

(19)



(11)

EP 3 171 172 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
18.07.2018 Patentblatt 2018/29

(51) Int Cl.:
G01N 33/569 ^(2006.01) **G01N 21/00** ^(2006.01)
B01L 3/00 ^(2006.01)

(21) Anmeldenummer: **15003307.4**

(22) Anmeldetag: **20.11.2015**

(54) VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN

METHOD AND DEVICE FOR DETECTING BACTERIA

PROCEDE ET DISPOSITIF DE CONTROLE DE BACTERIES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

(74) Vertreter: **Kador & Partner PartG mbB**
Corneliusstraße 15
80469 München (DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
24.05.2017 Patentblatt 2017/21

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A1-2006/105504 US-A1- 2001 006 783

(73) Patentinhaber:
• **Sinamira AG**
81545 München (DE)
• **Friedrich-Alexander-Universität**
Erlangen-Nürnberg
91054 Erlangen (DE)

- **P.A. MOSIER-BOSS ET AL.:** "Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species", **APPLIED SPECTROSCOPY**, Bd. 57, 2003, Seiten 1138-1144, XP002754992,
- **"VWR Collection filtration VWR Collection products: delivering high quality & superior performance A collection of filtration products and speciality papers"**, , 1. Januar 2010 (2010-01-01), XP055253122, Gefunden im Internet:
URL:https://si.vwr.com/store/asset?assetURL=https://si.vwr.com/stibo/hi_res/std.lang_all/52/55/11935255.pdf [gefunden am 2016-02-25]

(72) Erfinder:
• **MIEDL, Walter**
9050 Appenzell (CH)
• **FRIEDRICH, Oliver**
90408 Nürnberg (DE)
• **GILBERT, Daniel**
90482 Nürnberg (DE)

EP 3 171 172 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien, insbesondere ein beschleunigtes und hoch-sensitives Verfahren zum Nachweis von bakteriellen Erregern, welches auf der Bildung von spezifischen Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen beruht. Darüber hinaus werden ein Reaktionsgefäß sowie die Verwendung dieses Reaktionsgefäßes und eines Messgeräts für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens offenbart.

[0002] Bakterien zeichnen sich oftmals als Erreger ernstzunehmender Erkrankungen aus. Insbesondere sind multiresistente Bakterienstämme, welche auch als "Krankenhaus-Keime" bezeichnet werden, für eine Vielzahl von bakteriellen Infektionen in Krankenhäusern verantwortlich. Gerade angesichts des demographischen Wandels und der Möglichkeiten der modernen Intensivmedizin, finden sich auf einer Intensivstation zunehmend ältere Patienten, welche besonders anfällig für Infektionen durch Bakterien sind. Einer der zentralen Bausteine intensivmedizinischer Therapie bildet die mikrobiologische Diagnostik. Eine schnelle und korrekte Identifizierung der Erreger einer Infektion beeinflusst in erheblicher Weise nicht nur die Letalität der Patienten, sondern ermöglicht auch den keimspezifischen Antibiotikaeinsatz, so dass eine inflationäre Verwendung von Breitbandantibiotika und die damit verbundene Selektion multiresistenter Bakterienstämme vermieden werden können. Allerdings sind die bisherigen Verfahren meist zeitaufwendig und ebenso kostenintensiv.

So bildet die Blutkultur bisher einen der Hauptpfeiler in der Diagnosestellung von Blutstrominfektionen. Hierbei findet die Bebrütung in Kulturflaschen unter aeroben und anaeroben Bedingungen statt. Geeignet sind dazu neben Blut sterile Flüssigkeiten wie Punktate oder Liquorentnahmen. Im Allgemeinen werden etwa 3-4 Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Vollblut zur Diagnostik bei Raumtemperatur entnommen. Bebrütet werden die Blutkulturflaschen in einem halbautomatischen System, bei denen das zunehmende Wachstum von Bakterien an der zunehmenden CO₂-Produktion oder einer Flaschendruckzunahme gemessen wird. Die Routinebebrütung beträgt in den meisten Fällen 48-72 Stunden. Besondere Probleme bereiten dabei langsam wachsende Bakterien, die eine Bebrütung von 5 bis zu 21 Tagen erfordern können und somit leicht in der Routine übersehen werden. Aber auch spezielle Nährmedien oder Färbeverfahren verkomplizieren und verzögern eine ausreichende und schnelle Diagnosestellung. Ist eine Blutkulturflasche positiv detektiert, wird diese aus dem System selektiert. Aus dieser Flasche wird eine Probe entnommen und auf verschiedenen Nährmedien werden wiederum aerobe und anaerobe Subkulturen angefertigt. Nach etwa acht weiteren Stunden kann eine grobe Resistenzbestimmung bei begleitender Antibiotikatestung erfolgen.

Eine schnellere Erregeridentifizierung gelingt direkt aus der positiven Blutkulturflasche innerhalb von 1-2

Stunden mittels Latexagglutination zum Nachweis von Antigenen von *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitis*, *E. coli* und *Salmonella typhi*. Nukleinsäurenachweisverfahren, wie die DNA-Hybridisierung, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und spezifische Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) werden zur Bakteriämie- und Sepsisdiagnostik in der jüngeren Zeit eingesetzt, stehen aber nur in sehr wenigen Laboren zur Verfügung. Die Erregerbestimmung gelingt dabei innerhalb von 1-3 Stunden aus einer positiven Blutkulturflasche. Daneben sind in den letzten Jahren einige klinische Labore mit MALDI-TOF (matrixunterstützte Laserdesorption/ Ionisation-Time of Flight)-Massenspektrometern erweitert worden, welche eine Bakterienidentifizierung innerhalb nur weniger Minuten erlauben. Allerdings erfordern auch die oben beschriebenen modernen Nachweismethoden eine positiv detektierte Blutkulturflasche. Daher kann mittels einer positiven Blutkultur der Nachweis von bakteriellen Erregern in der Regel erst innerhalb eines Zeitfensters von 24 bis 36 Stunden nach Entnahme der Probe gelingen. Zum Teil ist es durch PCR-diagnostische Verfahren möglich, schon innerhalb von 4-6 Stunden nach der Entnahme Bakteriennachweise aus Blutproben ohne den Zwischenschritt der Bebrütung einer Blutkultur zu erhalten, z.B. für *Staphylococcus aureus*. Die modernsten Verfahren sind die Multiplex-Amplifikationsverfahren, welche die häufigsten Erregerarten erfassen können. Dazu gehören beispielsweise LightCycler, SeptiFast und SepsiTtest. Allerdings sind diese Untersuchungen recht anfällig für Kontaminationen, was falsche oder falsch positive Ergebnisse liefert. Nachteilig zeigen sich bei diesen Verfahren zudem der Arbeitsaufwand und die Kostenstruktur, da für die PCR-Diagnostik neben dem Material, entsprechendes Fachpersonal sowie eine geeignete Infrastruktur benötigt werden.

Darüber hinaus ist zu beachten, dass in 2-3 % der Fälle eine positiv detektierte Blutkultur ebenfalls auf eine Kontamination der Probe oder Verarbeitungsfehler nach der Probenentnahme zurückgeht. Die Folge sind fehlerhafte antibiotische Therapien mit unnötigen und zum Teil erheblichen Kosten, weshalb ein schnelles, einfach zu handhabendes und hoch-sensitives Verfahren zum Nachweis der bakteriellen Erreger wünschenswert wäre. Bezüglich der Erfordernisse einer hohen Sensitivität und Spezifität bieten Bakteriophagen (kurz Phagen) einen vielversprechenden Ansatzpunkt. Bakteriophagen sind Viren, die sich spezifisch nur gegen Bakterienzellen richten, diese über Oberflächen-Rezeptorstrukturen erkennen, daran Schlüssel-Schloss-ähnlich binden und in den nachfolgenden Schritten die genetische und enzymatische Ausstattung der Bakterien für ihre eigene Vermehrung nutzen. Die befallenen Bakterienzellen lysieren und entlassen zahlreiche neue Phagen. Diese biologische Prozesskette geht so lange weiter, bis alle für die freien Phagen erreichbaren Wirtsbakterienzellen entfernt sind. Phagen befallen fast immer nur Stämme in-

nerhalb einer Bakterienart, d.h. sie sind jeweils hoch-spezifisch für eine bestimmte Bakterienart. Da viele Bakterienarten ubiquitär in zahlreichen Habitaten vorkommen, können gleich einem biologischen Prinzip dort auch ihre komplementären Phagen vermutet werden. Global übertrifft die von Experten geschätzte Zahl der Phagen die der Bakterien um das Zehnfache (C. Rohde & J. Sikorski: Bakteriophagen - Vielfalt, Anwendung und ihre Bedeutung für die Wissenschaft vom Leben. Naturwiss. Rundschau (2011), 64, 5-14). Die gewünschten Bakteriophagen können oft aus allen denkbaren wässrigen Habitaten durch einfache Beprobung und nachfolgendes Screening gegen die Zielbakterien gewonnen werden. Aufgrund der enormen Wirtsspezifität und der lytischen Eigenschaften werden Phagen in der klinischen Forschung und Analytik bereits vielfältig verwendet, z.B. in der Phagentherapie gegen bakterielle Infektionen. Ferner beschreiben Thanki, Malik, Clokie die Entwicklung eines biolumineszenten Reporter-Phagen zur Identifizierung von *Clostridium difficile*, bei dem die Gen-Kassetten *luxA* und *luxB*, welche das Enzym Luziferase codieren, in ein Plasmid kloniert werden zur Konjugation in einen *Clostridium difficile*-spezifischen Phagen und zur homologen Insertion in das Phagengenom (A. Thanki, D. Malik, M. Clokie, The Development of a Reporter Phage for the Identification of *Clostridium difficile*, Bacteriophages (2015), Abstract, 25). Die wissenschaftliche Publikation von Mosier-Boss et al. beschreibt weiterhin den spezifischen Nachweis von *Salmonella typhimurium* LT2 unter Verwendung fluoreszenzmarkierter P22-Phagen. Die Markierung der Phagen ist bei dem beschriebenen Ansatz komplett auf die Phagen DNA beschränkt (10 min Inkubation von P22 mit SYBR gold), welche bei Infektion in das Wirtsbakterium injiziert wird. Die Detektion spezifischer *Salmonella typhimurium*-P22-Phagen-Komplexe erfolgt nach deren Isolierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. (P.A. Mosier-Boss et al., Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species, Applied Spectroscopy (2003), 57, 1138-1144).

Auch in der Lebensmittelindustrie und bei der Trinkwasserversorgung ist ein einfacher und sicherer Bakteriennachweis wichtig. Im Trinkwasser können sich Legionella-Stämme bei Temperaturen zwischen 20 und 45 °C vermehren, sodass eine regelmäßige Untersuchung des Trinkwassers geboten und auch in vielen Ländern gesetzlich vorgeschrieben ist. Die deutsche Trinkwasserverordnung schreibt beispielsweise eine regelmäßige Untersuchungspflicht auf Legionellen vor. Es ist zu erwarten, dass die gesetzlichen Bestimmungen weiter verschärft werden. Institute und Behörden, wie z.B. Trinkwasserlabore oder Gesundheitsämter sind demnach bestrebt, einen schnellen, einfachen, sensitiven und sicheren Bakteriennachweis auf Legionella-Stämme durchzuführen. Hieran fehlt es derzeit, und eine Verbesserung ist wünschenswert.

Andererseits sind durch Lebensmittel übertragene bakterielle Lebensmittelintoxikationen und Lebensmittel-

Toxin-Infektionen ein weltweites Problem und verursachen massive wirtschaftliche Schäden. Die lange Zeitspanne bis zum sicheren Nachweis der Erreger bedeutet einen erheblichen ökonomischen und wirtschaftlichen Verlust, da sich entweder die Lagerzeit der Produkte bis zum Weiterverkauf verlängert oder es sogar zum Rückruf des entsprechenden Lebensmittels kommen kann. Eine schnellere und sichere Nachweismethode kann hier einen wesentlichen Anteil zur Lebensmittelsicherheit und der Minimierung wirtschaftlicher Verluste beitragen. Gefürchtete Erreger im Lebensmittelbereich sind u.a. *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, oder *Bacillus cereus*. Ein schneller Ausschluss oder Nachweis von Erregern in Lebensmitteln ist daher für deren Freigabe essenziell.

Weitere Gebiete, in denen schnelle und einfache Bakteriennachweise wünschenswert sind, beinhalten die Agrarindustrie, die Veterinärmedizin oder Anwendungen im militärischen Bereich oder Katastrophenschutz.

Die Veröffentlichung von P.A. Mosier-Boss et al. ("Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species", Applied Spectroscopy 2003, 57, 1138-1144) beschreibt den spezifischen Nachweis von *Salmonella typhimurium* LT2 Bakterien mit Hilfe fluoreszenzmarkierter SYBR Gold P22 Bakteriophagen. Dabei werden die Bakterien mit den gelabelten Phagen versetzt, inkubiert und die Suspension schließlich durch einen Whatman-Filter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Der Überstand auf dem Filter, d.h. die entstandenen Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe, werden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Weiterhin offenbart WO 2006/105504 A1 ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zum Nachweis von Mikroorganismen. Dabei umfasst die Vorrichtung markierte Bakteriophagen sowie ein Gefäß mit zwei Kammern und einem Trennelement, wobei das Trennelement die beiden Kammern voneinander trennt. Ferner kann das Trennelement ein Filter (Porengröße 0.2 µm) oder eine Membran sein, welches die markierten Bakteriophagen passieren lässt während es die Mikroorganismen zurückhält. Zudem können neben Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen der einen Trennfraktion auch ungebundene Bakteriophagen der anderen Trennfraktion detektiert werden. Darüber hinaus werden in US 2001/0006783 A1 ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zum Nachweis von Bakterien beschrieben, wobei der Nachweis auf der Messung der Fluoreszenz von gelabelter Phagen-DNS nach Injektion in die Bakterien beruht. Dabei wird ein Bakterien-Detektor, welcher ein optisches Detektionsmittel enthält, wie z.B. ein (Fluoreszenz)-Mikroskop, ein (Fluoreszenz)-Spektrophotometer oder ein Fluoreszenz-Detektor, verwendet. Zudem können die Vorrichtungen einen Bildprozessor zur prozessorgestützten Auswertung der Detektions-Signale enthalten.

Im Hinblick auf die Nachteile der klinischen Nachweisverfahren für Bakterien aus dem Stand der Technik, ins-

besondere bezüglich Zeitaufwand, Komplexität und Kostenintensität, bedarf es einer neuen schnelleren und spezifischeren Diagnostik für einen zeitnahen und selektiven Bakteriennachweis, sei es für klinische, human- oder veterinärmedizinische, agrarindustrielle oder militärische Anwendungen, oder für die Trinkwasseranalytik, um nur einige spezifische Anwendungen zu nennen. Daher besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein verbessertes Verfahren zum Nachweis von Bakterien bereitzustellen, welches eine schnellere und verlässliche Identifikation von bakteriellen Erregern, eine vereinfachte Handhabung und eine hohe Sensitivität bei geringeren Kosten liefert. Ebenso soll ein Reaktionsgefäß für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellt werden.

[0003] Die erfinderische Lösung der oben genannten Aufgabe basiert auf der evolutionär konservierten, hochspezifischen Wechselwirkung zwischen Bakterien und Bakteriophagen.

[0004] So offenbart die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien, umfassend die Schritte

A) Bereitstellen einer Suspension, umfassend mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen kennzeichnend ist;

B) Zugabe einer Probe, die auf das Vorliegen mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart getestet werden soll, zu der Suspension;

C) Mischen der Probe mit der Suspension und Inkubation des Reaktionsgemisches;

D) Filtration des Reaktionsgemisches durch einen Filter, wobei der Filter eine Porengröße von 0,1 µm bis 0,5 µm aufweist und die Porengröße des verwendeten Filters so gewählt ist, dass die mindestens eine nachzuweisende Bakterienart sowie Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe, welche aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies bestehen, zurückgehalten und auf der Filteroberfläche immobilisiert werden, während ungebundene Bakteriophagen den Filter passieren können;

E) Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen im Überstand, bei Vorliegen mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart, wobei die Komplexe aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies von Testbakteriophagen bestehen;

F) Detektion von ungebondenen Testbakteriophagen im Filtrat;

G) prozessorgestützte Verarbeitung von erhaltenen Signalen, welche durch die Detektion in den Schritten F) und G) erzeugt werden und Ausgabe von Detektionsergebnissen an einen Benutzer,

dadurch gekennzeichnet, dass die Suspension ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen umfasst, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen disjunkte Markierung aufweist, so dass der markierte Referenz-Bakteriophage ebenfalls im Schritt F) detektiert wird; oder dass, alternativ zu einem markierten Referenz-Bakteriophagen, markierte Mikro- oder Nanopartikel verwendet werden, welche an keine nachzuweisende Bakterienart binden und den Filter aufgrund ihrer geringen Größe passieren können.

[0005] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Reaktionsgefäß zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Bakterien, umfassend mindestens zwei Kompartimente, welche durch einen Filter voneinander getrennt sind, wobei ein Kompartiment ein Phagenreservoir ist, welches eine Suspension enthält, die mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen umfasst, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen kennzeichnend ist; und ein Kompartiment ein Auffangreservoir ist, zur Aufnahme des Filtrats nach Zugabe einer Probe zu der Suspension und Filtration durch den Filter, und wobei der Filter eine Porengröße von 0,1 µm bis 0,5 µm aufweist und die Porengröße des verwendeten Filters so gewählt ist, dass die mindestens eine nachzuweisende Bakterienart sowie Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe, welche aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies bestehen, zurückgehalten und auf der Filteroberfläche immobilisiert werden, während ungebundene Bakteriophagen den Filter passieren können;

ein Mittel zur Identifikation des Reaktionsgefäßes; und mindestens zwei Messfenster, wobei ein Messfenster im Bereich der Filteroberfläche, welche dem Phagenreservoir zugewandt ist, angeordnet ist, und ein Messfenster im Bereich des Auffangreservoirs angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Suspension ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen umfasst, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen disjunkte Markierung aufweist oder dass das Reaktionsgefäß ein weiteres Kompartiment zwischen Filter und Phagenreservoir umfasst, welches eine Indikatorlösung mit markierten Mikro- oder Nanopartikeln enthält, welche nicht an eine nachzuweisende Bakterienart binden und den Filter aufgrund ihrer geringen Größe passieren können.

[0006] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfin-

dung eine Kartusche, die zwei oder mehrere erfindungsgemäße Reaktionsgefäße umfasst, welche parallel zueinander angeordnet sind, wobei jedes Reaktionsgefäß eine unterschiedliche Spezies von markierten Testbakteriophagen in der Suspension des Phagenreservoirs enthält, welche jeweils spezifisch an unterschiedliche nachzuweisende Bakterienarten binden, wobei die Markierungen der Spezies disjunkt sind.

[0007] Zusätzlich bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung eines Messgeräts zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Bakterien, wobei das Messgerät umfasst:

einen Schacht, in den ein erfindungsgemäßes Reaktionsgefäß oder eine erfindungsgemäße Kartusche eingeschoben wird;

mindestens zwei Detektions-Optiken, welche jeweils im Bereich der Messfenster des eingeschobenen Reaktionsgefäßes oder der Kartusche angeordnet sind, wobei die Detektionsoptiken jeweils ein Linsensystem zur Fokussierung von emittiertem Licht der Markierung der Bakteriophagen auf mindestens einen optischen Sensor umfassen, wobei der mindestens eine optische Sensor das emittierte Licht detektiert;

einen Prozessor, welcher jeweils mit dem mindestens einen optischen Sensor der Detektions-Optiken verbunden ist und welcher die erhaltenen Detektionssignale verarbeitet; und

eine mit dem Prozessor verbundene Ausgabereinheit, welche die Detektionsergebnisse an einen Benutzer ausgibt.

[0008] Die vorteilhafte Wirkung der vorliegenden Erfindung liegt einerseits in der schnellen und hochsensitiven Identifizierung von bakteriellen Erregern. So ist für das erfindungsgemäße Verfahren kein Anlegen einer Blutkultur notwendig. Vielmehr kann eine Probe, welche auf das Vorliegen einer bestimmten Bakterienart getestet werden soll, direkt nach der Probenentnahme verwendet werden. Dadurch erfolgt ein Bakteriennachweis im Idealfall, ohne einen notwendigen Transport und Lagerung der Probe, in weniger als 1 Stunde. Dies ermöglicht eine schnellere und keimspezifischere Anwendung von Antibiotika, wodurch eine prophylaktische Verwendung von Breitbandantibiotika vermieden wird. Zudem können mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens Bakterien bereits ab einer Konzentration von weniger als 100 Bakterien pro Milliliter nachgewiesen werden. Andererseits zeichnet sich das vorliegende Verfahren durch die unmittelbare Verwendung der Messprobe nach deren Entnahme und Einfachheit in der Handhabung aus, so dass es weniger anfällig für Verarbeitungsfehler ist. Darüber hinaus erfordert die Durchführung des Verfahrens mit Hilfe des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes und des erfindungsgemäßen Messgeräts kein ausgewiesenes Fachpersonal oder eine spezielle Infrastruktur, was den Kostenaufwand erheblich reduziert.

Figuren

[0009]

- 5 Figur 1: Schematische Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Bakterien
- 10 Figur 2: Schematische Darstellung einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Bakterien
- 15 Figur 3 A: Schematische Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes zum Nachweis von Bakterien
- 20 Figur 3 B: Theoretischer Verlauf einer zeitaufgelösten Messung der Fluoreszenz in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes aus Figur 3A.
- 25 Figur 4: Schematische Darstellung des Aufbaus von erfindungsgemäßem Reaktionsgefäß und Messgerät in einer Ausführungsform.
- 30 Figur 5: RFID Chip als Mittel zur Identifizierung des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes.
- 35 Figur 6: Markierung eines TB54-Bakteriophagen mit Fluorescein-NHS-Estern.
- 40 Figur 7: Anregungs- und Emissionsspektrum von Fluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen.
- 45 Figur 8 A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Bakterien-Bakteriophagen-Interaktion.
- Figur 8 B: Hellfeldaufnahme der Bakterien-Bakteriophagen-Interaktion.
- 50 Figur 9 A: Optische Schnittbilder von mit Fluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen infizierten *Escherichia coli* Bakterien im Durchlicht und in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung.
- 55 Figur 9 B: Dreidimensionale Rekonstruktionen von mit Fluoresceinmarkierten TB54 Bakteriophagen infizierten *Escherichia*

coli Bakterien.

Figur 10 A: Fluoreszenzspektren von Fluoresceinmarkierten TB54 Bakteriophagen bei unterschiedlichen Bakteriophagenkonzentrationen.

Figur 10 B: Darstellung der Integrale der zwischen 520 und 530 nm der Fluoreszenzspektren aus Figur 10A bei unterschiedlichen Bakteriophagenkonzentrationen.

Figur 11 A-C: Messung der optischen Dichte einer seriell verdünnten Bakteriensuspension, Darstellung der detektierten Fluoreszenzsignale von *E. coli* C600-TB54-Phagen-Komplexen auf der Filteroberfläche im Überstand sowie Darstellung der detektierten Fluoreszenzsignale ungebundener TB54-Phagen im Filtrat, jeweils bei verschiedenen Bakterienkonzentrationen.

[0010] Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst im Schritt A) die Bereitstellung einer Suspension, welche mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen umfasst, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet. Dabei ist die Markierung für die jeweilige Spezies von markierten Testbakteriophagen kennzeichnend. Dies bedeutet, die Markierungen, die an unterschiedliche Spezies von Testbakteriophagen gekoppelt sind, sind jeweils disjunkt. Vorzugsweise beträgt das Volumen der Suspension zwischen 0,5 und 5,0 ml.

Die Konzentration der Bakteriophagen in der Suspension, auch als Phagentiter bezeichnet, beträgt vorzugsweise 10^3 - 10^{12} pfu/ml (pfu = "plaque forming unit"), weiter vorzugsweise 10^4 - 10^{10} pfu/ml. Am meisten bevorzugt ist ein Phagentiter in der Suspension von 10^5 - 10^7 pfu/ml. Je nachdem welche Bakterienart nachgewiesen werden soll, wird eine Spezies von Testbakteriophagen für die Herstellung der Suspension ausgewählt, welche spezifisch an diese Bakterienart bindet, d.h. spezifisch diese Bakterienart infiziert. Aufgrund der evolutionär konservierten, enormen Wirtsspezifität der Bakteriophagen ist überdies ein spezifischer Nachweis einzelner Stämme innerhalb einer Bakterienart möglich. In diesem Fall wird eine Spezies von Testbakteriophagen für die Herstellung der Suspension ausgewählt, welche spezifisch an einen bestimmten Stamm innerhalb einer Bakterienart bindet. Dabei ist eine Bindung der ausgewählten Spezies von Testbakteriophagen an eine andere als die nachzuweisende Bakterienart bzw. an einen anderen als den nachzuweisenden Stamm nahezu ausgeschlossen. Infolgedessen ist die Möglichkeit, einen falsch-positiven Nachweis durch das erfindungsgemäße Verfahren zu erhalten, minimal und das Ergebnis des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens äußerst verlässlich. Um im weite-

ren Verfahren die Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies und die entstehenden Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe detektieren zu können, tragen die Testbakteriophagen eine Markierung. Die Markierung ist für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen kennzeichnend, d.h. alle Testbakteriophagen einer Spezies tragen die gleiche Markierung, welche von den Markierungen anderer Spezies unterscheidbar ist.

Zur Herstellung der Suspension werden die markierten Testbakteriophagen der jeweiligen mindestens einen Spezies vorzugsweise in Wasser oder in einer geeigneten Pufferlösung suspendiert. Als geeignete Pufferlösungen werden vorzugsweise 0,01-0,3 M Phosphatpuffer, pH 6,5-9,5; 0,01-0,3 M Carbonatpuffer, pH 6,5-9,5; phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) oder Mischungen davon verwendet. Weiter vorzugsweise enthalten das Wasser und die geeigneten Pufferlösungen jeweils $MgCl_2$, $MgSO_4$ und/oder $CaCl_2$. Die Konzentration von $MgCl_2$, $MgSO_4$ und $CaCl_2$ beträgt vorzugsweise jeweils 1 bis 15 mM.

In Schritt B) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine Probe, die auf das Vorliegen mindestens einer zu nachzuweisenden Bakterienart getestet werden soll, zu der Suspension gegeben. Vorzugsweise besteht die Probe aus einer humanen oder tierischen Körperflüssigkeit, wie Blut, Urin, Speichel oder einer anderen Körperflüssigkeit, einem Abstrich, welcher von einem Menschen oder einem Tier entnommen wird, aus Wasser aus einem Trinkwassersystem oder in wässriger Lösung aufbereitete Lebensmittel oder Lebensmittelbestandteile. Die Probe kann nach ihrer Entnahme direkt, ohne weitere Vorbehandlung zu der Suspension gegeben werden. Lebensmittel oder Lebensmittelbestandteile werden in wässrige Lösung gebracht. Dadurch wird der Zeitaufwand für den Bakteriennachweis erheblich reduziert und die Gefahr einer Kontamination durch Transport und/oder Lagerung minimiert. Ferner erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren ebenso den Nachweis von Bakterien aus einer Probe, welche aus einer angelegten Bakterienkultur stammt.

Vorzugsweise wird die Probe vor Zugabe durch einen Grobfilter mit einer Porengröße von 0,5-10,0 μm filtriert, um etwaige Verunreinigungen durch Partikel ($> 0,5 \mu m$) zu entfernen, damit ein mögliches Verstopfen des Filters im nachfolgenden Schritt D) vermieden werden kann. Alternativ kann auch ein mehrstufiger Grobfilter mit abnehmenden Porengrößen von 0,5-10 μm verwendet werden. Das Volumen der Probe beträgt vorzugsweise 0,05-2,5 ml, weiter vorzugsweise 0,1-2,0 ml und am meisten bevorzugt 0,5-2,0 ml. Es sind auch Kombinationen der genannten Volumenbereiche möglich.

Die Probe wird in Schritt C) mit der Suspension vermischt. Das Mischen erfolgt vorzugsweise durch mehrmaliges Schwenken oder moderates Rühren. Das entstehende Reaktionsgemisch wird vorzugsweise 2-30 min, weiter vorzugsweise 5-15 min, noch weiter vorzugsweise 5-10 min inkubiert. Die Temperatur während der Inkubation beträgt vorzugsweise 4-60°C, weiter vorzugs-

weise 10-30°C. Eine Inkubation des Reaktionsgemisches bei Raumtemperatur (RT, 20-25°C) ist am meisten bevorzugt. Durch das Mischen und die Inkubation soll, bei Vorliegen mindestens einer zu nachzuweisenden Bakterienart, sichergestellt werden, dass jedes nachzuweisende Bakterium vor der nachfolgenden Filtration in Schritt D) von den markierten Testbakteriophagen der jeweiligen mindestens einen Spezies gebunden bzw. infiziert wird.

Der Filter für die Filtration des Reaktionsgemisches in Schritt D) weist eine Porengröße von 0,1-0,5 µm, vorzugsweise von 0,2-0,5 µm, weiter vorzugsweise von 0,3-0,5 µm und am meisten bevorzugt von 0,2-0,4 µm auf. Generell ist die Porengröße des verwendeten Filters so zu wählen, dass die mindestens eine nachzuweisende Bakterienart sowie Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe, welche aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies bestehen, zurückgehalten und auf der Filteroberfläche immobilisiert werden, während ungebundene Bakteriophagen den Filter passieren können. Dadurch wird eine Trennung von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen der nachzuweisenden Bakterienart und sonstigen eventuell vorliegenden Bakterien von ungebundenen Bakteriophagen erreicht. Die Porengröße des verwendeten Filters wird somit entsprechend der Größe und Morphologie der jeweiligen nachzuweisenden Bakterienart gewählt. Der Filter besteht vorzugsweise aus einer Membran, einer Folie oder einer Matrix, wie einem Kugelbett oder einer nano- oder mikrostrukturierten Oberfläche aus filamentärem oder tubulärem Material (z.B. Fiber/Hohlfiber).

Vorzugsweise besteht das Filtermaterial aus synthetischen oder natürlichen Polymeren, wie Polyvinylchlorid (PVC), Polyvinylidenfluorid (PVDF), Polypropylen (PP), Polyethersulfon (PES), Polyethylenglycol (PEG), Polyacrylamid (PAA), Polytetrafluorethylen (PTFE), Nylon, Polydimethylsiloxan (PDMS), Stärke, Zuckerverbindungen, Latex oder Silikon; Metall oder Metall-Legierungen, welche magnetisch, paramagnetisch, superparamagnetisch oder unmagnetisch sein können; Glas, wie Borosilikatglas; Cellulose, wie Methylcellulose oder regenerierter Cellulose oder anderen Kohlenstoffverbindungen, wie Aktivkohle.

[0011] Die Filtration erfolgt vorzugsweise gravimetrisch, durch Anlegen eines Vakuums oder durch Überdruck.

Die Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen auf der Filteroberfläche im Überstand in Schritt E) sowie die Detektion von ungebundenen Testbakteriophagen im Filtrat in Schritt F) basiert jeweils auf der Detektion der Markierung, mit welcher die Bakteriophagen versehen sind. Beispielsweise kann die Markierung aus einem Reportermolekül mit fluoreszenten Eigenschaften bestehen. Nach entsprechender Anregung des Reportermoleküls, kann das emittierte Fluoreszenzsignal dann über einen optischen Sensor detektiert werden.

Die erhaltenen Signale aus den Schritten E) und F), wie beispielsweise die jeweils detektierten Fluoreszenzsignale, werden in Schritt G) von einem Prozessor verarbeitet und die Ergebnisse der Detektion schließlich an einen Benutzer ausgegeben.

Die Ausgabe erfolgt vorzugsweise über ein mit dem Prozessor verbundenes optisches Display. Alternativ können die Detektionsergebnisse auch drahtlos per Funk von dem Prozessor an einen Tablet-Computer oder ein entferntes Computerterminal übertragen werden.

Bei Vorliegen mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart in der Probe binden die markierten Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies spezifisch an die mindestens eine nachzuweisende Bakterienart und bilden damit entsprechende Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe. Durch die Filtration werden diese Komplexe sowie sonstige Bakterien von ungebundenen Bakteriophagen abgetrennt. Somit können die auf der Filteroberfläche immobilisierten Komplexe anhand der Markierung der gebundenen Testbakteriophagen detektiert werden. Die überschüssigen ungebundenen Testbakteriophagen können den Filter passieren und anhand ihrer Markierung im Filtrat detektiert werden. Enthält die Probe keine nachzuweisende Bakterienart, so können sich keine Komplexe bilden und nur ungebundene Testbakteriophagen werden im Filtrat detektiert.

Die zusätzliche Detektion von ungebundenen Testbakteriophagen im Schritt F) reduziert das Risiko, ein falsch positives Signal bei Verstopfen des Filters zu erhalten. Enthält die Probe keine nachzuweisende Bakterienart und wird der Filter beispielsweise durch eine nicht nachzuweisende Bakterienart oder andere Partikel in der Reaktionslösung verstopft, so können die ungebundenen Testbakteriophagen den Filter nicht passieren und verbleiben im Überstand. Daraus resultiert eine Detektion im Überstand, obwohl keine spezifischen Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe gebildet werden können. Das Ergebnis ist ein falsch-positiver Nachweis der nachzuweisenden Bakterienart. Ist eine Detektion von ungebundenen Testbakteriophagen im Filtrat im Schritt F) also nicht möglich, so deutet dies auf ein Verstopfen des Filters hin. Folglich erhöht zusätzliche Detektion von ungebundenen Testbakteriophagen im Schritt F) die Verlässlichkeit des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens.

Alternativ kann eine fehlende Detektion von ungebundenen Testbakteriophagen im Filtrat im Schritt F) darauf zurückzuführen sein, dass sämtliche Testbakteriophagen an die mindestens eine nachzuweisende Bakterienart gebunden haben. Wenngleich diese Möglichkeit aufgrund des hohen Phagentiters unwahrscheinlich ist, umfasst die Suspension ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen disjunkte Markierung aufweist, um die Verlässlichkeit des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens weiter zu erhöhen. Durch die Markierung ist der Referenz-Bakteriophage ebenfalls detektierbar. Die Markierung des Referenz-Bakteriophagen ist dabei von den Markierungen

der Testbakteriophagen disjunkt, so dass der Referenz-Bakteriophage eindeutig und unabhängig von den jeweiligen Testbakteriophagen detektiert werden kann. Da der Referenz-Bakteriophage an keine nachzuweisende Bakterienart bindet, d.h. keine Komplexe mit Bakterien bildet, kann er nach der Filtration, im Idealfall, ausschließlich im Filtrat detektiert werden. Ist dagegen kein Referenz-Bakteriophage im Filtrat detektierbar, so deutet dies auf ein vollständiges Verstopfen des Filters hin.

Auch bei teilweisem oder vollständigem Verstopfen des Filters während der Durchführung des Verfahrens liefert die Verwendung eines Referenz-Bakteriophagen ein sehr verlässliches Nachweisergebnis. Hierfür wird der Quotient aus Gesamtsignalintensität des Referenz-Bakteriophagen im Überstand und Gesamtsignalintensität des Referenz-Bakteriophagen im Filtrat ermittelt und mit dem Quotienten aus Gesamtsignalintensität des mindestens einen Testbakteriophagen im Überstand und Gesamtsignalintensität des mindestens einen Testbakteriophagen im Filtrat miteinander verglichen. Ist der ermittelte Quotient für den mindestens einen Testbakteriophagen dabei deutlich höher als der ermittelte Quotient für den Referenz-Bakteriophagen, so liefert dies einen eindeutigen Nachweis des Vorliegens mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart in der verwendeten Probe. Finden sich dagegen Signale des mindestens einen Testbakteriophagen sowohl im Überstand als auch im Filtrat jedoch in vergleichbaren Quotienten wie für den Referenz-Bakteriophagen, so kann von einem unspezifischen Verstopfen des Filters, z.B. durch nicht nachzuweisende Bakterien, während der Durchführung des Verfahrens ausgegangen werden.

[0012] Alternativ zu einem markierten Referenz-Bakteriophagen werden markierte Mikro- oder Nanopartikel verwendet. Diese binden ebenfalls nicht an eine nachzuweisende Bakterienart und können den Filter aufgrund ihrer geringen Größe passieren.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass es nicht auf bestimmte nachzuweisende Bakterienarten beschränkt ist, sondern universell anwendbar ist. Einzige Voraussetzung ist das Vorhandensein eines komplementären Bakteriophagen zu einer nachzuweisenden Bakterienart. Gleich einem biologischen Prinzip, wonach in den zahlreichen Habitaten von Bakterienarten dort auch ihre komplementären Phagen vermutet werden, ist davon auszugehen, dass zu jeder Bakterienart mindestens ein Bakteriophage existiert, welche diese Bakterienart spezifisch infiziert.

Vorzugsweise werden die nachzuweisenden Bakterienarten jedoch ausgewählt aus der Gruppe umfassend *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (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*, *B-Streptokokken (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*, *Clamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Francisella tularensis*, *Gardenerella 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.* und *Legionella pneumophila*.

[0013] In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die Suspension vorzugsweise zwei oder mehrere Spezies von markierten Testbakteriophagen. Die Spezies binden jeweils spezifisch an unterschiedliche, nachzuweisende Bakterienarten, und die Markierungen der Spezies sind disjunkt. Dadurch wird ermöglicht, in einem Ansatz das Vorliegen zweier oder mehrerer Bakterienarten in einer Probe gleichzeitig nachzuweisen. Vorzugweise enthält die Suspension bis zu 6 verschiedene Spezies, weiter vorzugsweise bis zu 5 verschiedene Spezies, noch weiter vorzugsweise bis zu 4 verschiedene Spezies und am meisten bevorzugt bis zu 3 verschiedene Spezies von markierten Testbakteriophagen.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren parallel mit zwei oder mehreren Suspensionen durchgeführt, welche jeweils eine andere Spezies von markierten Testbakteriophagen umfassen, wobei die Markierungen der Spezies disjunkt sind. Die zu testende Probe wird dabei auf die zwei oder mehreren Suspensionen verteilt. Vorzugsweise erfolgt die Verteilung der zu testenden Probe über ein Mikrofluidik-System, so dass die Probe nicht einzeln zu den Suspensionen gegeben werden muss, sondern die Zugabe gleichzeitig durch Mikrofluidik-Kanäle des Mikrofluidik-Systems erfolgt. Vorzugsweise werden in dieser Ausführungsform 6 parallele Suspensionen, weiter vorzugsweise 5 parallele Suspensionen, noch weiter vorzugsweise 4 parallele Suspensionen und am meisten bevorzugt bis zu 3 parallele Suspensionen verwendet. Dadurch wird ebenfalls ermöglicht, das Vorliegen zweier oder mehrerer Bakterienarten in einer Probe gleichzeitig nachzuweisen.

In einer anderen Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner einen Schritt, welcher auf Schritt A) folgt, in

welchem die markierten Bakteriophagen in der Suspension vor Zugabe der Probe detektiert werden. Dieser Schritt dient der Erfassung der Gesamtheit der Signale, welche von den Markierungen der ungebundenen Bakteriophagen stammen, als Ausgangsreferenz. Handelt es sich bei der Markierung beispielsweise um ein Reportermolekül mit fluoreszenten Eigenschaften, so wird nach entsprechender Anregung die Gesamtfluoreszenz der ungebundenen Bakteriophagen als Ausgangsreferenz vor Zugabe der Probe detektiert.

Vorzugsweise umfasst das Verfahren weiterhin die Detektion der in Schritt C) entstandenen Reaktionslösung vor der Filtration.

Die Markierung der Bakteriophagen umfasst vorzugsweise mindestens ein Reportermolekül mit fluoreszenten oder chemilumineszenten Eigenschaften oder mindestens ein Reportermolekül, welches durch Interaktion mit einem sekundären Molekül Licht emittiert. Weiter bevorzugt ist mindestens ein Reportermolekül mit fluoreszenten oder chemilumineszenten Eigenschaften. Mindestens ein Reportermolekül mit fluoreszenten Eigenschaften ist besonders bevorzugt.

Zu den Reportermolekülen mit fluoreszenten Eigenschaften zählen

- organische Fluorophore, wie Xanthene, Rhodamine, Cumarine, AcridinDerivate, Fluorescein- und Alexa Fluor-Derivate, SYBR Green und SYBR Gold;
- anorganische Fluorophore und deren Composite, wie Quantenpunkte (quantum dots, QD);
- fluoreszierende magnetische Partikel; und
- fluoreszierende Proteine, wie das grün-fluoreszierende Protein (GFP), das gelb-fluoreszierende Protein (YFP) oder Derivate davon.

Zu den Reportermolekülen, welche durch Interaktion mit einem sekundären Molekülen Licht emittiert, zählen

- Enzyme, wie Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase, welche durch Umsatz entsprechender Markersubstrate Licht emittieren; und
- Biotin, das durch Bindung von Streptavidin als Interaktionspartner, welches wiederum eine fluoreszente oder chemilumineszente Markierung trägt, Licht emittiert.

Für die Markierung der Bakteriophagen sind organische Fluorophore am meisten bevorzugt.

Die Markierung der Bakteriophagen kann durch Kopplung mindestens eines Reportermoleküls an die DNA des Phagen, an Proteine im Capsid-Bereich (Kopfhüllenproteine) oder an Proteine im Schwanz-Bereich des Phagens (*tail fiber* Proteine) erfolgen. Dabei ist die Kopplung mindestens eines Reportermoleküls an Proteine im Cap-

sid-Bereich der Bakteriophagen bevorzugt.

Vorzugsweise erfolgt die Kopplung durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem mindestens einen Reportermolekül und dem Bakteriophagen. Hierzu werden verwendet

- 5 • Aktivester, wie N-Hydroxysuccinimidester (NHS-ester) oder Sulfotetrafluorophenylester (STFP-ester), des mindestens einen Reportermoleküls zur Kopplung an Aminogruppen;
- 10 • Isothiocyanate des mindestens einen Reportermoleküls zur Kopplung an Aminogruppen;
- 15 • Maleimide des mindestens einen Reportermoleküls zur Kopplung an Thiolgruppen;
- 20 • Azide des mindestens einen Reportermoleküls zur Kopplung über eine zweistufige Azid-Alkin-Cycloaditionsreaktion an Alkine; und
- Photoreaktive Gruppen in dem mindestens einem Reportermolekül zur unspezifischen Kopplung.

25 Exemplarisch seien 5(6)-Carboxyfluorescein-NHS-ester als Beispiel eines Aktivesters, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Beispiel eines Isothiocyanats, Alexa Fluor 488-maleimid als Beispiel eines Maleimids, 5-Azidotetramethylrhodamin (5-TAMRA-azid) als Beispiel eines Azids und Photobiotin als Beispiel einer photoreaktiven Gruppe genannt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die Markierung der Bakteriophagen jeweils aus mindestens einem fluoreszenten Reportermolekül. Die Anregung erfolgt jeweils durch eine Beleuchtungseinheit, welche vorzugsweise ein Laser oder eine Licht-emittierende Diode (LED) ist. Ferner erfolgt die Anregung im Wellenlängenbereich von 200-1000 nm, weiter vorzugsweise im Wellenlängenbereich von 350-700 nm. Die Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen auf der Filteroberfläche im Überstand sowie die Detektion von ungebundenen Bakteriophagen im Filtrat erfolgt jeweils durch Messung der Fluoreszenz. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt vorzugsweise fluoreszenzmikroskopisch und/oder mit Hilfe eines optischen Sensors. Der optische Sensor wird weiter vorzugsweise ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus einem Photomultiplier (PMT), einem CCD-Sensor (*charge coupled device*) und einem CMOS-Sensor (*complementary metal-oxide-semiconductor*).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion jeweils durch zeitaufgelöste Messung der Lichtemission, d.h. das jeweils von Reportermolekülen emittierte Licht wird über einen bestimmten Zeitraum kontinuierlich detektiert. Handelt es sich bei der Markierung der Bakteriophagen jeweils um mindestens ein fluoreszentes Reportermolekül, so erfolgt die Anregung und Detektion wie in der vorhergehenden Ausführungs-

form beschrieben, mit der Maßgabe, dass die Fluoreszenz zeitaufgelöst gemessen wird.

Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von Bakterien ferner den Schritt einer Vortrennung von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen und ungebundenen Bakteriophagen, wobei sich die Vortrennung an Schritt C) anschließt. Dabei erfolgt die Vortrennung des Reaktionsgemisches nach dem Prinzip der Gelfiltration (Gelpermeationschromatographie bzw. Größenausschlussvolumen-Chromatographie) durch eine Gelmatrix. Dies bedeutet, dass Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe und ungebundene Bakteriophagen aufgrund ihres Größenunterschiedes separiert werden, wobei die größeren Komplexe die Gelmatrix vor den kleineren ungebundenen Bakteriophagen verlassen. Die Gelmatrix besteht vorzugsweise aus synthetischen oder natürlichen Polymeren, wie Polyvinylchlorid (PVC), Polyvinylidenfluorid (PVDF), Polypropylen (PP), Polyethersulfon (PES), Polyethylenglycol (PEG), Polyacrylamid (PAA), Polytetrafluorethylen (PTFE), Nylon, Polydimethylsiloxan (PDMS), Stärke, Zuckerverbindungen, Latex oder Silikon; Metall oder Metall-Legierungen, welche magnetisch, paramagnetisch, superparamagnetisch oder unmagnetisch sein können; Glas, wie Borosilikatglas; Cellulose, wie Methylcellulose oder regenerierter Cellulose oder anderen Kohlenstoffverbindungen.

Die Gelmatrix weist vorzugsweise eine Porengröße von 0,01-5 µm auf. Die Wahl des Materials sowie der Porengröße der Gelmatrix hängt dabei von der Größe und Morphologie der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart ab, so dass jeweils eine optimale Vortrennung der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe von ungebundenen Bakteriophagen erzielt wird.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren ferner den Schritt einer Konzentrierung der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe und der ungebundenen Bakteriophagen vor der Filtration in Schritt D).

Die Konzentrierung kann mechanisch oder elektromagnetisch erfolgen.

Weiter vorzugsweise sind die Testbakteriophagen der mindestens einen Spezies sowie der Referenzphage mit magnetischen Beads beschichtet. In diesem Fall kann die Konzentrierung elektromagnetisch durch Anlegen eines externen Magnetfeldes erfolgen, beispielsweise durch Bereitstellen eines Elektromagneten.

Die optionalen Schritte der Vortrennung und der Konzentrierung können jeweils einzeln oder auch in Kombination in dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt werden.

[0014] In einem weiteren Aspekt beschreibt die vorliegende Erfindung ein Reaktionsgefäß zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweises von Bakterien.

[0015] Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Reaktionsgefäß eine Länge von 5-20 mm, eine Breite von 5-20 mm und eine Höhe von 50-100 mm auf.

Das erfindungsgemäße Reaktionsgefäß umfasst mindestens zwei Kompartimente, welche durch einen Filter

voneinander getrennt sind. Der Filter weist eine Porengröße von 0,1 µm bis 0,5 µm, vorzugsweise von 0,2-0,5 µm, weiter vorzugsweise von 0,3-0,5 µm und am meisten bevorzugt von 0,2-0,4 µm auf. Wie zuvor für das Verfahren beschrieben, wird die Porengröße des verwendeten Filters entsprechend der Größe und Morphologie der jeweiligen nachzuweisenden Bakterienart gewählt, um eine effiziente Trennung von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen und sonstigen eventuell vorliegenden Bakterien von ungebundenen Bakteriophagen zu erreichen. Der Filter besteht vorzugsweise aus einer Membran, einer Folie oder einer Matrix, wie einem Kugelbett oder einer nano- oder mikrostrukturierten Oberfläche aus filamentärem oder tubulärem Material (z.B. Fiber/Hohlfiber).

Vorzugsweise besteht das Filtermaterial aus synthetischen oder natürlichen Polymeren, wie Polyvinylchlorid (PVC), Polyvinylidenfluorid (PVDF), Polypropylen (PP), Polyethersulfon (PES), Polyethylenglycol (PEG), Polyacrylamid (PAA), Polytetrafluorethylen (PTFE), Nylon, Polydimethylsiloxan (PDMS), Stärke, Zuckerverbindungen, Latex oder Silikon; Metall oder Metall-Legierungen, welche magnetisch, paramagnetisch, superparamagnetisch oder unmagnetisch sein können; Glas, wie Borosilikatglas; Cellulose, wie Methylcellulose oder regenerierter Cellulose oder anderen Kohlenstoffverbindungen, wie Aktivkohle.

Ein Kompartiment des Reaktionsgefäßes ist ein Phagenreservoir, welches eine Suspension enthält, die mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen umfasst, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen kennzeichnend ist. Die Konzentration der Bakteriophagen in der Suspension, das Volumen der Suspension sowie die weiteren Spezifikationen der Suspension entsprechen den Angaben wie für das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben.

Ebenso gelten die Angaben des Verfahrens bezüglich der markierten Testbakteriophagen und deren Markierung entsprechend für das erfindungsgemäße Reaktionsgefäß.

Die Suspension im Phagenreservoir umfasst ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen disjunkte Markierung aufweist. Die vorteilhaften Wirkungen dieser Ausführungsform sind im Detail für das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes ist das Phagenreservoir durch eindrückbare Membranen geschlossen, so dass die Suspension nicht in direktem Kontakt mit dem Filter steht. Erst durch Eindrücken der eindrückbaren Membranen bei der Zugabe einer Probe, die auf das Vorliegen mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart getestet werden soll, fließt die entstehende Reaktionslösung auf den Filter.

Ein Kompartiment des erfindungsgemäßen Reaktions-

gefäßes ist ein Auffangreservoir, welches für die Aufnahme des Filtrats der Reaktionslösung nach Zugabe einer Probe zu der Suspension und anschließender Filtration vorgesehen ist.

Weiterhin umfasst das Reaktionsgefäß ein Mittel zu dessen Identifikation.

Vorzugsweise handelt es sich dabei um einen RFID-Chip (*radio-frequency identification*) oder um einen Barcode. Weiter vorzugsweise enthalten der RFID-Chip (*radio-frequency identification*) oder der Barcode Daten hinsichtlich der Seriennummer, des Produktionsdatums, des Ablaufdatums, des Phagentiters in der Suspension und/oder der nachzuweisenden Bakterienart(en) bzw. der nachzuweisenden Stämme. Das Mittel zur Identifikation ermöglicht eine einfache und eindeutige Identifizierung des Reaktionsgefäßes, wodurch die Gefahr von Verwechslungen von Reaktionsgefäßen minimiert und somit die Verlässlichkeit eines damit durchgeführten Nachweisverfahrens erhöht wird.

Weiterhin umfasst das erfindungsgemäße Reaktionsgefäß mindestens zwei Messfenster, wobei ein Messfenster im Bereich der Filteroberfläche, welche dem Phagenreservoir zugewandt ist, angeordnet ist, und ein Messfenster im Bereich des Auffangreservoirs angeordnet ist. Dadurch wird die Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen auf der Filteroberfläche im Überstand und die Detektion von ungebundenen Bakteriophagen im Filtrat bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens unter Verwendung des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes ermöglicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Reaktionsgefäß ein weiteres Kompartiment zwischen Phagenresevoir und Filter, welches mindestens einen Vorfilter enthält. Der mindestens eine Vorfilter ermöglicht eine Vortrennung von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen und ungebundenen Bakteriophagen aus dem Reaktionsgemisch vor der Filtration.

[0016] Weiter vorzugsweise handelt es sich bei dem Vorfilter um eine Gelmatrix, welche das Reaktionsgemisch nach dem Prinzip der Gelfiltration vortrennt. Die Gelmatrix besteht vorzugsweise aus synthetischen oder natürlichen Polymeren, wie Polyvinylchlorid (PVC), Polyvinylidenfluorid (PVDF), Polypropylen (PP), Polyethersulfon (PES), Polyethylenglycol (PEG), Polyacrylamid (PAA), Polytetrafluorethylen (PTFE), Nylon, Polydimethylsiloxan (PDMS), Stärke, Zuckerverbindungen, Latex oder Silikon; Metall oder Metall-Legierungen, welche magnetisch, paramagnetisch, superparamagnetisch oder unmagnetisch sein können; Glas, wie Borosilikatglas; Cellulose, wie Methylcellulose oder regenerierter Cellulose oder anderen Kohlenstoffverbindungen. Ferner weist die Gelmatrix vorzugsweise eine Porengröße von 0,01-5 µm auf. Die Wahl des Materials sowie der Porengröße der Gelmatrix hängt dabei von der Größe und Morphologie der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart ab, so dass jeweils eine optimale Vortrennung der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe von ungebundenen Bakteriophagen erzielt wird.

In dieser Ausführungsform umfasst das Reaktionsgefäß weiterhin ein Messfenster, das unmittelbar unterhalb des Kompartiments, welches mindestens einen Vorfilter enthält, angeordnet ist.

5 Vorzugsweise verengt sich das Reaktionsgefäß vom Phagenreservoir zum Filter hin, so dass eine Konzentrierung der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe und der ungebundenen Bakteriophagen vor der Filtration ermöglicht wird.

10 Darüber hinaus wird das Reaktionsgefäß vorzugsweise im Bereich des Phagenreservoirs durch ein Septum verschlossen.

Das Reaktionsgefäß umfasst vorzugsweise ein weiteres Messfenster, welches im Bereich des Phagenreservoirs angeordnet ist. Dies ermöglicht die Detektion der Gesamtheit der Signale, welche von den Markierungen der ungebundenen Bakteriophagen stammen, als Ausgangsreferenz. Handelt es sich bei der Markierung beispielsweise um ein Reportermolekül mit fluoreszenten Eigenschaften, so kann nach entsprechender Anregung die Gesamtfluoreszenz der ungebundenen Bakteriophagen als Ausgangsreferenz vor Zugabe der Probe detektiert werden.

Vorzugsweise umfasst das Reaktionsgefäß ein weiteres 25 Kompartiment, welches als Abfallreservoir bezeichnet wird und sich an das Auffangreservoir anschließt. Weiter vorzugsweise ist dieses Kompartiment durch einen Endfilter mit einer Porengröße von $\leq 0,05 \mu\text{m}$ von dem Auffangreservoir getrennt. Durch den Endfilter werden sämtliche Bakteriophagen entfernt, so dass das verbleibende Filtrat kostengünstig und gefahrlos entsorgt werden kann. Alternativ enthält das Abfallreservoir ein Absorptionsmittel, welches das Filtrat aus dem Auffangreservoir absorbiert.

30 In einer alternativen Ausführungsform umfasst das Reaktionsgefäß ein weiteres Kompartiment zwischen Filter und Phagenreservoir, welches vorzugsweise von anderen Kompartimenten durch ein Septum getrennt ist. Dieses Kompartiment enthält eine Indikatorlösung mit markierten Mikro- oder Nanopartikeln, welche nicht an eine nachzuweisende Bakterienart binden und den Filter aufgrund ihrer geringen Größe passieren können. Daher kann die Indikatorlösung mit den markierten Mikro- oder Nanopartikeln als Alternative zu einem Referenz-Bakteriophagen verwendet werden und mittels Durchstechen der Membran zugeben werden.

Die verschiedenen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes schließen sich gegenseitig nicht aus und können daher einzeln oder in Kombination verwirklicht werden.

45 **[0017]** In einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine Kartusche, welche zwei oder mehrere erfindungsgemäße Reaktionsgefäße umfasst, die parallel zueinander angeordnet sind, wobei jedes Reaktionsgefäß eine unterschiedliche Spezies von markierten Testbakteriophagen in der Suspension in den Phagenreservoirs enthält, welche jeweils spezifisch an unterschiedliche nachzuweisende Bakterienarten binden,

wobei die Markierungen der Spezies disjunkt sind. Dadurch wird ermöglicht, das Vorliegen zweier oder mehrerer Bakterienarten in einer Probe gleichzeitig nachzuweisen.

Vorzugsweise umfasst die Kartusche bis zu 6 parallel angeordnete Reaktionsgefäße, weiter vorzugsweise bis zu 5 parallel angeordnete Reaktionsgefäße, noch weiter vorzugsweise bis zu 4 parallel angeordnete Reaktionsgefäße und am meisten bevorzugt bis zu 3 parallel angeordneten Reaktionsgefäße.

Darüber hinaus umfasst die Kartusche vorzugsweise ein Mikrofluidik-System, in welches die zu testende Probe injiziert wird und welches die Probe über Mikrofluidik-Kanäle jeweils zu den Phagenreservoirs der parallel angeordneten Reaktionsgefäße leitet, so dass die Probe nicht einzeln zu den Suspensionen gegeben werden muss.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines Messgeräts zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Bakterien.

Das Messgerät umfasst einen Schacht, in den ein erfindungsgemäßes Reaktionsgefäß oder eine erfindungsgemäße Kartusche eingeschoben wird.

Ferner umfasst das Messgerät mindestens zwei Detektions-Optiken, welche jeweils im Bereich der Messfenster des eingeschobenen Reaktionsgefäßes oder der Kartusche angeordnet sind und einen Prozessor.

Umfasst das Messgerät einen Schacht für ein Reaktionsgefäß, so kann es je nach Ausführungsform des Reaktionsgefäßes, d.h. entsprechend der Anzahl der Messfenster, drei oder vier Detektions-Optiken beinhalten.

Umfasst das Messgerät dagegen einen Schacht für eine Kartusche, so hängt die Anzahl der Detektions-Optiken von der Anzahl der in Kartusche parallel angeordneten Reaktionsgefäße ab, wobei das Messgerät pro parallel angeordnetem Reaktionsgefäß bis zu vier Detektions-Optiken beinhalten kann.

Die Detektions-Optiken umfassen jeweils ein Linsensystem zur Fokussierung von emittiertem Licht der Markierung der Bakteriophagen auf mindestens einen optischen Sensor, wobei der mindestens eine optische Sensor das emittierte Licht detektiert.

Vorzugsweise wird der optische Sensor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Photomultiplier (PMT), einem CCD-Sensor (*charge coupled device*) und einem CMOS-Sensor (*complementary metal-oxide-semiconductor*).

Darüber hinaus umfassen die Detektions-Optiken vorzugsweise jeweils eine Beleuchtungseinheit, welche Licht im Wellenlängenbereich von 200-1000 nm emittiert und ein Linsensystem zur Fokussierung des von der Beleuchtungseinheit emittierten Lichts auf einen Messbereich. Die Beleuchtungseinheit ist dabei ebenfalls mit dem Prozessor verbunden und wird von diesem gesteuert.

Die Beleuchtungseinheit emittiert vorzugsweise Licht im Wellenlängenbereich von 350-700 nm. Weiter vorzugs-

weise ist die Beleuchtungseinheit ein Laser oder eine Licht-emittierende Diode (LED).

Der Prozessor ist jeweils mit dem mindestens einen optischen Sensor der Detektionsoptiken verbunden und verarbeitet die erhaltenen Detektionssignale.

Darüber hinaus umfasst das Messgerät eine mit dem Prozessor verbundene Ausgabereinheit, welche die Detektionsergebnissen an einen Benutzer ausgibt.

Die Ausgabereinheit umfasst vorzugsweise ein optisches Display.

[0019] Weiter vorzugsweise umfasst die Ausgabereinheit eine Funkschnittstelle, wodurch die Detektionsergebnisse drahtlos per Funk von dem Prozessor an einen Tablet-Computer oder ein entferntes Computerterminal übertragen werden können.

Vorzugsweise umfasst das Messgerät ferner ein integriertes Lesegerät, welches das Mittel zur Identifikation des Reaktionsgefäßes erfasst und die erfassten Daten an den Prozessor weiterleitet, wobei der Prozessor die erfassten Daten verarbeitet und die Ergebnisse der Identifikation über die Ausgabereinheit an einen Benutzer ausgegeben werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Messgerät ferner einen selektiv zu und abschaltbaren Elektromagneten, wie beispielsweise eine Ringspule. Dieser ist weiter vorzugsweise im Bereich der Filteroberfläche des in den Schacht eingeschobenen Reaktionsgefäßes angeordnet, welche dem Phagenreservoir zugewandt ist.

[0020] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung unter Bezugnahme auf die Figuren im Detail dargestellt und verschiedene Ausführungsformen weiter erläutert.

Figur 1 zeigt eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Dabei wird eine Probe (3), welche auf das Vorliegen einer nachzuweisenden Bakterienart getestet werden soll, in eine Suspension (1), welche in einem eindrückbaren Phagenreservoir (8) bereitgestellt ist, injiziert. Die Probe (3) kann dabei weitere, nicht nachzuweisende Bakterienarten enthalten. Die Suspension (1) enthält in dieser Ausführungsform eine Spezies von markierten Testbakteriophagen (2), welche spezifisch an die nachzuweisende Bakterienart bindet. Bei der Markierung handelt es sich um einen Reportermolekül mit fluoreszenten Eigenschaften. Nach Mischen der Probe (3)

mit der Suspension (1) und Inkubation des Reaktionsgemisches fließt dieses auf den Filter (4) mit einer Porengröße zwischen 0,1 μm und 0,5 μm und wird gravimetrisch filtriert. Dadurch werden die entstandenen Bakterien-Bakteriophage-Komplexe (5) sowie weitere, nicht nachzuweisende Bakterienarten auf der Filteroberfläche im Überstand immobilisiert, während die verbliebenen ungebundenen Testbakteriophagen (2) die Poren des Filters (4) passieren und als Filtrat in einem Auffangreservoir (9) gesammelt werden. Die Detektion der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe (5) auf der Filteroberfläche sowie der ungebundenen Testbakteriophagen (2) im Filtrat erfolgt durch spezifische Anregung der verwendeten fluoreszenten Reportermoleküle und durch Messung

der

der resultierenden Fluoreszenz. In der Regel erfolgt die Anregung in dem Wellenlängenbereich, in welchem das Absorptionsmaximum des jeweiligen fluoreszenten Reporter-moleküls liegt. In dieser Ausführungsform enthält die Suspension (1) ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen (6), welcher nicht an die nachzuweisende Bakterienart bindet, dadurch die Poren des Filters (4) passiert und ebenfalls als Filtrat in dem Auffangreservoir (9) aufgefangen wird. Die Markierung des Referenz-Bakteriophagen (6) besteht dabei ebenfalls aus einem Reporter-molekül mit fluoreszenten Eigenschaften, wobei die Reporter-moleküle der Test- (2) und des Referenz-bakteriophagen (6) disjunkt sind. Dies bedeutet, dass die jeweiligen fluoreszenten Reporter-moleküle derart ausgewählt werden, dass sie Licht bei gleichen oder unterschiedlichen Anregungswellenlängen absorbieren können, jedoch Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. Dadurch können die emittierten Fluoreszenzsignale der jeweiligen Reporter-moleküle und damit der jeweiligen Bakteriophagen eindeutig unterschieden werden. Die Detektion des Referenz-Bakteriophagen (6) erfolgt dementsprechend ebenfalls durch spezifische Anregung seiner fluoreszenten Reporter-moleküle und durch Messung der resultierenden Fluoreszenz. Die erhaltenen Fluoreszenzsignale aus dem Überstand und dem Filtrat werden anschließend von einem Prozessor verarbeitet und die Ergebnisse der Detektion an einen Benutzer ausgegeben. Die Ausgabe kann über ein, mit dem Prozessor verbundenes optisches Display oder drahtlos per Funk an einen Tablet-Computer oder ein entferntes Computerterminal erfolgen. Anhand der Bildung der Quotienten aus Gesamtintensität der gemessenen Fluoreszenz im Überstand und Gesamtintensität der gemessenen Fluoreszenz im Filtrat für den Test- (2) und für den Referenz-Bakteriophagen (6) und Vergleich dieser lässt sich ein verlässliches Ergebnis des Nachweisverfahrens erzielen. Ist der ermittelte Quotient für den Testbakteriophagen (2) dabei deutlich höher als der ermittelte Quotient für den Referenz-Bakteriophagen (6), so liefert dies einen eindeutigen Nachweis des Vorliegens der nachzuweisenden Bakterienart in der verwendeten Probe. Finden sich dagegen Fluoreszenzsignale des Testbakteriophagen (2) sowohl im Überstand als auch im Filtrat, jedoch im vergleichbaren Verhältnis wie für den Referenz-Bakteriophagen (6), so kann von einem unspezifischen Verstopfen des Filters (4), z.B. durch nicht nachzuweisende Bakterien, während der Durchführung des Verfahrens ausgegangen werden.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Figur 2 dargestellt. Hierbei werden die einzelnen Verfahrensschritte wie in der zuvor beschriebenen Ausführungsform in Figur 1 durchgeführt, allerdings parallel mit drei verschiedenen Suspensionen (1). Diese enthalten jeweils eine andere Spezies von markierten Testbakteriophagen (2), welche jeweils spezifisch eine unterschiedliche nachzuweisende Bakterienart bindet, sowie einen Referenz-Bakteriophagen (6). Bei den Markierungen handelt es sich jeweils um fluoreszen-

te Reporter-moleküle, welche jeweils disjunkt sind. Die zu testende Probe (3) wird in dieser bevorzugten Ausführungsform durch Mikrofluidik-Kanäle (25) eines Mikrofluidik-Systems (24) auf die drei Suspensionen (1) verteilt, so dass die Zugabe gleichzeitig erfolgt. Aufgrund der disjunkten Markierungen ist folglich ein jeweils spezifischer Nachweis von drei nachzuweisenden Bakterienarten in einer Probe (3) gleichzeitig möglich.

In Figur 3A ist eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes (7) dargestellt. Dieses umfasst zunächst vier Kompartimente (a)-(d). Kompartiment (a) ist ein Phagenreservoir (8), welches eine Suspension (1) enthält, die mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen umfasst, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen kennzeichnend ist. Ferner kann die Suspension (1) im Phagenreservoir (8) einen markierten Referenz-Bakteriophagen, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen disjunkte Markierung aufweist, enthalten. Das Phagenreservoir (8) ist dabei durch ein Septum (23) verschlossen. Kompartiment (b) enthält eine Gelmatrix (24) mit einer Porengröße von 0,01-5 µm als Vorfilter, welche eine Vortrennung des Reaktionsgemisches nach dem Prinzip der Gelfiltration ermöglicht. Dabei werden Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe und nicht nachzuweisende Bakterien von ungebundenen Bakteriophagen aufgrund ihres Größenunterschiedes separiert, wobei die größeren Komplexe die Gelmatrix (24) vor den kleineren, ungebundenen Bakteriophagen verlassen. Kompartiment (c) ist ein Auffangreservoir (9), welches für die Aufnahme des Filtrats der Reaktionslösung nach Zugabe einer Probe zu der Suspension (1) und anschließender Filtration vorgesehen ist. Kompartiment (d) stellt ein Abfallreservoir (25) dar, das ein Absorptionsmittel (26) enthält, welches das Filtrat aus dem Auffangreservoir (9) absorbiert. Die Kompartimente (a) und (b) sind durch einen Filter (4) mit einer Porengröße von 0,1 µm bis 0,5 µm von den Kompartimenten (c) und (d) getrennt. In der dargestellten Ausführungsform verfügt das Reaktionsgefäß weiterhin über einen RFID-Chip (10) zur Identifikation sowie über ein zusätzliches, durch ein Septum (27) von den anderen Kompartimenten getrenntes Kompartiment, welches eine Indikatorlösung (28) mit markierten Mikro- oder Nanopartikeln enthält. Diese binden nicht an eine nachzuweisende Bakterienart und passieren den Filter (4) aufgrund ihrer geringen Größe. Daher kann die Indikatorlösung (28) mit den markierten Mikro- oder Nanopartikeln als Alternative zu einem Referenz-Bakteriophagen verwendet werden und mittels Durchstechen der Membran (27) zu der Reaktionslösung geben werden. Das Reaktionsgefäß verengt sich in dieser Ausführungsform zum Filter (4) hin, so dass eine Konzentrierung der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe und der ungebundenen Bakteriophagen vor der Filtration ermöglicht wird. Weiterhin umfasst das dargestellte Reaktionsgefäß (7) insgesamt vier Messfenster (11-14). Dabei ist ein Mess-

fenster (11) im Bereich der Filteroberfläche, welche dem Phagenreservoir zugewandt ist, angeordnet. Ein weiteres Messfenster (12) ist im Bereich des Auffangreservoirs angeordnet. Dadurch wird die Detektion von auf der Filteroberfläche im Überstand immobilisierten Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen und von ungebundenen Bakteriophagen im Filtrat ermöglicht. Ein weiteres Messfenster (13) ist im Bereich des Phagenreservoirs angeordnet, so dass die Gesamtheit der Signale, welche von den Markierungen der Bakteriophagen stammen, als Ausgangsreferenz vor Zugabe einer zu testenden Probe detektiert werden kann. Darüber hinaus ist ein viertes Messfenster (14) unterhalb der Gelmatrix angeordnet zur Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen und ungebundenen Bakteriophagen im Reaktionsgemisch bei Austritt aus der Gelmatrix (24) vor der Filtration. In der gezeigten Ausführungsform weist das Reaktionsgefäß (7) ferner im Bereich des Abfallreservoirs (25) einen integrierten Belüftungsmechanismus (29) bestehend aus Belüftungsnadel (30) und Septum (31) auf. Bei Durchstechen des Septums (31) wird das Reaktionsgefäß belüftet, wodurch die gravimetrische Filtration gestartet wird.

Figur 3B zeigt den theoretischen Verlauf einer zeitaufgelösten Messung der Fluoreszenz in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes (7) aus Figur 3A. Hierbei wird eine Probe, die auf das Vorliegen einer nachzuweisenden Bakterienart getestet wird, durch das Septum (23) in die Suspension (1) im Phagenreservoir (8) injiziert, durch mehrfaches (3-5x) Schwenken mit der Suspension (1) vermischt und 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die mindestens eine Spezies von Testbakteriophagen in der Suspension (1) weist dabei fluoreszente Reportermoleküle als Markierung auf. Mit dem Durchstechen des Septums (31) im integrierten Belüftungsmechanismus (29) wird gleichzeitig eine zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität an den vier Messfenstern (11-14) des Reaktionsgefäßes (7) gestartet. Infolge der Belüftung werden die Kompartimente (b) und (c) nacheinander vom Reaktionsgemisch durchströmt, wodurch die Fluoreszenz an Messfenster 13 in Kompartiment (a) im zeitlichen Verlauf immer weiter abnimmt, bis diese nicht mehr detektierbar ist. In der Gelmatrix (24) in Kompartiment (b) werden ungebundene Phagen von größeren Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen aufgrund ihres Größenunterschiedes separiert. Die größeren Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe verlassen die Gelmatrix (24) vor den kleineren ungebundenen Bakteriophagen, wodurch die Fluoreszenz an Messfenster (14) zunächst zunimmt bis alle Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe diesen Messbereich passiert haben. Danach nimmt die Fluoreszenz wieder etwas ab, bis schließlich die ungebundenen Bakteriophagen die Gelmatrix verlassen, was durch einen erneuten Anstieg der Fluoreszenz an Messfenster (14) gekennzeichnet ist. Auf dem Filter (4) werden die Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe immobilisiert, so dass

deren Fluoreszenzsignal an Messfenster (11) zunimmt, bis alle Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe bzw. nicht nachzuweisenden Bakterienarten auf dem Filter (4) immobilisiert sind. Ungebundene Bakteriophagen passieren den Filter (4) und treten als ansteigendes Fluoreszenzsignal in Messfenster (12) im Auffangreservoir (9) in Erscheinung. Überschüssiges Reaktionsgemisch, das das Reaktionsgefäß vollständig durchlaufen hat, wird in Kompartiment (d) gesammelt und durch ein Absorptionsmittel (26) gebunden.

Eine schematische Darstellung des Aufbaus von erfindungsgemäßem Reaktionsgefäß (7) und Messgerät (15) in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist in Figur 4 dargestellt. Das gezeigte Reaktionsgefäß (7) enthält ein Phagenreservoir (8) mit eindrückbaren Membranen, welches wiederum eine Suspension (1) enthält, die mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen (2) umfasst, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen (2) kennzeichnend ist. Ferner kann die Suspension (1) im eindrückbaren Phagenreservoir (8) einen markierten Referenz-Bakteriophagen (6) enthalten, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen (2) disjunkte Markierung aufweist, enthalten. Das Reaktionsgefäß (7) ist im oberen Bereich mit einem Septum (23) verschlossen, an das sich ein Grobfilter (32) mit einer Porengröße von 0,5-10,0 μm anschließt, um größere Schwebteile und etwaige Verunreinigungen zu entfernen. Dabei kann auch ein mehrstufiger Grobfilter (32) mit abnehmenden Porengrößen von 0,5-10 μm verwendet werden. Durch Injektion einer zu testenden Probe (3) in die Suspension (1) im Phagenreservoir (8) werden die Membranen des Phagenreservoirs (8) eingedrückt, so dass die entstehende Reaktionslösung beginnt, aufgrund der Gravitation in Richtung des Filters (4) zu fließen, welcher eine Porengröße von 0,2 μm aufweist. In der gezeigten Ausführungsform verengt sich das Reaktionsgefäß (7) nach unten hin, so dass eine Konzentrierung der Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe (5) und der ungebundenen Bakteriophagen (2, 6) vor der Filtration ermöglicht wird. Zusätzlich erfolgt eine Konzentrierung elektromagnetisch durch selektives Zu- und Abschalten eines homogenen Magnetfeldes. Hierfür umfasst das Messgerät (15) eine Ringspule (33) als Elektromagneten, welche im Bereich der Filteroberfläche des Filters (4) angeordnet ist. Darüber hinaus sind die Testbakteriophagen (2) der mindestens einen Spezies sowie der optionale Referenzphage (6) mit magnetischen Beads beschichtet. An den Filter 4 schließt sich ein Auffangreservoir (9) zur Aufnahme des Filtrats nach erfolgter Filtration an. An das Auffangreservoir (9) schließt sich wiederum ein weiteres Kompartiment an, welches als Abfallreservoir (25) bezeichnet wird und durch einen Endfilter (34) mit einer Porengröße von $\leq 0,05 \mu\text{m}$ von dem Auffangreservoir (9) getrennt ist. Durch den Endfilter (34) werden sämtliche Bakteriophagen entfernt, so dass das verbleibende Filtrat kostengünstig und

gefahrlos entsorgt werden kann. In dieser Ausführungsform besteht die Markierung der Bakteriophagen (2, 6) ebenfalls aus mindestens einem Reportermolekül mit fluoreszenten Eigenschaften. Dementsprechend umfasst das Messgerät (15) neben einem Schacht, in den das Reaktionsgefäß (7) eingeschoben wird, zwei Detektions-Optiken (16), welche jeweils im Bereich der Messfenster (11, 12) des eingeschobenen Reaktionsgefäßes (7) angeordnet sind. In der vorliegenden Ausführungsform bedeutet dies, dass eine Detektions-Optik (16) im Messbereich an der Filteroberfläche des Filters (4) zur Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen (5) angeordnet ist, während die zweite Detektions-Optik (16) im Messbereich an der Filteroberfläche des Endfilters (34) zur Detektion von ungebundenen Bakteriophagen (2, 6) angeordnet ist. Die Detektions-Optiken (16) enthalten jeweils eine LED (19) als Beleuchtungseinheit, welche Licht im Wellenlängenbereich von 200-1000 nm, vorzugsweise 350-700 nm, emittiert, je nach den Absorptionseigenschaften der verwendeten fluoreszenten Reportermoleküle. Dabei soll möglichst eine maximale Absorption erzielt werden, um ein entsprechend starkes Fluoreszenzsignal zu generieren. Ferner enthalten die Detektions-Optiken (16) jeweils ein Linsensystem (20) zur Fokussierung des von der LED emittierten Lichts auf die oben beschriebenen Messbereiche und jeweils ein weiteres Linsensystem (17) zur Fokussierung des emittierten Lichts der fluoreszenten Reportermoleküle auf mindestens einen optischen Sensor (18), wie z.B. einem Photomultiplier, einem CCD-Sensor oder einem CMOS-Sensor. Die optischen Sensoren (18) der beiden Detektions-Optiken (16) detektieren dabei jeweils das einfallende Licht und leiten die erhaltenen Detektionssignale an einen Prozessor weiter, welcher jeweils mit diesen verbunden ist. Der Prozessor verarbeitet schließlich die erhaltenen Detektionssignale und leitet die Detektionsergebnisse an ein mit dem Prozessor verbundenes Display weiter, welche diese optisch an einen Benutzer ausgibt (nicht gezeigt). Darüber hinaus kann eine oder können beide Detektionsoptiken (16) einen Strahlenteiler (35) zur spektralen Trennung mehrerer Farbkanäle enthalten.

In Figur 5 ist ein RFID Chip als eine Ausführungsform des Mittels zur Identifizierung des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes dargestellt, welcher unter anderem Daten hinsichtlich der Seriennummer, des Produktionsdatums, des Ablaufdatums, des Phagentiters in der Suspension und/oder der nachzuweisenden Bakterienart(en) bzw. der nachzuweisenden Stämme enthält. Das RFID Chip ermöglicht eine einfache und eindeutige Identifizierung des Reaktionsgefäßes, wodurch die Gefahr von Verwechslungen von Reaktionsgefäßen minimiert und somit die Verlässlichkeit eines damit durchgeführten Nachweisverfahrens erhöht wird.

Experimenteller Teil

1. Isolierung von Bakteriophagen

[0021] Da Bakteriophagen keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, können sie nur auf einem geeigneten Wirtsbakterium angezogen und vermehrt werden. Die Wirtsbakterien benötigen ein Nährmedium, in dem sie optimal wachsen können. Je besser das Wachstum der Bakterien desto höher ist die Ausbeute an Bakteriophagen. In einem ersten Schritt wird pulverförmiges Nährmedium in Wasser gelöst und in einem Autoklaven sterilisiert. Danach wird das sterile Nährmedium direkt aus dem Autoklaven in einen Fermenter gepumpt und dort auf die optimale Temperatur für das Wachstum der Wirtsbakterien vorgeheizt (z.B. 30°C). Sobald die Nährlösung die Betriebstemperatur erreicht hat, werden aus einer Bakterienvorkultur Wirtsbakterien in den Fermenter gegeben. Diese Bakterien beginnen nun, sich zu teilen. Nach einer kurzen Adaptationsperiode wachsen die Wirtsbakterien exponentiell, d.h. mit der höchstmöglichen, für den Bakterientyp spezifischen, Wachstumsrate.

[0022] Das Wachstum der Bakterienzellen wird über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in einem Photometer verfolgt. Wenn eine in Vorexperimenten optimierte Zelldichte erreicht ist, z.B. 5×10^8 Bakterien pro Milliliter Nährlösung, werden aus einer Bakteriophagen-Vorkultur Bakteriophagen zum Fermenter zugegeben. Die Konzentration der Bakteriophagen in der Vorkultur wird im Vorfeld mittels der klassischen Titrationsmethode, einer biologischen Aktivitätsnachweismethode, bestimmt (siehe z.B. Martha R. J. Clokie, Andrew M. Kropinski (eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, vol. 501, C 2009 Humana Press, a part of Springer Science+Business Media). Die Konzentration wird so eingestellt, dass idealerweise jedes Bakterium im Fermenter durch mindestens einen Bakteriophagen erkannt und infiziert wird. Nach erfolgreicher Infektion produzieren die Wirtsbakterien nun neue Bakteriophagen anstatt wie bisher neue Bakterien. Der Vermehrungsprozess der Bakteriophagen dauert etwa eine Stunde, und in dieser Zeit werden pro Bakterienzelle etwa 100 neue Bakteriophagen produziert.

[0023] Am Ende des Prozesses platzen die Bakterien auf und entlassen die neuen Bakteriophagen ins Nährmedium. Die so im Fermenter entstandene Lösung ist hoch viskos, da sie neben den neuen Bakteriophagen auch alle Komponenten der aufgeplatzten Bakterienzelle (Bruchstücke der Zellwand, Lipide, Ribosomen, Erbmaterial der Bakterien etc.) und auch die ursprünglichen Komponenten des Nährmediums (Zucker, Salze und Proteine) enthält. Deshalb müssen die Bakteriophagen erst über ein mehrstufiges Filtrationsverfahren aufgereinigt werden, bevor sie für eine Markierungsreaktion zur Verfügung stehen. Nach der Aufreinigung erfolgt eine Sterilfiltration, z.B. über 0,2 μm Sartobran® Filterkartuschen von Sartorius Stedim Biotech, kombiniert mit der

Abfüllung in Vorratsbehälter (Kegs).

[0024] In dieser Form sind Bakteriophagen stabil, lassen sich einfach transportieren und über Monate ohne Aktivitätsverlust lagern.

2. Markierung von Bakteriophagen mit Reporter-molekülen

[0025] Um Nebenreaktionen während der Kopplung mit Reporter-molekülen und schlechte Kopplungseffizienzen zu vermeiden, werden die Phagen vor der Markierung mit den aktivierten Reporter-Molekülen gereinigt und umgepuffert. Während der Isolierung von Proteinen muss in vielen Fällen ein Pufferaustausch vorgenommen werden, z.B. wenn mehrere chromatographische Verfahren mit unterschiedlichen Puffern hintereinander verwendet werden sollen.

[0026] Die für die Markierungsexperimente eingesetzten Phagen werden mittels der folgenden Standardverfahren gereinigt und gegebenenfalls konzentriert:

- durch Ultrafiltration, wobei der Größenausschlußbereich (molecular weight cut-off (MWCO)) > 100 kDa sein sollte:
- durch Polyethylenglycol/Natriumchlorid-Präzipitation
- durch Größenausschluß-Chromatographie (Gelfiltration)
- durch Ionenaustausch-Chromatographie
- durch Dialyse

[0027] Die Trennung kleiner, überschüssiger Moleküle, wie Salze, Farbstoffe oder Biotin, aus Lösungen von Phagen wird durch Fällung mit Polyethylenglycol und Natriumchlorid und anschließender Zentrifugation durchgeführt (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. J. Immunol. 166, 7250).

[0028] Im Anschluß an die Inkubation der Kopplungsreaktion werden die Phagen-Konjugate mindestens zweimal mit Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000) und einer NaCl-Lösung gefällt. Dieses minimiert den Anteil freier Reporter-Moleküle in der Konjugatlösung. Abschließend wird das Konjugatpellet in einem geeigneten Puffer resuspendiert. Gelfiltrationssäulen mit einem Größenausschlussmaterial auf Dextran-Basis mit einem MWCO > 25 kDa können ebenfalls eingesetzt werden. Die Ionenaustausch-Chromatographiebasierte Reinigung gestattet ebenfalls die rasche Trennung der Konjugate von den kleinen Molekülen, wobei der geeignetste Gradient und die Art sowie die Stärke des Ionenaustauschermaterials von den eingesetzten Markermolekülen und der Natur der spezifischen Phagen abhängen. Eine Optimierung der Parameter ist vorab notwendig.

Beispiel 1:

[0029] 1×10^{11} pfu von zuvor gereinigten und konzentrierten TB54 Bakteriophagen (siehe oben) wurden in 10 ml PBS mit 0,1 M NaHCO_3 (pH 8,5) resuspendiert. Daraufhin 100 nmol 5(6)-Carboxyfluorescein-NHS-Ester pro 1×10^{10} pfu zugegeben. Die Kopplungsreaktion verläuft bei Raumtemperatur im Dunkeln für eine Stunde. Wie in Figur 6 schematisch dargestellt reagiert der NHS-Ester von 5(6)-Carboxyfluorescein (2) mit den primären Aminogruppen von Proteinen auf der Oberfläche der TB54 Phagen (1) unter Ausbildung stabiler Amidbindungen.

[0030] Die Reinigung der Konjugate erfolgt entweder per Präzipitation oder mittels chromatographischer Methoden wie oben beschrieben. Anschließend wird das Konjugat photophysikalisch mittels UV/vis- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert.

[0031] In Figur 7 sind die Anregungs- und Emissionsspektren von 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen gezeigt. Die Spektren lassen das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum von 5(6)-Carboxyfluorescein bei einer Wellenlänge von 495 nm bzw. im Bereich von 520-530 nm erkennen. Diese Wellenlängen wurden im Folgenden auch für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Bakterien-Bakteriophagen-Interaktion verwendet.

Beispiel 2:

[0032] Eine Fluorescein-isothiocyanat (FTIC)-Lösung in 0,1 M Carbonat-Puffer, pH 9,0 wird vorbereitet. Ein entsprechendes Aliquot wird zu der, wie in Beispiel 1 vorbereiteten Phagen-Lösung gegeben und vorsichtig durchmischt. Die Phagensuspension wird für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reinigung und Charakterisierung des Konjugates erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

3. Spezifität der Bakterien-Bakteriophagen-Interaktion

[0033] Um die enorme Wirtsspezifität einer markierten Spezies von Testbakteriophagen zu demonstrieren, wurden in einem vorbereitenden Schritt Übernachtskulturen von *Escherichia coli*-Bakterien der Stämme C600 (PTC Phage Technology Center GmbH), ECOR34 (PTC Phage Technology Center GmbH) und XL10-Gold (Agilent) unter Standardbedingungen bei 37°C in 10 ml TSB (*Tryptic Soy Broth*)(Sigma-Aldrich) hergestellt. Die Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag verdünnt (1:10 in TSB) und für weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die auf diese Weise erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden anschließend zu gleichen Teilen vermischt (1:1:1). Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Bakteriophagen-Wirt Interaktion wurden 10 µl der Bakterien-Mischkultur *E. coli* Bakterien (C600, ECOR34, XL10-Gold) in 990 µl einer Suspension von 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen in PBS,

pH 7,4 gegeben (Bakterientiter: $\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml; Phagentiter: $\sim 1 \times 10^8$ pfu/ml) und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Von dem Reaktionsgemisch wurden anschließend 20 μ l auf einen Objektträger gegeben und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Eclipse Ti, 100x Objektiv, Nikon).

[0034] Figur 8A zeigt die erhaltene fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Inkubation der *E. coli* Bakterienstämme C600, ECOR34 und XL10-Gold mit 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen. Der Bildausschnitt in der linken unteren Ecke zeigt eine vergrößerte Darstellung des weiß umgrenzten Bildbereichs.

[0035] In Figur 8B ist eine entsprechende Hellfeldaufnahme nach Inkubation der *E. coli* Bakterienstämme C600, ECOR34 und XL10-Gold mit 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen dargestellt. Der Bildausschnitt in der linken unteren Ecke zeigt eine vergrößerte Darstellung des weiß umgrenzten Bildbereichs. Die weißen Pfeile weisen dabei auf nichtmarkierte Bakterien hin, die sich morphologisch von den, mit markierten TB54-Phagen infizierten *E. coli* C600 Bakterienzellen unterscheiden und den Stämmen ECOR34 bzw. XL10-Gold zuzuordnen sind (Größenmarker: 10 μ m).

[0036] Die Versuchsergebnisse belegen die enorme Spezifität der mit 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen. Diese binden ausschließlich an den *E. coli* C600 Bakterienstamm, während die Stämme ECOR34 und XL10-Gold nicht infiziert werden. Daher weisen im Reaktionsgemisch nur Bakterien des *E. coli* C600 Stamms durch Komplexbildung Fluoreszenzsignale auf. Somit bietet das erfindungsgemäße Verfahren, aufgrund der enormen Wirtsspezifität von Bakteriophagen, einen eindeutigen und verlässlichen Nachweis von Bakterienarten. Dabei können sogar einzelne Stämme innerhalb einer Bakterienart nachgewiesen werden.

[0037] Figur 9A zeigt darüber hinaus optische Schnittbilder der in diesem Versuch erhaltenen *E. coli* C600-TB54 Bakteriophagen-Komplexe. Die optischen Schnitte wurden Abständen von 0,3 μ m angefertigt (Größenmarker 2 μ m). In der oberen Reihe sind die Komplexe im Durchlicht dargestellt, die untere Reihe zeigt dieselben Komplexe in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung.

[0038] Die Verteilung der punktförmigen Fluoreszenzsignale lässt dabei eine Lokalisation der fluoreszenten Reporter-moleküle (5(6)-Carboxyfluorescein) auf der Bakterienoberfläche erkennen.

[0039] In Figur 9B sind dreidimensionale Rekonstruktionen der erhaltenen *E. coli* C600-TB54 Bakteriophagen-Komplexe in unterschiedlichen perspektivischen Ansichten dargestellt, was die Oberflächenlokalisierung der der fluoreszenten Reporter-moleküle bestätigt.

4. Sensitivität des Verfahrens

[0040] Zur Ermittlung der Sensitivität des Nachweisverfahrens für Bakterien wurde durch serielle Verdün-

nung einer Ausgangssuspension von 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen (PBS, pH 7,4, Phagentiter: $\sim 1 \times 10^8$ pfu/ml) mit PBS, pH 7,4 eine Verdünnungsreihe erstellt. Von den jeweiligen Verdünnungsstufen mit $\sim 1 \times 10^7$ pfu/ml, $\sim 1 \times 10^6$ pfu/ml, $\sim 1 \times 10^5$ pfu/ml, $\sim 1 \times 10^4$ pfu/ml und $\sim 1 \times 10^3$ pfu/ml wurden jeweils 1 ml in eine Messküvette gegeben und fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Qwave compact USB Spektrometer, RGB Lasersystems). Als Referenz wurde 1 ml PBS Puffer ohne markierte TB54 Bakteriophagen verwendet.

[0041] Die erhaltenen Fluoreszenzspektren sind in Figur 10 dargestellt. Für sämtliche Verdünnungsstufen ist jeweils ein distinktes Maximum der Emission im Wellenlängenbereich zwischen 520 und 530 nm zu erkennen, was dem Emissionsmaximum von 5(6)-Carboxyfluorescein entspricht. In Figur 10B ist daher das Integral der Fluoreszenz im Wellenlängenbereich zwischen 520 und 530 nm für die verschiedenen Phagentiter dargestellt. Dabei ist das erhaltene Fluoreszenzintegral für eine Phagenmenge von nur $\sim 1 \times 10^3$ pfu noch deutlich von der Referenz unterscheidbar, d.h. es gelingt ein spezifischer Nachweis ab $\sim 1 \times 10^3$ Bakteriophagen.

[0042] Bei einer durchschnittlichen Menge von $\sim 1 \times 10^2$ gebundenen Bakteriophagen pro infiziertem Bakterium bedeutet dies, dass durch das erfindungsgemäße Verfahren ein spezifischer Nachweis bereits ab einer Bakterienkonzentration von nur ~ 10 Bakterienzellen/ml erbracht werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren ist damit nicht nur hoch-spezifisch, sondern auch höchst sensitiv.

5. Spezifischer Nachweis einer Bakterienart bzw. eines Stamms einer Bakterienart.

[0043] Im Folgenden ist der spezifische Nachweis für den Bakterienstamm *Escherichia coli* C600 mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen beschrieben.

[0044] Dazu wurde zunächst eine Übernachtskultur des Bakterienstamms *Escherichia coli* C600 (PTC Phage Technology Center GmbH) unter Standardbedingungen bei 37°C in 10 ml TSB (*Tryptic Soy Broth*) (Sigma-Aldrich) hergestellt. Die Übernachtskultur wurde am folgenden Tag verdünnt (1:10 in TSB) und für weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Von der erhaltenen Kultur wurde im Anschluss eine Verdünnungsreihe durch serielle Verdünnung mit TSB erstellt. Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration in den seriell verdünnten Bakterien-suspensionen wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Figur 11A zeigt die jeweils erhaltenen Daten der Bakterientiter für die verschiedenen Verdünnungsstufen.

[0045] Die Ausgangsintensität der Fluoreszenz in der Phagensuspension vor Zugabe einer zu testenden Probe wurde bestimmt, indem 900 μ l einer Suspension von 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen und Alexa532-markierten TB99 Bakteriophagen

($\sim 10^8$ pfu/ml in PBS, versetzt mit 10 mM $MgCl_2$) mit 100 μ l TSB-Medium vermischt und für 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurden. Der Alexa532-markierte TB99 Bakteriophage dient dabei als Referenz-Bakteriophage mit disjunkter Markierung. Die Fluoreszenzsignale des Testbakteriophagen (5(6)-Carboxyfluorescein-TB54) und des Referenz-Bakteriophagen (Alexa532-TB99) wurden anschließend mit einem Plattenlesegerät (Perkin Elmer) gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden als Ausgangsintensität bzw. 100% Signalintensität der Phagensuspension vor Zugabe einer zu testenden Probe definiert, welche im Graph in Figur 11B als gestrichelte Linie eingezeichnet sind.

[0046] Weiterhin wurden jeweils 900 μ l der oben genannten Suspension mit jeweils 100 μ l der seriell verdünnten *E. coli* C600 Bakteriensuspensionen ($\sim 10^4$ - 10^7 Zellen/ml in TSB) vermischt und die Reaktionsgemische ebenfalls für 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden anschließend jeweils durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,4 μ m (Micropore Membran, Milipore) filtriert.

[0047] Die Fluoreszenz in den erhaltenen Filtraten wurde jeweils mit einem Plattenlesegerät (Perkin Elmer) gemessen. Abbildung 11B zeigt jeweils die Fluoreszenzintensitäten von ungebundenen 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten TB54 Bakteriophagen (Quadrate) und Alexa532-markierten TB99 Bakteriophagen (Dreiecke) im Filtrat. Die angegebenen Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils durch Normalisierung auf den ermittelten Ausgangsintensitätswert erhalten, d.h. die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils in Bezug zur Ausgangsintensität gesetzt. Dabei ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität der Testbakteriophagen (5(6)-Carboxyfluorescein-TB54 als Quadrate) deutlich abnimmt. Dies zeigt, dass die Testbakteriophagen den Bakterienstamm *E. coli* C600 spezifisch infizieren und die entsprechenden Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe bilden, welche durch Filtration entfernt werden. Dadurch ist die Anzahl ungebundener Testbakteriophagen im Filtrat geringer als in der anfänglichen Phagensuspension, was sich in der Abnahme der Fluoreszenzintensität im Filtrat widerspiegelt.

[0048] Die Fluoreszenzintensitäten im Überstand sind in Abbildung 11C dargestellt. Die dargestellten Messwerte wurden jeweils fluoreszenzmikroskopisch, durch Ablichtung der Filteroberflächen mit einem Standardobjektiv (20x, Nikon) und Berechnung der mittleren Bildintensität aus drei Bildern pro Filterfläche ermittelt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $N=3$). Die Daten zeigen, dass mit Zunahme der Bakterienkonzentration in der zugegebenen Probe, die Fluoreszenzintensität des Testbakteriophagen (5(6)-Carboxyfluorescein-TB54) zunimmt, während sich die Fluoreszenzintensität des Referenz-Bakteriophagen (Alexa532-TB99) kaum ändert. Dies lässt darauf schließen, dass der Testbakteriophage die nachzuweisenden Bakterien spezifisch bindet und mit steigender Konzentration der Bakterien auch die Konzentration der gebildeten Bakterien-Bakteriophagen-

Komplexe zunimmt, welche schließlich durch die Filtration auf der Filteroberfläche immobilisiert werden. Der Referenz-Bakteriophage bindet dagegen nicht an die nachzuweisende Bakterienart bzw. den nachzuweisenden Bakterienstamm, so dass die Konzentration der Bakterien keinen Einfluss auf dessen gemessene Fluoreszenzintensität im Überstand hat.

[0049] Wie gezeigt, erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren einen hoch-spezifischen und hoch-sensitiven Nachweis von Bakterien. Das Verfahren ist dabei einfach durchzuführen und liefert sehr verlässliche Ergebnisse. Zudem ist der Zeitaufwand des Verfahrens gering, so dass ein Nachweis innerhalb von weniger als einer Stunde ab Probenzugabe gelingt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Bakterien, umfassend die Schritte

- A) Bereitstellen einer Suspension (1), umfassend mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen (2), welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen (2) kennzeichnend ist;
- B) Zugabe einer Probe (3), die auf das Vorliegen mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart getestet werden soll, zu der Suspension;
- C) Mischen der Probe mit der Suspension und Inkubation des Reaktionsgemisches;
- D) Filtration des Reaktionsgemisches durch einen Filter (4), wobei der Filter (4) eine Porengröße von 0,1 μ m bis 0,5 μ m aufweist und die Porengröße des verwendeten Filters (4) so gewählt ist, dass die mindestens eine nachzuweisende Bakterienart sowie Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe (5), welche aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen (2) der mindestens einen Spezies bestehen, zurückgehalten und auf der Filteroberfläche immobilisiert werden, während ungebundene Bakteriophagen (2, 6) den Filter passieren können;
- E) Detektion von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen (5) im Überstand, bei Vorliegen mindestens einer nachzuweisenden Bakterienart, wobei die Komplexe aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen (2) der mindestens einen Spezies von Testbakteriophagen (2) bestehen;
- F) Detektion von ungebundenen Testbakteriophagen (2) im Filtrat;
- G) prozessorgestützte Verarbeitung von erhaltenen Signalen, welche durch die Detektion in

den Schritten E) und F) erzeugt werden und Ausgabe von Detektionsergebnissen an einen Benutzer,

- dadurch gekennzeichnet, dass** die Suspension ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen (6) umfasst, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen (2) disjunkte Markierung aufweist, so dass der markierte Referenz-Bakteriophage (6) ebenfalls im Schritt F) detektiert wird; oder dass, alternativ zu einem markierten Referenz-Bakteriophagen (6), markierte Mikro- oder Nanopartikel verwendet werden, welche an keine nachzuweisende Bakterienart binden und den Filter (4) aufgrund ihrer geringen Größe passieren können.
2. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß Anspruch 1, wobei die nachzuweisenden Bakterienarten ausgewählt werden aus der Gruppe umfassend *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (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*, *B-Streptokokken (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*, *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 prowazeki*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Cronobacter spp.*, *Campylobacter spp.* und *Legionella pneumophila*.
3. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Suspension (1) zwei oder mehrere Spezies von markierten Testbakteriophagen (2) umfasst, welche jeweils spezifisch an unterschiedliche nachzuweisende Bakterienarten binden und wobei die Markierungen der Spezies disjunkt sind.
4. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Markierung mindestens ein Reportermolekül mit fluoreszenten oder chemilumineszenten Eigenschaften oder mindestens ein Reportermolekül, welches durch Interaktion mit einem sekundären Molekül Licht emittiert, umfasst.
5. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß Anspruch 4, wobei die Markierung jeweils aus mindestens einem fluoreszenten Reportermolekül besteht und die Detektion durch Messung der Fluoreszenz erfolgt, wobei die Anregung mindestens eines fluoreszenten Reportermoleküls im Wellenlängenbereich von 200-1000 nm erfolgt.
6. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei das mindestens eine Reportermolekül an Proteine im Capsid-Bereich der Bakteriophagen gekoppelt ist.
7. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei die Detektion jeweils durch zeitaufgelöste Messung der Lichtemission erfolgt.
8. Verfahren zum Nachweis von Bakterien gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, ferner umfassend den Schritt einer Vortrennung von Bakterien-Bakteriophagen-Komplexen (5) und ungebundenen Bakteriophagen (2, 6), wobei sich die Vortrennung an Schritt C) anschließt und nach dem Prinzip der Gelfiltration durch eine Gelmatrix (24) erfolgt.
9. Reaktionsgefäß (7) zum Nachweis von Bakterien, umfassend mindestens zwei Kompartimente, welche durch einen Filter (4) voneinander getrennt sind, wobei ein Kompartiment ein Phagenreservoir (8) ist, welches eine Suspension (1) enthält, die mindestens eine Spezies von markierten Testbakteriophagen (2) umfasst, welche spezifisch an eine nachzuweisende Bakterienart bindet, wobei die Markierung für die jeweilige Spezies von Testbakteriophagen (2) kennzeichnend ist, und ein Kompartiment ein Auffangreservoir (9) ist, zur Aufnahme des Filtrats nach Zugabe einer Probe (3) zu der Suspension (1) und Filtration durch den Filter (4), und wobei der Filter (4) eine Porengröße von 0,1 µm bis 0,5 µm aufweist und die Porengröße des verwendeten Filters so gewählt ist, dass die min-

destens eine nachzuweisende Bakterienart sowie Bakterien-Bakteriophagen-Komplexe (5), welche aus Bakterien der mindestens einen nachzuweisenden Bakterienart und daran gebundenen Testbakteriophagen (2) der mindestens einen Spezies bestehen, zurückgehalten und auf der Filteroberfläche immobilisiert werden, während ungebundene Bakteriophagen (2, 6) den Filter passieren können;

ein Mittel (10) zur Identifikation des Reaktionsgefäßes; und mindestens zwei Messfenster (11, 12),

wobei ein Messfenster (11) im Bereich der Filteroberfläche, welche dem Phagenreservoir (8) zugewandt ist, angeordnet ist, und ein Messfenster (12) im Bereich des Auffangreservoirs (9) angeordnet ist,

dadurch gekennzeichnet, dass die Suspension (1) ferner einen markierten Referenz-Bakteriophagen (6) umfasst, welcher an keine nachzuweisende Bakterienart bindet und eine von den Testbakteriophagen (2) disjunkte Markierung aufweist oder dass das Reaktionsgefäß (7) ein weiteres Kompartiment zwischen Filter (4) und Phagenreservoir (8) umfasst, welches eine Indikatorlösung (28) mit markierten Mikro- oder Nanopartikeln enthält, welche nicht an eine nachzuweisende Bakterienart binden und den Filter (4) aufgrund ihrer geringen Größe passieren können.

10. Reaktionsgefäß (7) gemäß Anspruch 9, ferner umfassend ein Kompartiment zwischen Phagenreservoir (8) und Filter (4), welches mindestens einen Vorfilter enthält, wobei es sich bei dem mindestens einen Vorfilter um eine Gelmatrix (24) handelt.

11. Kartusche, umfassend zwei oder mehrere Reaktionsgefäße (7) nach einem der Ansprüche 9-10, welche parallel zueinander angeordnet sind, wobei jedes Reaktionsgefäß (7) eine unterschiedliche Spezies von markierten Testbakteriophagen (2) in der Suspension (1) des Phagenreservoirs (8) enthält, welche jeweils spezifisch an unterschiedliche nachzuweisende Bakterienarten binden, wobei die Markierungen der Spezies disjunkt sind.

12. Verwendung eines Reaktionsgefäßes (7) gemäß einem der Ansprüche 9 bis 10 oder einer Kartusche gemäß Anspruch 11 zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von Bakterien gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.

13. Verwendung eines Messgeräts (15) zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von Bakterien gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das

Messgerät (15) umfasst:

einen Schacht, in den ein Reaktionsgefäß (7) gemäß einem der Ansprüche 9-10 oder eine Kartusche nach Anspruch 11 eingeschoben wird; mindestens zwei Detektions-Optiken (16), welche jeweils im Bereich der Messfenster (11, 12) des eingeschobenen Reaktionsgefäßes (7) oder der Kartusche angeordnet sind, wobei die Detektions-Optiken (16) jeweils ein Linsensystem (17) zur Fokussierung von emittiertem Licht der Markierung der Bakteriophagen (2, 6) auf mindestens einen optischen Sensor (18) umfassen, wobei der mindestens eine optischen Sensor (18) das emittierte Licht detektiert; einen Prozessor, welcher jeweils mit dem mindestens einen optischen Sensor (18) der Detektionsoptiken (16) verbunden ist und welcher die erhaltenen Detektionssignale verarbeitet; und eine mit dem Prozessor verbundene Ausgabereinheit, welche die Detektionsergebnisse an einen Benutzer ausgibt.

14. Verwendung eines Messgeräts gemäß Anspruch 13, wobei die Detektions-Optiken (18) des Messgeräts (15) ferner jeweils eine Beleuchtungseinheit (19), welche Licht im Wellenlängenbereich von 200-1000 nm emittiert und ein Linsensystem (20) zur Fokussierung des von der Beleuchtungseinheit (19) emittierten Lichts auf einen Messbereich umfassen, wobei die Beleuchtungseinheit (19) ebenfalls mit dem Prozessor verbunden ist und von diesem gesteuert wird.

15. Verwendung eines Messgeräts gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14, wobei das Messgerät (15) ferner ein integriertes Lesegerät umfasst, welches das Mittel (10) zur Identifikation des Reaktionsgefäßes (7) erfasst und die erfassten Daten an den Prozessor weiterleitet, wobei der Prozessor die erfassten Daten verarbeitet und die Ergebnisse der Identifikation über die Ausgabereinheit an einen Benutzer ausgegeben werden.

Claims

1. Method for the detection of bacteria comprising the steps of

A) providing a suspension (1) comprising at least one species of labelled test bacteriophages (2) which specifically bind to a bacterial species to be detected, wherein the label is specific to the respective species of test bacteriophages (2);
B) addition of a sample (3) to be tested for the

presence of at least one species of bacteria to be detected to the suspension;
 C) mixing the sample with the suspension and incubation of the reaction mixture;
 D) filtering the reaction mixture through a filter (4), wherein the filter (4) has a pore size of 0.1 μm to 0.5 μm and the pore size of the filter (4) used is selected such that the at least one bacterial species to be detected and bacteria-bacteriophage-complexes (5), which consist of bacteria of the at least one bacterial species to be detected and test bacteriophages (2) of the at least one species bound thereto, are retained and immobilized on the filter surface while unbound bacteriophages (2, 6) can pass the filter;
 E) detection of bacteria-bacteriophage-complexes (5) in the supernatant, provided that at least one bacterial species to be detected is present, wherein the complexes consist of bacteria of the at least one bacterial species to be detected and test bacteriophages (2) of the at least one species bound thereto;
 F) detection of unbound test bacteriophages (2) in the filtrate;
 G) processor-aided processing of received signals generated by the detection in steps E) and F) and output of detection results to a user,

characterized in that the suspension further comprises a labelled reference bacteriophage (6) which does not bind to any bacterial species to be detected and which has a label disjunct relative to the test bacteriophages (2) so that the labelled reference bacteriophage (6) is also detected in step F); or **in that** labelled micro- or nanoparticles are used in alternative to a labelled reference bacteriophage (6), which cannot bind to any bacterial species to be detected and can pass the filter (4) due to their small size.

2. Method for the detection of bacteria according to claim 1, wherein the bacterial species to be detected are selected from the group comprising *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (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*, *B-Streptokokken (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*, *Clamymdia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Francisella tularensis*, *Gardenella 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.* and *Legionella pneumophila*.

3. Method for the detection of bacteria according to claim 1 or 2, wherein the suspension (1) comprises two or more species of labelled test bacteriophages (2) which each specifically bind to different bacterial species to be detected and wherein the labels of the species are disjunct.
4. Method for the detection of bacteria according to any of the preceding claims, wherein the label comprises at least one reporter molecule having fluorescent or chemiluminescent properties or at least one reporter molecule which emits light by interaction with a secondary molecule.
5. Method for the detection of bacteria according to claim 4, wherein the label consists of at least one fluorescent reporter molecule and the detection is carried out by measuring the fluorescence, wherein the excitation of at least one fluorescent reporter molecule is carried out in the wavelength range of from 200-1000 nm.
6. Method for the detection of bacteria according to claim 4 or 5, wherein the at least one reporter molecule is coupled to proteins in the capsid region of the bacteriophages.
7. Method for the detection of bacteria according to any one of claims 4 to 6, wherein the detection is carried out by time-resolved measurement of the light emission.
8. Method for the detection of bacteria according to any of the preceding claims, further comprising the step of a pre-separation of bacteria-bacteriophage-complexes (5) and unbound bacteriophages (2, 6), wherein the pre-separation follows step C) and is carried out according to the principle of gel filtration

through a gel matrix (24).

9. Reaction vessel (7) for the detection of bacteria, comprising at least two compartments separated from each other by a filter (4),

wherein one compartment is a phage reservoir (8) containing a suspension (1) which comprises at least one species of labelled test bacteriophages (2) that specifically bind to a bacterial species to be detected, wherein the label is specific to the respective species of test bacteriophages (2), and

wherein one compartment is a collection reservoir (9) for receiving the filtrate after the addition of a sample (3) to the suspension (1) and filtration through the filter (4), and

wherein the filter (4) has a pore size of 0.1 μm to 0.5 μm and the pore size of the filter used is selected such that the at least one bacterial species to be detected and bacteria-bacteriophage-complexes (5), which consist of bacteria of the at least one bacterial species to be detected and test bacteriophages (2) of the at least one species bound thereto, are retained and immobilized on the filter surface while unbound bacteriophages (2, 6) can pass the filter;

a means (10) for identifying the reaction vessel; and at least two measuring windows (11, 12),

wherein one measuring window (11) is arranged in the region of the filter surface facing the phage reservoir (8), and

one measuring window (12) is arranged in the region of the collection reservoir (9),

characterized in that the suspension (1) further comprises a labelled reference bacteriophage (6) which does not bind to any bacterial species to be detected and which has a label disjunct relative to the test bacteriophages (2) or **in that** the reaction vessel (7) comprises a further compartment between the filter (4) and the phage reservoir (8) which contains an indicator solution (28) with labelled micro- or nanoparticles that cannot bind to any bacterial species to be detected and can pass the filter (4) due to their small size.

10. Reaction vessel (7) according to claim 9, further comprising a compartment between the phage reservoir (8) and the filter (4), which contains at least one pre-filter, wherein the at least one pre-filter is a gel matrix (24).

11. Cartridge, comprising two or more reaction vessels (7) according to any

one of claims 9-10, which are arranged parallel to one another,

wherein each reaction vessel (7) contains a different species of labelled test bacteriophages (2) in the suspension (1) of the phage reservoir (8), each specifically binding to different bacterial species to be detected, wherein the labels of the different species of test bacteriophages are disjunct.

12. Use of a reaction vessel (7) according to any one of claims 9 to 10 or of a cartridge according to claim 11 for carrying out the method for the detection of bacteria according to any one of claims 1 to 8.

13. Use of a measuring device (15) for carrying out the method for the detection of bacteria according to any one of claims 1 to 8, wherein said measuring device (15) comprises:

a slot into which a reaction vessel (7) according to any one of claims 9-10 or a cartridge according to claim 11 is inserted;

at least two detection optics (16), each of which is arranged in the region of the measuring windows (11, 12) of the inserted reaction vessel (7) or cartridge,

wherein the detection optics (16) each comprise a lens system (17) for focusing light emitted by the label of the bacteriophages (2, 6) onto at least one optical sensor (18), the at least one optical sensor (18) detecting the emitted light; a processor which is connected to the at least one optical sensor (18) of the detection optics (16), respectively, and which processes the received detection signals; and

an output unit connected to the processor which outputs the detection results to a user.

14. Use of a measuring device (15) according to claim 13, wherein the detection optics (16) of the measuring device (15) each further comprise an illumination unit (19), which emits light in the wavelength range of from 200-1000 nm, and a lens system (20) for focusing the light emitted by the illumination unit (19) onto a measuring area, wherein the illumination unit (19) is also connected to and controlled by the processor.

15. Use of a measuring device (15) according to claims 13 or 14, wherein the measuring device (15) further comprises an integrated reader that detects the means (10) for identifying the reaction vessel (7) and forwards the detected data to the processor, whereby the processor processes the detected data and outputs the results of the identification to a user via the output unit.

Revendications

1. Procédé de détection de bactéries, comprenant les étapes suivantes :

A) fourniture d'une suspension (1) comprenant au moins une espèce de bactériophages d'essai (2) marqués, qui se lie spécifiquement à une espèce de bactérie à détecter, le marquage étant caractéristique de chaque espèce de bactériophages d'essai (2) ;

B) addition, à la suspension, d'un échantillon (3) qui doit faire l'objet d'un essai portant sur la présence d'au moins une espèce de bactérie à détecter ;

C) mélange de l'échantillon à la suspension et incubation du mélange réactionnel ;

D) filtration du mélange réactionnel à travers un filtre (4), le filtre (4) présentant une grosseur de pores de 0,1 µm à 0,5 µm, et la grosseur des pores du filtre (4) utilisé étant choisie de telle sorte que soient retenues la ou les espèces de bactéries à détecter, ainsi que les complexes bactéries-bactériophages (5) qui sont constitués de bactéries de la ou des espèces de bactéries à détecter et de bactériophages d'essai (2), qui y sont liés, de la ou des espèces, et qu'elles soient immobilisées sur la surface du filtre, tandis que les bactériophages (2, 6) non liés peuvent passer le filtre ;

E) détection de complexes bactéries-bactériophages (5) dans le surnageant, dans le cas de la présence d'au moins une espèce de bactérie à détecter, les complexes étant constitués de bactéries de la ou des espèces de bactéries à détecter et de bactériophages d'essai (2) qui y sont liés, de la ou des espèces de bactériophages d'essai (2) ;

F) détection, dans le filtrat, des bactériophages d'essai (2) non liés ;

G) traitement assisté par ordinateur des signaux obtenus, qui sont produits sous l'effet de la détection dans les étapes E) et F), et sortie des résultats de la détection à l'attention d'un utilisateur,

caractérisé en ce que la suspension comprend en outre un bactériophage de référence (6) marqué, qui ne se lie à aucune espèce de bactérie à détecter et présente un marquage disjoint de celui des bactériophages d'essai (2), de telle sorte que le bactériophage de référence (6) marqué soit aussi détecté dans l'étape F) ; ou que, à la place d'un bactériophage de référence (6) marqué, on utilise des micro- ou des nanoparticules marquées, qui ne se lient à aucune espèce de bactérie à détecter, et qui peuvent, du fait de leur faible grosseur, passer le filtre (4).

2. Procédé de détection de bactéries selon la revendication 1, les espèces de bactéries à détecter étant choisies dans le groupe comprenant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (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*, *Streptococcus B (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*, *Chlamydia 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 prowazeki*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Cronobacter spp.*, *Campylobacter spp.* et *legionella pneumophila*.

3. Procédé de détection de bactéries selon la revendication 1 ou 2, la suspension (1) comprenant deux espèces ou plus de bactériophages d'essai (2) marqués, dont chacun se lie spécifiquement à différentes espèces de bactéries à détecter, les marquages des espèces étant disjoints.

4. Procédé de détection de bactéries selon l'une des revendications précédentes, le marquage comprenant au moins une molécule rapporteuse présentant des propriétés fluorescentes ou chimioluminescentes, ou au moins une molécule rapporteuse qui émet de la lumière par interaction avec une molécule secondaire.

5. Procédé de détection de bactéries selon la revendication 4, chaque marquage étant constitué d'au moins une molécule rapporteuse fluorescente, et la détection étant réalisée par mesure de la fluorescence, l'excitation d'au moins une molécule rapporteuse

fluorescente s'effectuant dans la gamme de longueurs d'onde de 200 à 1000 nm.

6. Procédé de détection de bactéries selon la revendication 4 ou 5, la ou les molécules rapporteuses étant couplées à des protéines dans le domaine de la capside des bactériophages. 5
7. Procédé de détection de bactéries selon l'une des revendications 4 à 6, la détection étant dans chaque cas effectuée par mesure, avec résolution dans le temps, de l'émission de lumière. 10
8. Procédé de détection de bactéries selon l'une des revendications précédentes, comprenant en outre l'étape d'une séparation préalable des complexes bactéries-bactériophages (5) et des bactériophages (2, 6) non liés, la séparation préalable suivant l'étape C) et étant réalisée conformément au principe de la filtration sur gel à travers une matrice de gel (24). 15 20
9. Réacteur (7) destiné à la détection de bactéries, comprenant
- au moins deux compartiments, séparés l'un de l'autre par un filtre (4), 25
- un compartiment étant un réservoir de phages (8), qui contient une suspension (1) qui comprend au moins une espèce de bactériophages d'essai (2) marqués, qui se lie spécifiquement à une espèce de bactérie à détecter, le marquage étant caractéristique de chaque espèce de bactériophages d'essai (2), et 30
- un compartiment étant un réservoir récepteur (9), destiné à loger le filtrat après addition d'un échantillon (3) à la suspension (1) et filtration à travers le filtre (4), le filtre (4) présentant une grosseur de pores de 0,1 μm à 0,5 μm , et la grosseur des pores du filtre (4) utilisé étant choisie de telle sorte que soient retenues la ou les espèces de bactéries à détecter, ainsi que les complexes bactéries-bactériophages (5) qui sont constitués de bactéries de la ou des espèces de bactéries à détecter et de bactériophages d'essai (2), qui y sont liés, de la ou des espèces, et qu'elles soient immobilisées sur la surface du filtre, tandis que les bactériophages (2, 6) non liés peuvent passer le filtre ; 35 40 45 50
- un moyen (10) destiné à l'identification du réacteur ; et 55
- au moins deux fenêtres de mesure (11, 12),
- une fenêtre de mesure (11) étant disposée

dans la zone de la surface du filtre dirigée vers le réservoir de phages (8), et une fenêtre de mesure (12) étant disposée dans la zone du réservoir récepteur (9),

caractérisé en ce que la suspension (1) comprend en outre un bactériophage de référence (6) marqué, qui ne se lie à aucune espèce de bactérie à détecter et qui présente un marquage disjoint de celui des bactériophages d'essai (2), ou que le réacteur (7) comprend un compartiment supplémentaire entre le filtre (4) et le réservoir de phages (8), qui contient une solution indicatrice (28) comprenant des micro- ou des nanoparticules marquées, qui ne se lient pas à une espèce de bactérie à détecter et qui, du fait de leur faible taille, peuvent passer le filtre (4).

10. Réacteur (7) selon la revendication 9, comprenant en outre un compartiment entre le réservoir de phages (8) et le filtre (4), qui contient au moins un pré-filtre, auquel cas, pour ce qui concerne l'au moins un préfiltre, il s'agit d'une matrice de gel (24).
11. Cartouche comprenant : 25
- deux réacteurs (7) ou plus selon l'une des revendications 9 à 10, qui sont disposés parallèlement les uns aux autres, 30
- chaque réacteur (7) contenant une espèce différente de bactériophages d'essai (2) marqués dans la suspension (1) du réservoir de phages (8), dont chacune se lie spécifiquement à des espèces de bactéries à détecter différentes, les marquages des espèces étant disjoints. 35
12. Utilisation d'un réacteur (7) selon l'une des revendications 9 à 10 ou d'une cartouche selon la revendication 11 pour la mise en oeuvre du procédé de détection de bactéries selon l'une des revendications 1 à 8. 40
13. Utilisation d'un appareil de mesure (15) destiné à la mise en oeuvre du procédé de détection de bactéries selon l'une des revendications 1 à 8, l'appareil de mesure (15) comprenant : 45
- un puits, dans lequel est enfoncé un réacteur (7) selon l'une des revendications 9 à 10 ou une cartouche selon la revendication 11 ; 50
- au moins deux optiques de détection (16), dont chacune est disposée dans la zone des fenêtres de mesure (11, 12) du réacteur (7) enfoncé ou de la cartouche,
- chaque optique de détection (16) comprenant un système de lentilles (17) destiné à focaliser la lumière émise par le marquage des bactériophages (2, 6) sur au moins un capteur optique 55

- (18), l'au moins un capteur optique (18) détectant la lumière émise,
un processeur, qui est relié à chacun du ou des capteurs optiques (18) des optiques de détection (16), et qui traite les signaux de détection obtenus ; et
une unité de sortie, reliée au processeur, qui envoie en sortie les résultats de la détection à un utilisateur.
14. Utilisation d'un appareil de mesure selon la revendication 13, les optiques de détection (18) de l'appareil de mesure (15) comprenant en outre chacune une unité d'éclairage (19), qui émet une lumière dans la gamme de longueurs d'onde de 200 à 1000 nm, et un système de lentilles (20) destiné à la focalisation de la lumière émise par l'unité d'éclairage (19) sur une zone de mesure, l'unité d'éclairage (19) étant elle aussi reliée au processeur et étant commandée par celui-ci.
15. Utilisation d'un appareil de mesure selon l'une des revendications 13 ou 14, l'appareil de mesure (15) comprenant en outre un lecteur intégré, qui comprend le moyen (10) destiné à l'identification du réacteur (7) et qui transmet au processeur les données saisies, le processeur traitant les données saisies, et les résultats de l'identification étant, par l'intermédiaire de l'unité de sortie, envoyés en sortie à un utilisateur.

5

10

15

20

25

30

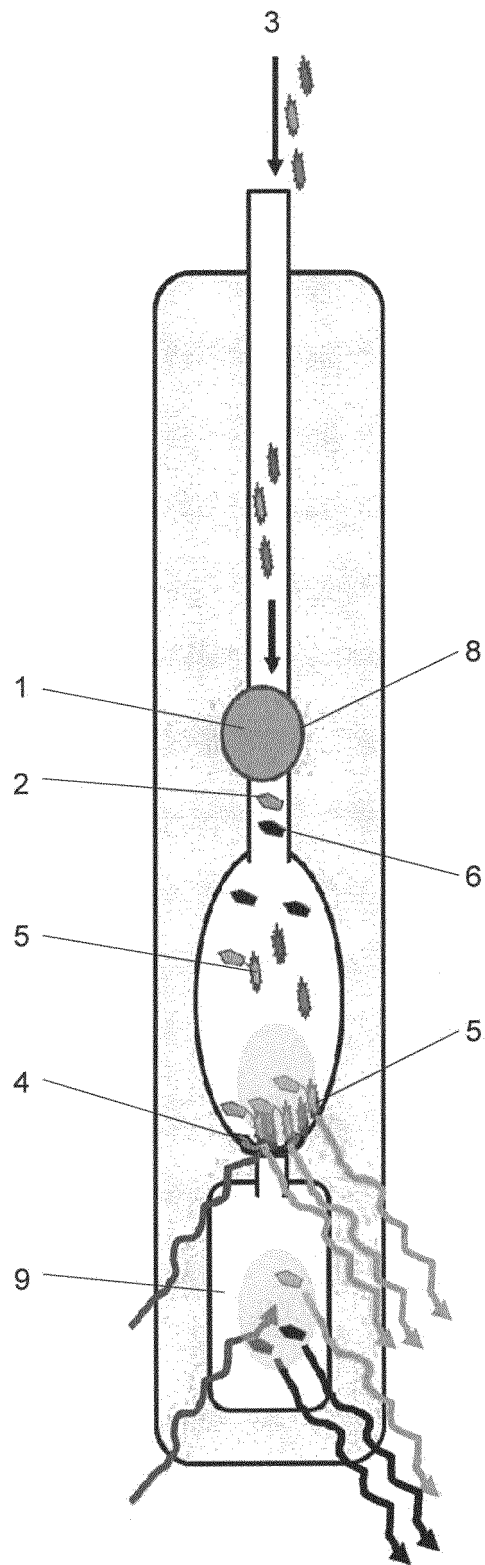
35

40

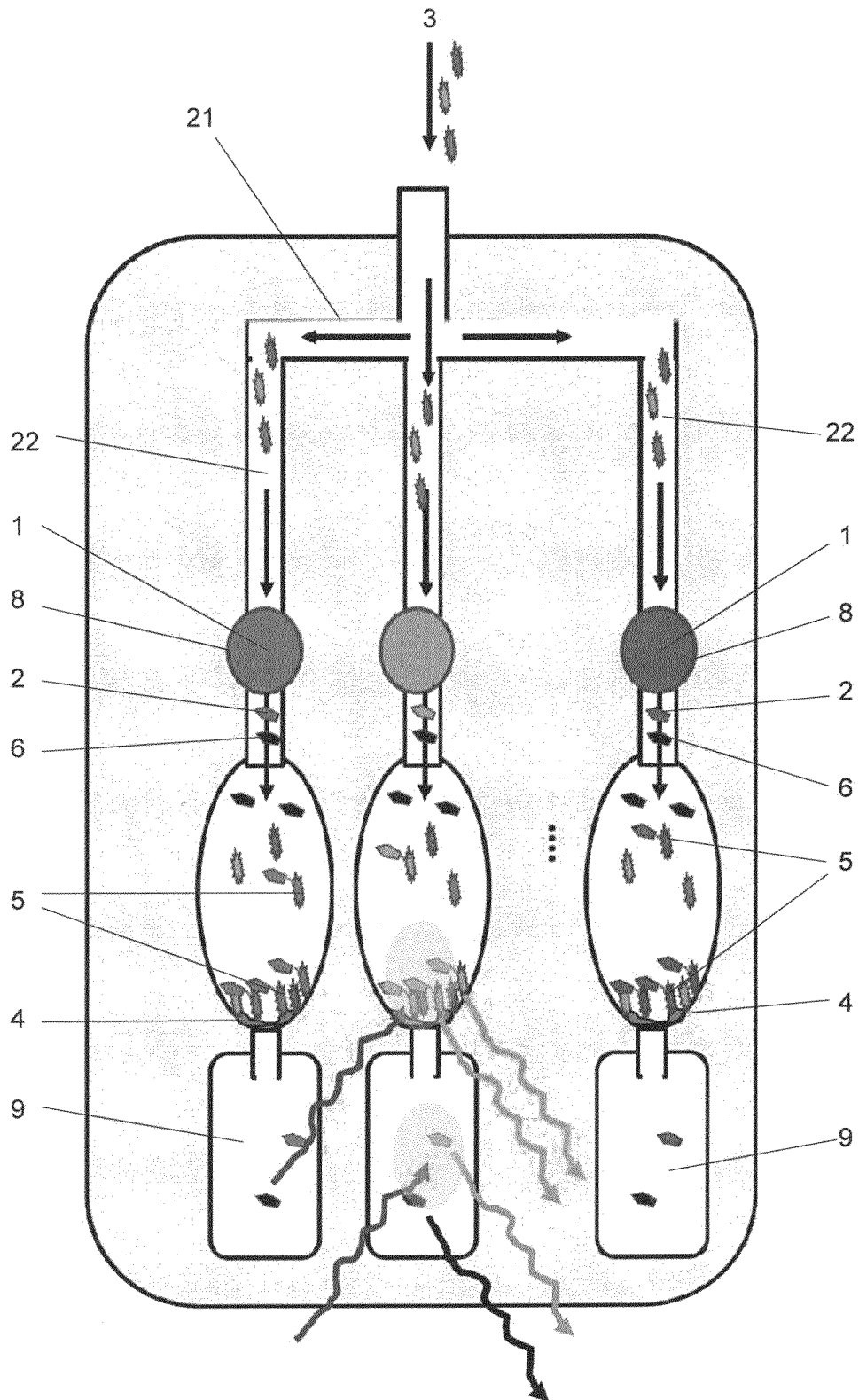
45

50

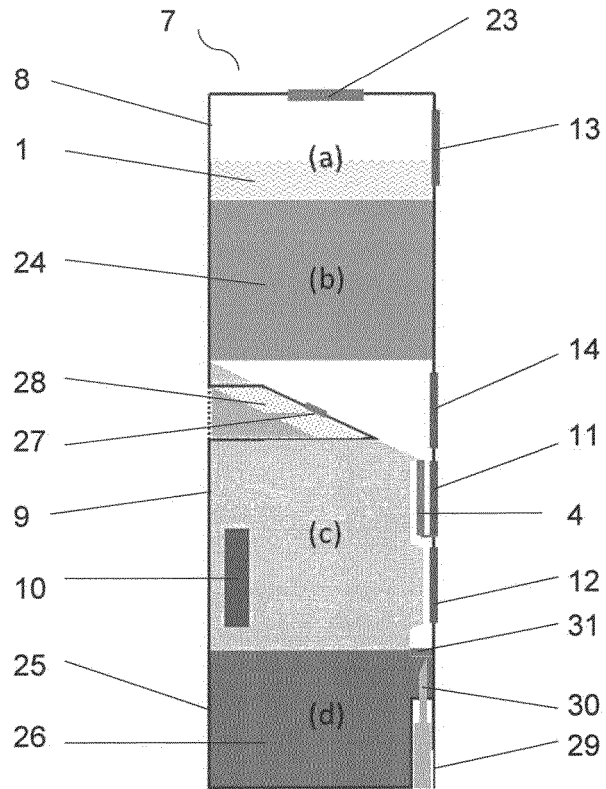
55



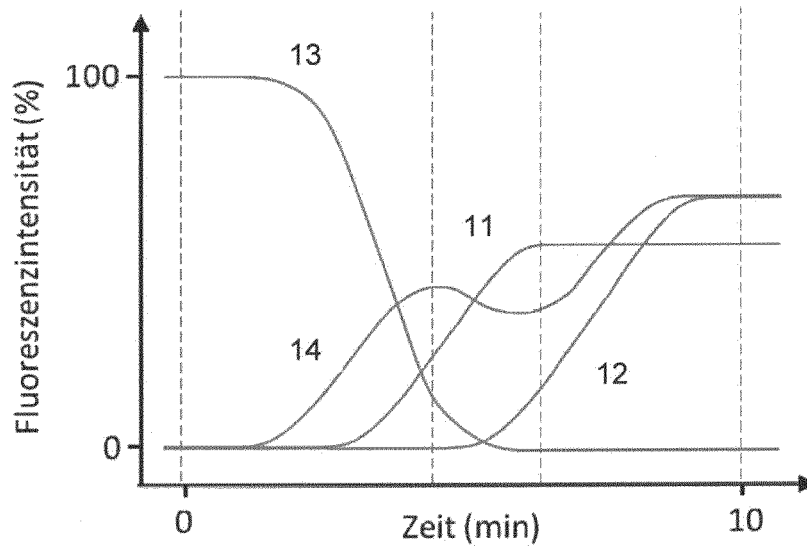
Figur 1



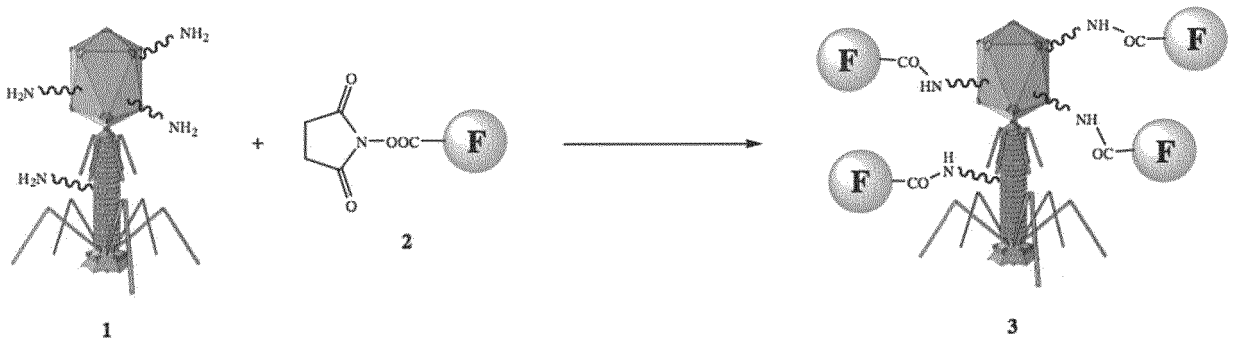
Figur 2



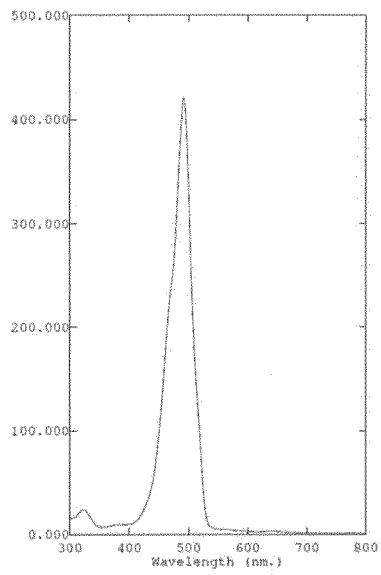
Figur 3 A



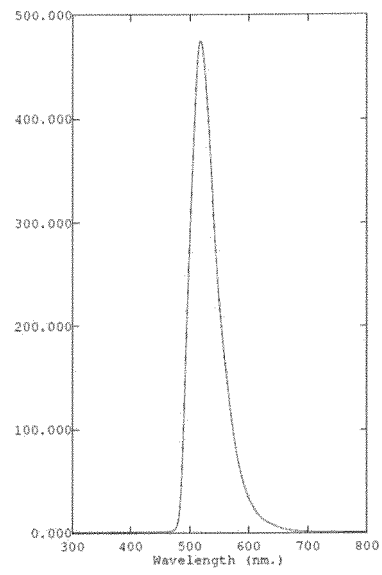
Figur 3 B



Figur 6

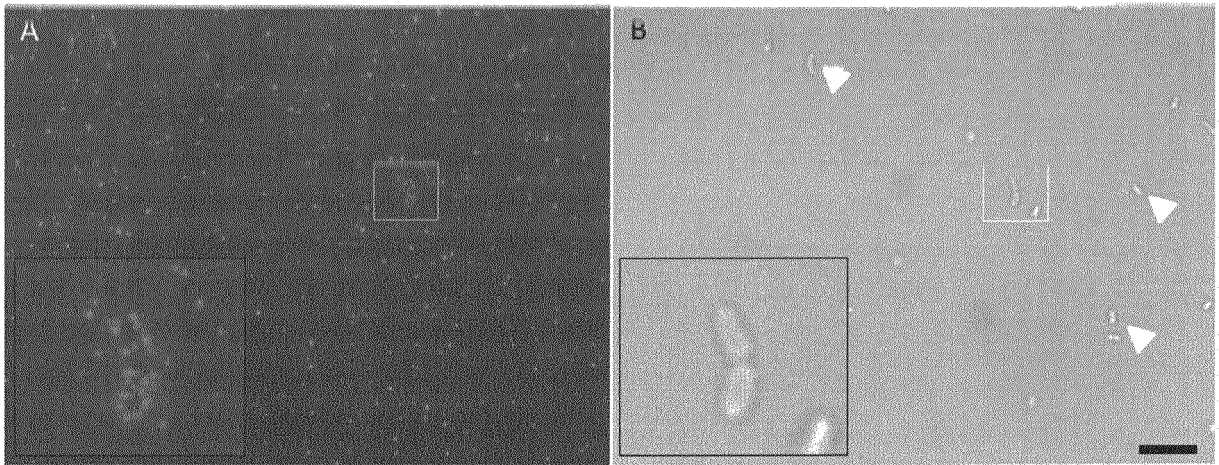


Anregungsspektrum

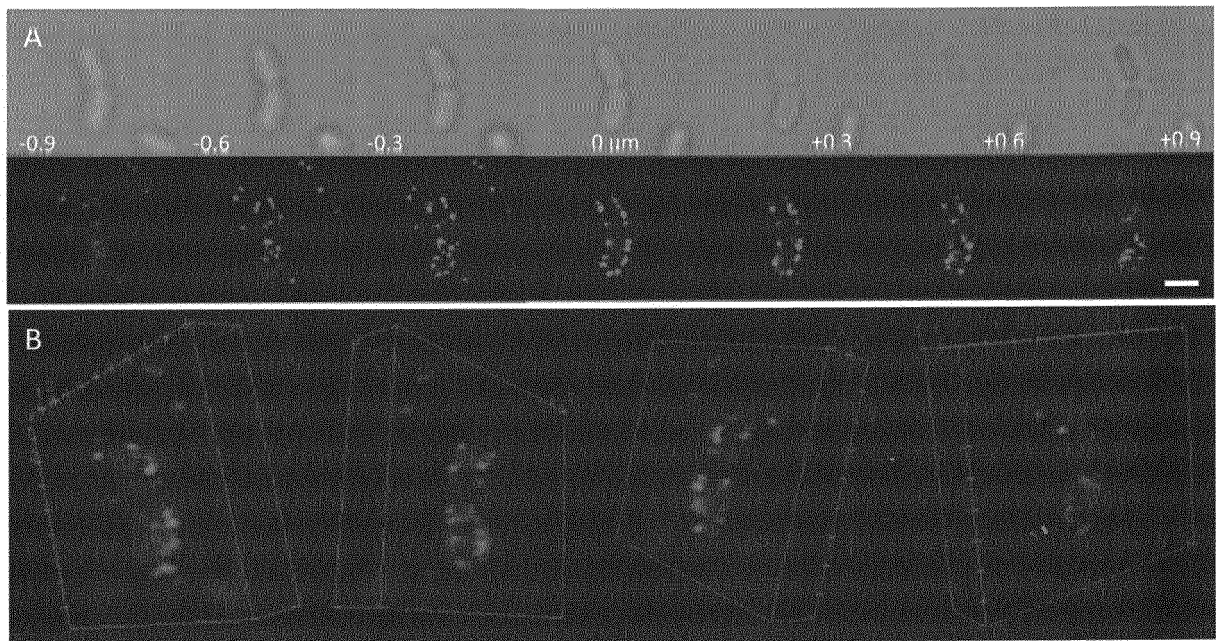


Emissionsspektrum

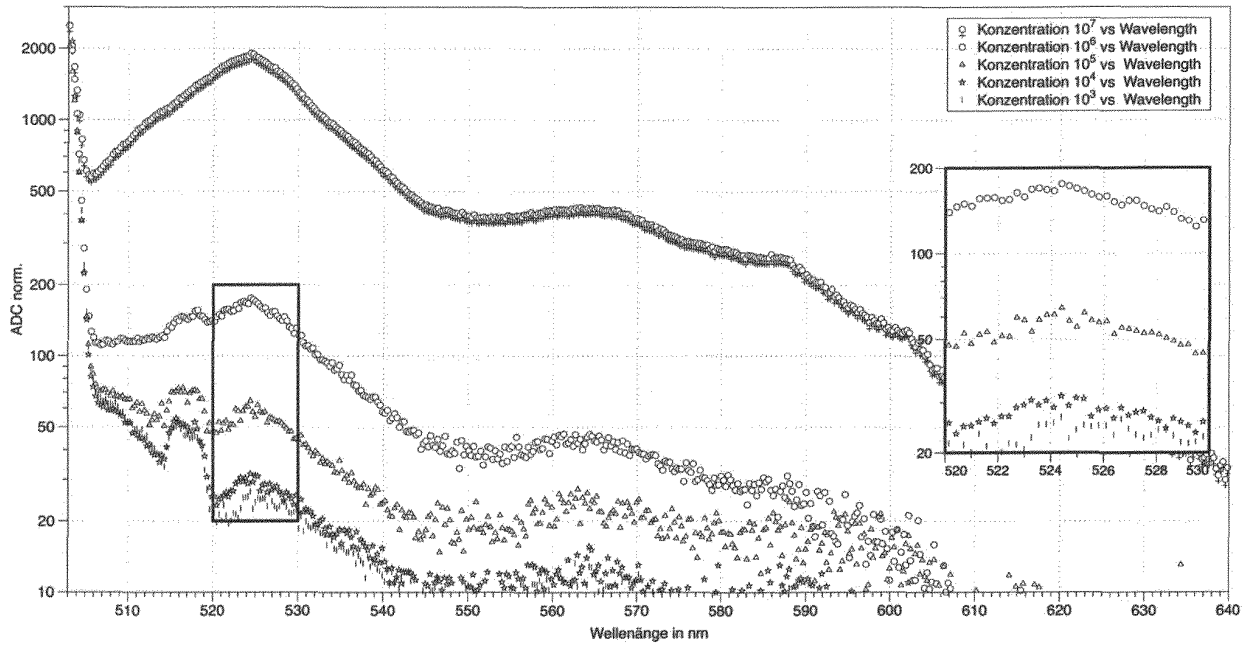
Figur 7



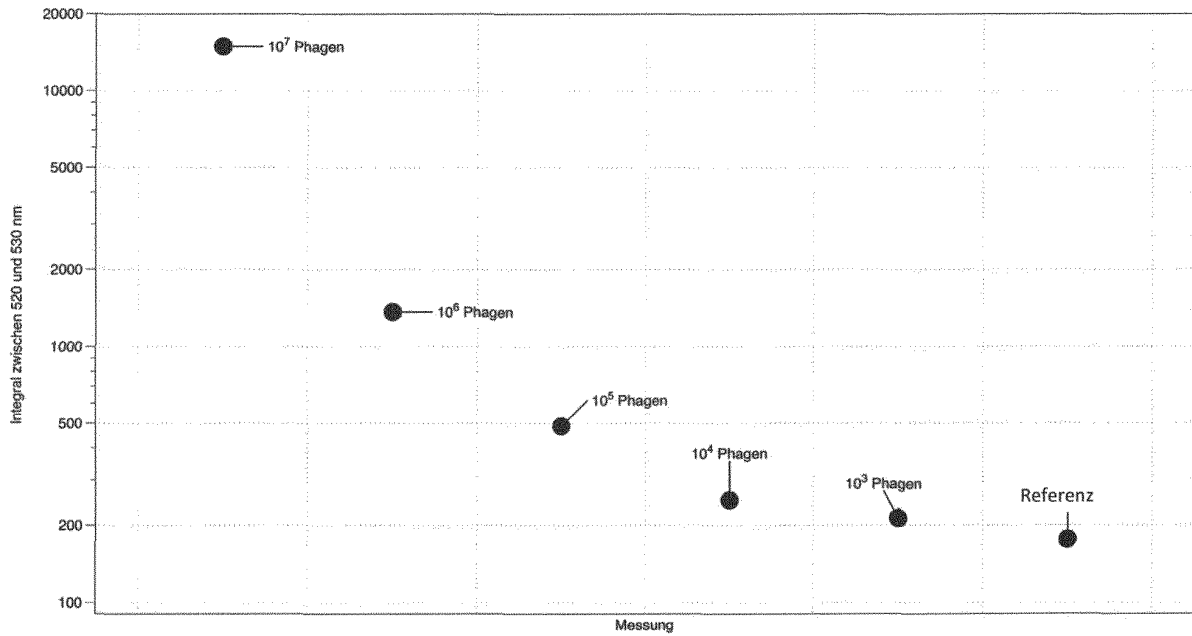
Figur 8



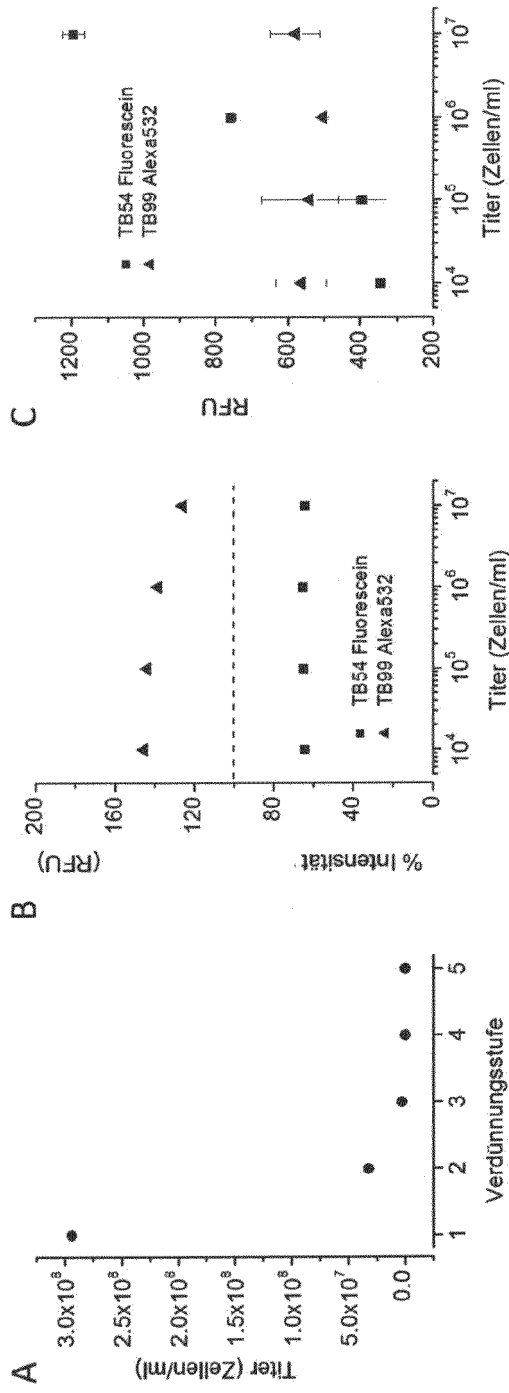
Figur 9



Figur 10 A



Figur 10 B



Figur 11

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 2006105504 A1 [0002]
- US 20010006783 A1 [0002]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **C. ROHDE ; J. SIKORSKI.** Bakteriophagen - Vielfalt, Anwendung und ihre Bedeutung für die Wissenschaft vom Leben. *Naturwiss. Rundschau*, 2011, vol. 64, 5-14 [0002]
- **A. THANKI ; D. MALIK ; M. CLOKIE.** The Development of a Reporter Phage for the Identification. *Clostridium difficile, Bacteriophages*, 2015 [0002]
- **MOSIER-BOSS et al.** Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species, *Applied Spectroscopy*, 2003, vol. 57, 1138-1144 [0002]
- **P.A. MOSIER-BOSS et al.** Use of Fluorescently Labeled Phage in the Detection and Identification of Bacterial Species. *Applied Spectroscopy*, 2003, vol. 57, 1138-1144 [0002]
- Isolation, Characterization. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. vol. 1 [0022]
- Interactions. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, 2009, vol. 501 [0022]
- **JAYE, D.L. ; EDENS, H.A. ; MAZZUCHELLI, L. ; PARKOS, C.A.** Novel G protein-coupled responses in leukocytes elicited by a chemotactic bacteriophage displaying a cell type-selective binding peptide. *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, 7250 [0027]