

[000102] Способ, где алгоритм выбора антибиотика основан на оценке наибольшей вероятности того, что он будет эффективным и определяется тем, какое значение "X" в уравнении "C 1/x max" является наибольшим.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[000103] Заявка содержит, по крайней мере, один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации патента или патентной заявки с цветным чертежом (чертежами) будут предоставлены ведомством по запросу.

[000104] **На фигуре 1** показан план автоматической или полуавтоматической станции/комплекса для подготовки тест-систем.

[000105] **На фигуре 2** показан план блока регистрации автоматической или полуавтоматической станции/комплекса для подготовки тест-систем.

[000106] **На фигуре 3** показано наличие роста после анализа невооруженным глазом с последующим мониторингом в течение 24 часов с использованием способа (алгоритма) №1 или способа (алгоритма) №2 *

[000107] ММ - смешанная среда (колумбийский агар + мясо-пептонный агар); LB - LB - бульон; МПА - мясо-пептонный агар; КА - колумбийский агар; ША - агар Шедлера

[000108] **На фигуре 4** показано наличие роста после микроскопического исследования с последующим наблюдением в течение 24 часов с использованием способа (алгоритма) №1 или способа (алгоритма) №2 *.

[000109] ММ - смешанная среда (колумбийский агар + колумбийский мясной агар); LB - LB - бульон; МПА – мясо-пептонный агар; КА - колумбийский агар; ША - агар Шедлера.

[000110] *Совокупные данные для всего набора использованных антибиотиков.

[000111] **На фигуре 5** показано отсутствие роста после анализа невооруженным глазом с последующим наблюдением в течение 24 часов с использованием способа (алгоритма) №3 *.

- [000112] **На фигуре 6** показано отсутствие роста после микроскопического исследования с последующим мониторингом в течение 24 ч с использованием способа (алгоритма) №3 * ММ - смешанная среда (колумбийский агар + мясо-пептонный агар); LB - LB - бульон; МПА - мясо-пептонный агар; КА - колумбийский агар; ША- агар Шедлера
- [000113] *Совокупные данные для всего набора антибиотиков.
- [000114] **На фигуре 7** показано наличие роста невооруженным глазом с последующим мониторингом в течение 24ч с использованием Способа (Алгоритма) №1 или Способа (Алгоритма) №2
- [000115] * Совокупные данные по всему набору использованных антибиотиков.
- [000116] **На фигуре 8** показан пример гистограммы серого цвета одного из датчиков, использованных в исследовании.
- [000117] **На фигуре 9** показано влияние различных магнитных и/или электромагнитных полей на разнообразие роста микроорганизмов.
- [000118] **На фигуре 10** показано отсутствие роста невооруженным глазом с последующим наблюдением в течение 24 часов. КК - контроль; Д - ДНКаза; Р - РНКаза; Д+Р - ДНКаза + РНКаза.
- [000119] **На фигуре 11** показано разнообразие бактерий при росте в нормальном магнитном поле, измененном магнитном поле (фольга), измененном магнитном поле (материал: мю-экран) в присутствии и отсутствии антибиотиков.
- [000120] **На фигуре 12** показано использование фольги для увеличения количества клеток (увеличение x10)
- [000121] **На фигуре 13** показано влияние различных инкубаторов на рост микроорганизмов.
- [000122] **На фигуре 14** показано использование устройств, содержащих мю-металл, для мониторинга условий окружающей среды.
- [000123] **На фигуре 15** показано наличие роста после анализа невооруженным глазом с последующим мониторингом в течение 24 часов.
- [000124] **На фигуре 16** показано использование мю-металла и различных параметров агара для регулирования роста бактерий.
- [000125] **На фигуре 17** показано использование мю-металла и различных модификаций агара для регулирования бактериальной памяти.
- [000126] **На фигуре 18** показано использование мю-металлов в тест-системах для контроля состояния здоровья.
- [000127] **На фигуре 19** показано влияние света на рост микроорганизмов в нормальных и измененных геомагнитных условиях.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[000128] Здесь мы впервые предлагаем новый способ контроля роста эукариотических и прокариотических клеток; разработку автоматизированных диагностических методов и тест-систем, в том числе позволяющих выбирать: эффективные антибиотики узкого спектра действия; антибиотики, эффективные против бактерий с лекарственной устойчивостью, включая те, против которых данный антибиотик не эффективен при культивировании в качестве монобактерии; антибиотики, эффективные против персистеров, которые уже присутствуют в месте инфекции или организме; антибиотики для организмов с индивидуальными особенностями метаболизма антимикробных агентов, моделирования роста микроорганизмов, идентичных тем, которые существуют в естественных условиях, предотвращения образования персистеров, и моделирования и/или регулирования такого процесса путем изменения разнообразия клеток. Более подробно реализация способа объясняется на примерах, представленных ниже.

Определения

[000129] Первичный патоген - микроорганизм, который в определенных условиях может быть возбудителем заболевания. В месте инфекции может быть один или несколько первичных патогенов. Первичный патоген выбирается из группы, состоящей из бактерий, грибов (т.е. дрожжи, плесени), простейших, неограниченными примерами семейств бактерий и грибов являются *Pseudomonadales*, *Aeromonadales*, *Legionellales*, *Pasteurellales*, *Vibrionales*, *Burkholderiales*, *Alphaproteobacteria*, *Spirochaetia*, *Lactobacillales*, *Bacillales*, *Enterobacterales*, *Ascomycota* *Basidiomycota* *Chytridiomycota* *Glomeromycota*, *Microsporidia*, *Mycetozoa*, *Oomycota*, *Zygomycota*, с неограниченными примерами родов *Aeromonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Burkholderia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Treponema*, *Ureaplasma*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Talaromyces*, *Sporothrix*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Saccharomyces*, *Saprolegnia*, *Erysiphe*, *Claviceps*, *Cladosporium*,

Bipolaris, Shoem, Helmintosporium, Alternaria, Penicillium, Cladosporium, Alternaria, Epicoccum, Aureobasidium, Absidia, Chrysosporium, Geotrichum, Risopus, Eurotium.

[000130] Микроорганизм - модулятор - микроорганизм, который в определенных условиях может прямо или косвенно модулировать первичные патогены, повышая или понижая чувствительность первичных патогенов к антибиотикам, включая изменение экспрессии генов устойчивости к антибиотикам.

[000131] Эффективный антибиотик - когда антибиотик, эффективный против "основного патогена", выбирается из тех антибиотиков, которые прямо или косвенно воздействуют (в неограниченном примере убивают, уничтожают, уменьшают количество жизнеспособных клеток, подавляют рост) на основной патоген и/или микроорганизм-модуляторы

[000132] Появление и/или прогрессирование признаков роста микроорганизмов включает образование пленки, микроколоний, колоний, газона, биопленки, изменение цвета, изменение цвета красителей-индикаторов, электрических и/или магнитных параметров, отражающих наличие роста клеток и/или метаболизма, изменение флуоресценции и т.д.

[000133] Питательная среда - культуральная среда, подходящая для роста микроорганизмов и/или используемая для культивирования Первичного Патогена и/или Микроорганизмов-Модуляторов и представляющая собой жидкую среду, полужидкую среду, плотную среду.

[000134] Антимикробные агенты - противомикробные средства и/или их комбинации и/или их модификации, неограниченными примерами которых являются аминогликозиды, аннамицин, пенициллины, макролиды, цефалоспорины, хлорамфеникол, гликопептиды, фторхинолоны, бета-лактамы с повышенной активностью, тетрациклины, хинолоны, сульфозамиды, стрептограмин, триметоприм, сульфаметоксазол, мочевые антисептики, липопептиды, оксазолидиноны, нитрофурантоин, нитроимидазол, линкозамиды, азолы, эхинокандин, полиены, тритерпеноиды, пептидные антимикробные агенты, бактериофаги, а также антисептики и дезинфицирующие средства, например, спирты, альдегиды, анилиды, бигуаниды, фенолы, диамидины, галогеновыделяющие агенты, производные металлов, пероксигены, четвертичные аммониевые вещества, вещества в паровой фазе.

[000135] Биорегулируемые Tetz инкубаторы - инкубаторы и/или CO₂-инкубаторы и/или термостатные комнаты для выращивания бактерий и/или грибов и/или клеточных культур, которые позволяют контролировать и/или регулировать геомагнитное поле и/или электромагнитное воздействие и/или изменения геомагнитной активности и/или изменения магнитного поля Земли.

[000136] Биорегулируемые Tetz конверты/контейнеры - позволяют контролировать и/или регулировать влияние геомагнитного поля, радиации, электромагнитных излучений, колебаний геомагнитной активности, изменений магнитного поля Земли и др.

[000137] Биообразцы, включающие по меньшей мере один из неограниченных примеров тканей и жидкостей млекопитающих, например, слюну, мазок, мокроту, бронхо-альвеолярный лаваж, гной, синовиальную жидкость, биологические жидкости (например, сыворотка крови, сыворотка крови плода, плазма, спинномозговая жидкость), грудное молоко, моча, отделяемое ран и/или ожогов, хирургический материал, биопсии тканей пищеварительного тракта, кожа, эпителиальная ткань, соединительная ткань, мышечная ткань, жировая ткань, ареолярная ткань, соматическая ткань, нервная ткань, костная ткань, хрящевая ткань, лимфатическая ткань, фиброзная ткань, ткани мочевыводящих путей, лимфатическая ткань, ткани печени и любые их комбинации, которые могут быть дополнительно изменены неограниченными примерами добавлением растворителя, гомогенизацией, фильтрацией.

[000138] Ингибиторы обратной транскриптазы (невирапин, пенцикловир, тенофовир дизопроксил, зидовудин, фоскарнет, эфавиренц, ставудин, делавирдин, ламивудин, адефовир дипивоксил, этравирин, абакавир)

[000139] Ингибиторы интегразы/рекомбиназы (ралтегравир, долутегравир, биктегравир, каботегравир)

[000140] 2,8-дихлор-5-(4-нитрофенил)-5,9-дигидро-4Н-пиримидо[5',4':5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4,6(1H)-дион (VTL)

[000141] Ингибиторы протеаз (асунапревир, боцепревир, гразопревир, глекапревир, паритапревир, симепревир, телапревир, ампренавир, атазанавир, дарунавир, фосампренавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, ритонавир, саквинавир, типранавир)

ПРИМЕРЫ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[000142] Настоящее изобретение описано и продемонстрировано на следующих примерах. Однако использование этих и других примеров в данной спецификации является исключительно иллюстративным и ни в коем случае не ограничивает объем и значение изобретения или любого приведенного в пример термина. Аналогичным образом, изобретение не ограничивается какими-либо конкретными предпочтительными вариантами, описанными здесь. Действительно, многие модификации и вариации изобретения могут стать очевидными для специалистов в данной области после прочтения данной спецификации, и такие вариации могут быть сделаны без отклонения от духа или

объема изобретения. Таким образом, изобретение ограничивается только условиями прилагаемой формулы изобретения, а также полным объемом эквивалентов, на которые распространяется эта формула.

Пример 1. Автоматизированная система для подготовки тест-систем, обработки биообразцов, обработки тест-систем, регистрации и анализ данных

[000143] Пример устройства, представляющего собой автоматическую или полуавтоматическую станцию/комплекс для подготовки тест-систем с индивидуально настраиваемыми параметрами, представлен на фиг. 1.

[000144] Пример блока регистрации представлен на фигуре 2.

[000145] На фигурах 1 и 2 показана возможная структура автоматизированного устройства для подготовки тест-систем, обработки биообразцов, обработки тест-систем, регистрации и анализа данных.

Пример 2. Определение оптимального угла визуализации для анализа данных

[000146] Мы изучили, может ли угол визуализации влиять на скорость и точность анализа данных.

[000147] Мы использовали образцы эндотрахеального аспирата и мокроты, полученные от пациентов с муковисцидозом. Образцы разводили в фосфатно-солевом буфере и вносили в лунки многолуночных планшетов площадью 1.9 0.95, 0.32 см², заполненных смешанной средой (колумбийский агар+мясо-пептонный агар+5% эритроцитов). Выявление микроколоний или бактериального газона проводился при осмотре планшетов невооруженным глазом под разными углами. Бактериальным газоном считались бактериальные колонии, которые сливались на поверхности агара, образуя «поле» из бактерий. Данные представлены в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Наличие микроколоний (часы) в зависимости от угла визуализации

Биопроба #	Появление микроколоний (часы) в зависимости от угла визуализации								
	0-10°	11-20°	21-30°	31-40°	41-50°	51-60°	61-70°	71-80°	81-90°
1	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4.5
2	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4	3.5	4	6
3	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4.5

Таблица 2. Наличие газона (часы) в зависимости от угла визуализации

	Внешний вид газона (часы) в зависимости от угла обзора
--	--

Биопроба #	0-10°	11-20°	21-30°	31-40°	41-50°	51-60°	61-70°	71-80°	81-90°
1	12	9	10	9	9	10	11	11	12
2	12	12	8	8	12	14	14	15	18
3	12	10	8	8	8	10	12	12	12

[000148] Эти данные недвусмысленно демонстрируют, что использование "появления микроколоний" в качестве индикатора роста микроорганизмов обеспечивает более быструю оценку эффективности антибиотиков по сравнению с наблюдением за "бактериальным газоном", независимо от угла визуализации. Интересно, что мы выявили, что изменение угла наблюдения значительно ускоряет визуализацию роста микроорганизмов.

Пример 3. Влияние алгоритма анализа данных на скорость и точность подбора антибиотиков

[000149] Эндотрахеальный аспират (n=3), мокрота (n=3), БАЛ (n=2), тканевое отделяемое (n=3), полученные от пациентов с вентиляторно-ассоциированной пневмонией были ресуспендированы в фосфатно-солевом буфере и 0.15 мкл засеяли в лунки 24-луночного планшета, заполненные смешанной средой (колумбийский агар + мясо-пептонный агар) (ММ), LB-агаром (LB), мясо-пептонным агаром (МПА), колумбийским агаром (КА) или агаром Шедлера (ША).

[000150] 22 лунки были заполнены средой, дополненной антибиотиками (каждый антибиотик был взят в средней концентрации, достигаемой в легких через 0-4 часа после введения препарата): ампициллин, цефтриаксон, цефтазидим, цефепим, пиперациллин-тазобактам, меропенем, ванкомицин, клиндамицин, цiproфлоксацин, имипенем, левофлоксацин, тобрамицин, амикацин, линезолид, тобрамицин, цефтазидим + тобрамицин, пиперациллин-тазобактам + тобрамицин, пиперациллин-тазобактам + цефепим, Две лунки были свободны от антибиотиков.

[000151] Биопробы наносились на среду с помощью стерильного тампона легким надавливанием на агар круговыми движениями. Планшеты инкубировали при 37С, и анализ наличия/отсутствия микробного роста проводился невооруженным глазом или с помощью микроскопа AmScore с 20-кратным увеличением и 12-мп камерой каждые 15 минут с 0 до 5 часов, затем ежечасно с 5 до 8 часов и затем через 18 и 24 часа после нанесения.

[000152] Использовались три способа (алгоритма) выявления роста бактерий.

[000153] Способ (алгоритм) №1. Лаборант проанализировал появление бактериального роста, сравнив признаки бактериального роста в каждой лунке,

дополненной антибиотиком(ами) в определенный момент времени, с признаками бактериального роста в той же лунке в предыдущий момент(ы) времени.

[000154] Способ (алгоритм) №2. Лаборант проанализировал появление бактериального роста, сравнив признаки бактериального роста в каждой лунке, дополненной антибиотиком(ами), с бактериальным ростом в контроле без антибиотиков

[000155] Способ (алгоритм) №3. Лаборант проанализировал отсутствие роста бактерий в лунках в фиксированные промежутки времени 3.0ч, 3.5ч, 4ч и 24ч. Результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Анализ характеристик роста бактерий в образцах, устойчивых к конкретному антибиотику, после визуального осмотра невооруженным глазом.

Антибиотик	Среднее время (час), когда бактериальный рост стал обнаруживаться в лунках, дополненных определенным антибиотиком									
	Способ (алгоритм) №1					Способ (алгоритм) №2				
	ММ	LB	МПА	КА	ША	ММ	LB	МПА	КА	ША
Без антибиотика	3	3.5	4.5	4	4.5	4	5.5	5.5	4.5	4.5
Ампициллин	3.5	4	3.5	3.5	4	4.5	5	5	5	5
Цефтриаксон	3	4	4	4.5	4	5	6	5	5	5
Цефтазидим	3.5	4.5	4.5	3.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Цефепим	3	3	3	4	3.5	4.5	5.5	6	5.5	5
Пиперациллин-тазобактам	3.5	4	3.5	3.5	4	4	5	4	5.5	5.5
Меропенем	3.5	3.5	4.5	4	4	4.5	4.5	4.5	4.5	5.5
Ванкомицин	3.5	3.5	4	3.5	4.5	4	5	6	5	5
Клиндамицин	3	4.5	4	5	4	4.5	4.5	4.5	4	4.5
Ципрофлоксацин	3.5	4	3.5	3.5	4.5	4.5	5.5	4.5	4.5	5
Имипенем	4	4	4	4	4	4	5	4.5	5	4.5
Левифлоксацин	3	5	5	3.5	4.5	4.5	6	5	5	6
Тобрамицин	3	4	3.5	3.5	3	4.5	5.5	5	6	5.5
Амикацин	3.5	4.5	3.5	5	4	4	5	4.5	5	5
Линезолид	3	3.5	3.5	5	3.5	3.5	6.5	5.5	4.5	4.5
Тобрамицин	3	4	3.5	3.5	4	4	4	5	4	5

пиперациллин-тазобактам	+	3	5	3.5	4.5	4.5	4	5.5	6	5	5.5
цефепим											
цефтазидим	+	3	4	4	4	4.5	4	5.5	6	6	5.5
тобрамицин											
пиперациллин-тазобактам	+	3.5	4	3.5	3.5	4	4.5	5	5	5	4.5
тобрамицин											
Среднее		3.3	4.0	3.9	4.0	4.1	4.3	5.2	5.1	4.9	5.0

[000156] ММ - смешанная среда (колумбийский агар + колумбийский мясной агар);
 LB - LB - агар; МПА - колумбийский мясной агар; КА - колумбийский агар; ША - агар Шедлера

Таблица 4. Выявление роста бактерий после микроскопического исследования

Антибиотик	Среднее время (час), когда бактериальный рост стал обнаруживаться в лунках, дополненных определенным антибиотиком									
	Способ (алгоритм) №1					Способ (алгоритм) №2				
	ММ	LB	МПА	КА	ША	ММ	LB	МПА	КА	ША
Без антибиотика	3	3	4	3.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Ампициллин	3	3	3.5	3	4	4	5	5	5	5
Цефтриаксон	3	3.5	3.5	4.5	3	4.5	5	4.5	4.5	5
Цефтазидим	3.5	4	4	3.5	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Цефепим	3	3	3	3.5	3	4.5	5	5	4.5	5
Пиперациллин-тазобактам	3.5	4	3.5	3.5	3.5	4	4	4	3.5	3.5
Меропенем	3.5	3.5	4	3.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Ванкомицин	3.5	3.5	3.5	3.5	4	4	4	4	4	4
Клиндамицин	3	3	3.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.0	4.5
Ципрофлоксацин	3.5	4	3	3.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.0
Имипенем	4	4	4	3	4	4	5	4.5	3.5	4.5
Левифлоксацин	3	4	4	3.5	3.5	4.5	5.5	4.5	4.5	5.5
Тобрамицин	3	3	3.5	3	3	4.5	5.5	5	5.5	5.5
Амикацин	3	4	3.5	4.5	3.5	4	5	4.5	5	5
Линезолид	3	3	3	4	3.5	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5

Тобрамицин		3	3.5	3.5	3	3	4	3.5	3.5	4	4
пиперациллин- тазобактам	+	3	4	3	4	4	4	4.5	4	4	4.5
цефтазидим тобрамицин	+	3	4	3.5	3.5	4	4	5.5	5.5	5.0	5.5
пиперациллин- тазобактам	+	3.5	4	3.5	3	4	4.5	5	5	5	4.5
тобрамицин											
Среднее		3.2	3.6	3.5	3.6	3.7	4.2	4.7	4.5	4.4	4.6

[000157] ММ - смешанная среда (колумбийский агар + колумбийский мясной агар); LB - LB - агар; МПА - колумбийский мясной агар; КА - колумбийский агар; ША - агар Шедлера

[000158] Заключение. Выявление наличия бактериального роста (с помощью способа (алгоритма) №1), путем сравнения появления (прогрессирования) микробного роста в течение времени в одной лунке, дополненной антибиотиком, позволяет быстрее подобрать эффективные антибиотики по сравнению со способом (алгоритмом) №2), когда наличие бактериального роста оценивается путем анализа наличия бактериального роста в лунках, дополненных антибиотиками, по сравнению с контрольными лунками без антибиотиков.

[000159] Далее мы проанализировали, насколько точны результаты, полученные при мониторинге ранних признаков роста микроорганизмов с точки зрения их прогрессирования до роста в течение первых 24 ч. Нас особенно интересовали возможные большие ошибки (вариации между средними), определяемые как случаи, когда, согласно тест-системе, антибиотик был эффективен (рост микроорганизмов отсутствовал) в первые временные точки 2.5-5 ч, но затем рост микроорганизмов прогрессировал с появлением микроколоний при последующем культивировании в течение 24 ч. Данные представлены на фигурах 3, 4.

[000160] Заключение: как видно, использование Способа (Алгоритма) №1, сравнивающего признаки роста бактерий в каждой лунке, дополненной антибиотиком(ами) в определенный момент времени, с признаками роста бактерий в той же лунке в предыдущий момент времени, обеспечивает более точный анализ данных со значительно меньшим количеством очень серьезных ошибок. Использование смешанных сред дает более точные результаты по сравнению с другими средами. Использование микроскопа повышает точность полученных данных.

[000161] Далее мы проверили, насколько анализ отсутствия роста бактерий в различные фиксированные временные точки является точным с точки зрения последующего прогрессирования роста микроорганизмов при последующем культивировании в течение 24 ч (фигура 5).

[000162] Заключение: Использование метода (алгоритма) №3, основанного на мониторинге отсутствия роста бактерий, показывает более достоверные результаты в более короткие временные промежутки, чем применение того же способа (алгоритма) №3.

[000163] Метод (алгоритм) №2: Применение смешанных питательных сред дает более точные результаты по сравнению с использованием других культуральных сред. Включение микроскопического исследования слегка улучшает точность получаемых данных.

Пример 4. Новая композиция питательной среды, используемая для повышения скорости культивирования грибов и их разнообразия

[000164] Новая питательная среда (Смешанная среда 1) для культивирования грибов была подготовлена следующим образом: на 1 литр воды взвешивали следующие компоненты среды: 200 г картофельного отвара, 50 мл настойки кукурузной муки, 350 мл отвара овсяной муки, 300 мл картофельно-морковного отвара, 30 г сахарозы, 20 г целлобиозы, 4 г дрожжевого экстракта, 40 г мальтозы, 2.0 г NaNO₃, 1.0 г K₂HPO₄, 0.5 г MgSO₄, 0.5 г KCl, 1 г FeSO₄, 0.1 г ZnSO₄, 0.1 г MnCl₂ и 10 мл Твин-80.

[000165] Смешанная среда 1 (ММ1) была стерилизована автоклавированием при давлении 1.0 атм и температуре 120°C в течение 20 минут. Для оценки разнообразия и скорости роста грибов, различные штаммы грибов из коллекции Института микробиологии человека (Нью-Йорк, США) культивировали на ММ1 и на агаре Сабуро, после чего проводили визуальную оценку роста грибов за период менее 6 часов.

[000166] Результаты сравнения новой питательной среды ММ1 с агаром Сабуро представлены в таблице 5.

Таблица 5. Видимый рост грибов на питательных средах

Грибы (spp.)	Видимый роста грибов на питательной среде в течение <6 ч	
	Смешанная среда #1	Сабуро-агар
<i>Candida</i>	+	-
<i>Aspergillus</i>	+	+
<i>Mucor</i>	+	-

<i>Trichophyton</i>	+	-
<i>Blastomyces</i>	+	-
<i>Cryptococcus</i>	+	-
<i>Pneumocystis</i>	+	-
<i>Paracoccidioides</i>	+	-
<i>Histoplasma</i>	+	-
<i>Coccidioides</i>	+	-
<i>Talaromyces</i>	+	-
<i>Sporotrix</i>	+	-
<i>Fusarium</i>	+	+
<i>Malassezia</i>	+	-
<i>Microsporum</i>	+	-
<i>Saccharomyces</i>	+	-
<i>Saprolegnia</i>	+	-
<i>Helmintosporium</i>	+	-
<i>Penicillium</i>	+	-
<i>Eurotium</i>	+	-
<i>Chrysosporium</i>	+	-
<i>Cladosporium</i>	+	-
<i>Alternaria</i>	+	-

[000167] Анализ результатов выявил, что предложенная питательная среда ММ1 способствует культивированию наибольшего количества грибов в течение менее чем 6 часов, в сравнении с другими общепринятыми питательными средами, применяемыми для выращивания грибов.

Пример 5. Влияние алгоритма анализа данных на скорость и точность подбора противогрибкового антибиотика

[000168] Мазки из полости рта (n=6), полученные от пациентов с подтвержденным кандидозом полости рта, вызванным *C.albicans*, не-*albicans Candida spp. Aspergillus spp*, растворяли в фосфатно-солевом буфере и по 0.1 мкл вносили в 12 лунок тест-системы, заполненных смешанной средой 1 (см. выше), смешанной средой 2 (агар Сабуро + картофельно-декстрозный агар + витамины В12 + В7) (ММ2), агаром Сабуро (СА), картофельно-декстрозным агаром (КДА), агаром Сабуро с инфузорией сердца (SABHI). 11 лунок были заполнены средой с добавлением антибиотиков (взяты средние концентрации

каждого антибиотика, достигаемые в легких в разные моменты времени после введения препарата) - нистатин, амфотерицин В, клотримазол, флуконазол, исавуконазол, тербинафин, позаконазол, вориконазол, анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин. В одной лунке антибиотики отсутствовали.

[000169] Планшеты инкубировали при 30С, и анализ наличия/отсутствия микробного роста проводился каждые 15 минут с 0 до 5 часов, затем ежедневно с 5 до 8 часов и затем через 18 и 24 часа после нанесения невооруженным глазом.

[000170] Использовались три способа (алгоритма) выявления роста грибов.

[000171] Способ (алгоритм) №1. Лаборант проанализировал появление грибкового роста, сравнив признаки грибкового роста в каждой лунке, дополненной антибиотиком(ами) в определенный момент времени, с признаками грибкового роста в той же лунке в предыдущей(их) точке(ах) времени.

[000172] Способ (алгоритм) №2. Лаборант проанализировал появление грибкового роста, сравнив признаки грибкового роста в каждой лунке, дополненной антибиотиком(ами), с грибковым ростом в контроле без антибиотиков

[000173] Способ (алгоритм) №3. Лаборант проанализировал отсутствие грибкового роста в лунках в фиксированные промежутки времени 3.5 ч; 5 ч и 24 ч. Результаты представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Анализ признаков грибкового роста невооруженным глазом в образцах, которые были устойчивы к определенному антибиотику

Антибиотик	Среднее время (час), когда грибковый рост стал обнаруживаться в лунках, дополненных определенным антибиотиком									
	Способ (алгоритм) №1					Способ (алгоритм) №2				
	ММ 1	ММ 2	СА	КД А	SABH I	ММ 1	ММ 2	СА	КД А	SABH I
Без антибиотика	4	5	6	6	6.5	5	5.5	5.5	8	7.5
Нистатин	4	4.5	6	5	5.5	4.5	6	6	6.5	7.5
Амфотерицин В	3	5	6.5	4.5	6	5	5	7	7.5	8
Клотримазол	3.5	4.5	5	7.5	6.5	4.5	6.5	7.5	8.5	6.5
Флуконазол	4	4.5	6.5	5	7.5	5.5	5.5	7	6.5	8
Исавуконазол	5	4.5	6.5	6	7	6	5.5	7.5	7.5	8.5

Тербинафин	4.5	5	5	5	5	4.5	5.5	6.5	8	6.5
Посаконазол	3.5	4.5	5	5	5.5	4.5	5	7	8.5	7
Вориконазол	4	4.5	4.5	5.5	5.5	4.5	4.5	8	6.5	7
Анидулафунгин	4	5	5.5	6.5	6.5	5.5	4.5	6.5	7.5	8.5
Каспофунгин	3.5	5	5.5	6	7	6	5.5	7.5	8	8.5
Микафунгин	4.5	5	6	6	5	4.5	5.5	8	7.5	6.5
Среднее	3.96	4.75	5.59	5.67	6.13	5.00	5.38	7.00	7.54	7.50

[000174] Заключение: выявление наличия грибкового роста с помощью метода (алгоритма) №1, который включает в себя сравнение скорости появления и прогрессирования грибкового роста в течение времени в лунке с добавлением антибиотика, позволяет эффективнее подбирать действующие антибиотики по сравнению с методом (алгоритмом) №2. В последнем методе оценка наличия грибкового роста производится путем выявления бактериального роста в лунках с антибиотиками по сравнению с контрольными лунками без антибиотиков за тот же временной период.

[000175] Дополнительно была проведена оценка точности результатов, полученных при мониторинге ранних признаков грибкового роста и их прогрессирования в течение первых 24 часов. Особое внимание уделялось серьезным ошибкам (вариации между средними), которые определялись как ситуации, когда по данным тест-системы антибиотик был эффективен (то есть бактериальный рост отсутствовал) в первый временной промежуток 4-8 часов, но затем, в течение дальнейшего культивирования на протяжении 24 часов, происходило прогрессирование до появления роста. Результаты представлены на фигуре 7.

[000176] Заключение: использование метода (алгоритма) №1 позволяет проводить более точный анализ данных и существенно снижает количество серьезных ошибок. Применение смешанных питательных сред 1 и 2 демонстрирует более точные результаты по сравнению с использованием других сред.

Пример 6. Использование цифровых изображений для выявления наличия микробного роста.

[000177] Те же образцы мокроты, что использовались ранее, от пациентов с ВАП были разведены в фосфатно-солевом буфере и 0.2 мкл были высеяны с помощью одноканальной пипетки Eppendorf в 12-луночный планшет, заполненный смешанной средой

(колумбийский агар + мясо-пептонный агар + 10% эритроцитов) без добавления антибиотиков.

[000178] Планшеты инкубировали при 37°C, и анализ наличия/отсутствия микробного роста отслеживался каждые 15 минут с 0 до 5 часов с помощью (i) невооруженного глаза или (ii) изображений, полученных на iPhoneX при обычных настройках. Как для (i), так и для (ii) мы использовали фиксированные настройки с фиксированным расстоянием 10 см от глаза/камеры и углом 60°. Изображения, сделанные на цифровую камеру, были преобразованы в оттенки серого, а затем с помощью онлайн-программы <https://www.dcode.fr/image-histogram> была построена гистограмма изображения. Результаты показаны в Таблице 7 и на фигуре 8.

Таблица 7. Выявление признаков роста бактерий невооруженным глазом или с помощью цифрового алгоритма

Номер	Среднее время (час), когда бактериальный рост бактерий обнаруживался невооруженным глазом			Среднее время (час), когда бактериальный рост бактерий обнаруживался согласно анализу гистограммы изображения в оттенках серого		
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	3	3.25	3.25	2.5	2.5	2.5
2	3	3.25	3.25	2.75	2.5	2
3	3	3	3.5	2.75	2.75	3
4	3	3	3.25	3	2.5	2.75
5	3	3.25	3.25	2.5	2.5	2
6	3	3	3.25	2	2.25	2.5
7	3.25	3.5	3.5	2	2.25	2.5
8	3	3	3.25	2.75	2.25	2.75
9	3	3.25	3.25	2.75	3	3
10	3	3	3.5	2.75	2.5	3
11	3.25	3	3.5	2.5	2.75	2.5
12	3	3	3.25	2.75	2.5	2.75
Всего	3.04	3.125	3.33	2.58	2.52	2.60

[000179] Как видно, использование программного обеспечения для анализа изображений позволяет получить более быстрые и надежные результаты по сравнению с невооруженным глазом.

Пример 7. Использование фольги или экрана из мю-металла для изменения видового спектра бактерий, способных расти на выбранных питательных средах

[000180] Мы исследовали, может ли изменение магнитного поля влиять на разнообразие бактерий, культивируемых на питательных средах. В рамках эксперимента 50 мкл биологического образца (мокроты) высевали на среду, состоящую из колумбийского и мясо-пептонного агаров, и инкубировали при 37°C в условиях как нормального, так и измененного магнитного/электромагнитного поля. Модификацию магнитного поля осуществляли, выращивая бактерии при мю-экранировании или помещая их в чашку Петри, упакованную в фольгу.

[000181] Микроскопические исследования проводились с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti и объективов Nikon Plan Fluor ×100/1.30 Oil Ph3 DLL и Plan Apo ×100/1.40 Oil Ph3. Морфология бактерий определялась с помощью окрашивания клеточных мембран метиленовым синим или окрашиванием по Граму (Sigma). Результаты эксперимента представлены в таблице 8 и на фигуре 9.

[000182] Было ясно видно, что разнообразие бактерий значительно изменилось после изменения магнитного и/или электромагнитного поля, и что изменение магнитного и/или электромагнитного поля с неограниченными примерами использования фольги и/мю-материалов может быть использовано для модуляции микробного разнообразия.

Таблица 8. Микроскопическое исследование разнообразия бактерий после культивирования в различных магнитных и/или электромагнитных полях

Бактерии	Распределение бактерий		
	Нормальное магнитное поле	Мю-экранирование	Фольга
Грамположительные кокки	+++++	+++	+++
Грамотрицательные палочки	0	++	++

[000183] Было ясно видно, что разнообразие бактерий значительно изменилось после изменения магнитного и/или электромагнитного поля, и что изменение магнитного и/или

электромагнитного поля с неограниченными примерами использования фольги и/мю-материалов может быть использовано для модуляции микробного разнообразия.

Пример 8. Влияние нуклеаз на скорость роста бактерий.

[000184] Эндотрахеальный аспират (n=3), мокрота (n=3), БАЛ (n=2), тканевое отделяемое (n=3), полученные от пациентов с пневмонией были разведены в фосфатносолевом буфере и 0.1 мл были высеяны в 12 лунок тест-системы, заполненных смешанной средой (колумбийский агар + мясо-пептонный агар + 10% эритроцитов). 9 лунок были заполнены средой, дополненной нуклеазами (ДНКаза I, РНКаза, ДНКаза + РНКаза), взятыми в различных концентрациях до 100 мкг/мл.

[000185] Планшеты инкубировали при 37°C, и выявление наличия/отсутствия роста микроорганизмов отслеживалось каждые 15 минут с 0 до 5 часов, затем ежечасно с 5 до 8 часов и затем через 18 и 24 часа после внесения невооруженным глазом или с помощью микроскопа AmScore с 20-кратным увеличением и 12-Мп камерой. Результаты представлены в Таблице 9.

Таблица 9. Выявление признаков роста бактерий в образцах, устойчивых к определенному антибиотику

Средний время (час), когда бактериальный рост обнаруживался в лунках, дополненных определенным антибиотиком							
Невооруженным глазом				Микроскопическое исследование			
КК	Д	Р	Д+Р	КК	Д	Р	Д+Р
3	2.5	2.75	2.75	3	2.5	2.5	2.5

КК - контроль; Д - ДНКаза; Р - РНКаза; Д+Р - ДНКаза + РНКаза

[000186] Мы провели анализ точности результатов, полученных при мониторинге ранних признаков роста микроорганизмов, особенно в течение первых 24 часов. Особое внимание уделялось крупным ошибкам (вариация между средними), которые определялись как случаи, когда согласно результатам тест-системы, антибиотик был эффективен (то есть бактериальный рост отсутствовал) на начальной стадии (2.5-5 часов), но затем, после продолжения культивирования на протяжении 24 часов, наблюдалось появление роста (фигура 10).

[000187] Выводы: культивирование биологических образцов на среде с добавлением нуклеаз или обработка образцов разными концентрациями нуклеаз способствует ускоренному росту бактерий. Это позволяет проводить более точный анализ на ранних стадиях роста, уменьшая количество ошибок.

Пример 9. Влияние изменения магнитного и/или электромагнитного поля на бактериальное разнообразие и чувствительность микроорганизмов в присутствии антимикробных агентов

[000188] Далее мы изучили, может ли изменение магнитного поля повлиять на разнообразие бактерий, выращенных на питательных средах в присутствии антибиотика. Для этого мы поместили 50 мкл биообразца (мокроты) в среду, состоящую из колумбийского и мясо-пептонного агаров, и инкубировали разное время при 37°C в нормальном или измененном магнитном/электромагнитном поле. Мы модулировали измененное магнитное поле, выращивая бактерии при мю-экранировании или в чашках Петри, упакованных в фольгу. Антибиотики добавляли в среду в средних концентрациях, достижимых в месте инфекции через 4 ч после введения

[000189] Эффективность антибиотика определялась по наличию или отсутствию роста бактерий невооруженным глазом в течение 24ч культивирования. Микроскопический анализ проводился с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti (объективы Nikon Plan Fluor ×100/1,30 Oil Ph3 DLL и Plan Apo ×100/1,40 Oil Pч3). Морфологию бактерий определяли путем окрашивания метиленовым синим или окрашивания по Граму (Sigma). Результаты представлены в таблицах 10, 11 и на фигуре 11.

Таблица 10. Влияние различных магнитных и/или электромагнитных полей на эффективность антибиотиков

	Нормальное магнитное поле	Фольга	Мю-экранирование
Амоксицилина клавуланат	S	R	R
Азитромицин	R	R	R
Цефтриаксон	S	S	S
Левофлоксацин	S	S	S
Меропенем	S	S	S
Линезолид	S	R	R
Амикацин	R	S	R
Ванкомицин	R	R	S
Клиндамицин	R	R	R
Цефепим	S	S	S

R-устойчивый (т.е. отсутствие роста бактерий); S-чувствительный (т.е. наличие роста бактерий)

Таблица 11. Микроскопическое исследование разнообразия бактерий после культивирования в различных магнитных и/или электромагнитных полях

Бактерии	Распределение бактерий		
	Нормальное магнитное поле	Фольга	Мю-экранирование
Гр+ микрококки	+	+	+
Гр+ диплококки	-	+	-
Гр+ стрептококки	+	-	+
Гр+ палочки	+	+	+
Гр+ коринеформные бактерии	-	+	-
Палочки	-	+	+
Гр-кокки	-	-	+
Гр- нитевидные палочки	-	+	+

Заключение: Наблюдения показали, что рост бактерий в различных магнитных и электромагнитных полях, модулированных с помощью мю-металла или фольги, оказывает различное влияние на многообразие микроорганизмов, способных к росту на питательной среде. Это позволяет эффективно отбирать разнообразные типы бактерий и способствует активному росту определенных видов бактерий. Применение магнитного или электромагнитного экранирования с использованием мю-металла усиливает разнообразие грамотрицательных палочковидных бактерий в культуре, в то время как использование фольги повышает разнообразие как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий в смеси, а также увеличивает количество фенотипов, демонстрирующих рост.

Пример 10. Влияние изменения магнитного и/или электромагнитного поля на рост и характеристики эукариотических клеток

[000190] Далее мы изучили, могут ли изменения магнитного поля повлиять на рост эукариотических клеток. Для этого 5×10^5 клеток CHO-K1 (48-часового монослой) выращивали на чашках Петри с культуральной средой DMEM (Gibco), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой и 1% смеси пенициллина/стрептомицина (Invitrogen) при 37°C, увлажненной 5% CO₂ среде, в течение 24 часов (Sanyo MCO-19AIC).

[000191] Мы моделировали измененное магнитное поле, выращивая бактерии в контейнерах из фольги толщиной 50 микрон. Микроскопия проводилась с помощью Axiovert 40 CFL (Zeiss). Результаты показаны в Таблице 12 и на фигуре 12.

Таблица 12. Использование фольги для увеличения количества клеток

	Контроль	Выращивание в фольге
Количество клеток в трех полях микроскопа	256	395

[000192] Эти данные ясно показывают, что использование фольги увеличивает синтетическую активность клеток и их количество.

Пример 11. Использование мю-металла для изменения роста эукариотических клеток

[000193] Чтобы выяснить роль мю-металла в ускорении роста эукариотических клеток, мы использовали *C. glabrata* MR-V32. Стандартный инокулят для тестирования дрожжей составлял 2.5×10^3 КОЕ/мл, грибы культивировали в течение 24 ч при 35°C в бульоне Сабуро. Контрольную группу грибов выращивали в инкубаторе Sanyo (MCO-19AIC), или помещали в мю-металлический конверт собственного производства, помещенный в инкубатор Sanyo (MCO-19AIC), или помещали в мю-металлический бокс, помещенный в инкубатор Sanyo (MCO-19AIC). OD600 сразу после засева, через 6 и 24 часа роста определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (ThermoFisher Scientific, США). Результаты представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Мю-металл для изменения роста эукариотических клеток

	OD 600								
	Контроль			Мю-конверт			Мю-бокс		
	0ч	6ч	24ч	0ч	6ч	24ч	0ч	6ч	24ч
<i>C. glabrata</i> MR-V32	0.025	0.992	4.345	0.03	1.345	>10000	0.025	2.358	>10000

[000194] Эти данные показывают, что культивирование эукариотических клеток в мю-металле увеличивает синтетическую активность клеток и их количество.

Пример 12. Использование новых инкубаторов для выращивания микроорганизмов с уникальными свойствами и/или модулированием условий для роста микроорганизмов, как в месте инфекции

[000195] Мы сравнили свойства микроорганизмов непосредственно в месте инфекции, когда они культивировались в специально разработанном инкубаторе, и в коммерчески доступных инкубаторах.

[000196] В качестве коммерческих инкубаторов мы использовали инкубатор Sanyo с железно-никелевой камерой Sanyo, имеющую ферромагнитные свойства, усиливающую геомагнитное поле, и CO₂-инкубатор Heracell 150i (Thermo Fisher Scientific) с медной камерой. Имеющей диамагнитные свойства, ослабляющую геомагнитное поле.

[000197] Мы разработали четыре типа инкубаторов (Биорегулируемые Tetz инкубаторы):

[000198] Прототип 1 - инкубатор с добавлением фольги в камеру.

[000199] Прототип 2 - с добавлением слоев фольги, отделенными друг от друга диамагнитными слоями.

[000200] Прототип 3 - инкубатор с добавлением мю-металла в камеру.

[000201] Прототип 4 - инкубатор с добавлением слоев фольги, отделенными друг от друга диамагнитными слоями с добавлением мю-металла в камеру.

[000202] Биопроба (слюна) была высеяна на среду, состоящую из колумбийского агара и мясо-пептонного агара, в 90-миллиметровую чашку Петри (Corning).

[000203] Результаты показаны на фигуре 13.

[000204] Мы неожиданно обнаружили, что изменение геомагнитного поля с помощью инкубатора по-разному влияет на рост микроорганизмов. Использование различных инкубаторов (регулируемых Tetz инкубаторов), по-разному влияющих на геомагнитное поле Земли, внешние магнитные поля, собственное электромагнитное поле, генерируемое микроорганизмами во время их роста, позволяет получить микроорганизмы с разными свойствами, то есть с разной синтетической активностью.

Пример 13. Использование мю-металлсодержащих устройств для мониторинга состояния окружающей среды, радиации и экологии.

[000205] Мы использовали бокс из мю-металла в качестве устройства для мониторинга экологических, погодных и геомагнитных условий. Для этого мы ежедневно высевали микроорганизмы (в том числе спорообразующие) на поверхность колумбийского агара на 90-миллиметровые стеклянные чашки Петри, которые помещали в мю-металлические боксы и культивировали в течение 24 часов при 37°C. Мы проанализировали изменения морфологии биопленки на поверхности агара и соотнесли эти изменения с геомагнитными бурями. Результаты показаны на фигуре 14

[000206] Как видно, выращивая микроорганизмы с мю-экранированием, можно обнаруживать геомагнитные бури и другие изменения и возмущения магнитосферы.

Пример 14. Факторы, добавляемые в культуральные среды для регуляции роста определенных групп микроорганизмов

[000207] Далее мы изучили, можно ли регулировать разнообразие бактерий, выращенных из биообразцов, с помощью различных веществ, включая ингибиторы транскриптазы, ингибиторы протеазы, ингибиторы рекомбиназы/интегразы, нуклеазы. Для этого мы высевали 10 мкл биообразцов (мокрота, БАЛ, тканевое отделяемое) на среду, состоящую из колумбийского и мясо-пептонного агаров, дополненную 10% эритроцитов, и инкубировали разное время при 37°С (табл. 14).

Таблица 14. Вещества, добавляемые в среду и/или используемые для обработки биообразца перед посевом.

Группа	Вещество	Концентрация
1	2-циклопропил-7-метил-2,4,9,15-тетразатрицикло[9.4.0.0 3,8]пентадека-1(11),3,5,7,12,14-гексаен-10-он; гидрат	0.5 мкг/мл
2	2-циклопропил-7-метил-2,4,9,15-тетразатрицикло[9.4.0.0 3,8]пентадека-1(11),3,5,7,12,14-гексаен-10-он; гидрат	100 мкг/мл
3	4-[6-амино-5-бром-2-(4-цианоанилино)пиримидин-4-ил]окси-3.5-диметилбензонитрил	0.5 мкг/мл
4	4-[6-амино-5-бром-2-(4-цианоанилино)пиримидин-4-ил]окси-3.5-диметилбензонитрил	100 мкг/мл
5	4-амино-1-[(2R,5S)-2-(гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил]пиримидин-2-он	0.5 мкг/мл
6	4-амино-1-[(2R,5S)-2-(гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил]пиримидин-2-он	100 мкг/мл
7	[(2R)-1-(6-аминопурин-9-ил)пропан-2-ил]оксиметилфосфовая кислота	0.5 мкг/мл
8	[(2R)-1-(6-аминопурин-9-ил)пропан-2-ил]оксиметилфосфовая кислота	100 мкг/мл

9	[(2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	0.5 мкг/мл
10	[(2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	100 мкг/мл
11	натрий;2-амино-9-(2-гидроксиэтоксиметил)пурин-6-олат	0.5 мкг/мл
12	натрий;2-амино-9-(2-гидроксиэтоксиметил)пурин-6-олат	100 мкг/мл
13	Оротат калия	0.5 мкг/мл
14	Оротат калия	100 мкг/мл
15	[(1S,4R)-4-[2-амино-6-(циклопропиламино)пурин-9-ил]циклопент-2-ен-1-ил]метанол	0.5 мкг/мл
16	[(1S,4R)-4-[2-амино-6-(циклопропиламино)пурин-9-ил]циклопент-2-ен-1-ил]метанол	100 мкг/мл
17	N-[2-[4-[(4-фторфенил)метилкарбамоил]-5-гидрокси-1-метил-6-оксопиримидин-2-ил]пропан-2-ил]-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоксамид	0.5 мкг/мл
18	N-[2-[4-[(4-фторфенил)метилкарбамоил]-5-гидрокси-1-метил-6-оксопиримидин-2-ил]пропан-2-ил]-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоксамид	100 мкг/мл
19	ДНКаза	0.5 мкг/мл
20	ДНКаза	100 мкг/мл
21	РНКаза	0.5 мкг/мл
22	РНКаза	100 мкг/мл
23	ДНКаза + РНКаза	0.5 мкг/мл
24	ДНКаза + РНКаза	100 мкг/мл
25	Протеиназа	0.1 мкг/мл
26	Протеиназа	кг/мл

[000208] Эффективность вещества для регуляции бактериального разнообразия определялась по наличию или отсутствию бактерий с определенными морфологическими свойствами после 18 часов культивирования.

[000209] Микроскопия проводилась с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti (объективы Nikon Plan Fluor $\times 100/1.30$ Oil Ph3 DLL и Plan Apo $\times 100/1.40$ Oil Ph3). Морфологию бактерий определяли путем окрашивания клеточных мембран метиленовым синим или окрашивания по Граму. Результаты представлены в Таблице 15.

Таблица 15. Эффекты веществ, добавляемых в культуральные среды, для регуляции роста определенных групп микроорганизмов

Группа	Бактерии*		
	Грамположительные неспорообразующие бактерии	Грамположительные спорообразующие бактерии	Грамотрицательные палочки
Контроль	+++	+++	+++
1	+++++	+++	+++
2	+++++	+++	+++
3	+++++	+++	+++
4	+++++	+++	+++
5	+++++	+++	+++
6	+++++	+++	+++
7	+++++	+++	+++
8	+++++	+++	+++
9	+++++	+++	+++
10	+++++	+++	+++
11	+++++	+++	+++
12	+++++	+++	+++
13	+++++	+++	+++
14	+++++	+++	+++
15	+++	+++	+++++
16	+++	+++	+++++
17	+++	+++	+++++
18	+++	+++	+++++
19	+++++	+++	+++
20	+++++	+++	+++
21	+++++	+++	+++
22	+++++	+++	+++
23	+++	+++	+++++
24	+++	+++	+++++
25	+++	+++	+++++
26	+++	+++	+++++

[000210] Разнообразие определенного типа бактерий было представлено в виде "+", где "+++" обозначает разнообразие определенного типа бактерий в контроле, а "+++++" указывает на увеличение разнообразия типов бактерий.

[000211] Было хорошо видно, что разнообразие бактерий значительно изменилось после использования различных веществ, перечисленных в этом примере, а также нуклеаз и протеиназ. Использование перечисленных веществ позволило отобрать различные типы бактерий и вырастить определенные виды бактерий.

Пример 15. Использование тест-системы для выделения ранее некультивируемых бактерий

[000212] Мазок с поверхности языка был получен от пациента с болезнью Альцгеймера, и материал был высеван на плотные среды: (i) колумбийский и мясо-пептонный агар или (ii) LB-агар или (iii) колумбийский агар, с добавлением / без добавления 5% бараньих эритроцитов, антибиотиков, нуклеаз.

[000213] В агар добавляли нуклеазы: ДНКаза I, РНКаза (все Sigma-Aldrich) или их смесь, взятые в концентрации 100 мкг/мл. Пробы культивировали при 37°C в течение 24 ч. Колонии с различной морфологией пересеивали на соответствующую питательную среду с антибиотиками или нуклеазами или без них на следующие 24 часа при 37. Этот цикл повторяли несколько раз, чтобы получить чистые культуры, согласно результатам микроскопического исследования. Результаты представлены в Таблице 16.

Таблица 16. Количество видов выделенных бактерий

Среда	Э+	Э-	Э+ЛЕ В+	Э- ЛЕВ+	Э+Д+	Э- Д+	Э+Р+	Э- Р+	Э+ДР +	Э- ДР+
КА + МПА	8	6	4	2	8	8	9	9	9	8
LB	5	4	2	0	6	5	6	6	5	5
КА	6	4	0	0	7	7	7	6	7	5

[000214] КА+МПА Колумбийский и мясо-пептонный агар, LB - LB агар, КА - Колумбийский агар, агент добавлен (+), агент не добавлен (-), эритроциты (Э), левофлоксацин (ЛЕВ), ДНКаза I (Д), РНКаза (Р), ДНКаза I + РНКаза (ДР)

[000215] Как видно, различные вспомогательные факторы, добавленные в среду, по-разному влияли на рост бактерий, а некоторые из них способствовали большему разнообразию культивируемых микроорганизмов.

[000216] Далее мы определили виды бактерий, которые были уникальными (на основании морфологии колоний или микроскопии) в сравнении между пробами с добавлением/без добавления вспомогательных факторов. Количество бактерий, идентифицированных как "уникальные", приведено в таблице 17.

Таблица 17. Уникальные виды бактерий, идентифицированные с помощью предложенного способа

Среда	Э+	Э-	Э+ЛЕВ+	Э- ЛЕВ+	Э+Д+	Э- Д+	Э+Р+	Э- Р+
КА + МПА	2	1	1	0	1	1	1	0
LB	1	0	1	0	1	1	1	0
КА	0	0	1	1	1	1	1	0

[000217] Как видно, добавление различных факторов позволило культивировать бактерии, присутствующие в биообразце, но не растущие при стандартном методе культивирования. Далее была изолирована геномная ДНК с использованием набора QIAamp для очистки геномной ДНК. Ген 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных бактериальных праймеров 27F и 1492R, и последовательности были собраны с использованием программы SeqMan v7. Ген 16S рРНК *Streptococcus oraculs* sp. nov. показал 95% генетическое сходство с *S. pneumoniae* и 94% с *S. mitis*.

[000218] Парные библиотеки ДНК (длиной 300 пар оснований) были подготовлены с использованием набора TruSeq для подготовки образцов ДНК и затем секвенированы на устройстве HiSeq 2500 (Illumina, США) в соответствии с инструкциями производителя.

[000219] Сырые последовательности были обрезаны с использованием программы Trimmomatic (версия 0.38) для удаления адаптеров Illumina и обрезки последовательностей в случае снижения среднего качества оснований ниже 15 в пределах скользящего окна из 4 оснований. Загрязняющие последовательности удалялись путем их выравнивания с референсным геномом человека (GRC38) с использованием программы Bowtie 2 (версия 2.3.4.2), собирая только пары чтений, которые не выровнялись. Черновой геном был собран с использованием SPAdes (версия 3.7.1) с использованием стандартных параметров. Полученные 20 контигов имели среднее покрытие k-мерами в 150 раз, общую длину 1 970 714 пар оснований и GC-содержание составляло 41,6%. Гибридизацию ДНК-ДНК *in silico* проводили с помощью программы Genome-to-Genome Distance Calculator.

[000220] Результаты показали, что геном *S. oraculs* sp. nov. отличается от геномов типичных штаммов родственных видов (например, *S. pneumoniae* и *S. mitis*, со значениями сходства 24.60% и 32.20% соответственно) и находится ниже 70%-ного порога для ДНК-ДНК гибридизации.

Пример 17. Способ выбора эффективных антибиотиков с максимально узким спектром активности против ПП

[000221] Анализ эффективности антибиотиков проводился по элиминации основного возбудителя *Pseudomonas aeruginosa* после добавления к образцам мокроты антибиотиков, считающихся эффективными с помощью предложенного способа по сравнению с посевом биообразцов по сравнению со стандартным методом (метод серийных разведений). Мы использовали 5 образцов мокроты с подтвержденным высевам *P.aeruginosa*, полученных от взрослых пациентов с МВ.

[000222] Каждый образец мокроты был поделен на 4 части (P1, P2, P3, P4).

[000223] P1 ресуспендировали в 1.0 мл фосфатно-солевого буфера и высевали в лунки, содержащие плотную питательную среду с добавлением антибиотиков в средней концентрации, которая может быть достигнута в месте заражения с 0 до 4 часов, и культивировали в течение 24 часов при 37°C (предложенный способ).

[000224] P2 непосредственно высевали (без ресуспендирования) в лунки, содержащие плотную питательную среду с добавлением антибиотиков в средней концентрации, которая может быть достигнута в месте заражения с 0 до 4 часов, и культивировали в течение 24 часов при 37°C.

[000225] Для анализа P3 использовался обычный метод серийных разведений. Отношение *P.aeruginosa* к антибиотикам классифицировалось как «чувствительный» или «резистентный» в соответствии с рекомендациями CLSI.

[000226] Использовались антибиотики узкого спектра действия: азтреонам, ванкомицин, колистин, цефалексин.

[000227] Затем мы проверили эффективность антибиотиков, выбранных как эффективные в пределах P1-P3, и добавили их в оставшуюся часть биообразцов (обозначенную как P4). Оценивалось количество жизнеспособных КОЕ/мл *P.aeruginosa*. Эффективным считалось снижение количества КОЕ/мл *P.aeruginosa* на (i) $4\log_{10}$ или (ii) полная элиминация. Результаты представлены в Таблице 18.

[000228] Таблица 18. Общее количество антибиотиков узкого спектра действия, считающихся эффективными против *P.aeruginosa*, определенное различными способами.

Биопроба #	Общее количество антибиотиков узкого спектра действия, предложенных в качестве эффективных против <i>P.aeruginosa</i>					
	Предлагаемый способ		Посев без ресуспендирования		Стандартный метод	
	Снижение на $4\log_{10}$ КОЕ/мл	Полная элиминация	Снижение на $4\log_{10}$ КОЕ/мл	Полная элиминация	Снижение на $4\log_{10}$ КОЕ/мл	Полная элиминация

1	2	1	2	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	2	2	1	1	0	0
5	3	1	2	1	1	0
Всего	7	4	5	3	1	0

[000229] Как оказалось, предложенный метод обеспечивает более высокую скорость подбора антибиотиков с узким спектром действия по сравнению с методом, при котором биопробу непосредственно высевали на питательную среду, а также по сравнению со стандартным методом тестирования чувствительности к антибиотикам. Выбор антибиотиков с узким спектром действия имеет важное значение для эффективного применения антибиотиков и сокращения распространения антибиотикорезистентности. Кроме того, во многих случаях антибиотики с узким спектром, отобранные с помощью предложенного метода, чаще полностью элиминировали *Pseudomonas aeruginosa*, в отличие от других методов.

Пример 18. Разработка схемы применения антибиотиков для непрямого уничтожения целевых микроорганизмов

[000230] Мы применили вышеописанный метод для выбора антибиотиков, косвенно действующих против *Pseudomonas aeruginosa* (первичного патогена), из числа тех, которые напрямую неэффективны против *P.aeruginosa*. Для этого были использованы биообразцы, полученные в ходе предыдущего эксперимента. Два антибиотика — ванкомицин и цефалексин, к которым резистентна (согласно методу серийных разведений) *Pseudomonas aeruginosa*, были добавлены к образцам мокроты, содержащим *Pseudomonas aeruginosa*. Мы оценили эффективность этих антибиотиков, косвенно активных против *Pseudomonas aeruginosa*, для уничтожения этого микроорганизма в смешанных биопленках (см. таблицу 19).

Таблица 19. Эффективность антибиотиков, косвенно действующих на бактерии в образцах

Биопроба #	Снижение на $4\log_{10}$ КОЕ/мл	Полная элиминация
1	+	+
2	-	-
3	-	-

4	+	-
5	+	+
6	+	-
7	-	-
8	+	+
9	-	-
10	-	-
Общее количество эрадикаций <i>P.aeruginosa</i>	5	3

[000231] Как оказалось, предложенный метод позволил отобрать антибиотики, которые косвенно действовали против *Pseudomonas aeruginosa* и были способны элиминировать этот патоген, не оказывая прямого воздействия на него. В то же время стандартные методы определения антибиотикочувствительности, такие как метод серийных разведений, не смогли идентифицировать эти препараты как эффективные.

Пример 19. Способ выбора антибиотиков исключительно против первичных патогенов, а не против всех микроорганизмов, дающих видимый рост на среде

[000232] Были использованы четыре образца мокроты, полученных от пациентов с легочными инфекциями. Содержание основных микроорганизмов, идентифицированных в образцах с помощью MALDI-TOF, перечислено в Таблице 20. Чистая бактериальная культура каждого микроорганизма была получена классическим бактериологическим способом.

[000233] Результаты представлены в Таблице 20.

Таблица 20. Состав бактериальных смесей

	Бактериальная смесь №1	Бактериальная смесь №2	Бактериальная смесь №3	Бактериальная смесь №4
Первичный патоген	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Микроорганизмы - модуляторы	<i>E. coli</i> <i>S.anginosus</i> <i>B.sonorensis</i>	<i>R. dentocariosa</i> <i>A.ursingii</i> <i>B.pumilus</i>	<i>S. aureus</i> <i>B. thailandensis</i>	<i>E.coli</i> <i>S. haemolyticus</i>

[000234] Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в отношении основного патогена были определены методом серийных разведений в бульоне для таких антибиотиков, как меропенем, цефепим, цефтазидим и амикацин.

[000235] Если МИК конкретного антибиотика в отношении основного патогена превышала 16 мкг/мл, то этот патоген считался устойчивым к данному антибиотику. В таких случаях антибиотик с МИК 16 мкг/мл использовали в последующих исследованиях. Только первичный патоген (ПП), только микроорганизмы - модуляторы (ММ) или исходная мокрота высевались в лунки 24-луночного планшета, заполненного питательным колумбийским агаром с добавлением 5% эритроцитов, с добавлением антибиотиков в концентрациях, равных МИК в отношении первичного патогена, но не превышающими 16 мкг/мл, и инкубировались в течение 24 часов при температуре 37°C. Результаты исследования представлены в Таблице 21.

Таблица 21. Результаты индивидуальной и комплексной чувствительности к антибиотикам бактериальных смесей

Бактериальный набор №1				Бактериальный набор №2						Бактериальный набор №3			Бактериальный набор №4					
Меропенем (16 мкг/мл)				Цефепим (16 мкг/мл)						Цефтазидим (2 мкг/мл)			Амикацин (1 мкг/мл)					
П												Присутствие					Присутствие	
П	БМ			Міх	ПП+	ММ	П	БМ	Міх	ПП+	ММ	П	БМ	П	БМ	П	БМ	П
												на в смеси					на в смеси	
												ПП+М					ПП+М	
												М					М	
Р	А	В	Е	МІХ	РА	RD	А	В	МІХ	Р	А	В	МІХ	Р	Е	С	МІХ	
А	А	С	С				U	Р		А	А	Т		А	С	Ч		
+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	

[000236] ПП – первичный патоген, БМ - бактерии-модуляторы, МІХ - ПП +БМ

[000237] Отсутствие роста микроорганизмов означает, что антибиотик эффективен (отмечено как "-")

[000238] Наличие роста микроорганизмов означает, что антибиотик неэффективен (отмечено как "+")

[000239] Из данных таблицы видно, что эффективность антибиотиков против первичного патогена (ПП) меняется, когда бактерии культивируются отдельно или вместе с микроорганизмами - модуляторами (ММ). Например, для меропенема и цефепима в

бактериальных смесях №1 и №2 соответственно, хотя первичный патоген был устойчив к этим антибиотикам при выращивании в монокультуре, при культивировании вместе с ММ в смешанной культуре он неожиданно становился чувствительным к ним и не давал роста на среде.

[000240] Противоположный эффект наблюдался в бактериальных смесях №3 и №4. Цефтазидим и амикацин, которые не были активными против *Pseudomonas aeruginosa*, когда она культивировалась отдельно, оказывались эффективными при выращивании этого патогена вместе с ММ. Тем не менее, другие бактерии в составе микробной смеси продолжали расти.

[000241] Таким образом, неожиданно выяснилось, что предложенный метод позволяет выбирать эффективные антибиотики даже в смешанных биопробах с видимым ростом на питательной среде.

Пример 20. Влияние разбавления материала на время появления бактериального роста.

[000242] Мы использовали биообразцы (3 пробы мокроты, 3 бронхоальвеолярных лаважа, 3 мазка из горла и 3 соскоба с диабетической язвы), взятые у пациентов с пневмонией (внебольничной, внутрибольничной, вентилятор-ассоциированной), муковисцидозом, пациентов, ожидающих трансплантацию легких, и с хронической обструктивной болезнью легких.

[000243] Биообразцы высевали на плотные питательные среды: колумбийский агар, мясо-пептонный агар, LB-агар и колумбийский агар с добавлением 5% эритроцитов.

[000244] Группа 1 – прямой высев.

[000245] Группа 2 – высев после встряхивания в течение 60 секунд.

[000246] Группа 3 – высев после добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера к 1 мл биообразца или к 1 мазку.

[000247] Группа 4 – высев после добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера к 1 мл биообразца или к 1 мазку и последующего встряхивания на 60 секунд.

[000248] Пробы инкубировали при температуре 37°C и каждый час проводили визуальный анализ на наличие бактериального роста, наблюдая за появлением бактериального роста в каждой пробе под углом 45 градусов невооруженным глазом. Результаты представлены в Таблице 22.

Таблица 22. Влияние разбавления и выращивания на различных питательных средах на время появления первых признаков роста бактерий

Проба	Время появления первых признаков роста бактерий											
	Группа 1			Группа 2			Группа 3			Группа 4		
	ММ	LB	КА	ММ	LB	КА	ММ	LB	КА	ММ	LB	КА
Мокрота	3.5	4.5	4.5	3.5	4	4.5	3	3	3	3	3	3
БАЛ	3.5	5	5	4	4.5	4.5	2.5	3.5	3.5	2	3	3
Мазок из горла	4	4.5	4.5	4	4	4	4	3	3.5	3.5	3	3.5
Соскоб	4.5	5	5	4	4.5	4.5	3	3.5	3.5	3	3	3

ММ - смешанная среда (колумбийский агар + мясо-пептонный агар), LB -LB-агар, КА - колумбийский агар

[000249] Далее мы проанализировали точность результатов, полученных при мониторинге ранних признаков роста микроорганизмов и их прогрессирования в течение первых 24 часов. Нас особенно интересовали серьезные ошибки (вариации между средними), которые определялись как ситуации, когда антибиотик, согласно результатам тест-системы, был эффективен (то есть рост бактерий отсутствовал) на начальном этапе 2.5-5 часов, но затем, в процессе дальнейшего культивирования в течение 24 часов, происходило прогрессирование до появления роста (см. фигуру 15).

[000250] Как оказалось, неожиданно, использование разбавителей и/или встряхивания перед отбором проб значительно увеличило скорость роста бактерий и улучшило точность определения начала и прогрессирования бактериального роста.

Пример 21. Способ, позволяющий подбирать антибиотики в течение менее, чем 4 часов, эффективных против персистеров и/или подходящих для предотвращения антибиотикоиндуцированного образования персистеров.

[000251] Патологический материал (мокроту), полученный от пациентов с заболеваниями легких высевали в лунки 24-луночных планшетов, заполненных питательной средой с добавлением 5% эритроцитов. К этой среде добавляли антибиотики в различных концентрациях.

[000252] Группа №1 - антибиотики использовались в концентрациях, приближенных к максимальной (пиковой) концентрации, достижимой в очаге инфекции (Cmax).

[000253] Группа №2 - антибиотики использовались в средних концентрациях, достижимых в очаге инфекции в течение первых 0-4 часов после введения антибиотика (C0-4ч).

[000254] Алгоритм №1. Лаборант анализировал появление бактериального роста, сравнивая признаки бактериального роста в каждой лунке, содержащей антибиотик(и), в

определенный момент времени с признаками бактериального роста в той же лунке на предыдущих этапах.

[000255] Алгоритм №2. Лаборант анализировал появление бактериального роста, сравнивая признаки роста бактерий в каждой лунке с антибиотиком(ами) с ростом бактерий в контрольной лунке без антибиотиков.

[000256] Алгоритм №3. Стандартный метод исследования чувствительности к антибиотикам с использованием метода серийных разведений. Результаты исследования представлены в Таблице 23.

Таблица 23. Сравнение различных алгоритмов анализа данных по скорости подбора антибиотиков

	Алгоритм									
	#1				#2				Метод серийных разведений	
	Время до получения результата в выборе антибиотика (ч) Сmax	Эффективность АТБ	Время до получения результата в выборе антибиотика (ч) С0-4ч	Эффективность АТБ	Время до получения результата в выборе антибиотика (ч) Сmax	Эффективность АТБ	Время до получения результата в выборе антибиотика (ч) С0-4ч	Эффективность АТБ	Время до получения результатов выбора антибиотика (ч)	Эффективность АТБ
Ванкомицин	4.5	-	3	+	5	-	4.5	+	42	-

Цефепим	3	-	2.5	-	4	-	4	-	42	+
Цефтазидим	3.5	+	3	+	4.5	+	4	+	42	+
Амикацин	3	-	3	-	5	-	4	-	42	-

[000257] АТБ - антибиотик; "+" - наличие роста бактерий, антибиотик неэффективен; "-" - отсутствие роста бактерий, антибиотик эффективен

[000258] Ясно видно, что использование антибиотиков в более низких концентрациях (не максимально достижимых в месте инфекции) позволяет быстрее оценить их эффективность в смешанных микробных сообществах. Кроме того, перечень антибиотиков, рекомендуемых как эффективные, отличается в зависимости от концентрации антибиотиков, добавленных в среду: Стах и С0-4ч.

[000259] Далее мы подтвердили эффективность антибиотиков, отобранных с помощью предложенного метода. Взрослых мышей породы C57BL/6 вводили до состояния нейтропении, вводя им циклофосамид подкожно за 4 дня до заражения (150 мг/кг), за 1 день до заражения (100 мг/кг) и через 1 день после заражения (100 мг/кг). Мышей анестезировали 2% изофлураном и перорально вводили биопробы (хранящиеся при +4°C). Кратко, носовые ходы блокировались, и мыши ингалировали 50 мкл биопробы в легкие, удерживая их в вертикальном положении в течение 60 секунд.

[000260] Группа №1 (n=8) получала ванкомицин в течение 72 часов - антибиотик, считающийся эффективным при разведении в микробиоте и по предложенному методу с добавлением в среду в концентрации Стах, но оказавшийся неэффективным при добавлении в среду в концентрации С0-4ч.

[000261] Группа №2 (n=8) в течение 72 часов получала цефепим - антибиотик, считающийся эффективным методом серийных разведений, но считающийся неэффективным при добавлении в среду в концентрациях Стах и С0-4ч.

[000262] Легкие и печень животных извлекали и гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора, затем проводили серийные десятикратные разведения гомогенатов тканей, которые затем высевали на колумбийский агар с 5% бараньей крови, с добавлением 100 мкг/мл ванкомицина или цефепима. Результаты представлены в Таблице 24.

Таблица 24. Наличие микробного роста в органах и крови животных, получавших антибиотики, выбранные как эффективные с помощью различных алгоритмов.

Антибиотик	Количество животных с ростом микроорганизмов в пробах на агаре с антибиотиками/общее количество животных в группе		
	Кровь	Легкие	Печень
Ванкомицин	6/8	8/8	5/8
Цефепим	4/8	3/8	2/8

[000263] Как видно из этих результатов, отбор антибиотиков по предложенному методу, когда они используются в концентрациях ниже максимально достижимых в очаге инфекции (C0-4ч), и выбираются не только для борьбы с первичными патогенами, но и с микроорганизмами-модуляторами позволяет более точно отобрать антибиотики, эффективные против персистеров или предотвращать их формирование. Применение антибиотиков в концентрации Cmax приводит к недооценке разнообразия антибиотиков, включая узкоспектральные, которые могут быть действительно эффективными, в то время как использование антибиотиков в более низких концентрациях в тест-системе дает более точные результаты.

[000264] Удивительно, но было обнаружено, что использование антибиотиков в концентрациях ниже максимально достижимых в месте инфекции (C0-4ч) позволяет более быстро подобрать подходящий антибиотик по сравнению с тест-системами, где антибиотики использовались в концентрации Cmax. Кроме того, применение Алгоритма №1, при котором сравниваются признаки роста бактерий в каждой лунке, дополненной антибиотиком(ами) в определенный момент времени, с признаками роста в той же лунке на предыдущих этапах, обеспечивает более быстрый анализ данных.

Пример 22. Оценка влияния микроорганизмов - модуляторов на первичные патогены из биообразцов от пациентов с заболеваниями с меньшим бактериальным разнообразием по сравнению с биообразцами от пациентов с муковисцидозом

[000265] Мы использовали биообразцы (мокрота, мазки из горла, соскобы с диабетической язвы, ожоговое отделяемое, моча, синовиальная жидкость), полученные от пациентов с пневмонией, хронической обструктивной болезнью легких, диабетической язвой, ожогами, артритом, циститом.

[000266] Биообразцы обрабатывались следующим образом: после добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера к 1 мл биообразца или к 1 тампону, встряхивания и инкубации при 37°C в течение 4 часов.

[000267] Микробное разнообразие оценивали с помощью культуральных методов. Чтобы подтвердить, что идентифицированные микроорганизмы являются микроорганизмами-модуляторами, мы получили первичный патоген из пробы с микробами-модуляторами и без них и проследили за экспрессией профиля антибиотикорезистентности с помощью транскриптомного анализа (Illumina HiSeq4000), чтобы оценить, повлияли ли микробные модуляторы на экспрессию генов антибиотикорезистентности первичного патогена.

[000268] Экспрессия генов устойчивости к антибиотикам первичных патогенов была оценена по базам данных белков Uniprot и NCBI (Таблица 25).

Таблица 25 Оценка влияния бактериальных модуляторов на основные патогены

	Первичный патоген					
	Пневмония	Хроническая обструктивная болезнь легких	Диабетическая язва	Ожоги	Артрит	Цистит
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E.coli</i>
Общее количество потенциальных ММ	3	7	5	4	2	2
Относительное количество сверхэкспрессированных генов антибиотикорезистентности в ПП, культивируемых отдельно	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Количество сверхэкспрессированных генов	46%	552%	217%	33%	190%	824%

антибиотикорезистентности в ПП, культивируемых вместе с ММ						
--	--	--	--	--	--	--

[000269] Эти результаты ясно показывают, что пробы даже с небольшим бактериальным разнообразием могут иметь ММ, которые модулируют экспрессию генов антибиотикорезистентности в ПП.

Пример 23. Тест-системы с индивидуальным составом антибиотиков для подбора эффективных концентрационно-зависимых антибиотиков для терапии лиц с измененной фармакокинетикой, детей, лиц с повышенной чувствительностью к антимикробным препаратам.

[000270] Далее мы неожиданно обнаружили, что, используя предложенный способ комбинированного культивирования ПП и ММ на средах с добавлением различных концентраций антибиотиков, мы можем разработать более безопасную и эффективную схему антибиотикотерапии и подобрать более эффективные антибиотики по сравнению с обычными методами, основанными на стандартных рекомендациях.

[000271] Мы использовали мокроту, полученную от пациентов с различными легочными инфекциями. Чистую культуру каждого микроорганизма получали обычными микробиологическими способами, бактериальную идентификацию проводили с помощью MALDI-TOF анализа, микробное разнообразие биообразцов - с помощью метагеномного анализа (секвенирование 16S РНК).

[000272] Первичный патоген был выбран в качестве ведущего в каждом случае инфекции на основании консультации с независимым врачом, который получил описание клинической картины, микробиологические и микробиологические анализы. Чувствительность ПП к антибиотикам оценивали с помощью стандартного способа серийного разведения в микробиоте. Результаты представлены в Таблице 26.

Таблица 26. Исходные характеристики первичных патогенов

Биообразцы	Идентифицированный первичный патоген	Тобрамицин*	
		МИК мкг/мл	Чувствительность
1	<i>P.aeruginosa</i>	2	S
2	<i>P.aeruginosa</i>	8	I
3	<i>P.aeruginosa</i>	8	I

[000273] Тобрамицин является концентрационно-зависимым антибиотиком.

[000274] Рядом с МИК антибиотика в мкг/мл указывается интерпретация восприимчивости: S (чувствительный), I (промежуточная чувствительность) или R (резистентный), установленная CLSI.

[000275] Затем биообразцы вносили в лунки 48-луночного планшета, заполненного колумбийским агаром + мясо-пептонным агаром с добавлением тобрамицина в различных концентрациях (мы приняли, что МИС равно C_{max}), и наличие роста ПП было оценено в каждой лунке через 24 часа роста. Результаты представлены в Таблице 27.

Таблица 27. Наличие бактериального роста в лунках с различными концентрациями тобрамицина

Биопроба# (ПП - <i>P.aeruginosa</i>)	Наличие бактериального роста в лунках с различными концентрациями тобрамицина						
	$C_{max} \times 10$	$C_{max} \times 2$	C_{max}	$\frac{1}{2} C_{max}$	$\frac{1}{4} C_{max}$	$\frac{1}{10} C_{max}$	$\frac{1}{100} C_{max}$
1	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	+	+

[000276] "+" - наличие бактериального роста, антибиотик неэффективен

[000277] "-" - отсутствие роста бактерий, антибиотик эффективен

[000278] Далее, используя те же биообразцы, мы заразили мышей, моделируя пневмонию. Для этого взрослых мышей C57BL/6 ввели в состояние нейтропении, вводя циклофосфамид подкожно за 4 дня до заражения (150 мг/кг массы тела), за 1 день до заражения (100 мг/кг) и через 1 день после заражения (100 мг/кг). Мышей анестезировали 2% изофлураном и перорально вводили биопробу, разведенную в фосфатно-солевом буфере. Вкратце, носовые ходы были перекрыты, и мышей аспирировали 50 мкл биообразца в легкие, удерживая их в вертикальном положении в течение 60 с. МИХ принимали за C_{max} .

[000279] В эксперименте участвовало 30 животных (n=10 на группу), которых лечили различными концентрациями тобрамицина в соответствии с результатами, полученными предложенным способом из 3 разных биообразцов. Пять животных из каждой группы получали тобрамицин в концентрации, которая была предложена как минимально эффективная, и 5 животных из каждой группы получали тобрамицин в концентрации, которая была предложена как первая неэффективная концентрация с помощью предложенного способа. Результаты представлены в Таблице 28.

Таблица 28 Подробное описание групп животных

Группа	# Количество животных в группе	Инфицирован биообразцом	Лечение тобрамицином, взятым в концентрации, предложенной как наименее ЭФФЕКТИВНАЯ	Лечили тобрамицином, взятым в концентрации, предложенной как самая высокая НЕЭФФЕКТИВНАЯ
1a	5	#1	Смах 1/10	Н/Д
1b	5	#1	Н/Д	Смах 1/100
2a	5	#2	Смах 1/1	Н/Д
2b	5	#2	Н/Д	Смах 1/10
3a	5	#3	Смах 1/4	Н/Д
3b	5	#3	Н/Д	Смах 1/10

[000280] Эффективность или неэффективность лечения тобрамицином, принятым в разных концентрациях, представлена в таблице ниже. Эффективность оценивалась по снижению количества ПП на $3\log_{10}$ в течение 48 часов. Результаты представлены в Таблице 29.

Таблица 29. Подтверждение эффективности антибиотиков *in vivo*

Группа	# Количество животных в группе	Инфицирован биообразцом	Лечение тобрамицином, взятым в концентрации, предложенной как наименее ЭФФЕКТИВНАЯ	Лечили тобрамицином, взятым в концентрации, предложенной как самая высокая НЕЭФФЕКТИВНАЯ	Количество животных, для которых терапия была эффективной/количество животных в группе
1a	5	#1	Смах 1/10	Н/Д	5/5
1b	5	#1	Н/Д	Смах 1/100	0/5
2a	5	#2	Смах 1/1	Н/Д	5/5
2b	5	#2	Н/Д	Смах 1/10	0/5
3a	5	#3	Смах 1/4	Н/Д	5/5
3b	5	#3	Н/Д	Смах 1/10	0/5

Пример 24. Тест-системы с индивидуальным составом антибиотиков для подбора эффективных антибиотиков, зависящих от времени действия, для терапии лиц с измененной фармакокинетикой, детей, лиц с повышенной чувствительностью к антимикробным препаратам.

[000281] Далее мы неожиданно обнаружили, что, используя предложенный способ комбинированного культивирования ПП и ММ на средах с добавлением различных концентраций антибиотиков, зависящих от времени, мы можем разработать более безопасную и эффективную схему антибиотикотерапии и подобрать более эффективные антибиотики по сравнению с обычными методами, основанными на стандартных рекомендациях.

[000282] Мы использовали мокроту, полученную от пациентов с различными легочными инфекциями. Чистую культуру каждого микроорганизма получали обычными микробиологическими способами, бактериальную идентификацию проводили с помощью MALDI-TOF анализа, микробное разнообразие биообразцов оценивалось с помощью метагеномного анализа (секвенирование 16S РНК).

[000283] Первичный патоген был выбран в качестве ведущего в каждом случае инфекции на основании консультации с независимым врачом, который получил описание клинической картины и результаты микробиологических анализов. Чувствительность ПП к антибиотикам оценивали с помощью стандартного метода серийных разведений. Результаты представлены в Таблице 30.

Таблица 30. Исходные характеристики *S.aureus*

Биообразцы	Идентифицированный первичный патоген	Амоксициллин*	
		МИК мкг/мл	Чувствительность
1	<i>S.aureus</i>	0,25	S
2	<i>S.aureus</i>	4	I
3	<i>S.aureus</i>	2	S

[000284] Амоксициллин - антибиотик, эффект которого зависит от времени действия.

[000285] Рядом с МИК антибиотика в мкг/мл указывается интерпретация восприимчивости: S (чувствительный), I (промежуточная чувствительность) или R (резистентный) согласно CLSI.

[000286] Затем биообразцы были высевались в лунки 48-луночного планшета, заполненного колумбийским агаром + мясо-пептонным агаром с добавлением амоксициллина. Мы моделировали QID, BID и TID введение амоксициллина на ПП+ММ

внутри биообразца. Были сделаны следующие предположения. Результаты представлены в Таблице 31.

Таблица 31. Взаимосвязь между концентрацией антибиотика, используемого в тест-системе, и режимом введения *in vivo*

Концентрация антибиотика, используемого в тест-системе	Комментарий	Эквивалент схемы введения
C0-6ч	Концентрация антибиотика, взятая по средней концентрации препарата от 0 до 6 часов	TID
C0-12ч	Концентрация антибиотика, взятая по средней концентрации препарата от 0 до 12 часов	BID
C0-24ч	Концентрация антибиотика, взятая по средней концентрации препарата от 0 до 24 часов	QID

[000287] Затем мы оценили наличие роста бактерий в лунках с добавлением амоксициллина. Результаты представлены в Таблице 32.

Таблица 32. Наличие роста бактерий в лунках с добавлением амоксициллина

Биопроба # (ПП - <i>S.aureus</i>)	Наличие роста бактерий в лунках с добавлением амоксициллина		
	C0-6ч	C0-12ч	C0-24ч
1	-	-	-
2	-	+	+
3	-	-	+

[000288] "+" - наличие бактериального роста, антибиотик неэффективен

[000289] "-" - отсутствие роста бактерий, антибиотик эффективен

[000290] В эксперименте участвовало 25 животных (n=5 на группу), которых лечили амоксициллином в различных концентрациях в соответствии с результатами, полученными предложенным способом из 3 разных биообразцов. Пять животных из каждой группы получали амоксициллин по схеме, оцененной предложенным способом (эквивалентно TID в течение C0-6 ч, BID в течение C0-12 ч или QID C-24 ч), а 5 животных из групп №2 и №3 получали амоксициллин по схеме, которая была предложена в качестве первой неэффективной. Результаты представлены в Таблице 33.

Таблица 33. Подробное описание групп животных

Группа	# Количество животных в группе	Инфицирован биообразцом	Лечение амоксициллином, принимаемым по схеме, предложенной в качестве наименее ЭФФЕКТИВНОЙ.	Лечение амоксициллином, принимаемым по схеме, взятым в концентрации, предложенной как самая высокая НЕЭФФЕКТИВНАЯ
1a	5	#1	QID	Н/Д
2a	5	#2	TID	Н/Д
2b	5	#2	Н/Д	VID
2a	5	#3	VID	Н/Д
2b	5	#3	Н/Д	QID

[000291] Эффективность или неэффективность такого лечения представлена в таблице ниже. Эффективность оценивалась по снижению количества ПП на $3\log_{10}$ в течение 48 часов. Результаты представлены в Таблице 34.

Таблица 34. Подтверждение эффективности антибиотиков *in vivo*

Группа	# Количество животных в группе	Инфицирован биообразцом	Лечение амоксициллином, принимаемым по схеме, предложенной в качестве наименее ЭФФЕКТИВНОЙ.	Лечение амоксициллином, принимаемым по схеме, взятым в концентрации, предложенной как самая высокая НЕЭФФЕКТИВНАЯ	Количество животных, для которых терапия была эффективной/количество животных в группе
1a	5	#1	QID	Н/Д	5/5
2a	5	#2	TID	Н/Д	5/5
2b	5	#2	Н/Д	VID	0/5
3a	5	#3	VID	Н/Д	5/5
3b	5	#3	Н/Д	QID	0/5

[000292] Таким образом, предложенный способ позволил подобрать эффективную схему приема препарата, включая использование более редких и оптимизированных режимов дозирования антимикробных препаратов. Это важно для людей с заболеваниями с измененными фармакодинамическими параметрами и детей. Кроме того, предложенный

способ со 100% точностью позволяет определить терапевтический курс, который не является эффективным.

Пример 25. Оценка вероятностной модели для предложенного способа диагностики

[000293] Далее мы попытались выбрать антибиотики, основываясь на построении вероятностной модели. Эффективность антибиотиков оценивалась на основе новых параметров:

[000294] АВЕПММ100 - концентрация антибиотика, необходимая для устранения 100% "комплекса" ПП+ММ.

[000295] АВЕПММ99- концентрация антибиотика, необходимая для уничтожения 99% "комплекса" ПП+ММ.

[000296] АВЕПММ90 - концентрация антибиотика, необходимая для уничтожения 90% "комплекса" ПП+ММ.

[000297] АВЕПММ50 - концентрация антибиотика, необходимая для уничтожения 50% "комплекса" ПП+ММ.

[000298] АВЕПП100 - концентрация антибиотика, воздействующая на "комплекс" ПП+ММ, необходимая для устранения 100% ПП.

[000299] АВЕПП99 - концентрация антибиотика, воздействующая на "комплекс" ПП+ММ, необходимая для устранения 99% ПП.

[000300] АВЕПП90 - концентрация антибиотика, воздействующая на "комплекс" ПП+ММ, необходимая для уничтожения 90% ПП.

[000301] АВЕПП50 - концентрация антибиотика, которая, действуя на "комплекс" ПП+ММ, необходима для уничтожения 50% ПП.

[000302] Мы предположили, что в случаях, когда инфекции вызваны микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью и невозможно подобрать эффективный антибиотик с достижением значения АВЕПММ100 или АВЕПП100 (т.е. из-за индивидуальных характеристик макроорганизма (сопутствующие заболевания, особенности фармакокинетики антибиотика)), необходимо выбирать антибиотики с наибольшей вероятностью терапевтической эффективности.

[000303] Мы использовали мокроту от детей с пневмонией, у которых *S.aureus* был подтвержден как ПП.

[000304] Пациент 1 - мальчик 10 лет.

[000305] Пациент 2 - мальчик 5 лет.

[000306] Пациент 3 - девочка 7 лет.

- [000307] Биообразцы высевали в лунки многолуночного планшета, заполненные колумбийским агаром с добавлением антибиотика (неограниченные примеры - левофлоксацин, цефепим), взятым в различных концентрациях, достижимых в месте инфекции, и анализировали наличие ПП и ММ через 24 ч роста.
- [000308] $C_{max} \times 2$ = максимальная пиковая концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции $\times 2$.
- [000309] C0-1ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 1 часа после введения
- [000310] C0-2ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 2 часов после введения
- [000311] C0-3ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 3 часов после введения
- [000312] C1-3ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции от 0 до 1 часа после введения
- [000313] C0-4ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 4 часов после введения
- [000314] C2-3ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 2 до 3 часов после введения
- [000315] C4-6ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 4 до 6 часов после введения
- [000316] C0-6ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 6 часов после введения
- [000317] C6-8ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 6 до 8 часов после введения
- [000318] C0-8ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 8 часов после введения
- [000319] C8-12ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 8 до 12 часов после введения
- [000320] C0-12ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 12 часов после введения
- [000321] C12-24ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 12 до 24 часов после введения
- [000322] C0-24ч - средняя концентрация антибиотика, достижимая в очаге инфекции с 0 до 24 часов после введения
- [000323] Результаты показаны в Таблицах 35 и 36.

Пациент1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0			
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Пациент2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9	9	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0
										0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Пациент3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
										0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[000326] 1 = оценка эффективности АВЕППММ; 2 = оценка эффективности АВЕПП; 0 - антибиотик не достигает никакой эффективности в диапазоне АВЕППММ-АВЕПП50-100

[000327] X - антибиотик не может быть назначен в такой концентрации из-за индивидуальных особенностей.

[000328] Как видно из данных, представленных в Таблице 1, наиболее эффективен левофлоксацин для пациента № 1. В то же время пациенты № 2 и 3 (дети с нарушенной функцией печени) не могут получить максимальную дозу антибиотика.

[000329] Чтобы оценить, какой антибиотик - левофлоксацин или цефепим - наиболее эффективен для пациентов 2 и 3, мы использовали вероятностную модель.

[000330] Как видно, антибиотик Левофлоксацин работает у обоих пациентов при более высоких концентрациях. Но для пациента № 2 Левофлоксацин в концентрации, эквивалентной от С0-3ч до С0-12ч, позволяет уничтожить 50% "комплекса" ПП+ММ. А для пациента №3 левофлоксацин уничтожает 50% "комплекса" ПП + ММ в более высоком диапазоне концентраций от С0-3ч до С0-4ч.

[000331] Расчет вероятности эффективности левофлоксацина проводился по формуле:

[000332] Вероятность эффективности антибиотика =

$$\frac{\text{Максимальная концентрация антибиотика } X_{\text{для достижения АВЕППММ50}} - \text{Минимальная концентрация антибиотика «X» для достижения АВЕППММ50}}{\text{Максимальная концентрация «X» для достижения АВЕППММ50} \times \text{Коэффициент вероятности 50}}$$

[000333] Таким образом, для пациента №2 вероятность эффективности левофлоксацина = 4,7 мкг/мл [концентрация левофлоксацина в легких после 3 ч приема] - 3,7 [концентрация левофлоксацина в легких после 12 ч приема]мкг/мл / 4,7 мкг/мл [концентрация левофлоксацина в легких после 3 ч приема] x Коэффициент вероятности 50 = 0,212 x Коэффициент вероятности 50

[000334] Для пациента №3 вероятность эффективности левофлоксацина = 4,7 мкг/мл [концентрация левофлоксацина в легких после 3 ч приема] - 4 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 3 ч приема] / 4,7 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 3 ч приема] x Коэффициент вероятности 50 = 0.15 x Коэффициент вероятности 50

[000335] Таким образом, предложенный способ позволяет оценить, что левофлоксацин, скорее всего, будет более эффективен для пациента 2 по сравнению с эффективностью того же антибиотика у пациента 3.

[000336] Вероятность эффективности цефепима для пациента №2 = 23 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 8 ч введения] - 8 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 12 ч введения] АВЕППММ50) / 23 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 8 ч введения] \times Коэффициент вероятности 50 = $0,65 \times$ Коэффициент вероятности 50

[000337] Для пациента №3 вероятность эффективности цефепима = 23 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 8 ч введения] - 12 мкг/мл [концентрация цефепима в легких после 6 ч введения] АВЕППММ50) / 23 мкг/мл \times Коэффициент вероятности 90 = $0,47 \times$ Коэффициент вероятности 90

[000338] Таким образом, предложенный способ позволяет оценить, что Цефепим, скорее всего, будет более эффективен для пациента 3 по сравнению с эффективностью того же антибиотика у пациента 2.

[000339] Эти данные ясно показывают, что предложенный способ позволяет с различной вероятностью определять эффективность антибиотиков у людей, в том числе с особенностями метаболизма и у особых групп пациентов. Более того, можно с разной вероятностью определить эффективность любого из АВЕППММ или АВЕПП.

[000340] Неожиданно мы обнаружили, что подбор эффективных антимикробных препаратов в предлагаемом способе исследования, когда патологический материал высевает на питательную среду с антибиотиками, взятыми в разных концентрациях, позволяет отобрать эффективные антибиотики в разных концентрациях и определить, какие антибиотики можно применять в меньших концентрациях, у лиц с нарушенной экскрецией. в результате - меньшая токсичность и меньшее количество побочных эффектов и осложнений.

Пример 26. Использование мю-металла и различных дефектов агара для стимуляции роста бактерий.

[000341] Мы использовали мю-металл для регулирования роста и памяти бактерий. Для этого мы высевали 10 мкл ночной бульонной культуры *Bacillus pumilus VT 1200* на поверхность смешанного колумбийского и мясо-пептонного агара (неизмененного или с небольшими круглыми дефектами диаметром 5 мм) в 90-миллиметровые чашки Петри, поместили их в мю-металлические боксы и культивировали в течение 24 часов при 37°C (фигура 16).

[000342] Видно, что рост бактерий в измененном геомагнитном поле на средах с изменением их поверхности (т. е. электромагнитных условий) стимулировал разнообразный "волнообразный" рост бактерий. Затем мы переседали бактерии с чашки "мю-металл + дефекты в агаре" на неизменный агар и контролировали рост бактерий в течение следующих 24 часов при 37С (фиг. 17).

[000343] Мы неожиданно обнаружили, что стимуляция роста микроорганизмов сохраняется на протяжении нескольких поколений клеток, и это может быть использовано в биотехнологии.

Пример 27. Использование систем мю-металлических тест-систем для контроля состояния здоровья.

[000344] Из слюны здорового человека и человека с мигренью были выделены 7 бактериальных штаммов (в виде чистой культуры или смешанного сообщества). По 10 мкл ночной культуры каждого из них высевали на поверхность смешанного колумбийского и мясо-пептонного агара с добавлением 10% эритроцитов в 90-миллиметровые чашки Петри, помещали в мю-металлические боксы и культивировали в течение 24 часов при 37С. Результаты показаны на фигуре 18.

[000345] Видно, что рост бактерий из биообразца человека с мигренью привел к выборочному росту микроорганизмов в измененном геомагнитном поле, по сравнению с бактериями из микробиоты здорового человека, которые не изменились после изменения геомагнитного поля.

Пример 28. Использование света для повышения производительности клеток в биопроизводстве.

[000346] *B.pumilus* VT1200 культивировали на агаре в 90-миллиметровых чашках Петри и выращивали на свету в течение 48 часов при 37С. Результаты показаны на фигуре 19.

[000347] Мы также проанализировали роль света на продуктивность клеток и биомассу, когда клетки выращивались в суспензионной культуре (Таблица 37).

Таблица 37. Роль света и темноты в потенцировании роста микроорганизмов в измененном магнитном поле.

Условия	N (КОЕ log10/mL/OD600% к контролю)	Мю-металл (КОЕ log10/мл /OD600% к контролю)
---------	------------------------------------	---

Темнота	$8.8 \pm 0.3/100\%$	$9.7 \pm 0.4/159\%$
Свет	$9.5 \pm 0.3/149\%$	$10.9 \pm 0.4/244\%$

[000348] Как видно, выращивание на свету способствует росту клеток и синтетической активности, а значит, может быть использовано в биотехнологии для повышения производительности.

Пример 29. Алгоритм выбора антибиотика.

[000349] Каждый биообразец непосредственно высевается на плотную питательную среду в лунки многолуночного планшета. В питательную среду в каждую лунку добавляют различные антибиотики или их комбинации, взятые в концентрациях от C_{max} , $C_{1/2max}$, $C_{1/4max}$, $C_{1/10max}$, $C_{1/50max}$, $C_{1/100max}$, $C_{1/1000max}$. После культивирования ПП, ММ или их смеси, антибиотики, которые предотвращают рост этих ПП, ММ или их смеси, предлагаются с наибольшей вероятностью эффективности, определяемой по тому, какое значение "X" в уравнении " $C_{1/xmax}$ " является наибольшим.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство, включающее в себя автоматическую и/или полуавтоматическую станцию для приготовления тест-систем различной конструкции, и/или тест-систем и/или биорегулируемых Tetz инкубаторов, и/или CO₂-инкубаторов и/или биореакторов и/или термостатных комнат различной конструкции для культивирования микроорганизмов и/или культур клеток с и/или питательными средами, и/или факторами роста и/или дополнениями к средам, отличающееся тем, что указанное устройство позволяет индивидуально готовить среды со специализированным составом в зависимости от объекта исследования и/или регулировать, контролировать взаимодействие микроорганизмов и эукариотических клеток с физическими, химическими, биологическими факторами среды, и/или изменять скорость роста различных еще не культивируемых бактерий, и/или грибов в составе смешанных микробных сообществ.
2. Способы приготовления тест-систем различной конструкции и/или культивирования микроорганизмов с применением питательных сред, факторов роста и добавок, и их применения, отличающиеся тем, что позволяют индивидуально готовить среды со специализированным составом в зависимости от объекта исследования и/или регулировать, контролировать взаимодействие микроорганизмов и эукариотических клеток с физическими, химическими, биологическими факторами среды, и/или изменять скорость роста различных неограничительных примеров еще не культивируемых бактерий, грибов в составе смешанных микробных сообществ, изменять и/или усиливать рост и/или синтетическую активность микробных и/или эукариотических клеток, и/или определять действие на них антимикробных агентов для выбора эффективных и/или неэффективных антимикробных агентов и/или их комбинаций, в том числе с максимально узким спектром действия и/или с наивысшим профилем безопасности и/или наиболее дешевых и/или с определенным способом введения, активных против (1) микроорганизмов с лекарственной устойчивостью и/или (2) существующих персистеров или персистеров, которые могут образоваться в процессе антибиотикотерапии инфекции и/или спорообразующих бактерий, (3) рецидивирующих инфекций, проводимый одновременный анализ комбинированного действия антимикробных агентов на основной патоген (ПП) и микроорганизмы-модуляторы (ММ), а также устройства и способы учета результатов этих действий, где указанный образец включает по меньшей мере одно из группы, включающей в себя жидкость, воду, пищу, напитки, биологические жидкости, ткани, микробиологические пробы, фармацевтические препараты, ткани и жидкости млекопитающих, воздух, почву, поверхности, мазки и любую

их комбинацию для применения в биофармацевтическом производстве, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, биоинженерии, разработке и открытии лекарств, экологии, исследовании космоса, космических технологиях, для людей с измененными метаболическими параметрами, с измененной фармакокинетикой и фармакодинамикой лекарств и/или, в частности, детей.

3. Устройство по п. 1, представляющее собой автоматическую или полуавтоматическую станцию/комплекс для подготовки тест-систем различных конструкций с индивидуальными запрограммированными свойствами, набором антимикробных веществ и различных добавок в различных концентрациях и комбинациях, маркировкой всех деталей и свойств конечного продукта и создания его электронного паспорта, подготовки тестируемого материала для засева тест-систем, проведения посева тестируемого материала на тест-систему, обеспечения роста микроорганизмов с различной толерантностью к кислороду в заданных условиях, контроля роста микробов, учета результатов этого роста и/или результатов эффективности антибиотиков, а также внесения результатов в базу данных и/или отправки их по указанному адресу/назначению.
4. Устройство по пп. 1, 3, в котором регистрирующий блок автоматической или полуавтоматической станции/комплекса учитывает результаты роста микроорганизмов в тест-системе и/или результаты эффективности антимикробных препаратов и добавляет результаты в базу данных и/или отправляет их по указанному адресу/назначению.
5. Устройство по пп. 1, 3, 4, в котором отслеживается рост и/или учитываются результаты этого роста и/или результаты эффективности антибиотиков через заданные промежутки времени с помощью неограниченных примеров цифровой фотографии, регистрации в видимом и/или ультрафиолетовом и/или инфракрасном спектрах и/или компьютерных изображений с неограниченным примером расчета значений градаций серого и построений гистограмм, и/или фотометрии, и/или колориметрии и/или проводимости/электрического сопротивления среды.
6. Устройство по пп. 1, 3-5, представляющее собой тест-систему, в которую встроены датчики, позволяющую различными способами отслеживать состояние отдельных клеток, которое меняется в зависимости от наличия и характера роста и метаболизма других микроорганизмов.
7. Устройство по пп. 1, 3-6, где контроль роста микроорганизмов на поверхности среды осуществляется под углом от 1 до 10 и/или от 10 до 30 и/или 30-45 и/или 45-90 градусов к детектирующему датчику.
8. Устройство по пп. 1, 3-7, где тест-система содержит градиенты концентрации для каждого антимикробного агента в одной зоне и/или в виде отдельных изолированных зон,

отражающих их фармакокинетику в определенных тканях и органах от нуля до максимального количества.

9. Устройство по п. 1, в котором биорегулируемые Tetz инкубаторы и/или CO₂-инкубаторы и/или биореакторы и/или термостатные комнаты для культивирования бактерий и/или грибов и/или клеток позволяют контролировать и/или регулировать геомагнитное поле и/или электромагнитное воздействие и/или изменения геомагнитной активности и/или изменения магнитного поля Земли.
10. Устройство по пп. 1, 9, представляющее собой инкубаторы, контейнеры, ферментеры, резервуары, биореакторы, конверты, сумки, лабораторную посуду, лабораторные принадлежности, имеющие корпус/детали из мю-металла, обеспечивающего заданную степень защиты, и/или их комплексы с диэлектриками из пластика или бумаги, имеющие комбинацию медных камер с цинком и пластиком или бумагой.
11. Устройство по пп. 1, 9, 10, включающее в себя инкубаторы, контейнеры, ферментеры, резервуары, биореакторы, конверты, пакеты, лабораторную посуду, лабораторные принадлежности, культуральные планшеты, имеющие оболочку/часть из фольги и/или их комплексов с диэлектриками.
12. Устройство по пп. 1, 9-11, включающее в себя инкубаторы, контейнеры, ферментеры, резервуары, биореакторы, конверты, пакеты, лабораторную посуду, лабораторные принадлежности, культуральные планшеты, имеющие оболочку/часть из мю-металла и/или фольги и/или их комплексов с диэлектриками.
13. Устройство по пп. 1, 9-12, включающее в себя инкубаторы, контейнеры, ферментеры, резервуары, биореакторы, конверты, пакеты, лабораторная посуду, лабораторные принадлежности, культуральные планшеты, имеющие корпус/часть из мю-металла и/или фольги и/или их комплексы с диэлектриками для культивирования эукариот и прокариот, применяемое для анализа окружающей среды, экологии с неограничительными примерами геомагнитных изменений, магнитного поля и/или волн, радиации и состояния здоровья человека, у которого были собраны клетки.
14. Устройство по п. 1, где добавки и факторы роста для питательной среды для регулирования роста различных микроорганизмов, в том числе в составе смешанных микробных сообществ, путем добавления рибавирина (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл) и/или ацикловира (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл) и/или оротата лития (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл) и/или оротата калия (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл), производных 2-хлор-5-фенил-5Н-пиримидо[5',4':5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4-ола (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл), нуклеаз (неограниченные примеры: ДНКаза (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл) и/или РНКаза (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл), ингибиторов транскриптазы и/или интегразы и/или ингибиторов протеаз, неограниченные примеры:

невирапин, этравирин, ламивудин, тенофовир, абакавир, ралтегравир (от 0.1 до 1000.0 мкг/мл), которые могут быть применены для модуляции роста микроорганизмов и/или синтетической активности и/или секреции и/или экспрессии генов, изменения соотношения культивируемых микроорганизмов, включая влияние на долю *Firmicutes*, *Gracilicutes* *Mollicutes*, кислотоустойчивых бактерий, дрожжей, плесени и культур эукариотических клеток.

15. Устройство по п. 1, где рост микробных, грибковых и эукариотических клеток на плотной или жидкой питательной среде происходит от 1 минуты до 24 часов в сутки под воздействием видимого света и/или синего света и/или красного света.
16. Устройство по пп. 1, 15, где для ускоренного роста грибов (дерматофитов, дрожжей, плесеней) неограничительными примерами являются *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Talaromyces*, *Sporothrix*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Malassezia* *Microsporium* *Saccharomyces*, *Saprolegnia*, *Erysiphe*, *Clavicens*, *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Shoem*, *Helmintosporium*, *Alternaria* *Penicillium* *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Absidia*, *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Risopus*, *Eurotium*, включая комбинированный рост различных грибов и/или бактерий в смешанных микробных сообществах, которые можно найти во внешней среде, почве, воде, книгах, предметах искусства, объектах, взаимодействующих с людьми, животными, растениями, грибами, вызывающими заболевания млекопитающих и растений, применяют следующее, включая картофельный отвар от 0.1 до 500 мл; настой из кукурузной муки от 0.1 до 100 мл; овсяную муку от 10 до 350 мл; сердечно-мозговой бульон от 0.001 до 100.0 г; картофельно-морковный отвар от 10 до 350 мл; декстрозу/глюкозу 40 г; пептон 10 г; сахарозу от 0.001 до 100.0 г; целлобиозу от 0.001 до 100.0 г; дрожжевой экстракт от 0.001 до 20.0 г; мальтозу от 0.001 до 100.0 г; NaNO_3 от 0.001 до 10.0 г; K_2HPO_4 от 0.001 до 10.0 г; MgSO_4 от 0.001- 10.0 г; KCl от 0.001 до 10.0 г; FeSO_4 от 0.001 до 40.0 г; Zn SO_4 от 0.001 до 5,0 г; MnCl_2 от 0.001 до 5,0 г, Твин 80 от 0.001 до 10 мл, тиамин от 0.001 до 5,0 мг, биотин от 0.001 до 4,0 мг; агар от 0 до 100 г, производные оротата от 0.001 до 500 г; эритроциты от 0 до 100 мл, антибиотики для подавления роста бактерий (такие как хлорамфеникол, цефалоспорины, тетрациклин).
17. Устройство по пп. 1, 15, 16 для применения для экспресс-выявления грибов (дерматофитов, дрожжей, плесеней), неограниченными примерами которых являются *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Talaromyces*, *Sporothrix*, *Emmonsia*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Saccharomyces*, *Saprolegnia*, *Erysiphe*, *Clavicens*, *Cladosporium*, *Bipolaris*,

Shoem, Helmintosporium, Alternaria, Penicillium, Cladosporium, Alternaria, Epicoccum, Aureobasidium, Absidia, Chrysosporium, Geotrichum, Risopus, Eurotium.

- 18.** Устройство по пп. 1, 15-17 для экспресс-отбора антибиотиков, эффективных против грибов, где противогрибковые агенты выбираются из неограниченных примеров производных азола (кетоконазол, флуконазол, изавуконазол, итраконазол, позаконазол и вориконазол), эхинокандинынов(анидулафунгин, каспофунгин, аминокандин, микафунгин), аллиламинов (тербинафин, нафтин, толнафтат), полиенов (нистатин, амфотерицин В), флуцитозина, ибрексафунгерпа, антисептиков, дезинфицирующих средств.
- 19.** Устройство по п. 1, которое позволяет одновременно выращивать максимальное количество и/или разнообразие неродственных микроорганизмов, присутствующих в месте инфекции, что позволяет регистрировать ранний рост микроорганизмов различными способами и определять эффективность применения антимикробных агентов, добавляемых в среду благодаря их действию на микробный(е) модулятор(ы), контролирующей в месте инфекции свойства основного патогена(ов), путем культивирования биообразцов и/или бактерий и/или грибов на среде, такой как: агар с солями желчных кислот, тиосульфат-цитратный агар с сахарозой и смесью желчных солей, агар с желчью, эскулином и азидом, кровяной агар, шоколадный агар, угольный кровяной агар, сердечный бульон, циклосерин-фруктозный агар, циклосерин-яично-желточный агар, солевой яично-желточный агар, щелочной яично-желточный агар, кровяной сахарный агар, среда Флетчера, нагретый кровяной агар/угольный агар, агар МакКонки, агар маннит-солевой, водно-сывороточная среда Хисса, среда Лёффлера, агар Мюллера-Хинтона, питательный агар, мясо-пептонный бульон, непитательный агар, пептонная вода, среда Пайка, анаэробно стерилизованная среда, среда Робертсона, полужидкий агар, среда для кампилобактерий, бульон для грамотрицательных бактерий, триптон соевый бульон, тиогликолевый бульон, минимальная среда, агар из кукурузной муки, картофельно-декстрозный агар, V-8 соковый агар, дрожжевой экстракт, агар с экстрактом солода, агар сальмонелла шигелла, агар гектоеновый, бульон Фразера, модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM), фетальная телячья сыворотка, налидиксовая кислота, фосфатно-солевой буфер, тетрационатный бульон, агар Сабуро, угольный агар с дрожжевым экстрактом, LB бульон, LB агар, колумбийский бульон, колумбийский агар, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон (MPB), ростовая среда BcS-LM, бруцелла-агар, агар с кукурузной мукой, водный агар, агар Эмерсона YpSs, агар с антибиотиками, подкисленный агар с кукурузной мукой, картофельно-морковный агар, солодовый агар, агар с солодовым экстрактом, картофельно-декстрозный агар и их комбинации.

20. Устройство по п. 1, содержащий антимикробные агенты, добавленные в среду в концентрации (меньше максимальной концентрации в месте инфекции), соответствующей средней концентрации антимикробного агента, достижимой в месте инфекции и/или системной циркуляции в различные моменты времени после введения этого антимикробного агента, с неограничительными примерами: концентрация антимикробного агента от 0 до 1 часа (C_{0-1h}), C_{1-2h}, C_{0-2h}, C_{1-2h}, C_{0-3h}, C_{1-3h}, C_{2-3h}, C_{0-4h}, C_{1-4h}, C_{2-4h}, C_{3-4h}, C_{0-5h}, C_{1-5h}, C_{2-5h}, C_{3-5h}, C_{4-5h}, C_{0-6h}, C_{1-6h}, C_{2-6h}, C_{3-6h}, C_{4-6h}, C_{5-6h}, C_{0-7h}, C_{1-7h}, C_{2-7h}, C_{3-7h}, C_{4-7h}, C_{5-7h}, C_{0-12h}, C_{2-12h}, C_{4-12h}, C_{6-12h}, C_{8-12h}, C_{0-24h}, C_{6-24h}, C_{12-24h}.
21. Устройство по п. 1, содержащее среду, дополненную антимикробным(и) агентом(ми), концентрация которого(ых) выбрана из значений, которые могут быть достигнуты в месте инфекции в течение времени, достаточного для элиминации и/или подавления роста микроорганизмов (неограниченные примеры времени в пределах 30 минут, 2 часов, 3 часов).
22. Устройство по п. 1, позволяющее за 2-6 ч выбрать антибиотик, который избирательно активен против определенных бактерий и/или грибов в микробной смеси, включая бактериально-грибную смесь.
23. Устройство по пп. 1, 21, 22, где концентрации антибиотиков, добавляемых к системе, выбираются на основе особенностей фармакокинетики, которая зависит от способа введения антибиотика индивидууму, неограниченные примеры: топически, энтерально, перорально, парентерально, ингаляционно, интраназально, ректально, вагинально.
24. Устройство по пп. 1, 21-23, где антибиотики выбираются для лечения бактериальных и/или грибковых инфекций, неограниченными примерами которых являются инфекции уха, инфекции синусов, кашель или бронхит, боль в горле, легочные инфекции (пневмония, муковисцидоз, хроническая обструктивная болезнь легких, туберкулез, микобактериоз, гистоплазмоз, бластомикоз, бронхоэктазы, абсцессы, эмпиема), инфекции кожи и мягких тканей (диабетическая раневая инфекция, ожоги, раны, укусы, импетиго, целлюлит/рожистое воспаление, фолликулит, абсцесс кожи, фурункул, карбункул, некротизирующие инфекции мягких тканей), гинекологические инфекции, родовые инфекции, офтальмологические инфекции, инфекции ротоглотки, инфекции желудочно-кишечного тракта (отравления, IBD, воспалительные заболевания кишечника), менингит, сепсис, фунгемия, системный микоз, онихомироз, инфекции мочевыводящих путей, заболевания, передающиеся половым путем, вульвовагинальный кандидоз, у людей с нормальным или нарушенным иммунным ответом, инфекции, вызванные *Burkholderia spp*, в том числе у детей и пациентов, перенесших трансплантацию легких, инфекции, связанные

с персистирующими микроорганизмами и/или вызванные спорообразующими микроорганизмами, и/или рецидивирующие инфекции.

25. Устройство по п. 1, в котором используются культуральные среды и антибиотики (взятые в разных концентрациях), которые позволяют выделить ранее некультивируемые микроорганизмы (ПП и/или ММ) из смешанных сообществ.
26. Устройство по пп. 1, 25, где антимикробный эффект лекарственных кандидатов и/или лекарственных средств оценивают против смешанных микробных сообществ (с неограниченными примерами микробных сообществ биообразцов) для (1) сравнительного анализа с активностью других лекарственных средств (2) выбора популяции пациентов для клинических испытаний (3) оценки эффективности действия на людей и животных.
27. Способ по п. 2, в котором рост микробных, грибковых и эукариотических клеток на плотной или жидкой культуральной среде происходит в течение периода от 1 минуты до 24 часов в сутки в присутствии видимого света и/или синего света и/или красного света или инфракрасного света.
28. Способ по п. 2, где мю-металл использую для изменения и/или усиления микробного роста и/или синтетической активности и/или секреции и/или экспрессии генов с неограниченными примерами природных и/или модифицированных и/или сконструированных эукариотических или прокариотических продуцентов молекул и/или белков, представляющих интерес, систем экспрессии белков, фагового дисплея и систем сверхэкспрессии рекомбинантных белков для применения в неограниченных примерах медицины, биотехнологии, биопроизводства, пищевой промышленности.
29. Способ по п. 2, где для получения чистой культуры культивированных и некультивированных микроорганизмов используют тест-систему, в которой микроорганизмы субкультивируют из зон и/или лунок, содержащих и/или не содержащих антимикробные агенты.
30. Способ по п. 2, где анализ признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. основного патогена и/или микроорганизмов-модуляторов) проводят путем визуального осмотра (т.е. невооруженным глазом, с помощью микроскопа), или путем обнаружения изображения с неограниченными примерами: фотографии, видео, компьютерных изображений, фотометрии, колориметрии с неограниченным примером расчета значений серого и вычисления гистограмм, с или без автоматической программы и/или алгоритма искусственного интеллекта (ИИ) и/или введения входных векторов в платформу машинного обучения и/или программного обеспечения; способов распознавания и обработки изображений, спектрофотометрии, с помощью сканеров, лазеров, с неограниченными примерами, когда анализ поверхности

носителя проводят при (i) определенном фиксированном расстоянии между образцом и камерой (ii) применяют определенную длину волны, (iii) определенный угол между тест-системой и камерой; осуществляют путем сравнения фотоизображений одних и тех же лунок, дополненных интересующим антимикробным агентом (с неограниченным примером, зависимым от времени или концентрации) в течение определенного периода времени или любых их комбинаций, и/или сравнения с ростом в других лунках, и/или сравнения с заранее определенным порогом роста.

- 31.** Способ по п. 2, где анализ признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. первичного патогена и/или микроорганизмов-модуляторов) проводится путем визуального осмотра (т.е. невооруженным глазом, микроскопом), или путем обнаружения изображения с неограниченными примерами: фотографии, видео, компьютерных изображений, фотометрии, колориметрии с неограниченным примером расчета значений серого и вычисления гистограмм, с или без автоматической программы и/или алгоритма ИИ и/или введения входных векторов в платформу машинного обучения и/или программного обеспечения; способов распознавания и обработки изображений, спектрофотометрии, сканеров, лазеров, с неограниченными примерами, когда анализ поверхности носителя проводят при (i) расстоянии между образцом и камерой от 4 до 5 см, от 7 до 10 см, от 12 до 18 см, от 20 до 30 см, от 32,5 до 50 см (ii) увеличении 1x, 1,5x, 2x-10x, 10x-40x, 40x-1000x, (iii) угол между тест-системой и камерой от 1 до 10 и/или от 10 до 30 и/или 30-45 и/или 45-90 градусов к детектирующему датчику); осуществляют путем сравнения фотоизображений одних и тех же лунок, дополненных интересующим антимикробным агентом (с неограниченным примером, зависимым от времени или концентрации) в течение определенного периода времени или любых их комбинаций, и/или сравнения с ростом в других лунках, и/или сравнения с заранее определенным порогом роста.
- 32.** Способ по п. 2, где результаты, полученные тест-системой, позволяют получить данные об эффективности антимикробных агентов в кратчайшие сроки на основе попарного сравнения роста микроорганизмов в одних и тех же лунках за различные периоды времени, когда эффективность антибиотика оценивают путем мониторинга признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. основного патогена и/или модуляторов микроорганизмов) в течение определенного периода времени или любых комбинаций в неограниченных примерах перечисленных ниже периодов времени от: от 0 до 1 часа, от 0 до 2 ч, от 1 ч до 2 ч, от 0 ч до 3 ч, от 1 ч до 3 ч, от 2 ч до 3 ч, от 0 ч до 4 ч, от 1 ч до 4 ч, от 2 ч до 4 ч, от 0 ч до 5 ч, от 1 ч до 5 ч, от 2 ч до 5 ч, от 3 ч до 5 ч, от 0 ч до 6 ч, от 1 ч до 6 ч, от 2 ч до 6 ч, от 3 ч до 6 ч, от 4 ч до 6 ч, от 0 ч до 8 ч, от 1 ч до

8 ч, от 2 ч до 8 ч, от 3 ч до 8 ч, от 4 ч до 8 ч, от 0 ч до 9 ч, от 1 ч до 9 ч, от 2 ч до 9 ч, от 3 ч до 9 ч, от 4 ч до 9 ч, от 5 ч до 9 ч, от 0 ч до 12 ч, от 1 ч до 12 ч, от 2 ч до 12 ч, от 4 ч до 12 ч, от 6 ч до 12 ч, от 8 ч до 12 ч, от 0 ч до 18 ч, от 1 ч до 18 ч, от 2 ч до 18 ч, от 4 ч до 18 ч, от 6 ч до 18 ч, от 8 ч до 18 ч, от 10 ч до 18 ч, от 0 ч до 24 ч, от 1 ч до 24 ч, от 2 ч до 24 ч, от 4 ч до 24 ч, от 12 ч до 36 ч, от 24 ч до 36 ч.

- 33.** Способ по п. 2, где эффективность антибиотика оценивают путем мониторинга признаков появления и/или прогрессирования или отсутствия признаков роста микроорганизмов (т.е. основного патогена и/или микроорганизмов-модуляторов) на агаре в лунках, содержащих интересующий антибиотик, в различные временные точки, включая фиксированное время 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 часов роста.
- 34.** Способ по пп. 2, 31, 32, где модели эффективности антибиотиков создаются с различными вероятностями.
- 35.** Способ по п. 2, включающий в себя получение чистой культуры или ПП из микробной смеси биообразца, где первый этап представляет собой совместный рост смешанных микроорганизмов на среде, содержащей набор антибиотиков, с последующим высевом бактерий на различные среды, содержащие или не содержащие антибиотики.
- 36.** Устройство по п. 1, где алгоритм выбора антибиотика основан на оценке наибольшей вероятности того, что он будет эффективным, и определяется тем, какое значение "X" в уравнении " $C \cdot 1/x \max$ " является наибольшим.

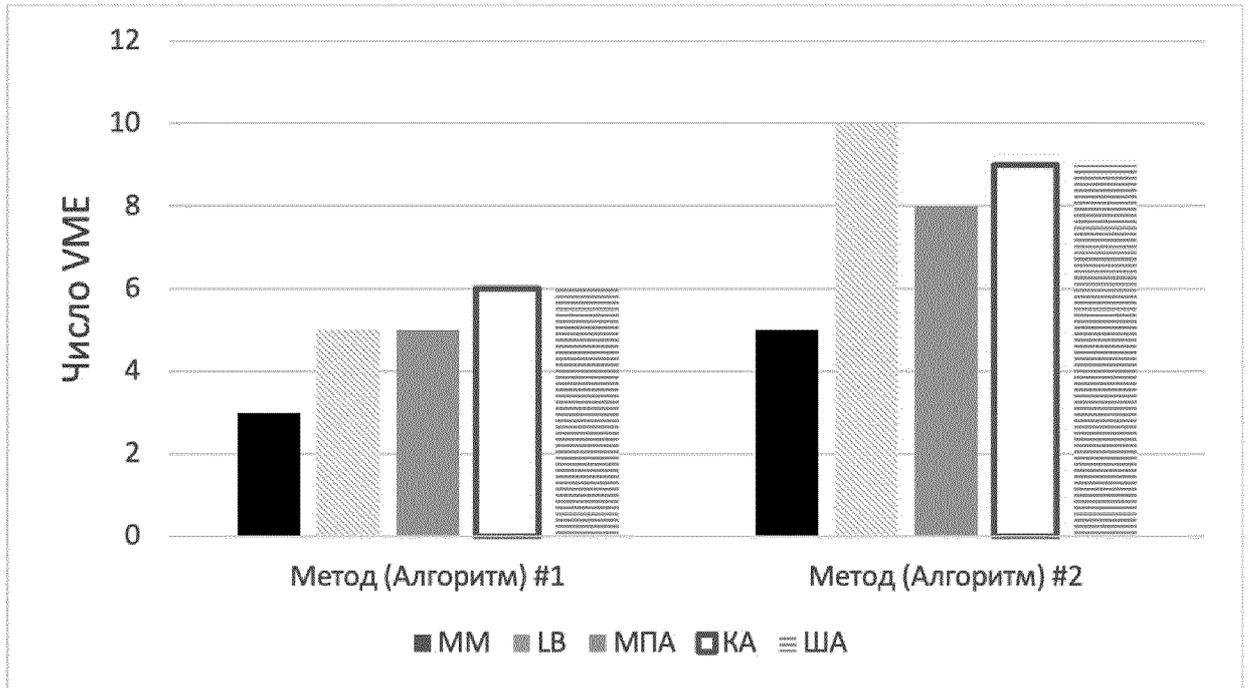
ФИГ. 1



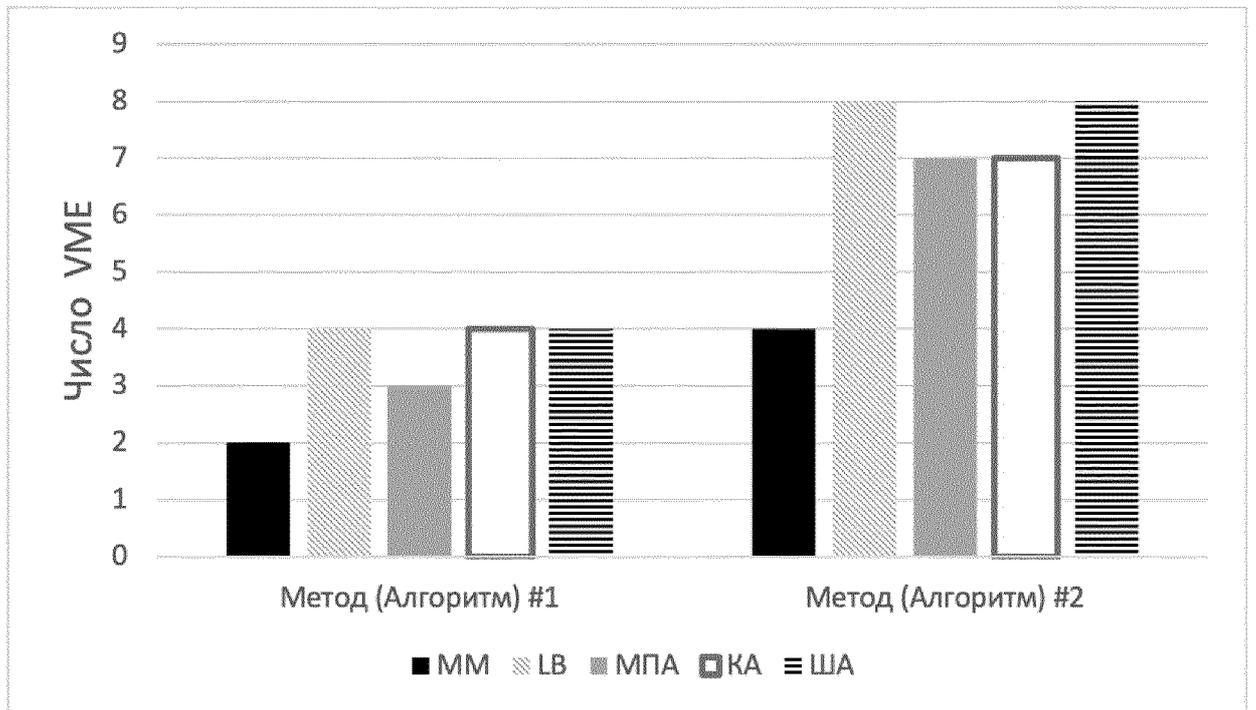
ФИГ. 2



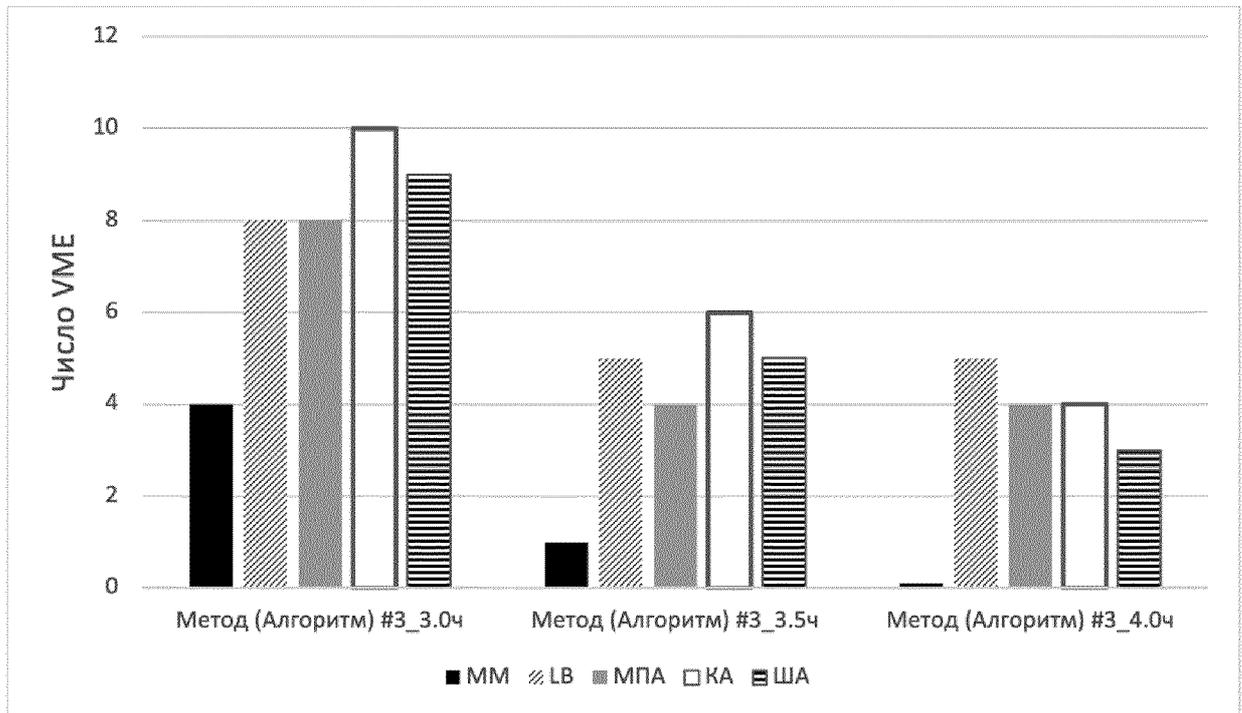
ФИГ. 3



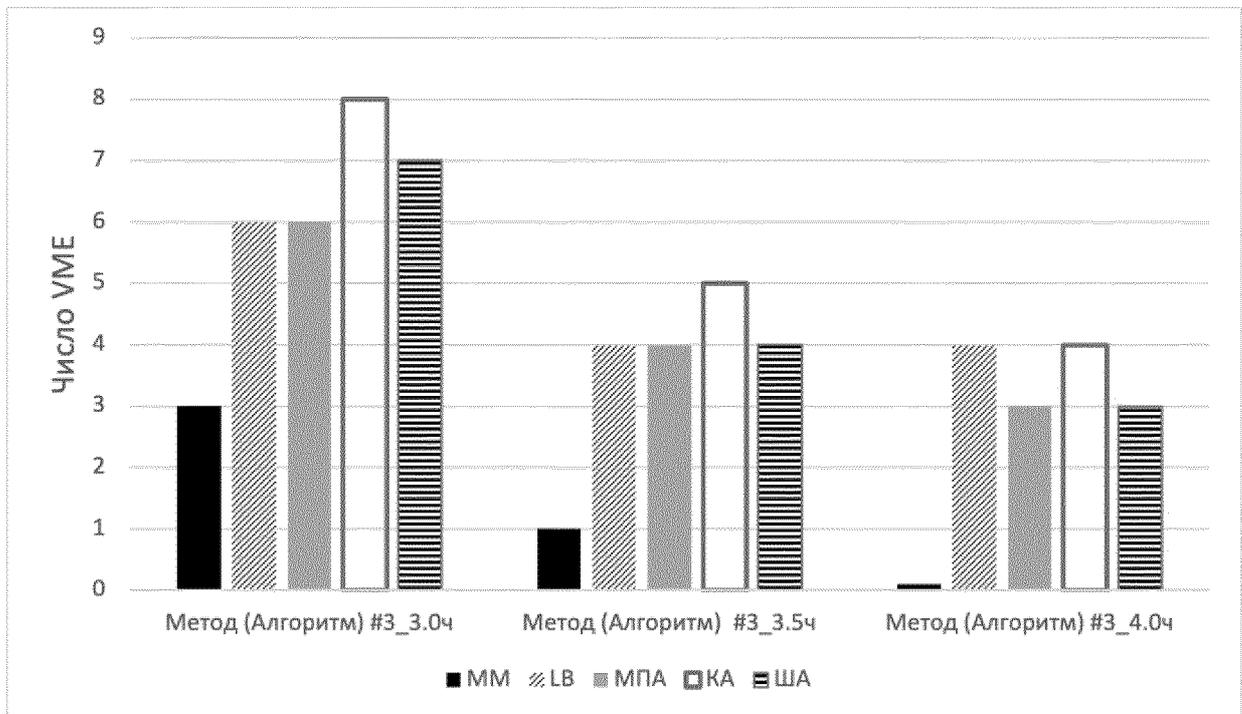
ФИГ. 4



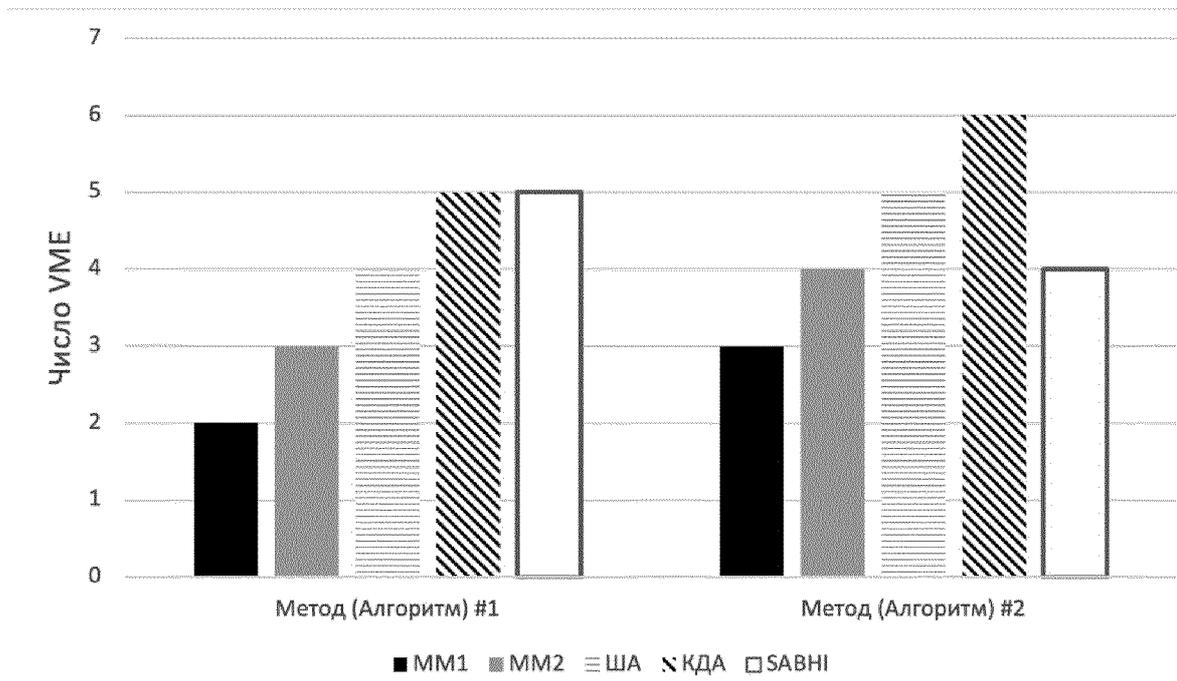
ФИГ. 5



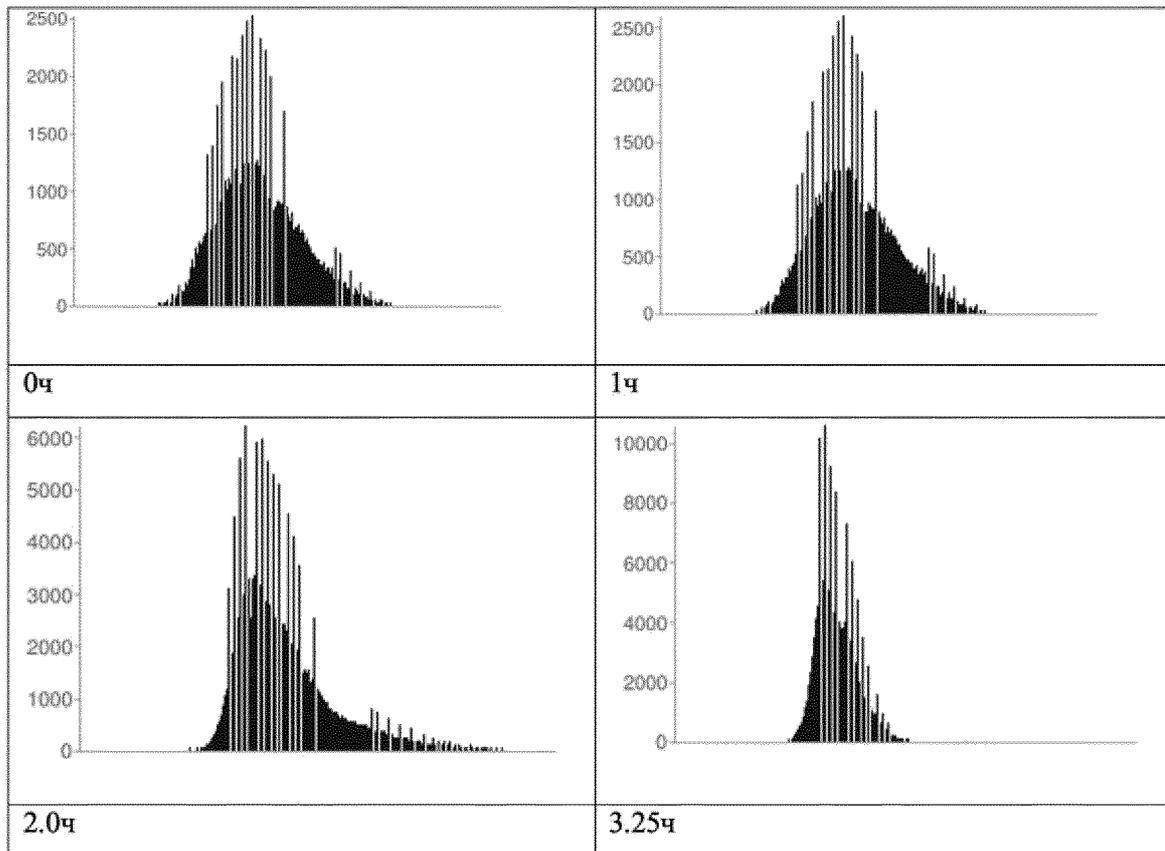
ФИГ. 6



ФИГ. 7

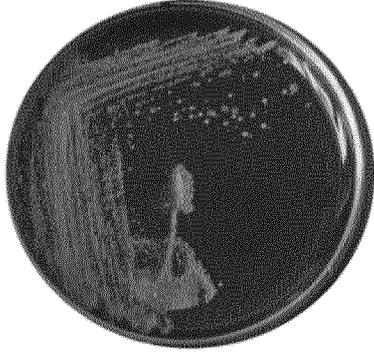


ФИГ. 8

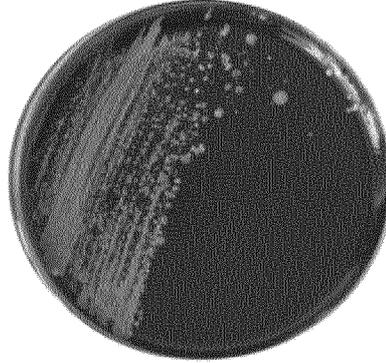


ФИГ. 9

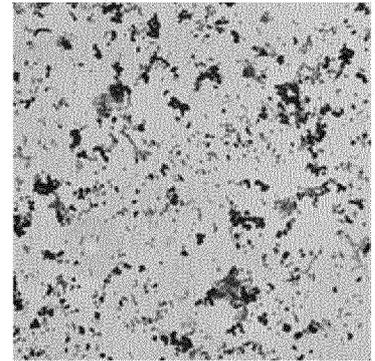
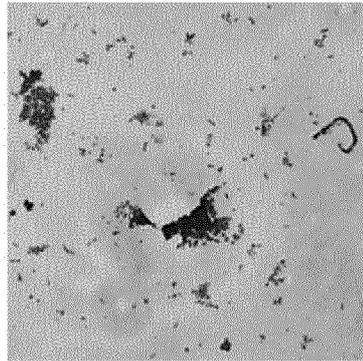
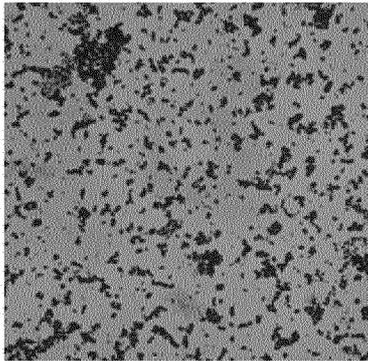
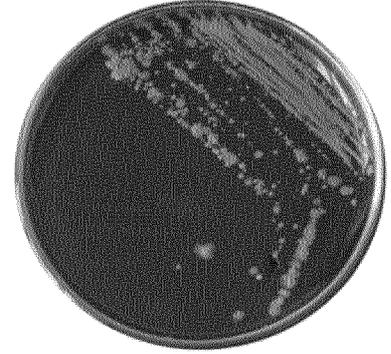
**Нормальное магнитное
поле**



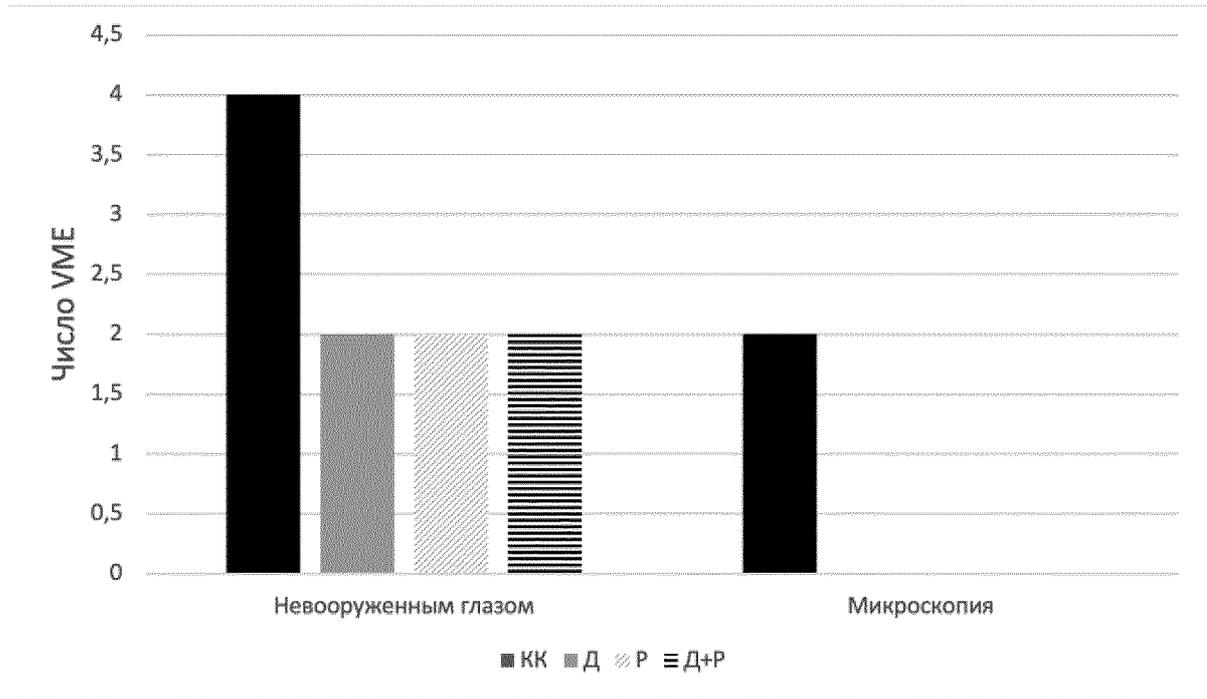
Мю-экранирование



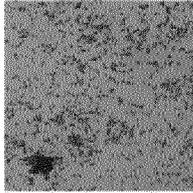
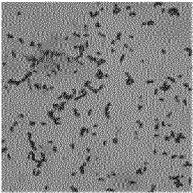
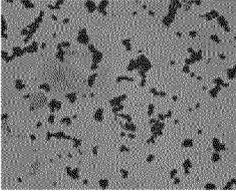
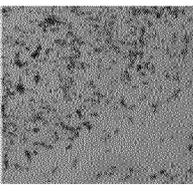
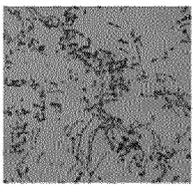
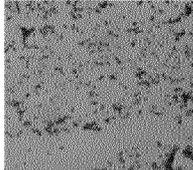
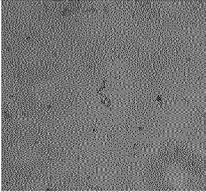
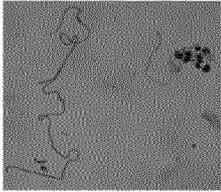
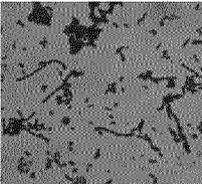
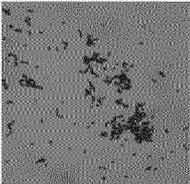
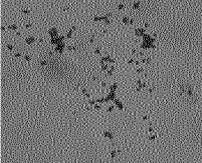
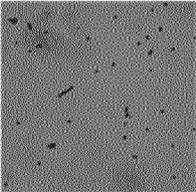
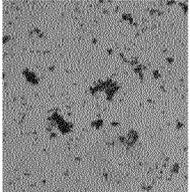
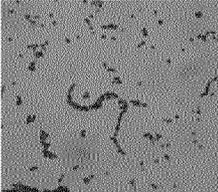
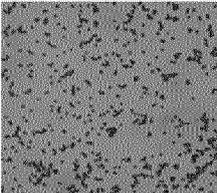
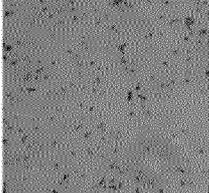
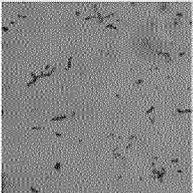
Фольга



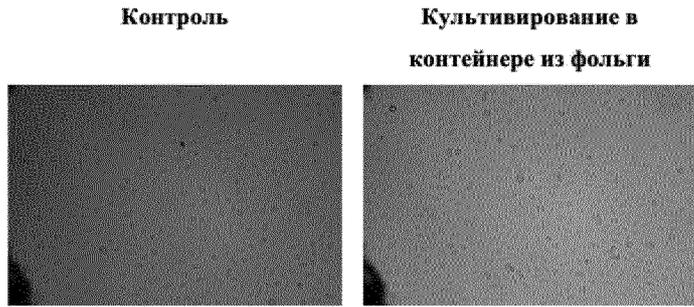
ФИГ. 10



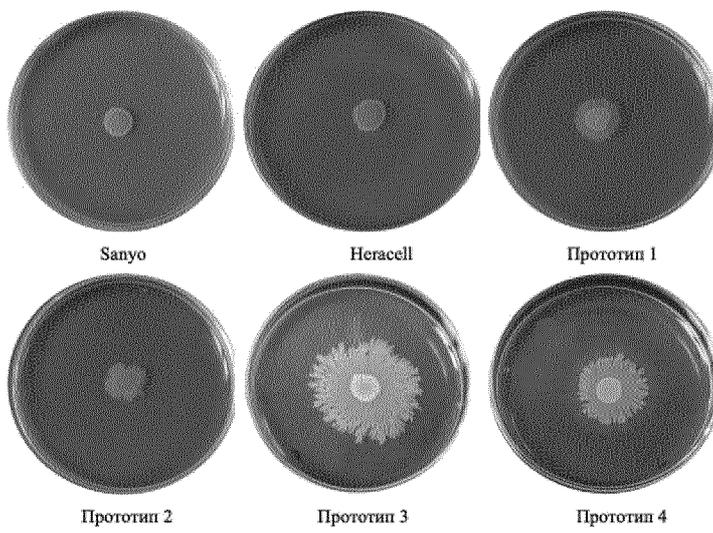
ФИГ. 11

	Нормальное магнитное поле	Фольга	Мю-экранирование
Амоксицилина клавуланат	Нет роста		
Азитромицин			
Цефтриаксон	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Левифлоксацин	Нет роста		Нет роста
Меропенем	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Линезолид	Нет роста		
Амикацин		Нет роста	
Ванкомицин			Нет роста
Клиндамицин			
Цефепим	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Без антибиотика			

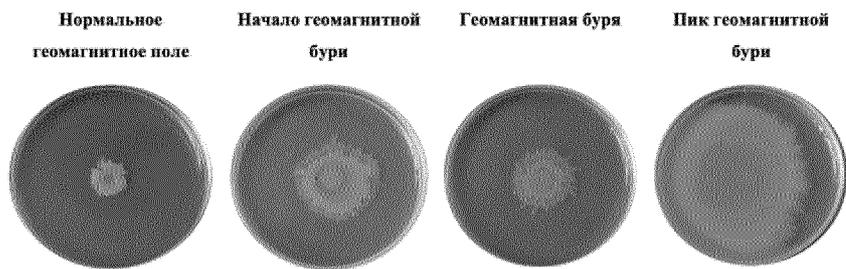
ФИГ. 12



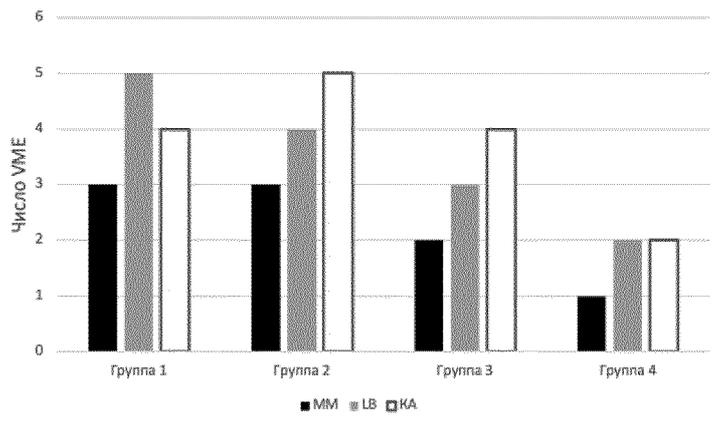
ФИГ. 13



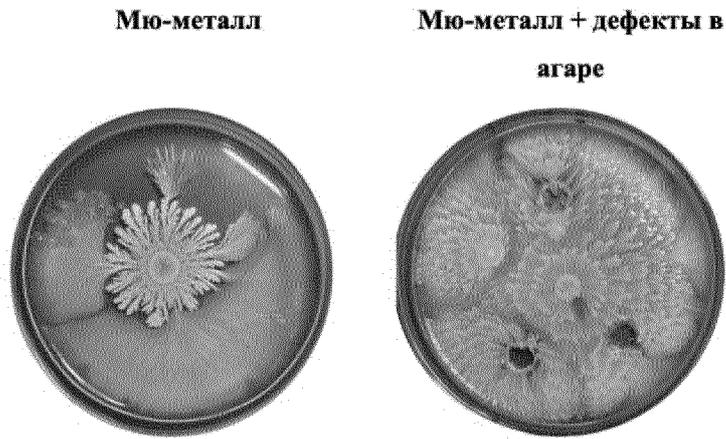
ФИГ. 14



ФИГ. 15



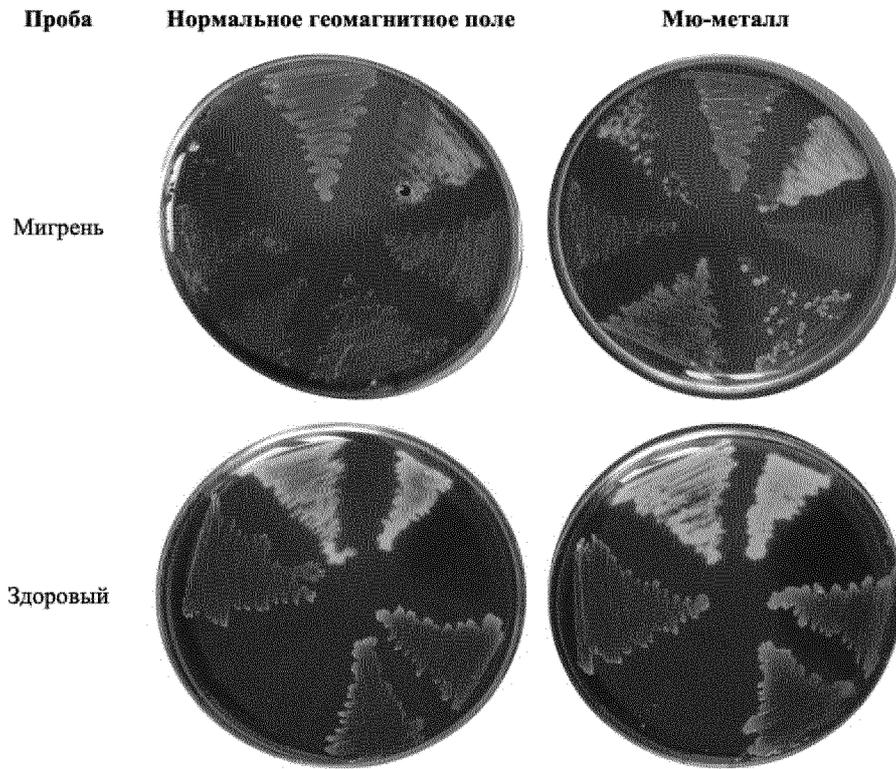
ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19

