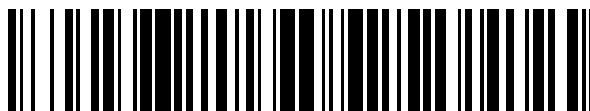


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 874**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2015** **E 15003307 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 3171172**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la detección de bacterias**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2018

73 Titular/es:

SINAMIRA AG (50.0%)
Schlossstrasse 19
82031 Grünwald, DE y
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG (50.0%)

72 Inventor/es:

MIEDL, WALTER;
FRIEDRICH, OLIVER y
GILBERT, DANIEL

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 694 874 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la detección de bacterias

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de bacterias, en particular, a un procedimiento acelerado y altamente sensible para detectar agentes patógenos bacterianos, basado en la formación de complejos de bacterias-bacteriófagos específicos. Además se dan a conocer un recipiente de reacción, así como el uso de este recipiente de reacción y un equipo de medición para la realización del procedimiento según la invención.
- 10 Las bacterias se caracterizan frecuentemente como patógenos causantes de enfermedades serias. En particular, las cepas bacterianas multirresistentes, también denominadas "gérmenes hospitalarios", son responsables de un gran número de infecciones bacterianas en los hospitales. Especialmente en vista del cambio demográfico y de las posibilidades que ofrece la medicina intensiva moderna, en una unidad de cuidados intensivos se encuentran cada vez más pacientes de edad avanzada que son especialmente vulnerables a las infecciones bacterianas. Uno de los componentes fundamentales de la terapia médica intensiva es el diagnóstico microbiológico. La identificación rápida y correcta de los agentes patógenos de una infección no sólo tiene un efecto significativo en la mortalidad de los pacientes, sino que también permite el uso de antibióticos específicos para el germen, lo que permite evitar el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro y la selección asociada de cepas bacterianas multirresistentes.
- 15 Sin embargo, los procesos anteriores requieren generalmente mucho tiempo y también son muy costosos. Por esta razón, hasta ahora los hemocultivos han representado uno de los pilares fundamentales en la elaboración de diagnósticos de las infecciones del torrente sanguíneo. En este contexto, la incubación se realiza en tubos de cultivo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Además de la sangre, también son adecuados líquidos estériles de punciones o extracciones. En general se extraen aproximadamente 3-4 tubos de cultivo con respectivamente 10 ml de sangre entera para el diagnóstico a temperatura ambiente. Los tubos de hemocultivo se incuban en un sistema semiautomático en el que se mide el aumento de crecimiento de bacterias en base al aumento de producción de CO₂ o al aumento de la presión de un tubo. La incubación de rutina lleva en la mayoría de los casos de 48 a 72 horas. En este sentido, las bacterias de crecimiento lento, que pueden requerir una incubación de 5 a 21 días y, por lo tanto, se pasan por alto fácilmente en la rutina, causan problemas particulares. Pero también los medios de cultivo o los procedimientos de tinción especiales complican y retrasan una elaboración de diagnóstico suficiente y rápida.
- 20 Si se detecta positivamente un tubo de hemocultivo, este se selecciona fuera del sistema. De este tubo se extrae una muestra y se crean nuevamente subcultivos aeróbicos y anaeróbicos sobre diferentes medios de cultivo. Después de unas ocho horas más se puede hacer una determinación aproximada de la resistencia y una prueba antibiótica complementaria.
- 25 Una identificación más rápida del agente patógeno es posible directamente desde el tubo de hemocultivo positivo en un plazo de 1-2 horas mediante aglutinación de látex para la detección de antígenos de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitis*, *E. coli* y *Salmonella typhi*. Recientemente se están utilizando métodos de detección de ácido nucleico como la hibridación del ADN, la hibridación fluorescente in situ (FISH) y las técnicas específicas de amplificación del ácido nucleico (NAT) para el diagnóstico de la bacteriemia y la sepsis, pero sólo están disponibles en muy pocos laboratorios. La determinación del agente patógeno se puede realizar en 1-3 horas a partir de un tubo de hemocultivo positivo. Adicionalmente, algunos laboratorios clínicos se han ampliado en los últimos años con espectrómetros de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ ionisation-Time of Flight) que permiten identificar bacterias en un plazo de pocos minutos. No obstante, los métodos modernos de detección descritos anteriormente también requieren un tubo de hemocultivo detectado positivamente. Por lo tanto, la detección de agentes patógenos bacterianos mediante un hemocultivo positivo generalmente sólo puede lograrse en un plazo de 24 a 36 horas después de la extracción de la muestra. En algunos casos, los procedimientos de diagnóstico por PCR permiten obtener la detección de bacterias a partir de muestras de sangre en un plazo de 4 a 6 horas a partir de la extracción sin el paso intermedio de la incubación de un hemocultivo, por ejemplo, para *Staphylococcus aureus*. Los procedimientos más modernos son los procedimientos de amplificación multiplexada, que permiten detectar las especies de agentes patógenos más frecuentes. Estos incluyen, por ejemplo, LightCycler, SeptiFast y SepsiTest. Sin embargo, estas pruebas son relativamente vulnerables a la contaminación, lo que produce resultados falsos o falsos positivos. La carga de trabajo y la estructura de costes de estos procedimientos también son desventajosas, ya que el diagnóstico por PCR requiere no sólo materiales, sino también el personal especializado correspondiente y una infraestructura adecuada.
- 30 Además, debe tenerse en cuenta que en el 2-3 % de los casos la detección positiva de un hemocultivo también se debe a una contaminación de la muestra o a errores de procesamiento tras la extracción de la misma. Las consecuencias son terapias antibióticas erróneas con costes innecesarios y en parte considerables, razón por la cual sería deseable un método rápido, fácil de usar y altamente sensible para la detección de agentes patógenos bacterianos. En cuanto a los requisitos de alta sensibilidad y especificidad, los bacteriófagos (abreviado fagos) ofrecen un punto de partida prometedor. Los bacteriófagos son virus que se enfocan específica y únicamente en las células bacterianas, las reconocen a través de las estructuras receptoras de la superficie, se acoplan a ellas a modo de llave-candado y seguidamente utilizan la estructura genética y enzimática de las bacterias para su propia reproducción. Las células bacterianas infectadas son sometidas a lisis y sueltan numerosos fagos nuevos. Esta cadena de procesos biológicos continúa hasta que todas las células bacterianas hospedadoras accesibles a los fagos libres hayan sido eliminadas. Los fagos casi siempre sólo infectan cepas dentro de una especie bacteriana, es decir, que cada uno es altamente específico para una especie bacteriana determinada. Dado que muchas especies bacterianas se encuentran de forma ubicua en numerosos hábitats, por un principio biológico sus fagos
- 35
40
45
50
55
60
65

complementarios también se pueden suponer allí. En general, el número de fagos estimado por los expertos supera al de bacterias en un factor de diez (C. Rohde & J. Sikorski: Bakteriophagen - Vielfalt, Anwendung und ihre Bedeutung für die Wissenschaft vom Leben. (Bacteriófagos - Variedad, uso y su significado para la ciencia de la vida.) Naturwiss. Rundschau (2011), 64, 5-14). Los bacteriófagos deseados pueden obtenerse frecuentemente de todos los hábitats acuosos imaginables mediante un simple muestreo y un posterior cribado contra las bacterias objetivo. Debido a su enorme especificidad de hospedador y a sus propiedades líticas, los fagos ya se utilizan de forma variada en la investigación y el análisis clínicos, por ejemplo, en la terapia fágica contra infecciones bacterianas. Thanki, Malik y Clokie describen además el desarrollo de un fago reportero bioluminiscente para la identificación de *Clostridium difficile*, en el que los casetes génicos *luxA* y *luxB*, que codifican la enzima luciferasa, se clonan a un plásmido para la conjugación en un fago específico de *Clostridium difficile* e inserción homóloga en el genoma del fago (A. Thanki, D. Malik, M. Clokie, The Development of a Reporter Phage for the Identification of *Clostridium difficile*, Bacteriophages (El desarrollo de un fago reportero para la identificación de bacteriófagos de *Clostridium difficile*) (2015), resumen, 25). La publicación científica de Mosier-Boss y otros describe además la detección específica de *Salmonella typhimurium* LT2 utilizando fagos P22 marcados con fluorescencia. El mercado de fagos en el planteamiento descrito se limita completamente al ADN de los fagos (incubación de 10 min. de P22 con SYBR gold) que es inyectado en la bacteria hospedadora en caso de infección. La detección de complejos específicos de *Salmonella typhimurium*-fago P22 tiene lugar tras su aislamiento mediante microscopía de fluorescencia. (P.A. Mosier-Boss y otros, Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species (Uso de fagos marcados con fluorescencia en la detección y la identificación de especies bacterianas), Applied Spectroscopy (2003), 57, 1138-1144).

También en la industria alimentaria y en el suministro de agua potable es importante una detección de bacterias sencilla y segura. Las cepas de Legionella se pueden reproducir en el agua potable a temperaturas entre 20 y 45°C, por lo que es necesario, y en muchos países obligatorio por ley, realizar análisis regulares del agua potable. Por ejemplo, la ordenanza alemana de agua potable estipula la obligación regular de realizar pruebas de Legionella. Es de esperar que las disposiciones legales se vuelvan cada vez más estrictas. Por esta razón, los institutos y las autoridades, por ejemplo, los laboratorios de agua potable o las autoridades sanitarias, están interesados en una detección de bacterias rápida, fácil, sensible y segura para cepas de Legionella. Actualmente esto no existe y es deseable lograr una mejora.

Por otra parte, las intoxicaciones alimentarias bacterianas transmitidas por los alimentos y las infecciones por toxinas alimentarias son un problema mundial y causan enormes daños económicos. El largo período de tiempo hasta la detección segura de los agentes patógenos supone una pérdida económica considerable, ya que, o bien se prolonga el período de almacenamiento de los productos hasta su venta posterior o incluso se puede llegar a la retirada del alimento correspondiente. Un método de detección más rápido y seguro puede contribuir significativamente a la seguridad alimentaria y a la minimización de las pérdidas económicas. Los agentes patógenos temidos en el sector alimentario son, entre otros, *Cronobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, o *Bacillus cereus*. Por lo tanto, la rápida exclusión o detección de agentes patógenos en los alimentos es esencial para su autorización.

Otras áreas en las que es deseable una detección rápida y sencilla de bacterias incluyen la agroindustria, la medicina veterinaria o las aplicaciones en el sector militar o la prevención de catástrofes.

La publicación de P.A. Mosier-Boss y otros ("Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species" (Uso de fagos marcados con fluorescencia en la detección e identificación de especies bacterianas), Applied Spectroscopy 2003, 57, 1138-1144) describe la detección específica de bacterias de *Salmonella typhimurium* LT2 con la ayuda de bacteriófagos P22 marcados con fluorescencia mediante SYBR Gold. Para ello, las bacterias se mezclan con los fagos marcados, se incuban y la suspensión se filtra finalmente a través de un filtro Whatman con un tamaño de poros de 0,2 µm. El residuo sobre el filtro, es decir, los complejos de bacterias-bacteriófagos generados, se analizan a continuación en el microscopio de fluorescencia.

El documento WO 2006/105504 A1 también da a conocer un procedimiento, así como un dispositivo para detectar microorganismos. El dispositivo comprende bacteriófagos marcados, así como un recipiente con dos cámaras y un elemento separador, tal que el elemento separador separa las dos cámaras entre sí. Además, el elemento separador puede ser un filtro (tamaño de poros de 0,2 µm) o una membrana que deja pasar los bacteriófagos marcados mientras retiene a los microorganismos. Adicionalmente, además de los complejos de bacterias-bacteriófagos de una fracción separada, también se pueden detectar los bacteriófagos no acoplados de la otra fracción separada.

Asimismo, en el documento US 2001/0006783 A1 se describen un procedimiento, así como un dispositivo para la detección de bacterias, tal que la detección se basa en la medición de la fluorescencia de ADN de fagos marcados tras la inyección en las bacterias. Para ello se utiliza un detector de bacterias que contiene un medio de detección óptico como, por ejemplo, un microscopio (de fluorescencia), un espectrofotómetro (de fluorescencia) o un detector de fluorescencia. Además, los dispositivos pueden contener un procesador de imágenes para la valoración asistida por procesador de las señales de detección.

En relación a las desventajas de los procedimientos de detección clínica para bacterias del estado de la técnica, en particular, en términos de tiempo necesario, complejidad e intensidad de costes, se necesitan diagnósticos nuevos, más rápidos y más específicos para la detección selectiva y a corto plazo de bacterias, ya sea para aplicaciones clínicas, humanas o veterinarias, agroindustriales o militares, o para el análisis del agua potable, por citar sólo algunas aplicaciones específicas. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento mejorado para la detección de bacterias, que proporcione una identificación más rápida y fiable de

agentes patógenos bacterianos, un manejo simplificado y una alta sensibilidad a un coste menor. También debe proporcionarse un recipiente de reacción para la realización del procedimiento según la invención.

5 La solución de la invención para el objetivo anteriormente mencionado se basa en la interacción conservada en la evolución y altamente específica entre bacterias y bacteriófagos.

Por tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la detección de bacterias, que comprende los pasos

10 A) Proporcionar una suspensión que comprenda al menos una especie de bacteriófagos de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie bacteriana a detectar, tal que el marcado es característico para la especie respectiva de bacteriófagos de prueba;

15 B) Añadir a la suspensión una muestra que se va a analizar en relación a la presencia de al menos una especie bacteriana a detectar;

C) Mezclar la muestra con la suspensión e incubar la mezcla de reacción;

20 D) Filtrar la mezcla de reacción a través de un filtro, tal que el filtro presenta un tamaño de poros de 0,1 μm a 0,5 μm y el tamaño de poros del filtro utilizado se elige de forma que la al menos una especie bacteriana a detectar, así como los complejos de bacterias-bacteriófagos compuestos por bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y bacteriófagos de prueba de la al menos una especie, acoplados a estas, quedan retenidos e inmovilizados sobre la superficie del filtro, mientras los bacteriófagos no acoplados pueden pasar el filtro;

25 E) Detección de complejos de bacterias-bacteriófagos en el residuo si está presente al menos una especie bacteriana a detectar, estando compuestos los complejos de bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y de bacteriófagos de prueba acoplados a estas, de la al menos una especie de bacteriófagos de prueba;

30 F) Detección de bacteriófagos de prueba no acoplados en el filtrado;

35 G) Procesamiento asistido por procesador de las señales recibidas que son generadas mediante la detección en los pasos F) y G) y emisión de resultados de detección a un usuario,

40 caracterizado por que la suspensión comprende además un bacteriófago de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos de prueba, de forma que el bacteriófago de referencia marcado también es detectado en el paso F); o por que, alternativamente a un bacteriófago de referencia marcado, se utilizan micro o nanopartículas marcadas que no se acoplan a ninguna especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro debido a su pequeño tamaño.

45 La presente invención se refiere además a un recipiente de reacción para realizar el procedimiento para detectar bacterias según la invención, que comprende al menos dos compartimentos que están separados entre sí por un filtro, siendo un compartimento un depósito de fagos que contiene una suspensión que comprende al menos una especie de bacteriófagos de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie bacteriana a detectar, siendo la marca característica para la especie respectiva de bacteriófago de prueba; y siendo un compartimento un depósito de recogida para la recepción del filtrado tras la adición de una muestra a la suspensión y filtración a través del filtro, y presentando el filtro un tamaño de poros de 0,1 μm a 0,5 μm y tal que el tamaño de poros del filtro utilizado se selecciona de forma que la al menos una especie bacteriana a detectar, así como los complejos de bacterias-bacteriófagos compuestos por bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y bacteriófagos de prueba de la al menos una especie, acoplados a estas, sean retenidos e inmovilizados sobre la superficie del filtro, mientras los bacteriófagos no acoplados pueden pasar el filtro;

50 un medio para la identificación del recipiente de reacción; y al menos dos ventanas de medición, estando dispuesta una ventana de medición en la zona de la superficie del filtro que está orientada al depósito de fagos, y una ventana de medición en la zona del depósito de recogida,

55 caracterizado por que la suspensión comprende además un bacteriófago de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos de prueba o por que el recipiente de reacción comprende otro compartimento entre el filtro y el depósito de fagos, que contiene una solución indicadora con micro o nanopartículas marcadas que no se acoplan a una especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro debido a su tamaño reducido.

60 La presente invención se refiere además a un cartucho que comprende dos o varios recipientes de reacción según la invención, que están dispuestos en paralelo entre sí, tal que cada recipiente de reacción contiene una especie diferente de bacteriófagos de prueba marcados en la suspensión del depósito de fagos, que se acoplan respectivamente de forma específica a diferentes especies bacterianas a detectar, siendo las marcas de las especies disjuntas.

La presente invención se refiere además al uso de un equipo de medición para realizar el procedimiento para detectar bacterias según la invención, tal que el equipo de medición comprende:

- 5 una ranura, en la que se introduce un recipiente de reacción según la invención o un cartucho según la invención;
- al menos dos sistemas ópticos de detección que están dispuestos respectivamente en la zona de la ventana de medición del recipiente de reacción o el cartucho introducido, tal que los sistemas ópticos de detección comprenden respectivamente un sistema de lentes para enfocar la luz emitida por la marca de los bacteriófagos en al menos un sensor óptico, tal que el al menos un sensor óptico detecta la luz emitida;
- 10 un procesador que está conectado respectivamente al al menos un sensor óptico de los sistemas ópticos de detección y que procesa las señales de detección recibidas; y
- una unidad de emisión conectada al procesador que emite los resultados de la detección a un usuario.

El efecto ventajoso de la presente invención consiste, por un lado, en la identificación rápida y altamente sensible de agentes patógenos bacterianos. En este sentido, para el procedimiento según la invención no es necesario realizar un hemocultivo. Más bien es posible utilizar una muestra, que se va a analizar para detectar la presencia de una especie bacteriana determinada, directamente tras la extracción de la misma. De este modo, en el caso ideal, la detección de bacterias tiene lugar sin necesidad de transporte y almacenamiento de la muestra, en menos de 1 hora. Esto permite una aplicación de antibióticos más rápida y específica para el germen, evitando un uso profiláctico de antibióticos de amplio espectro. Además, con ayuda del procedimiento según la invención se pueden detectar bacterias incluso a partir de una concentración inferior a 100 bacterias por mililitro. Por otro lado, el presente procedimiento se caracteriza por el uso directo de la muestra de medición tras su extracción y por la simplicidad en el manejo, por lo que es menos vulnerable a fallos de procesamiento. Además, la realización del procedimiento con ayuda del recipiente de reacción según la invención y del equipo de medición según la invención no requiere personal especializado y cualificado o una infraestructura especial, lo que reduce considerablemente los costes.

25 Figuras

Figura 1: Representación esquemática de un modo de realización preferente del procedimiento según la invención para detectar bacterias

Figura 2: Representación esquemática de otro modo de realización preferente del procedimiento según la invención para detectar bacterias

Figura 3 A: Representación esquemática de un modo de realización preferente del recipiente de reacción según la invención para detectar bacterias

Figura 3 B: Desarrollo teórico de una medición de la fluorescencia en el tiempo en un modo de realización preferente del procedimiento según la invención utilizando el recipiente de reacción según la invención de la figura 3A.

Figura 4: Representación esquemática de la estructura del recipiente de reacción y el equipo de medición según la invención en un modo de realización.

Figura 5: Chip RFID como medio de identificación del recipiente de reacción según la invención.

Figura 6: Marcado de un bacteriófago TB54 con ésteres de NHS-fluoresceína.

Figura 7: Espectro de excitación y emisión de bacteriófagos TB54 marcados con fluoresceína.

Figura 8 A: Toma mediante microscopía de fluorescencia de la interacción bacterias-bacteriófagos.

Figura 8 B: Toma de campo claro de la interacción de bacterias-bacteriófagos.

Figura 9 A: Imágenes ópticas en sección de bacterias *Escherichia coli* infectadas con bacteriófagos TB54 marcados con fluoresceína al trasluz y en representación mediante microscopía de fluorescencia.

Figura 9 B: Reconstrucciones tridimensionales de bacterias *Escherichia coli* infectadas con bacteriófagos TB54 marcados con fluoresceína.

Figura 10 A: Espectros de fluorescencia de bacteriófagos TB54 marcados con fluoresceína para concentraciones de bacteriófagos diferentes.

Figura 10 B: Representación de la integral entre 520 y 530 nm de los espectros de fluorescencia de la figura 10A para concentraciones de bacteriófagos diferentes.

Figura 11 A-C: Medición de la densidad óptica de una suspensión de bacterias diluida en serie, representación de las señales de fluorescencia detectadas de complejos de *E. coli* C600-Fagos TB54 en la superficie del filtro, en el

residuo, así como representación de las señales de fluorescencia detectadas de fagos TB54 no acoplados en el filtrado, respectivamente para concentraciones de bacterias diferentes.

El procedimiento según la invención comprende en el paso A) proporcionar una suspensión que comprenda al menos una especie de bacteriófagos de prueba marcados, que se acoplen específicamente a una especie bacteriana a detectar. En este contexto, el marcado es característico para la especie respectiva de bacteriófagos de prueba marcados. Esto significa que las marcas acopladas a las diferentes especies de bacteriófagos de prueba son respectivamente disjuntas.

Preferentemente, el volumen de la suspensión es de entre 0,5 y 5,0 ml.

La concentración de bacteriófagos en la suspensión, también denominada título fágico, es preferentemente de 10^3 - 10^{12} ufp/ml (ufp = "unidades formadoras de placa"), más preferentemente de 10^4 - 10^{10} ufp/ml. Se prefiere especialmente un título fágico en la suspensión de 10^5 - 10^7 ufp/ml.

Dependiendo de la especie bacteriana que se va a detectar se elige una especie de bacteriófagos de prueba para la obtención de la suspensión, que se acopla específicamente a esta especie bacteriana, es decir, que infecta específicamente a esta especie bacteriana. Debido a la enorme especificidad de hospedador de los bacteriófagos, conservada en la evolución, también es posible una detección específica de cepas individuales dentro de una especie bacteriana. En este caso se elige una especie de bacteriófagos de prueba para la obtención de la suspensión, que se acople específicamente a una cepa determinada dentro de una especie bacteriana. El acoplamiento de la especie elegida de bacteriófagos de prueba a una especie bacteriana diferente a la que se va a detectar o a una cepa diferente a la que se va a detectar queda prácticamente excluido. Por lo tanto, la posibilidad de obtener una detección de falso positivo a través del procedimiento según la invención es mínima y el resultado del procedimiento de detección según la invención es extremadamente fiable. Para poder detectar en el procedimiento subsiguiente los bacteriófagos de prueba de la al menos una especie y los complejos de bacterias-bacteriófagos generados, los bacteriófagos de prueba llevan una marca. La marca es característica para la especie respectiva de bacteriófagos de prueba, es decir, todos los bacteriófagos de prueba de una especie llevan la misma marca, que se puede diferenciar de las marcas de otras especies.

Para la obtención de la suspensión, los bacteriófagos de prueba marcados de la al menos una especie respectiva se suspenden en agua o en una solución tampón adecuada. Como soluciones tampón adecuadas se utilizan preferentemente tampón fosfato 0,01-0,3 M, pH 6,5-9,5; tampón carbonato 0,01-0,3 M, pH 6,5-9,5; tampón fosfato salino (PBS) o mezclas de las mismas. Más preferentemente, el agua y las soluciones tampón adecuadas contienen respectivamente $MgCl_2$, $MgSO_4$ y/o $CaCl_2$. Preferentemente, la concentración de $MgCl_2$, $MgSO_4$ y $CaCl_2$ es respectivamente de 1 a 15 mM.

En el paso B) del procedimiento según la invención se añade a la suspensión una muestra que se va a analizar en relación a la presencia de al menos una especie bacteriana a detectar. Preferentemente, la muestra está compuesta por un fluido corporal humano o animal como sangre, orina, saliva u otro fluido corporal, por un frotis tomado a una persona o un animal, por agua de un sistema de agua potable o por alimentos o componentes de alimentos preparados en solución acuosa. La muestra se puede añadir a la suspensión directamente tras la extracción, sin tratamiento previo adicional. Los alimentos o componentes de alimentos se preparan en solución acuosa. De este modo se reduce considerablemente el tiempo necesario para la detección de bacterias y se minimiza el riesgo de una contaminación por el transporte y/o el almacenamiento. Además, el procedimiento según la invención también permite realizar la detección de bacterias en una muestra procedente de un cultivo bacteriano realizado.

Preferentemente, la muestra se filtra antes de la adición a través de un filtro grueso con un tamaño de poros de 0,5-10,0 μm para eliminar posibles impurezas de partículas (> 0,5 μm), para poder evitar una posible obstrucción del filtro en el paso D) subsiguiente. Alternativamente también se puede utilizar un filtro grueso de varias etapas con tamaños de poros decrecientes de 0,5-10 μm . El volumen de la muestra es preferentemente de 0,05-2,5 ml, más preferentemente de 0,1-2,0 ml y de forma especialmente preferente de 0,5-2,0 ml. También son posibles combinaciones de los rangos de volumen mencionados.

La muestra se mezcla en el paso C) con la suspensión. La mezcla tiene lugar preferentemente mediante movimientos giratorios repetidos o agitación moderada. La mezcla de reacción generada se incuba preferentemente de 2-30 min., más preferentemente de 5-15 min. y de forma especialmente preferente de 5-10 min. La temperatura durante la incubación es preferentemente de 4-60°C, más preferentemente de 10-30°C. Se prefiere especialmente una incubación de la mezcla de reacción a temperatura ambiente (T_a , 20-25°C). Mediante la mezcla y la incubación se pretende asegurar, en el caso de la presencia de al menos una especie bacteriana a detectar, que cada bacteria a detectar fue acoplada o infectada antes de la filtración siguiente en el paso D) con el bacteriófago de prueba marcado de la al menos una especie respectiva.

El filtro para la filtración de la mezcla de reacción en el paso D) presenta un tamaño de poros de 0,1-0,5 μm , preferentemente de 0,2-0,5 μm , más preferentemente de 0,3-0,5 μm y de forma especialmente preferente de 0,2-0,4 μm . En general, el tamaño de poros del filtro utilizado se elige de forma que la al menos una especie bacteriana a detectar, así como los complejos de bacterias-bacteriófagos compuestos por bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y bacteriófagos de prueba de la al menos una especie, acoplados a estas, quedan retenidos e inmovilizados sobre la superficie del filtro, mientras los bacteriófagos no acoplados pueden pasar el filtro. De este modo se consigue una separación de complejos de bacterias-bacteriófagos de la especie bacteriana a detectar y otras bacterias eventualmente presentes de los bacteriófagos no acoplados. El tamaño de poros del filtro utilizado se elige por tanto en función del tamaño y la morfología de la especie bacteriana respectiva a detectar.

El filtro está compuesto preferentemente por una membrana, una lámina o una matriz, como un lecho de bolas o una superficie nano o microestructurada de material filamentosos o tubular (por ejemplo, fibras/fibras huecas).

Preferentemente, el material del filtro está compuesto por polímeros sintéticos o naturales, como policloruro de vinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno (PP), poliéter sulfona (PES), polietilenglicol (PEG), poli(acrilamida) (PAA), politetrafluoroetileno (PTFE), nylon, polidimetilsiloxano (PDMS), almidón, compuestos de azúcar, látex o silicona; metal o aleaciones de metal que pueden ser magnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos o no magnéticos; vidrio, como vidrio de borosilicato: celulosa, como metilcelulosa o celulosa regenerada u otros compuestos de carbono, como carbón activado.

La filtración tiene lugar preferentemente de forma gravimétrica, mediante aplicación de un vacío o mediante sobrepresión.

La detección de complejos de bacterias-bacteriófagos en la superficie del filtro, en el residuo, en el paso E), así como la detección de bacteriófagos de prueba no acoplados en el filtrado en el paso F) se basan respectivamente en la detección de la marca con la que están dotados los bacteriófagos. Por ejemplo, la marca puede estar compuesta por una molécula reportera con propiedades fluorescentes. Tras la correspondiente excitación de la molécula reportera puede detectarse la señal de fluorescencia emitida a través de un sensor óptico.

Las señales recibidas de los pasos E) y F) como, por ejemplo, las señales de fluorescencia detectadas respectivamente, son procesadas en el paso G) por un procesador y los resultados de la detección son emitidos finalmente a un usuario.

La emisión tiene lugar preferentemente a través de una pantalla óptica conectada al procesador. Alternativamente, los resultados de la detección pueden transmitirse también de forma inalámbrica por radio desde el procesador a una tableta o un terminal de ordenador remoto.

Si en la muestra está presente al menos una especie bacteriana a detectar, los bacteriófagos de prueba marcados de la al menos una especie se acoplan específicamente a la al menos una especie bacteriana a detectar y forman de este modo los correspondientes complejos de bacterias-bacteriófagos. Estos complejos, así como otras bacterias se separan de los bacteriófagos no acoplados mediante la filtración. De este modo, los complejos inmovilizados sobre la superficie del filtro pueden detectarse en base a la marca de los bacteriófagos de prueba acoplados.

Los bacteriófagos de prueba en exceso, no acoplados, pueden pasar el filtro y detectarse en el filtrado mediante su marca. Si la muestra no contiene ninguna especie bacteriana a detectar, entonces no puede generarse ningún complejo y solo se detectan bacteriófagos de prueba no acoplados en el filtrado.

La detección adicional de bacteriófagos de prueba no acoplados en el paso F) reduce el riesgo de recibir una señal de falso positivo en caso de obstrucción del filtro. Si la muestra no contiene ninguna especie bacteriana a detectar y el filtro se obstruye, por ejemplo, debido a una especie bacteriana que no se va a detectar u otra partícula en la solución de reacción, entonces los bacteriófagos de prueba no acoplados no pueden pasar el filtro y permanecen en el residuo. De esto resulta una detección en el residuo, aunque no se puede formar ningún complejo específico de bacterias-bacteriófagos. El resultado es una detección de falso positivo de la especie bacteriana a detectar. Es decir que si no es posible una detección de bacteriófagos de prueba no acoplados en el filtrado en el paso F), esto indica una obstrucción del filtro. Como consecuencia, la detección adicional de bacteriófagos de prueba no acoplados en el paso F) aumenta la fiabilidad del procedimiento de detección según la invención.

Alternativamente, la falta de una detección de bacteriófagos de prueba no acoplados en el filtrado en el paso F) puede deberse a que todos los bacteriófagos de prueba se han acoplado a la al menos una especie bacteriana a detectar. Aunque esta posibilidad es improbable debido al elevado título fágico, la suspensión comprende además un bacteriófago de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos de prueba para aumentar aún más la fiabilidad del procedimiento de detección según la invención. El bacteriófago de referencia también puede detectarse mediante la marca. La marca de los bacteriófagos de referencia se diferencia de las marcas de los bacteriófagos de prueba de forma que el bacteriófago de referencia puede detectarse de forma inequívoca e independientemente de los bacteriófagos de prueba respectivos. Puesto que el bacteriófago de referencia no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar, es decir, no forma ningún complejo con bacterias, puede detectarse después de la filtración, en un caso ideal exclusivamente en el filtrado. Por el contrario, si en el filtrado no puede detectarse ningún bacteriófago de referencia, esto indica una obstrucción total del filtro.

También en caso de una obstrucción parcial o total del filtro durante la realización del procedimiento, el uso de un bacteriófago de referencia proporciona un resultado de detección muy fiable. Para ello se determina el cociente entre la intensidad de señal total del bacteriófago de referencia en el residuo y la intensidad de señal total del bacteriófago de referencia en el filtrado y se compara con el cociente entre la intensidad de señal total del al menos un bacteriófago de prueba en el residuo y la intensidad de señal total del al menos un bacteriófago de prueba en el filtrado. Si el cociente determinado para el al menos un bacteriófago de prueba es considerablemente superior al cociente determinado para el bacteriófago de referencia, entonces esto proporciona una prueba inequívoca de la presencia de al menos una especie bacteriana a detectar en la muestra utilizada. Por el contrario, si se encuentran señales del al menos un bacteriófago de prueba tanto en el residuo como también en el filtrado pero en cocientes comparables como para el bacteriófago de referencia, entonces se puede partir de una obstrucción no específica del filtro, por ejemplo, debido a bacterias que no se van a detectar, durante la realización del procedimiento.

Alternativamente a un bacteriófago de referencia marcado se utilizan micro o nanopartículas marcadas. Estas tampoco se acoplan a una especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro debido a su tamaño reducido.

Otra ventaja del procedimiento según la invención consiste en que no está limitado a determinadas especies bacterianas a detectar, sino que puede aplicarse de forma universal. La única condición es la presencia de un bacteriófago complementario a una especie bacteriana a detectar. Al igual que en un principio biológico, según el

cual en numerosos hábitats de especies bacterianas también se presuponen sus fagos complementarios, se debe presuponer que para cada especie bacteriana existe al menos un bacteriófago que infecta esta especie bacteriana de forma específica.

No obstante, las especies bacterianas a detectar se eligen preferentemente del grupo que comprende *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA)*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *EHEC*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *BStreptokokken (agalactiae)*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Citrobacter freundii*, *Moraxella catarrhalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pasteurella multocida*, *Acinetobacter baumannii*, *Providencia rettgeri*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Clostridium butulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Francisella tularensis*, *Gardnerella vaginalis*, *Listeria monocytogenes*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Coxiella burnettii*, *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Xanthomonas maltophilia*, *Treponema pallidum*, *Eikenella corrodens*, *Spirillum minus*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Cronobacter spp.* y *Legionella pneumophila*.

En un modo de realización del procedimiento según la invención, la suspensión comprende preferentemente dos o varias especies de bacteriófagos de prueba marcados. Las especies se acoplan respectivamente de forma específica a diferentes especies bacterianas a detectar y las marcas de las especies son disjuntas. Esto permite detectar con un planteamiento la presencia de dos o más especies bacterianas en una muestra simultáneamente. Preferentemente, la suspensión contiene hasta 6 especies diferentes, más preferentemente hasta 5 especies diferentes, aún más preferentemente hasta 4 especies diferentes y de forma especialmente preferente hasta 3 especies diferentes de bacteriófagos de prueba marcados.

En otro modo de realización, el procedimiento según la invención se realiza en paralelo con dos o varias suspensiones que comprenden respectivamente otra especie de bacteriófagos de prueba marcados, siendo las marcas de las especies disjuntas. Para ello, la muestra a analizar se distribuye entre las dos o más suspensiones. La distribución de la muestra a analizar tiene lugar preferentemente a través de un sistema de microfluidos, de forma que la muestra no necesita añadirse individualmente a las suspensiones, sino que la adición tiene lugar simultáneamente mediante canales de microfluidos del sistema de microfluidos. En este modo de realización se utilizan preferentemente 6 suspensiones paralelas, más preferentemente 5 soluciones paralelas, aún más preferentemente 4 soluciones paralelas y de forma especialmente preferente hasta 3 suspensiones paralelas. De este modo también es posible detectar la presencia de dos o más especies bacterianas en una muestra simultáneamente.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende además un paso, que sigue al paso A), en el que los bacteriófagos marcados se detectan en la suspensión antes de añadir la muestra. Este paso sirve para registrar la totalidad de las señales procedentes de las marcas de los bacteriófagos no acoplados, como referencia de partida. Si la marca es, por ejemplo, una molécula reportera con propiedades fluorescentes, entonces tras la excitación correspondiente se detecta la fluorescencia total de los bacteriófagos no acoplados como referencia de partida antes de la adición de la muestra.

Preferentemente, el procedimiento comprende además la detección de la solución de reacción generada en el paso C) antes de la filtración.

El marcado de los bacteriófagos comprende preferentemente al menos una molécula reportera con propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes, o al menos una molécula reportera que emite luz a través de la interacción con una molécula secundaria. Más preferentemente, al menos una molécula reportera con propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes. Y de forma especialmente preferente, al menos una molécula reportera con propiedades fluorescentes.

Las moléculas reporteras con propiedades fluorescentes incluyen

- fluoróforos orgánicos, como xantenos, rodaminas, cumarinas, derivados de acridina, derivados de fluoresceína y Alexa Fluor, SYBR Green y SYBR Gold;
- fluoróforos inorgánicos y sus compuestos, como puntos cuánticos (quantum dots, QD);
- partículas fluorescentes magnéticas; y
- proteínas fluorescentes, como la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína amarilla fluorescente (YFP) o sus derivados.

Las moléculas reporteras que emiten luz a través de la interacción con una molécula secundaria incluyen

- enzimas, como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, que emiten luz mediante reacción de los sustratos marcadores correspondientes; y

- biotina, que emite luz a través de la unión a estreptavidina como componente de reacción que, a su vez, lleva una marca fluorescente o quimioluminiscente.

5 Para el marcado de los bacteriófagos se prefieren mayormente los fluoróforos orgánicos.
El marcado de los bacteriófagos puede tener lugar mediante acoplamiento de al menos una molécula reportera al ADN del fago, a proteínas en la zona del cápside (proteínas de la envoltura de la cabeza) o a proteínas en la zona de la cola del fago (proteínas *tail fiber*). En este contexto se prefiere el acoplamiento de al menos una molécula reportera a proteínas en la zona del cápside del bacteriófago.

10 Preferentemente, el acoplamiento tiene lugar mediante formación de un enlace covalente entre la al menos una molécula reportera y el bacteriófago. Para ello se utilizan

- ésteres activos, como éster de hidroxisuccinimida (éster de NHS) o éster de sulfotetrafluorofenilo (éster de STFP), de la al menos una molécula reportera para el acoplamiento a grupos amino;

15 • isotiocianatos de la al menos una molécula reportera para el acoplamiento a grupos amino;

- maleimidias de la al menos una molécula reportera para el acoplamiento a grupos tiol;

20 • azidas de la al menos una molécula reportera para el acoplamiento a alquinos a través de una reacción de cicloadición de azinas a alquinos de dos etapas; y

- grupos fotorreactivos en la al menos una molécula reportera para un acoplamiento no específico.

25 Se mencionan a modo de ejemplo el éster de 5(6)-carboxifluoresceína y NHS como ejemplo de un éster activo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) como ejemplo de un isotiocianato, maleimida de Alexa Fluor 488 como ejemplo de una maleimida, 5-azidotetrametilrodamina (azida de 5-TAMRA) como ejemplo de una azida y fotobiotina como ejemplo de un grupo fotorreactivo.

30 En un modo de realización preferente del procedimiento según la invención, la marca del bacteriófago está compuesta respectivamente por al menos una molécula reportera fluorescente. La excitación tiene lugar respectivamente a través de una unidad de iluminación que es preferentemente un láser o un diodo emisor de luz (LED). Además, la excitación tiene lugar en el rango de longitudes de onda de 200-1000 nm, más preferentemente en el rango de longitudes de onda de 350-700 nm. La detección de los complejos de bacterias-bacteriófagos en la superficie del filtro, en el residuo, así como la detección de bacteriófagos no acoplados en el filtrado tiene lugar respectivamente mediante medición de la fluorescencia. La medición de la fluorescencia tiene lugar preferentemente mediante microscopía de fluorescencia y/o con la ayuda de un sensor óptico. El sensor óptico se elige más preferentemente del grupo compuesto por un fotomultiplicador (PMT), un sensor CCD (*charge coupled device*) y un sensor CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*).

40 En otro modo de realización preferente, la detección tiene lugar respectivamente a través de la medición en el tiempo de la emisión de luz, es decir, la luz emitida respectivamente por las moléculas reporteras se detecta de forma continua durante un periodo de tiempo determinado. Si la marca de los bacteriófagos es respectivamente al menos una molécula reportera fluorescente, entonces la excitación y la detección tienen lugar como se ha descrito en el modo de realización anterior, con la condición de que la fluorescencia se mida en el tiempo.

45 Preferentemente, el procedimiento para la detección de bacterias según la invención comprende además el paso de una separación previa de complejos de bacterias-bacteriófagos y bacteriófagos no acoplados, disponiéndose la separación previa a continuación del paso C). En este sentido, la separación previa de la mezcla de reacción tiene lugar según el principio de la filtración en gel (cromatografía de permeación en gel o cromatografía de exclusión por tamaño) a través de una matriz de gel. Esto significa que se separan los complejos de bacterias-bacteriófagos y los bacteriófagos no acoplados en base a su diferencia de tamaño, tal que los complejos más grandes abandonan la matriz de gel antes que los bacteriófagos no acoplados y más pequeños. La matriz de gel está compuesta preferentemente por polímeros sintéticos o naturales como policloruro de vinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno (PP), poliéter sulfona (PES), polietilenglicol (PEG), poliacrilamida (PAA), politetrafluoroetileno (PTFE), nylon, polidimetilsiloxano (PDMS), almidón, compuestos de azúcar, látex o silicona; metal o aleaciones de metal que pueden ser magnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos o no magnéticos; vidrio, como vidrio de borosilicato; celulosa, como metilcelulosa o celulosa regenerada u otros compuestos de carbono.

50 La matriz de gel presenta preferentemente un tamaño de poros de 0,01-5 μm . La elección del material, así como del tamaño de poros de la matriz de gel depende del tamaño y la morfología de la al menos una especie bacteriana a detectar, de forma que se logra respectivamente una separación previa óptima de los complejos de bacterias-bacteriófagos y los bacteriófagos no acoplados.

60 En otro modo de realización, el procedimiento según la invención comprende además el paso de una concentración de los complejos de bacterias-bacteriófagos y los bacteriófagos no acoplados antes de la filtración en el paso D). La concentración puede tener lugar de forma mecánica o electromagnética.

65 Más preferentemente, los bacteriófagos de prueba de la al menos una especie, así como los fagos de referencia están recubiertos con perlas magnéticas. En este caso, la concentración puede realizarse de forma electromagnética mediante aplicación de un campo magnético externo, por ejemplo, proporcionando un electroimán.

En el procedimiento según la invención, los pasos opcionales de la separación previa y la concentración pueden realizarse respectivamente individuales o también en combinación.

5 En otro aspecto, la presente invención describe un recipiente de reacción para la realización de la detección de bacterias según la invención.

El recipiente de reacción según la invención presenta preferentemente una longitud de 5-20 mm, una anchura de 5-20 mm y una altura de 50-100 mm.

10 El recipiente de reacción según la invención comprende al menos dos compartimentos que están separados entre sí por un filtro. El filtro presenta un tamaño de poros de 0,1 μm a 0,5 μm , preferentemente de 0,2-0,5 μm , más preferentemente de 0,3-0,5 μm y de forma especialmente preferente de 0,2-0,4 μm . Tal como se ha descrito anteriormente para el procedimiento, el tamaño de poros del filtro utilizado se elige conforme al tamaño y la morfología de la especie bacteriana respectiva a detectar para lograr una separación eficiente de los complejos de bacterias-bacteriófagos y otras bacterias eventualmente presentes, y los bacteriófagos no acoplados. El filtro está
15 compuesto preferentemente por una membrana, una lámina o una matriz, como un lecho de bolas o una superficie nano o microestructurada de material filamentoso o tubular (por ejemplo, fibras/fibras huecas).

Preferentemente, el material del filtro está compuesto por polímeros sintéticos o naturales, como policloruro de vinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno (PP), poliéter sulfona (PES), polietilenglicol (PEG), poliacrilamida (PAA), politetrafluoroetileno (PTFE), nylon, polidimetilsiloxano (PDMS), almidón, compuestos de
20 azúcar, látex o silicona; metal o aleaciones de metal que pueden ser magnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos o no magnéticos; vidrio, como vidrio de borosilicato; celulosa, como metilcelulosa o celulosa regenerada u otros compuestos de carbono, como carbón activado.

Un compartimento del recipiente de reacción es un depósito de fagos que contiene una suspensión que comprende al menos una especie de bacteriófagos de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie
25 bacteriana a detectar, siendo característico el marcado para la especie respectiva de bacteriófagos de prueba. La concentración de bacteriófagos en la suspensión, el volumen de la suspensión, así como otras especificaciones de la suspensión se corresponden con las indicaciones descritas para el procedimiento según la invención.

También las indicaciones del procedimiento relacionadas con los bacteriófagos de prueba marcados y su marcado son correspondientemente válidos para el recipiente de reacción según la invención.

30 La suspensión en el depósito de fagos comprende además un bacteriófago de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos de prueba. Los efectos ventajosos de este modo de realización están descritos en detalle para el procedimiento según la invención.

En un modo de realización del recipiente de reacción según la invención, el depósito de fagos está cerrado mediante membranas compresibles, de forma que la suspensión no se encuentra en contacto directo con el filtro. La solución
35 de reacción que se genera solo fluye hacia el filtro cuando se presionan las membranas compresibles al añadir una muestra que se va a analizar en relación a la presencia de al menos una especie bacteriana a detectar.

Un compartimento del recipiente de reacción según la invención es un depósito de recogida que está previsto para recibir el filtrado de la solución de reacción tras la adición de una muestra a la suspensión y filtración subsiguiente.

El recipiente de reacción comprende además un medio para su identificación.

40 Preferentemente se trata de un chip RFID (*radio-frequency identification*) o de un código de barras. Más preferentemente, el chip RFID (*radio-frequency identification*) o el código de barras contienen datos relacionados con el número de serie, la fecha de producción, la fecha de caducidad, el título fágico en la suspensión y/o la(s) especie(s) bacteriana(s) a detectar o las cepas a detectar. El medio para la identificación permite una identificación sencilla y clara del recipiente de reacción, lo que minimiza el riesgo de confusiones de recipientes de reacción y por
45 tanto aumenta la fiabilidad de un procedimiento de detección realizado con el mismo.

El recipiente de reacción según la invención comprende además al menos dos ventanas de medición, tal que una ventana de medición está dispuesta en la zona de la superficie del filtro, que está orientada al depósito de fagos, y una ventana de medición está dispuesta en la zona del depósito de recogida. De este modo son posibles la
50 detección de los complejos de bacterias-bacteriófagos en la superficie del filtro, en el residuo, y la detección de bacteriófagos no acoplados en el filtrado al realizar el procedimiento de detección según la invención utilizando el recipiente de reacción según la invención.

En un modo de realización preferente, el recipiente de reacción comprende otro compartimento entre la reserva de fagos y el filtro, que contiene al menos un filtro previo. El al menos un filtro previo permite una separación previa de
55 complejos de bacterias-bacteriófagos y bacteriófagos no acoplados de la mezcla de reacción antes de la filtración.

Más preferentemente, el filtro previo es una matriz de gel que separa previamente la mezcla de reacción según el principio de la filtración en gel. La matriz de gel está compuesta preferentemente por polímeros sintéticos o naturales como policloruro de vinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polipropileno (PP), poliéter sulfona (PES), polietilenglicol (PEG), poliacrilamida (PAA), politetrafluoroetileno (PTFE), nylon, polidimetilsiloxano (PDMS), almidón,
60 compuestos de azúcar, látex o silicona; metal o aleaciones de metal que pueden ser magnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos o no magnéticos; vidrio, como vidrio de borosilicato; celulosa, como metilcelulosa o celulosa regenerada u otros compuestos de carbono. La matriz de gel presenta además preferentemente un tamaño de poros de 0,01-5 μm . La elección del material, así como del tamaño de poros de la matriz de gel depende del tamaño y la morfología de la al menos una especie bacteriana a detectar, de forma que se logra respectivamente una separación
65 previa óptima de los complejos de bacterias-bacteriófagos y los bacteriófagos no acoplados.

En este modo de realización, el recipiente de reacción comprende además una ventana de medición que está dispuesta directamente debajo del compartimiento que contiene al menos un filtro previo.

El recipiente de reacción se estrecha preferentemente desde el depósito de fagos hacia el filtro, lo que hace posible una concentración de los complejos de bacterias-bacteriófagos y de los bacteriófagos no acoplados antes de la filtración.

Además, el recipiente de reacción se cierra preferentemente en la zona del depósito de fagos mediante un septo.

El recipiente de reacción comprende preferentemente otra ventana de medición que está dispuesta en la zona del depósito de fagos. Esto permite la detección de la totalidad de las señales procedentes de las marcas de los bacteriófagos no acoplados, como referencia de partida. Si la marca es, por ejemplo, una molécula reportera con propiedades fluorescentes, entonces tras la excitación correspondiente puede detectarse la fluorescencia total de los bacteriófagos no acoplados como referencia de partida antes de la adición de la muestra.

El recipiente de reacción comprende preferentemente otro compartimiento que se denomina depósito de residuos y está a continuación del depósito de recogida. Más preferentemente, este compartimiento está separado del depósito de recogida mediante un filtro final con un tamaño de poros de $\leq 0,05 \mu\text{m}$. Mediante el filtro final se eliminan todos los bacteriófagos, de forma que el filtrado restante puede eliminarse de forma económica y sin riesgos. El depósito de residuos contiene alternativamente un medio de absorción que absorbe el filtrado del depósito de recogida.

En un modo de realización alternativo, el recipiente de reacción comprende otro compartimiento entre el filtro y el depósito de fagos, que está separado de otros compartimentos preferentemente mediante un septo. Este compartimiento contiene una solución indicadora con micro o nanopartículas marcadas que no se acoplan a una especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro debido a su tamaño reducido. Por esta razón, la solución indicadora con las micro o nanopartículas marcadas puede utilizarse como alternativa a los bacteriófagos de referencia y añadirse perforando la membrana.

Los diferentes modos de realización del recipiente de reacción según la invención no se excluyen entre sí y por tanto se pueden realizar individualmente o en combinación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un cartucho que comprende dos o varios recipientes de reacción según la invención, que están dispuestos en paralelo entre sí, tal que cada recipiente de reacción contiene una especie diferente de bacteriófagos de prueba marcados en la suspensión del depósito de fagos, que se acoplan respectivamente de forma específica a diferentes especies bacterianas a detectar, siendo las marcas de las especies disjuntas. De este modo es posible detectar la presencia de dos o más especies bacterianas en una muestra simultáneamente.

Preferentemente, el cartucho comprende hasta 6 recipientes de reacción dispuestos en paralelo, más preferentemente hasta 5 recipientes de reacción dispuestos en paralelo, aún más preferentemente hasta 4 recipientes de reacción dispuestos en paralelo y de forma especialmente preferente hasta 3 recipientes de reacción dispuestos en paralelo.

Además, el cartucho comprende preferentemente un sistema de microfluidos en el que se inyecta la muestra a analizar y que dirige la muestra a través de canales de microfluidos respectivamente al depósito de fagos de los recipientes de reacción dispuestos en paralelo, tal que no sea necesario añadir la muestra individualmente a las suspensiones.

La presente invención se refiere además al uso de un equipo de medición para realizar el procedimiento según la invención para detectar bacterias.

El equipo de medición comprende una ranura en la que se introduce un recipiente de reacción según la invención o un cartucho según la invención.

El equipo de medición comprende además al menos dos sistemas ópticos de detección que están dispuestos respectivamente en la zona de las ventanas de medición del recipiente de reacción introducido o del cartucho y un procesador.

Si el equipo de medición comprende una ranura para el recipiente de reacción, entonces puede incluir tres o cuatro sistemas ópticos de detección en función del modo de realización del recipiente de reacción, es decir, conforme al número de ventanas de medición.

Por el contrario, si el equipo de medición comprende una ranura para un cartucho, entonces el número de sistemas ópticos de detección depende del número de recipientes de reacción dispuestos en paralelo en el cartucho, pudiendo contener el equipo de medición hasta cuatro sistemas ópticos de detección por cada recipiente de reacción dispuesto en paralelo.

Los sistemas ópticos de detección comprenden respectivamente un sistema de lentes para enfocar la luz emitida por la marca de los bacteriófagos en al menos un sensor óptico, tal que el al menos un sensor óptico detecta la luz emitida.

El sensor óptico se selecciona preferentemente del grupo compuesto por un fotomultiplicador (PMT), un sensor CCD (charge coupled device) y un sensor CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor).

Preferentemente, los sistemas ópticos de detección comprenden además respectivamente una unidad de iluminación que emite luz en el rango de longitudes de onda de 200-1000 nm y un sistema de lentes para enfocar la luz emitida por la unidad de iluminación en una zona de medición. La unidad de iluminación también está conectada al procesador y es controlada por este.

La unidad de iluminación emite preferentemente luz en el rango de longitudes de onda de 350-700 nm. Más preferentemente, la unidad de iluminación es un láser o un diodo emisor de luz (LED).

El procesador está conectado respectivamente al al menos un sensor óptico de los sistemas ópticos de detección y procesa las señales de detección recibidas.

Además, el equipo de medición comprende una unidad de emisión conectada al procesador, que emite los resultados de detección a un usuario.

5 La unidad de emisión comprende preferentemente una pantalla óptica.

Más preferentemente, la unidad de emisión comprende una interfaz de radio, a través de la cual pueden transmitirse los resultados de la detección de forma inalámbrica por radio desde el procesador a una tableta o un terminal de ordenador remoto.

10 El equipo de medición comprende preferentemente un equipo de lectura integrado, que registra el medio de identificación del recipiente de reacción y transfiere los datos registrados al procesador, tal que el procesador procesa los datos registrados y puede emitir los resultados de la identificación a través de la unidad de emisión a un usuario.

15 En un modo de realización preferente, el equipo de medición comprende además un electroimán que se puede conectar y desconectar selectivamente como, por ejemplo, una bobina toroidal. Más preferentemente, este está dispuesto en la zona de la superficie del filtro del recipiente de reacción introducido en la ranura y orientado hacia el depósito de fagos.

20 A continuación se representa la presente invención en detalle en relación a las figuras y se continúan explicando diferentes modos de realización.

La figura 1 muestra un modo de realización del procedimiento según la invención. En él, una muestra -3- que se va a analizar en relación a la presencia de una especie bacteriana a detectar se inyecta en una suspensión -1- que está dispuesta en un depósito -8- de fagos compresible. La muestra -3- puede contener otras especies bacterianas que no se van a detectar. En este modo de realización, la suspensión -1- contiene una especie de bacteriófagos -2- de prueba marcados que se acoplan específicamente a la especie bacteriana a detectar. La marca es una molécula reportera con propiedades fluorescentes. Tras mezclar la muestra -3- con la suspensión -1- e incubación de la mezcla de reacción, esta fluye hacia el filtro -4- con un tamaño de poros de entre 0,1 μm y 0,5 μm y se filtra de forma gravimétrica. Los complejos -5- de bacterias-bacteriófagos generados, así como otras especies bacterianas que no se van a detectar quedan inmovilizados sobre la superficie del filtro, en el residuo, mientras los bacteriófagos -2- de prueba restantes y no acoplados pasan los poros del filtro -4- y se recogen como filtrado en un depósito -9- de recogida. La detección de los complejos -5- de bacterias-bacteriófagos en la superficie del filtro, así como de los bacteriófagos -2- de prueba no acoplados en el filtrado tiene lugar mediante excitación específica de las moléculas reporteras fluorescentes utilizadas y mediante medición de la fluorescencia resultante. Generalmente, la excitación tiene lugar en un rango de longitudes de onda en el que se encuentra el máximo de absorción de la molécula reportera fluorescente correspondiente. En este modo de realización, la suspensión -1- contiene además un bacteriófago -6- de referencia marcado que no se acopla a la especie bacteriana a detectar, por lo que pasa los poros del filtro -4- y también se recoge como filtrado en el depósito -9- de recogida. La marca del bacteriófago -6- de referencia también está compuesta por una molécula reportera con propiedades fluorescentes, siendo las moléculas reporteras de los bacteriófagos de referencia -6- y de prueba -2- disjuntas. Esto significa que las moléculas reporteras fluorescentes correspondientes se eligen de forma que pueden absorber luz para las mismas o diferentes longitudes de onda de excitación, pero emiten luz para diferentes longitudes de onda. De este modo es posible diferenciar inequívocamente las señales de fluorescencia emitidas de las moléculas reporteras correspondientes y, por tanto, de los bacteriófagos correspondientes. Por tanto, la detección del bacteriófago -6- de referencia también tiene lugar mediante excitación específica de sus moléculas reporteras fluorescentes y mediante medición de la fluorescencia resultante. Las señales de fluorescencia recibidas del residuo y del filtrado son procesadas a continuación por un procesador y los resultados de la detección, emitidos a un usuario. La emisión puede tener lugar con una pantalla óptica conectada al procesador o de forma inalámbrica por radio a una tableta o un terminal de ordenador remoto. Mediante formación del cociente entre la intensidad total de la fluorescencia medida en el residuo y la intensidad total de la fluorescencia medida en el filtrado para los bacteriófagos de referencia -6- y de prueba -2- y comparación de estos, puede lograrse un resultado fiable del procedimiento de detección. Si el cociente determinado para el bacteriófago -2- de prueba es considerablemente superior al cociente determinado para el bacteriófago -6- de referencia, entonces esto proporciona una prueba inequívoca de la presencia de la especie bacteriana a detectar en la muestra utilizada. Por el contrario, si se encuentran señales de fluorescencia del bacteriófago -2- de prueba tanto en el residuo como también en el filtrado pero en cocientes comparables como para el bacteriófago -6- de referencia, entonces se puede partir de una obstrucción no específica del filtro -4-, por ejemplo, debido a bacterias que no se van a detectar, durante la realización del procedimiento.

Otro modo de realización del procedimiento según la invención está representado en la figura 2. En este caso, los pasos de procedimiento individuales se realizan como en el modo de realización descrito anteriormente en la figura 1, aunque en paralelo con tres diferentes suspensiones -1-. Estas contienen respectivamente otra especie de bacteriófagos -2- de prueba marcados, que se acoplan respectivamente de forma específica a una especie bacteriana a detectar diferente, así como un bacteriófago -6- de referencia. Las marcas son respectivamente moléculas reporteras fluorescentes que son respectivamente diferenciadoras. La muestra -3- a analizar se distribuye en este modo de realización entre las tres suspensiones -1-, preferentemente a través de canales -25- de microfluidos de un sistema -24- de microfluidos, de forma que la adición tiene lugar simultáneamente. Debido a las marcas diferenciadoras es posible una detección respectivamente específica y simultánea de tres especies bacterianas a detectar en una muestra -3-.

En la figura 3A está representado un modo de realización preferente del recipiente -7- de reacción según la invención. Este comprende en primer lugar cuatro compartimentos -a- a -d-. El compartimento -a- es un depósito -8- de fagos que contiene una suspensión -1- que comprende al menos una especie de bacteriófagos de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie bacteriana a detectar, siendo característico el marcado para la especie respectiva de bacteriófagos de prueba. Además, la suspensión -1- en el depósito -8- de fagos puede contener un bacteriófago de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos de prueba. El depósito -8- de fagos está cerrado mediante un septo -23-. El compartimento -b- contiene una matriz -24- de gel con un tamaño de poros de 0,01-5 μm como filtro previo, que permite una separación previa de la mezcla de reacción según el principio de la filtración en gel. Los complejos de bacterias-bacteriófagos y las bacterias que no se van a detectar se separan de los bacteriófagos no acoplados en base a su diferencia de tamaño, tal que los complejos más grandes abandonan la matriz -24- de gel antes que los bacteriófagos no acoplados y más pequeños. El compartimento -c- es un depósito -9- de recogida que está previsto para recibir el filtrado de la solución de reacción tras la adición de una muestra a la suspensión -1- y filtración subsiguiente. El compartimento -d- representa un depósito -25- de residuos que contiene un medio -26- de absorción, que absorbe el filtrado del depósito -9- de recogida. Los compartimentos -a- y -b- están separados mediante un filtro -4- con un tamaño de poros de 0,1 μm a 0,5 μm de los compartimentos -c- y -d-. En el modo de realización representado, el recipiente de reacción dispone además de un chip -10- RFID para la identificación, así como de un compartimento adicional, separado de los demás compartimentos por un septo -27-, que contiene una solución -28- indicadora con micro o nanopartículas marcadas. Estas tampoco se acoplan a una especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro -4- debido a su tamaño reducido. Por esta razón, la solución -28- indicadora con las micro o nanopartículas marcadas puede utilizarse como alternativa a los bacteriófagos de referencia y añadirse a la solución de reacción perforando la membrana -27-. El recipiente de reacción se estrecha en este modo de realización hacia el filtro -4-, lo que hace posible una concentración de los complejos de bacterias-bacteriófagos y de los bacteriófagos no acoplados antes de la filtración. Además, el recipiente de reacción -7- representado comprende un total de cuatro ventanas -11- a -14- de medición. En este caso, una ventana -11- de medición está dispuesta en la zona de la superficie del filtro orientada al depósito de fagos. Otra ventana -12- de medición está dispuesta en la zona del depósito de recogida. De este modo son posibles la detección de los complejos de bacterias-bacteriófagos inmovilizados en la superficie del filtro, en el residuo, y de bacteriófagos no acoplados en el filtrado. Otra ventana -13- de medición está dispuesta en la zona del depósito de fagos, de forma que puede detectarse la totalidad de las señales que proceden de las marcas de los bacteriófagos como referencia de partida antes de la adición de una muestra a analizar. Además, debajo de la matriz de gel está dispuesta una cuarta ventana -14- de medición para la detección de complejos de bacterias-bacteriófagos y bacteriófagos no acoplados en la mezcla de reacción a la salida de la matriz -24- de gel antes de la filtración. En el modo de realización mostrado, el recipiente -7- de reacción presenta en la zona del depósito -25- de residuos un mecanismo -29- de ventilación integrado compuesto por una aguja -30- de ventilación y un septo -31-. Al perforar el septo -31- se ventila el recipiente de reacción, a través de lo cual se inicia la filtración gravimétrica.

La figura 3B muestra el desarrollo teórico de una medición de la fluorescencia en el tiempo en un modo de realización preferente del procedimiento según la invención utilizando el recipiente -7- de reacción según la invención de la figura 3A. En este caso, una muestra que se va a analizar en relación a la presencia de una especie bacteriana a detectar se inyecta a través del septo -23- en la suspensión -1- en el depósito -8- de fagos, se mezcla mediante movimientos giratorios repetidos (3-5x) con la suspensión -1- y se incuba durante 5-10 min. a temperatura ambiente (T_a). La al menos una especie de bacteriófagos de prueba en la suspensión -1- presenta moléculas reporteras fluorescentes como marca. Al perforar el septo -31- en el mecanismo -29- de ventilación integrado se inicia simultáneamente una medición en el tiempo de la intensidad de la fluorescencia en las cuatro ventanas -11- a -14- de medición del recipiente -7- de reacción. A consecuencia de la ventilación, los compartimentos -b- y -c- son atravesados sucesivamente por la mezcla de reacción, por lo cual la fluorescencia en la ventana -13- de medición en el compartimento -a- continúa disminuyendo con el tiempo hasta que ya no es detectable. En la matriz -24- de gel en el compartimento -b- se separan los fagos no acoplados de los complejos de bacterias-bacteriófagos más grandes debido a su diferencia de tamaño. Los complejos de bacterias-bacteriófagos más grandes abandonan la matriz -24- de gel antes que los bacteriófagos no acoplados y más pequeños, por lo cual la fluorescencia en la ventana -14- de medición aumenta al principio hasta que todos los complejos de bacterias-bacteriófagos han pasado por esta zona de medición. La fluorescencia vuelve a disminuir luego un poco hasta que, finalmente, los bacteriófagos no acoplados abandonan la matriz de gel, lo que está caracterizado por un nuevo aumento de la fluorescencia en la ventana -14- de medición. En el filtro -4- se inmovilizan los complejos de bacterias-bacteriófagos de forma que su señal de fluorescencia aumenta en la ventana -11- de medición hasta que todos los complejos de bacterias-bacteriófagos o especies de bacterias que no se van a detectar quedan inmovilizados en el filtro -4-. Los bacteriófagos no acoplados pasan el filtro -4- y aparecen como señal de fluorescencia creciente en la ventana -12- de medición en el depósito -9- de recogida. La mezcla de reacción en exceso que ha atravesado el recipiente de reacción completo se recoge en el compartimento -d- y es absorbida por un medio -26- de absorción.

Una representación esquemática de la estructura del recipiente -7- de reacción y el equipo -15- de medición según la invención en otro modo de realización está representada en la figura 4. El recipiente -7- de reacción mostrado contiene un depósito -8- de fagos con membranas compresibles, que contiene a su vez una suspensión -1- que comprende al menos una especie de bacteriófagos -2- de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie bacteriana a detectar, siendo característico el marcado para la especie respectiva de bacteriófagos -2- de prueba. Además, la suspensión -1- en el depósito -8- de fagos compresible puede contener un bacteriófago -6- de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo

diferencia de los bacteriófagos -2- de prueba. El recipiente -7- de reacción está cerrado en la zona superior con un septo -23- al que sigue un filtro -32- grueso con un tamaño de poros de 0,5-10,0 μm para eliminar partículas grandes en suspensión y posibles impurezas. En este caso, también se puede utilizar un filtro -32- grueso de varias etapas con tamaños de poros decrecientes de 0,5-10 μm . Mediante inyección de una muestra -3- a analizar en la suspensión -1- en el depósito -8- de fagos se presionan las membranas del depósito -8- de fagos, de forma que la solución de reacción generada comienza a fluir debido a la gravedad en dirección al filtro -4- que presenta un tamaño de poros de 0,2 μm . En el modo de realización mostrado, el recipiente -7- de reacción se estrecha hacia abajo, lo que hace posible una concentración de los complejos -5- de bacterias-bacteriófagos y de los bacteriófagos -2-, -6- no acoplados antes de la filtración. Adicionalmente tiene lugar una concentración electromagnética mediante conexión y desconexión selectivas de un campo magnético homogéneo. Para ello, el equipo -15- de medición comprende una bobina -33- toroidal como electroimán, que está dispuesta en la zona de la superficie filtrante del filtro -4-. Además, los bacteriófagos -2- de prueba de la al menos una especie, así como los fagos -6- de referencia están recubiertos con perlas magnéticas. Al filtro -4- le sigue un depósito -9- de recogida para recoger el filtrado tras la filtración efectuada. Al depósito -9- de recogida le sigue a su vez otro compartimento que se denomina depósito -25- de residuos y está separado del depósito -9- de recogida mediante un filtro -34- final con un tamaño de poros de $\leq 0,05 \mu\text{m}$. Mediante el filtro -34- final se eliminan todos los bacteriófagos, de forma que el filtrado restante puede eliminarse de forma económica y sin riesgos. En este modo de realización, la marca de los bacteriófagos -2-, -6- también está compuesta por al menos una molécula reportera con propiedades fluorescentes. De forma correspondiente, el equipo -15- de medición comprende además de una ranura, en la que se introduce el recipiente -7- de reacción, dos sistemas -16- ópticos de detección que están dispuestos respectivamente en la zona de las ventanas -11-, -12- de medición del recipiente -7- de reacción introducido. En el presente modo de realización, esto significa que un sistema -16- óptico de detección está dispuesto en la zona de medición en la superficie filtrante del filtro -4- para la detección de complejos -5- de bacterias-bacteriófagos, mientras el segundo sistema -16- óptico de detección está dispuesto en la zona de medición en la superficie filtrante del filtro -34- final para la detección de bacteriófagos -2-, -6- no acoplados. Los sistemas -16- ópticos de detección contienen respectivamente un LED -19- como unidad de iluminación que emite luz en el rango de longitudes de onda de 200-1000 nm, preferentemente 350-700 nm, en función de las propiedades de absorción de las moléculas reporteras fluorescentes utilizadas. En este sentido, debe lograrse la absorción máxima posible para generar una señal de fluorescencia respectivamente fuerte. Además, los sistemas -16- ópticos de detección contienen respectivamente un sistema -20- de lentes para enfocar la luz emitida por el LED en las zonas de medición anteriormente descritas y respectivamente otro sistema -17- de lentes para enfocar la luz emitida de las moléculas reporteras fluorescentes en al menos un sensor -18- óptico como, por ejemplo, un fotomultiplicador, un sensor CCD o un sensor CMOS. En este caso, los sensores -18- ópticos de ambos sistemas -16- ópticos de detección detectan respectivamente la luz incidente y transfiere las señales de detección recibidas a un procesador que está respectivamente conectado a estos. El procesador procesa finalmente las señales de detección recibidas y transfiere los resultados de la detección a una pantalla conectada al procesador, que los emite ópticamente (no mostrado) a un usuario. Además, uno o ambos sistemas -16- ópticos de detección pueden contener un divisor -35- de haz para la separación espectral de varios canales de colores. En la figura 5 está representado un chip RFID como un modo de realización del medio para la identificación del recipiente de reacción según la invención que, entre otros, contiene datos relacionados con el número de serie, la fecha de producción, la fecha de caducidad, el título fágico en la suspensión y/o la(s) especie(s) bacteriana(s) a detectar o las cepas a detectar. El chip RFID permite una identificación sencilla y clara del recipiente de reacción, lo que minimiza el riesgo de confusiones de recipientes de reacción y por tanto aumenta la fiabilidad de un procedimiento de detección realizado con el mismo.

45 Parte experimental

1. Aislamiento de bacteriófagos

Puesto que los bacteriófagos no disponen de un metabolismo propio, solo pueden ser atraídos y pueden reproducirse en una bacteria hospedadora adecuada. Las bacterias hospedadoras requieren un medio de cultivo en que puedan crecer de forma óptima. Cuanto mejor sea el crecimiento de las bacterias mayor es la producción de bacteriófagos. En un primer paso se disuelve medio de cultivo en polvo en agua y se esteriliza en un autoclave. Luego, el medio de cultivo estéril se bombea directamente desde el autoclave a un fermentador y allí se precalienta a la temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias hospedadoras (por ejemplo, 30°C). Una vez que el medio de cultivo ha alcanzado la temperatura de servicio, se añaden bacterias hospedadoras de un cultivo previo de bacterias al fermentador. Estas bacterias comienzan ahora a dividirse. Tras un breve periodo de adaptación, las bacterias hospedadoras crecen de forma exponencial, es decir, con la tasa de crecimiento más alta posible y específica para la especie de bacteria.

El crecimiento de las células bacterianas se sigue a través de la medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD_{600}) en un fotómetro. Cuando se alcanza una densidad celular optimizada en experimentos previos, por ejemplo, 5×10^8 bacterias por mililitro de solución de cultivo, a partir de un cultivo previo de bacteriófagos se añaden bacteriófagos al fermentador. La concentración de los bacteriófagos en el cultivo previo se determina previamente mediante el método de titración clásico, un método de detección de actividad biológica (véase, por ejemplo, Martha R. J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.), Bacteriophages: Methods and Protocols (Bacteriófagos: métodos y protocolos), volumen 1: Isolation, Characterization, and Interactions (Aislamiento,

caracterización e interacciones), vol. 501, C 2009 Humana Press, parte de Springer ciencia+Business Media). La concentración se ajusta de manera que, de forma idónea, cada bacteria en el fermentador es reconocida e infectada por al menos un bacteriófago. Tras la infección exitosa, las bacterias hospedadoras producen ahora nuevos bacteriófagos en lugar de, como hasta ahora, nuevas bacterias. El proceso de reproducción de los bacteriófagos dura aproximadamente una hora y en este tiempo se producen aproximadamente 100 nuevos bacteriófagos por cada célula bacteriana.

Al final del proceso, las bacterias explotan y sueltan los nuevos bacteriófagos al medio de cultivo. La solución generada de este modo en el fermentador es altamente viscosa, ya que, además de los nuevos bacteriófagos, también contiene todos los componentes de la célula bacteriana explotada (trozos de la pared celular, lípidos, ribosomas, material genético de las bacterias, etc.) y también los componentes originales del medio de cultivo (azúcar, sales y proteínas). Por esta razón, los bacteriófagos deben limpiarse en primer lugar a través de un procedimiento de filtración de varias etapas antes de estar disponibles para una reacción de marcado. Tras la limpieza tiene lugar una filtración estéril, por ejemplo, a través de cartuchos de filtro Sartobran® de 0,2 µm de Sartorius Stedim Biotech, combinada con el llenado de los depósitos de reserva (Kegs).

En esta forma, los bacteriófagos son estables, pueden transportarse fácilmente y pueden almacenarse durante meses sin pérdida de actividad.

2. Marcado de bacteriófagos con moléculas reporteras

Para evitar reacciones secundarias durante el acoplamiento con las moléculas reporteras y malas eficiencias de acoplamiento, los fagos se limpian y se adapta el tampón antes del marcado con las moléculas reporteras activadas. Durante el aislamiento de proteínas, en muchos casos se debe realizar una sustitución de tampón, por ejemplo, si van a utilizarse varios procedimientos cromatográficos con diferentes tampones uno tras otro.

Los fagos utilizados para los experimentos de marcado se limpian y, dado el caso, se concentran mediante los siguientes procedimientos estándar:

- mediante ultrafiltración, debiendo ser el rango de exclusión por tamaño (molecular weight cut-off (MWCO)) > 100 kDa:
- mediante precipitación con polietilenglicol/cloruro de sodio
- mediante cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel)
- mediante cromatografía de intercambio iónico
- mediante diálisis

La separación de moléculas pequeñas en exceso, como sales, colorantes o biotina, de soluciones de fagos se realiza mediante precipitación con polietilenglicol y cloruro de sodio y centrifugación subsiguiente (Jaye, D.L., Edens, H.A., Mazzucchelli, L., Parkos, C.A., 2001. Novel G protein-coupled responses in leukocytes elicited by a chemotactic bacteriophage displaying a cell type-selective binding peptide. (Innovadoras respuestas acopladas a la proteína G en leucocitos provocadas por un bacteriófago quimiotáctico que presenta un péptido de unión selectiva para el tipo celular.) J. Immunol. 166, 7250).

A continuación de la incubación de la reacción de acoplamiento, los conjugados de fagos se precipitan al menos dos veces con polietilenglicol 8000 (PEG 8000) y una solución de NaCl. Esto minimiza la cantidad de moléculas reporteras libres en la solución conjugada. Finalmente, el pellet de conjugado se vuelve a suspender en un tampón adecuado. También se pueden utilizar las columnas de filtración en gel con un material de exclusión por tamaño a base de dextrano, con un MWCO > 25 kDa. La limpieza basada en la cromatografía de intercambio iónico también permite la separación rápida de los conjugados de las moléculas pequeñas, dependiendo el gradiente más adecuado y el tipo, así como el espesor del material de intercambio iónico, de las macromoléculas utilizadas y de la naturaleza de los fagos específicos. Es necesaria una optimización previa de los parámetros.

Ejemplo 1:

1x10¹¹ ufp de bacteriófagos TB54 limpiados y concentrados previamente (véase arriba) se volvieron a suspender en 10 ml de PBS con NaHCO₃ 0,1 M (pH 8,5). A continuación se añadieron 100 nmol de éster de 5(6)-carboxifluoresceína y NHS por cada 1x10¹⁰ ufp. La reacción de acoplamiento se desarrolla a temperatura ambiente y a oscuras durante una hora. Tal como está representado esquemáticamente en la figura 6, el éster de NHS y 5(6)-carboxifluoresceína -2- reacciona con los grupos amino primarios de proteínas en la superficie de los fagos -1- TB54 formando uniones amida estables.

La limpieza de los conjugados tiene lugar, o bien mediante precipitación o mediante métodos cromatográficos, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, el conjugado se caracteriza fotofísicamente mediante espectroscopia de fluorescencia y UV/vis.

En la figura 7 se muestran los espectros de excitación y emisión de bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína. Los espectros permiten reconocer el máximo de excitación y de emisión de la 5(6)-carboxifluoresceína para una longitud de onda de 495 nm y en el rango de 520-530 nm respectivamente. Estas longitudes de onda también se utilizaron a continuación para estudios mediante microscopía de fluorescencia de la interacción de bacterias-bacteriófagos.

Ejemplo 2:

Se prepara una solución de fluoresceína-isotiocianato (FTIC) en un tampón carbonato 0,1 M, pH 9,0. Se añade una alícuota correspondiente a la solución de fagos preparada como en el ejemplo 1 y se mezcla cuidadosamente. La suspensión de fagos se incuba durante una hora a temperatura ambiente y a oscuras. La limpieza y la caracterización del conjugado tienen lugar, tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

3. Especificidad de la interacción de bacterias-bacteriófagos

Para demostrar la enorme especificidad de hospedador de una especie marcada de bacteriófagos de prueba, en un paso preparatorio se obtuvieron durante la noche cultivos de bacterias de *Escherichia coli* de las cepas C600 (PTC Phage Technology Center GmbH), ECOR34 (PTC Phage Technology Center GmbH) y XL10-Gold (Agilent) bajo condiciones estándar a 37°C en 10 ml de TSB (*Tryptic Soy Broth*)(Sigma-Aldrich). Los cultivos de la noche se diluyeron al siguiente día (1:10 en TSB) y se incubaron durante dos horas adicionales a 37°C. Las suspensiones de bacterias obtenidas de este modo se mezclaron a continuación a partes iguales (1:1:1). Para la detección de la interacción bacteriófago-hospedador mediante microscopía de fluorescencia se añadieron 10 ml del cultivo mixto bacteriano de bacterias *E. coli* C600, ECOR34, XL10-Gold) a 990 ml de una suspensión de bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína en PBS, pH 7,4 (título bacteriano: $\approx 1 \times 10^6$ células/ml; título fágico: $\approx 1 \times 10^8$ ufp/ml) y se incubaron durante 5 min. a temperatura ambiente (Ta). De la mezcla de reacción se colocaron luego 20 ml sobre un portaobjetos y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (Eclipse Ti, objetivo 100x, Nikon).

La figura 8A muestra la toma obtenida mediante microscopía de fluorescencia tras la incubación de las cepas bacterianas de *E. coli* C600, ECOR34 y XL10-Gold con bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína. La sección de la imagen en la esquina inferior izquierda muestra una representación ampliada de la zona limitada en blanco en la imagen.

En la figura 8B está representada una toma de campo claro correspondiente tras la incubación de las cepas bacterianas de *E. coli* C600, ECOR34 y XL10-Gold con bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína. La sección de la imagen en la esquina inferior izquierda muestra una representación ampliada de la zona limitada en blanco en la imagen. En este caso, las flechas blancas indican bacterias no marcadas que se diferencian morfológicamente de las células bacterianas de *E. coli* C600 infectadas con los fagos TB54 marcados y corresponden a las cepas ECOR34 o XL10-Gold (marcador de tamaño: 10 μm).

Los resultados de los ensayos demuestran la enorme especificidad de los bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína. Estos se acoplan exclusivamente a la cepa bacteriana *E. coli* C600, mientras las cepas ECOR34 y XL10-Gold no se infectan. Por esta razón, en la mezcla de reacción solo las bacterias de la cepa *E. coli* C600 presentan señales de fluorescencia gracias a la formación de complejos. Por tanto, gracias a la enorme especificidad de hospedador de los bacteriófagos, el procedimiento según la invención ofrece una detección inequívoca y fiable de especies bacterianas. Incluso se pueden detectar cepas individuales dentro de una especie bacteriana.

La figura 9A muestra además imágenes ópticas en sección de los complejos de *E. coli* C600-bacteriófagos TB54 obtenidos en este ensayo. Las secciones ópticas se realizaron con separaciones de 0,3 μm (marcador de tamaño 2 μm). En la serie de arriba, los complejos están representados a trasluz, la serie inferior muestra los mismos complejos en representación mediante microscopía de fluorescencia.

La distribución de las señales de fluorescencia puntuales permite reconocer una localización de las moléculas reporteras fluorescentes (5(6)-carboxifluoresceína) sobre la superficie de las bacterias.

En la figura 9B están representadas reconstrucciones tridimensionales de los complejos de *E. coli* C600-bacteriófagos TB54 obtenidos en diferentes vistas en perspectiva, lo que confirma la localización superficial de las moléculas reporteras fluorescentes.

4. Sensibilidad del procedimiento

Para determinar la sensibilidad del procedimiento de detección para bacterias se elaboró una serie de dilución mediante dilución en serie de una suspensión de partida de bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína (PBS, pH 7,4, título fágico: $\approx 1 \times 10^8$ ufp/ml) con PBS, pH 7,4. De los niveles de dilución respectivos con $\approx 1 \times 10^7$ ufp/ml, $\approx 1 \times 10^6$ ufp/ml, $\approx 1 \times 10^5$ ufp/ml, $\approx 1 \times 10^4$ ufp/ml y $\approx 1 \times 10^3$ ufp/ml se añadió respectivamente 1 ml en una cubeta de medición y se analizó mediante espectroscopia de fluorescencia

(espectrómetro Qwave compact USB, RGB Lasersystems). Como referencia se utilizó 1 ml de tampón PBS sin bacteriófagos TB54 marcados.

Los espectros de fluorescencia obtenidos están representados en la figura 10. Para todos los niveles de dilución se reconoce respectivamente un máximo de emisión diferente en el rango de longitudes de onda entre 520 y 530 nm, lo que corresponde al máximo de emisión de 5(6)-carboxifluoresceína. Por esta razón, en la figura 10B está representada la integral de la fluorescencia en el rango de longitudes de onda entre 520 y 530 nm para los diferentes títulos fágicos. En este caso, la integral de la fluorescencia obtenida para una cantidad de fagos de tan solo $\approx 1 \times 10^3$ ufp aún se diferencia considerablemente de la referencia, es decir que se logra una detección específica a partir de $\approx 1 \times 10^3$ bacteriófagos.

Para una cantidad media de $\approx 1 \times 10^2$ bacteriófagos acoplados por bacteria infectada, esto significa que mediante el procedimiento según la invención se puede lograr una detección específica incluso a partir de una concentración de bacterias de tan solo ≈ 10 células bacterianas/ml. Por tanto, el procedimiento según la invención no solo es altamente específico, sino también altamente sensible.

5. Detección específica de una especie bacteriana o de una cepa de una especie bacteriana.

A continuación se describe la detección específica de la cepa bacteriana *Escherichia coli* C600 con ayuda del procedimiento según la invención para concentraciones de bacterias diferentes.

Para ello, en primer lugar se obtuvo durante la noche un cultivo de la cepa bacteriana *Escherichia coli* C600 (PTC Phage Technology Center GmbH) bajo condiciones estándar a 37°C en 10 ml de TSB (*Tryptic Soy Broth*)(Sigma-Aldrich). El cultivo de la noche se diluyó al siguiente día (1:10 en TSB) y se incubó durante dos horas adicionales a 37°C. Del cultivo obtenido se elaboró a continuación una serie de dilución mediante dilución en serie con TBS. Para determinar la concentración bacteriana en las suspensiones de bacterias diluidas en serie se midió la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}). La figura 11A muestra los datos respectivamente obtenidos de los títulos bacterianos para los niveles de dilución diferentes.

Se determinó la intensidad inicial de la fluorescencia en la suspensión de fagos antes de la adición de la muestra a analizar mezclando 900 ml de una suspensión de bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína y bacteriófagos TB99 marcados con Alexa532 ($\sim 10^8$ upf/ml en PBS, mezclado con $MgCl_2$ 10 mM) con 100 ml de medio TSB e incubándolos durante 5-10 min. a temperatura ambiente (T_a). El bacteriófago TB99 marcado con Alexa532 sirve en este caso como bacteriófago de referencia con marca diferenciadora. Las señales de fluorescencia del bacteriófago de prueba (TB54-5(6)-carboxifluoresceína) y del bacteriófago de referencia (TB99-Alexa532) se midieron a continuación con un lector de placas (Perkin Elmer). Los valores de medición obtenidos se definieron como intensidad inicial o intensidad de señal 100% de la suspensión de fagos antes de la adición de una muestra a analizar y están representados en el gráfico en la figura 11B como línea discontinua.

Luego se mezclaron respectivamente 900 ml de la suspensión anteriormente mencionada con respectivamente 100 ml de las suspensiones de bacterias *E. coli* C600 diluidas en serie ($\sim 10^4$ - 10^7 células/ml en TSB) y las mezclas de reacción también se incubaron durante 5-10 min. a temperatura ambiente (T_a). Las mezclas de reacción se filtraron a continuación respectivamente a través de un filtro con un tamaño de poros de 0,4 μm (Micropore Membran, Milipore).

La fluorescencia en los filtrados obtenidos se midió respectivamente con un lector de placas (Perkin Elmer). La figura 11B muestra respectivamente las intensidades de fluorescencia de bacteriófagos TB54 marcados con 5(6)-carboxifluoresceína (cuadrados) y bacteriófagos TB99 marcados con Alexa532 (triángulos) en el filtrado. Las intensidades de fluorescencia indicadas se obtuvieron respectivamente mediante normalización al valor de intensidad inicial determinado, es decir, las intensidades de fluorescencia medidas se establecieron respectivamente en relación con la intensidad inicial. Se reconoce que la intensidad de fluorescencia de los bacteriófagos de prueba (TB54-5(6)-carboxifluoresceína como cuadrados) decrece considerablemente. Esto muestra que los bacteriófagos de prueba infectan específicamente la cepa bacteriana *E. coli* C600 y forman los complejos de bacterias-bacteriófagos correspondientes, que se eliminan mediante filtración. Por esta razón, la cantidad de bacteriófagos de prueba no acoplados en el filtrado es menor que en la suspensión de fagos inicial, lo que se refleja en la reducción de la intensidad de fluorescencia en el filtrado.

Las intensidades de fluorescencia en el residuo están representadas en la figura 11C. Los valores de medición representados fueron determinados respectivamente mediante microscopía de fluorescencia, realizando tomas de las superficies de los filtros con un objetivo estándar (20x, Nikon) y calculando la intensidad media de la imagen a partir de tres imágenes por cada superficie de filtro (valor medio \pm desviación estándar, $N=3$). Los datos muestran que al aumentar la concentración de bacterias en la muestra añadida, la intensidad de la fluorescencia del bacteriófago de prueba (TB54-5(6)-carboxifluoresceína) aumenta, mientras la intensidad de fluorescencia del bacteriófago de referencia (TB99-Alexa532) apenas cambia. Esto permite concluir que el bacteriófago de prueba se acopla específicamente a las bacterias a detectar y que al aumentar la concentración de bacterias también aumenta la concentración de los complejos de bacterias-bacteriófagos formados, que finalmente son inmovilizados en la

superficie del filtro mediante la filtración. Por el contrario, el bacteriófago de referencia no se acopla a la especie bacteriana a detectar o a la cepa bacteriana a detectar, de forma que la concentración de las bacterias no tiene ninguna influencia sobre la intensidad de la fluorescencia medida en el residuo.

- 5 Como se ha mostrado, el procedimiento según la invención permite una detección de bacterias altamente específica y altamente sensible. El procedimiento es sencillo de realizar y proporciona resultados muy fiables. Además, el tiempo necesario para el procedimiento es reducido, por lo que se logra una detección en un plazo de menos de una hora desde la adición de la muestra.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de bacterias, que comprende los pasos

- 5 A) Proporcionar una suspensión (1) que comprenda al menos una especie de bacteriófagos (2) de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie bacteriana a detectar, tal que el marcado sea característico para la especie respectiva de bacteriófagos (2) de prueba;
- B) Añadir a la suspensión una muestra (3) que se va a analizar en relación a la presencia de al menos una especie bacteriana a detectar;
- 10 C) Mezclar la muestra con la suspensión e incubar la mezcla de reacción;
- D) Filtrar la mezcla de reacción a través de un filtro (4), tal que el filtro (4) presenta un tamaño de poros de 0,1 µm a 0,5 µm y el tamaño de poros del filtro (4) utilizado se elige de forma que la al menos una especie bacteriana a detectar, así como los complejos (5) de bacterias-bacteriófagos compuestos por bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y bacteriófagos (2) de prueba de la al menos una especie, acoplados a estas, quedan retenidos e inmovilizados sobre la superficie del filtro, mientras los bacteriófagos (2, 6) no acoplados pueden pasar el filtro;
- 15 E) Detección de complejos (5) de bacterias-bacteriófagos en el residuo si está presente al menos una especie bacteriana a detectar, estando compuestos los complejos de bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y de bacteriófagos (2) de prueba acoplados a estas, de la al menos una especie de bacteriófagos (2) de prueba;
- 20 F) Detección de bacteriófagos (2) de prueba no acoplados en el filtrado;
- G) Procesamiento asistido por procesador de las señales recibidas que son generadas mediante la detección en los pasos E) y F) y emisión de resultados de detección a un usuario,

25 **caracterizado por que** la suspensión comprende además un bacteriófago (6) de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos (2) de prueba, de forma que el bacteriófago (6) de referencia marcado también es detectado en el paso F); o **por que**, alternativamente a un bacteriófago (6) de referencia marcado, se utilizan micro o nanopartículas marcadas que no se acoplan a ninguna especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro (4) debido a su pequeño tamaño.

30 2. Procedimiento para la detección de bacterias, según la reivindicación 1, tal que las especies bacterianas a detectar se eligen del grupo que comprende *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA)*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *EHEC*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *BStreptokokken (agalactiae)*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Citrobacter freundii*, *Moraxella catarrhalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pasteurella multocida*, *Acinetobacter baumannii*, *Providencia rettgeri*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Clostridium butolinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clamydía trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Francisella tularensis*, *Gardnella vaginalis*, *Listeria monocytogenes*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Coxiella burnettii*, *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Xanthomonas maltophilia*, *Treponema pallidum*, *Eikenella corrodens*, *Spirillum minus*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Cronobacter spp.*, *Campylobacter spp.* y *Legionella pneumophila*.

35 3. Procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, tal que la suspensión (1) comprende una o varias especies de bacteriófagos (2) de prueba marcados, que se acoplan respectivamente de forma específica a diferentes especies bacterianas a detectar, siendo las marcas de las especies disjuntas.

40 4. Procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, tal que la marca comprende al menos una molécula reportera con propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes, o al menos una molécula reportera que emite luz a través de la interacción con una molécula secundaria.

45 5. Procedimiento para la detección de bacterias, según la reivindicación 4, tal que la marca está compuesta respectivamente por al menos una molécula reportera fluorescente y la detección tiene lugar mediante medición de la fluorescencia, tal que la excitación de al menos una molécula reportera fluorescente tiene lugar en el rango de longitudes de onda de 200-1000 nm.

50 6. Procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, tal que la al menos una molécula reportera está acoplada a proteínas en la zona del cápside de los bacteriófagos.

65

7. Procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, tal que la detección tiene lugar respectivamente mediante medición de la emisión de luz en el tiempo.

5 8. Procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además el paso de una separación previa de complejos (5) de bacterias-bacteriófagos y bacteriófagos (2, 6) no acoplados, tal que la separación previa tiene lugar a continuación del paso C) y según el principio de la filtración en gel a través de una matriz (24) de gel.

10 9. Recipiente (7) de reacción para la detección de bacterias, que comprende al menos dos compartimentos que están separados entre sí por un filtro (4),

15 tal que un compartimento es un depósito (8) de fagos que contiene una suspensión (1) que comprende al menos una especie de bacteriófagos (2) de prueba marcados, que se acoplan específicamente a una especie bacteriana a detectar, siendo característico el marcado para la especie respectiva de bacteriófagos (2) de prueba y tal que un compartimento es un depósito (9) de recogida para la recepción del filtrado tras la adición de una muestra (3) a la suspensión (1) y filtración a través del filtro (4), y

20 tal que el filtro (4) presenta un tamaño de poros de 0,1 μm a 0,5 μm y el tamaño de poros del filtro utilizado se selecciona de forma que la al menos una especie bacteriana a detectar, así como los complejos (5) de bacterias-bacteriófagos compuestos por bacterias de la al menos una especie bacteriana a detectar y bacteriófagos (2) de prueba acoplados a estas de la al menos una especie, sean retenidos e inmovilizados sobre la superficie del filtro, mientras los bacteriófagos (2, 6) no acoplados pueden pasar el filtro;

un medio (10) para la identificación del recipiente de reacción; y al menos dos ventanas (11, 12) de medición,

25 tal que una ventana (11) de medición está dispuesta en la zona de la superficie del filtro, que está orientada al depósito (8) de fagos, y una ventana (12) de medición está dispuesta en la zona del depósito (9) de recogida,

30 **caracterizado por que** la suspensión (1) comprende además un bacteriófago (6) de referencia marcado que no se acopla a ninguna especie bacteriana a detectar y presenta una marca que lo diferencia de los bacteriófagos (2) de prueba o por que el recipiente (7) de reacción comprende otro compartimento entre el filtro (4) y el depósito (8) de fagos, que contiene una solución (28) indicadora con micro o nanopartículas marcadas que no se acoplan a una especie bacteriana a detectar y pueden pasar el filtro (4) debido a su tamaño reducido.

35 10. Recipiente (7) de reacción, según la reivindicación 9, que comprende además un compartimento entre el depósito (8) de fagos y el filtro (4), que contiene al menos un filtro previo, tal que el al menos un filtro previo es una matriz (24) de gel.

40 11. Cartucho que comprende dos o varios recipientes (7) de reacción, según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, que están dispuestos en paralelo entre sí, tal que cada recipiente (7) de reacción contiene una especie diferente de bacteriófagos (2) de prueba marcados en la suspensión (1) del depósito (8) de fagos, que se acoplan respectivamente de forma específica a diferentes especies bacterianas a detectar, siendo las marcas de las especies disjuntas.

45 12. Uso de un recipiente (7) de reacción, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, o de un cartucho, según la reivindicación 11, para la realización del procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

50 13. Uso de un equipo (15) de medición para la realización del procedimiento para la detección de bacterias, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, tal que el equipo (15) de medición comprende:

una ranura, en la que se introduce un recipiente (7) de reacción, según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, o un cartucho, según la reivindicación 11;

55 al menos dos sistemas (16) ópticos de detección que están dispuestos respectivamente en la zona de las ventanas (11, 12) de medición del recipiente (7) de reacción o el cartucho,

tal que los sistemas (16) ópticos de detección comprenden respectivamente un sistema (17) de lentes para enfocar la luz emitida por la marca de los bacteriófagos (2, 6) en al menos un sensor (18) óptico, tal que el al menos un sensor (18) óptico detecta la luz emitida;

60 un procesador que está conectado respectivamente al al menos un sensor (18) óptico de los sistemas (16) ópticos de detección y que procesa las señales de detección recibidas; y una unidad de emisión conectada al procesador, que emite los resultados de detección a un usuario.

65 14. Uso de un equipo de medición, según la reivindicación 13, tal que los sistemas (18) ópticos de detección del equipo (15) de medición comprenden además respectivamente una unidad (19) de iluminación que emite luz en el rango de longitudes de onda de 200-1000 nm y un sistema (20) de lentes para enfocar la luz emitida por la unidad

(19) de iluminación en una zona de medición, tal que la unidad (19) de iluminación también está conectada al procesador y es controlada por este.

- 5 15. Uso de un equipo de medición, según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, tal que el equipo (15) de medición comprende además un equipo de lectura integrado, que registra el medio (10) de identificación del recipiente (7) de reacción y transfiere los datos registrados al procesador, tal que el procesador procesa los datos registrados y puede emitir los resultados de la identificación a través de la unidad de emisión a un usuario.

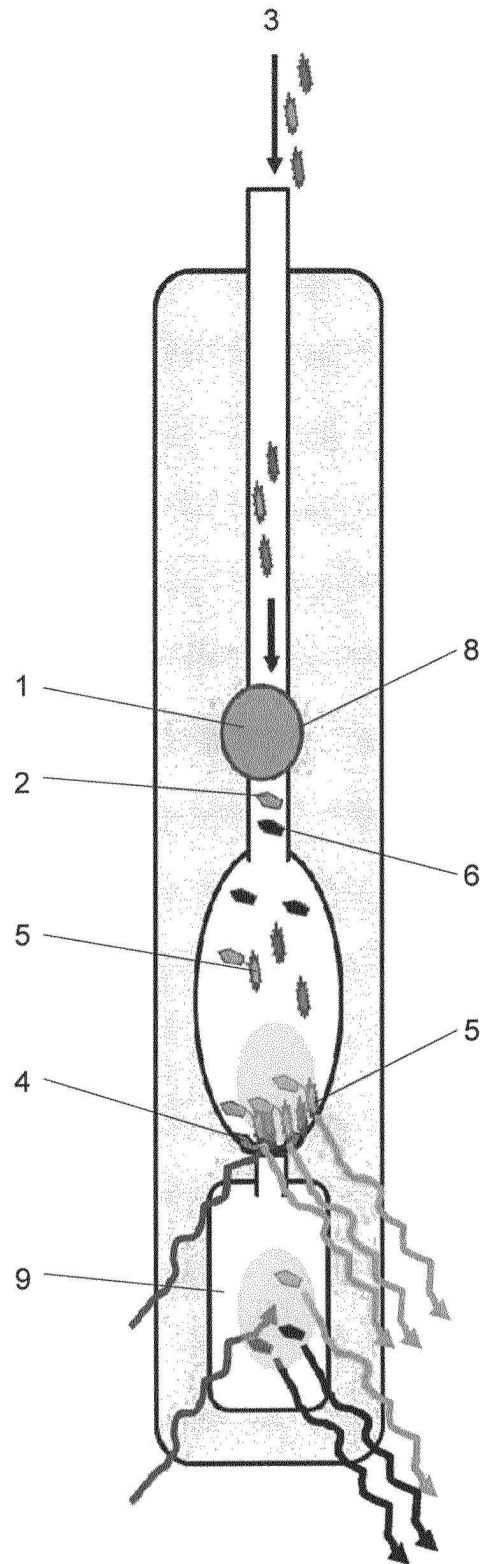


Figura 1

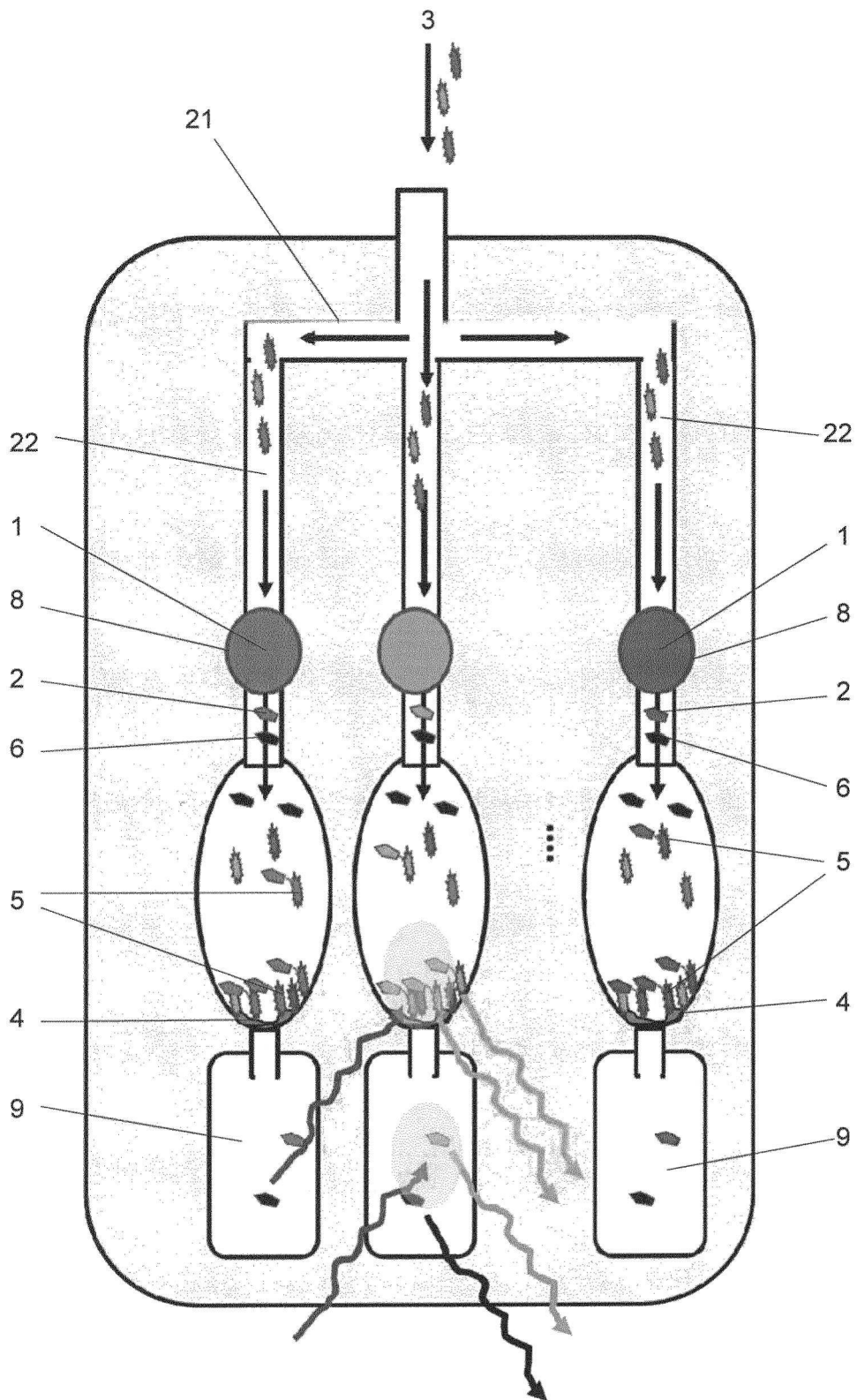


Figura 2

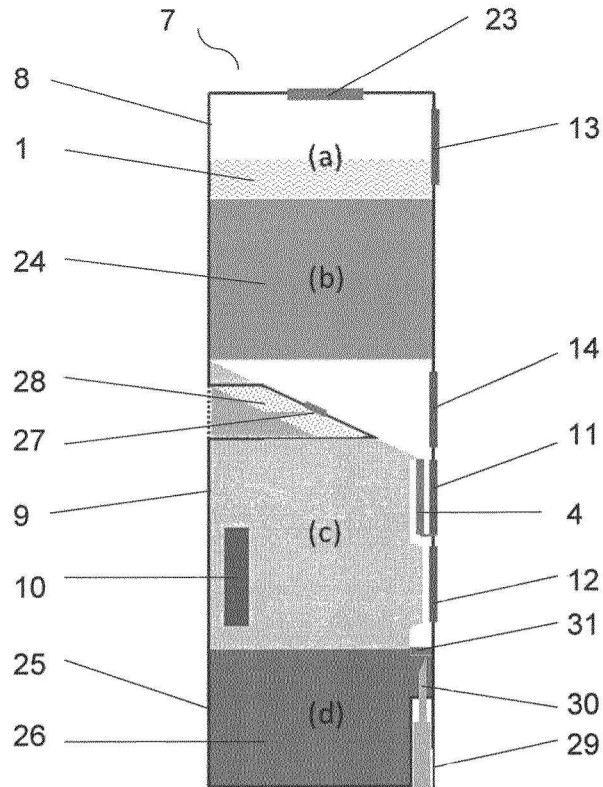


Figura 3 A

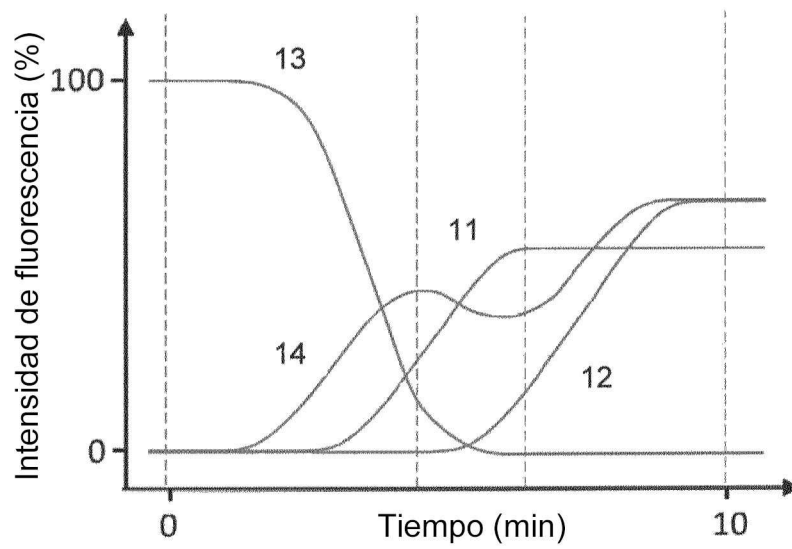


Figura 3 B

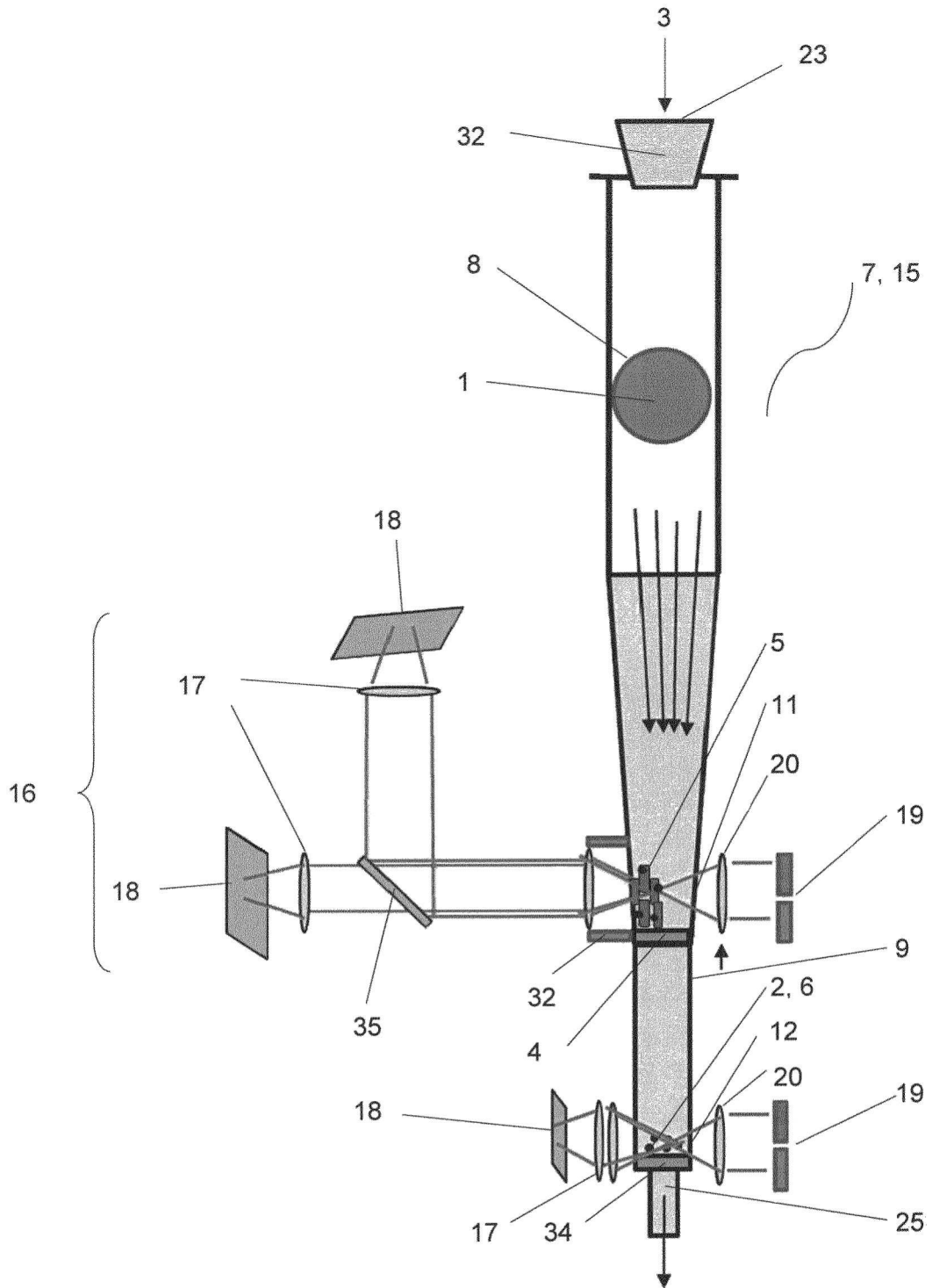


Figura 4

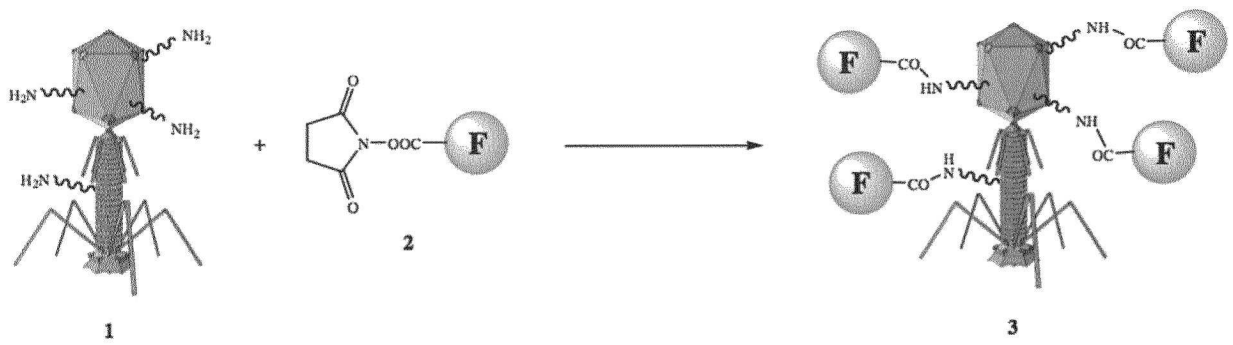
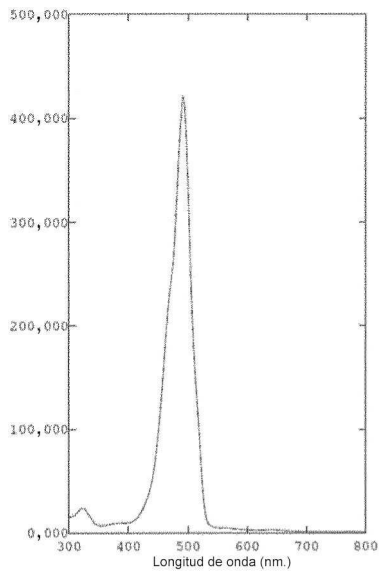
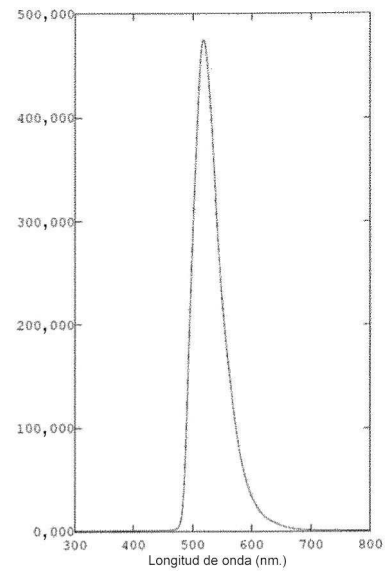


Figura 6



Espectro de excitación



Espectro de emisión

Figura 7

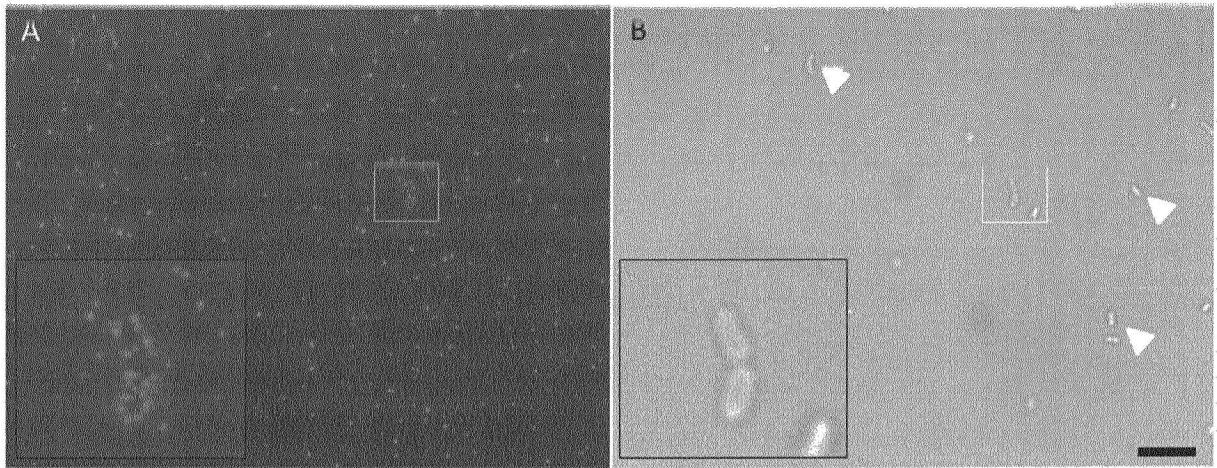


Figura 8

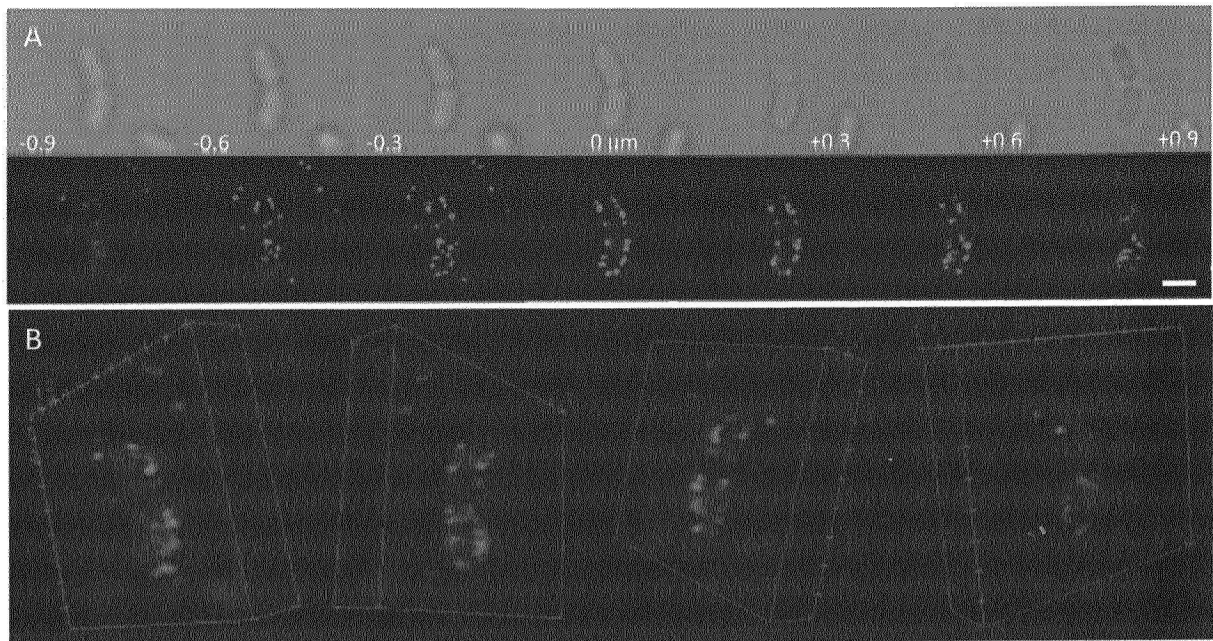


Figura 9

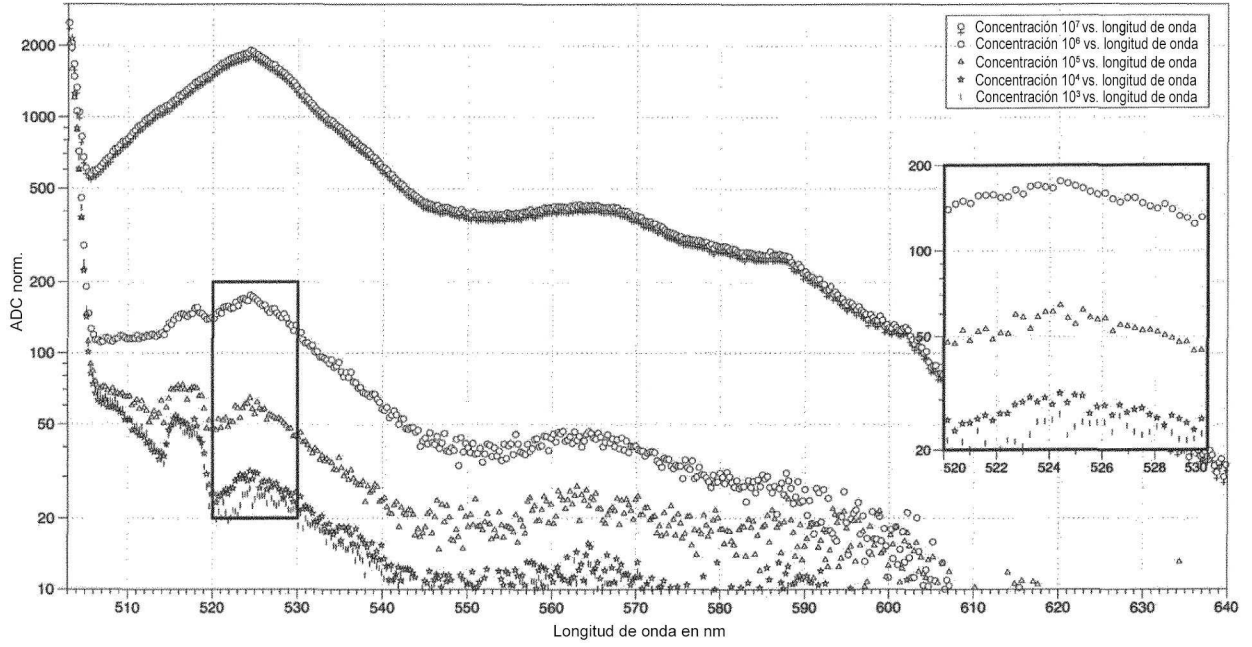


Figura 10 A

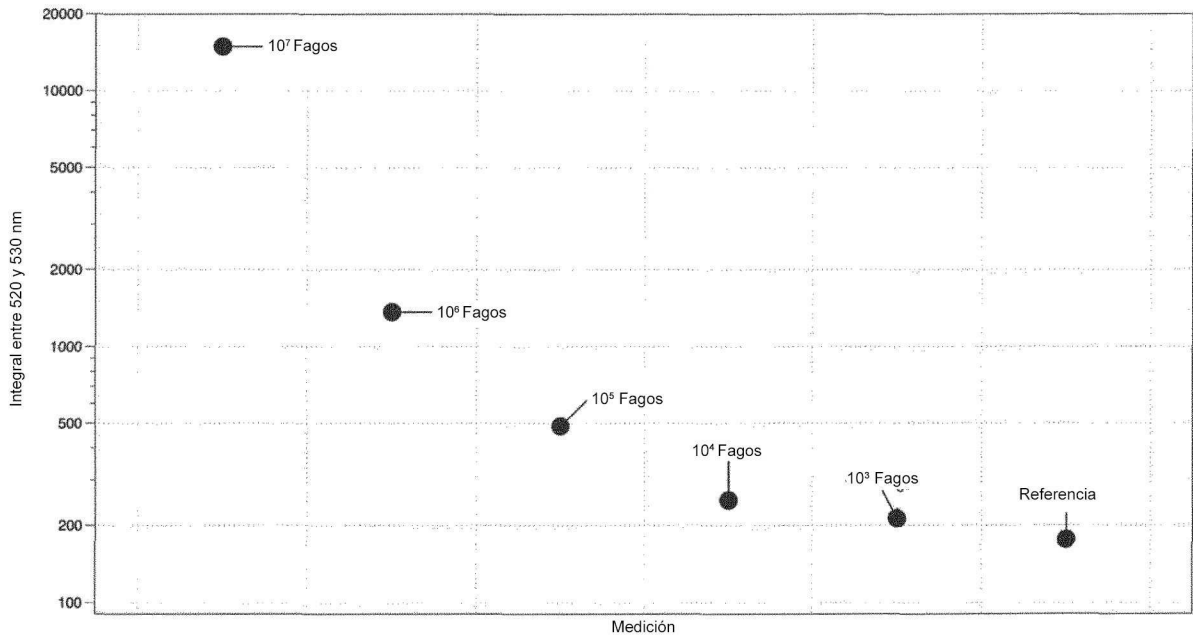


Figura 10 B

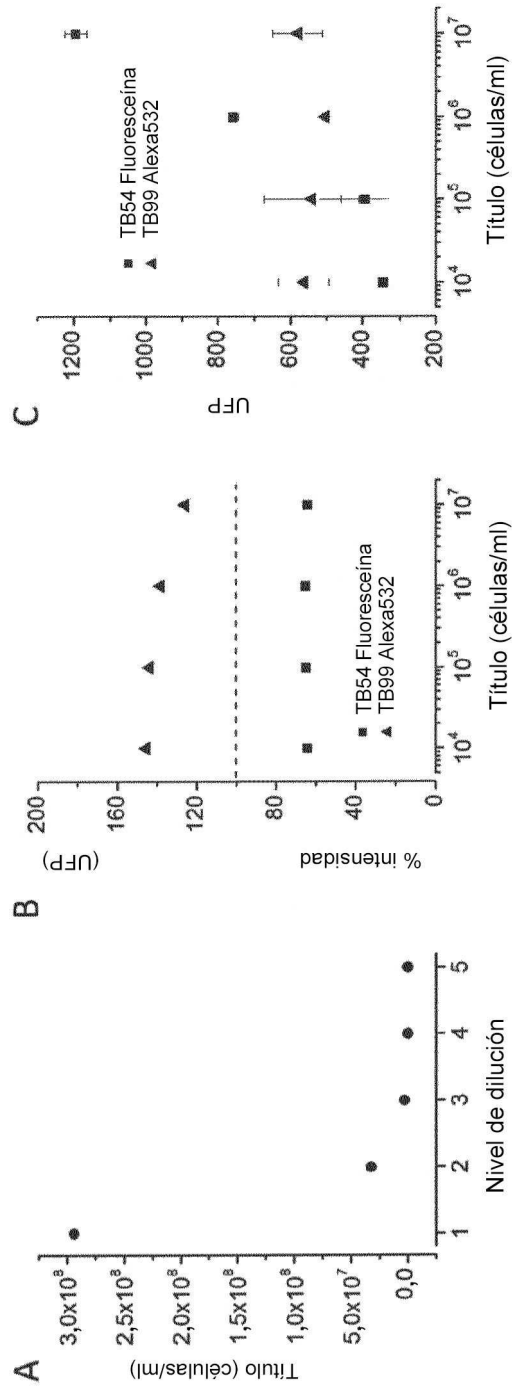


Figura 11