

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 981 968**

(51) Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)
G01N 21/55 (2014.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2018 PCT/GB2018/052154**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19025771**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2018 E 18755238 (5)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3662264**

(54) Título: **Método y aparato para análisis bacteriano**

(30) Prioridad:

31.07.2017 GB 201712279

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.10.2024

(73) Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRISTOL (100.0%)
Beacon HouseQueens Road
Bristol BS8 1QU, GB**

(72) Inventor/es:

**ANTOGNOZZI, MASSIMO;
BERMINGHAM, CHARLOTTE;
BALRAM, KRISHNA COIMBATORE y
ULTON, RUTH**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 981 968 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y aparato para análisis bacteriano

Antecedentes de la invención

5 Recientemente, el aumento de la resistencia antimicrobiana se ha vuelto problemático para el tratamiento de infecciones bacterianas. Por lo tanto, existe la necesidad de que la resistencia antimicrobiana se detecte más rápidamente y a un menor coste.

10 El documento US 2017/0045514 A1 divulga una prueba rápida de susceptibilidad a antibióticos (AST) basada en la detección y cuantificación del movimiento de células bacterianas individuales con una tecnología plasmónica de obtención de imágenes y rastreo (PIT). La AST basada en PIT detecta cambios en la actividad metabólica de las células bacterianas mucho antes de la replicación celular, y permite una AST rápida tanto para cepas cultivables como no cultivables. PIT rastrea el movimiento 3D con resolución subnanométrica y resolución temporal de milisegundos.

El sistema plasmónico de obtención de imágenes y rastreo usa una fuente de luz, un portaobjetos recubierto metálico y un detector.

15 Maximilian Kloucek *ET AL*: "Detecting metabolic activity of living bacteria using evanescent waves", URC/IAS Undergraduate Interdisciplinary Research Internship Scheme (IRIS) 2016, 22 de noviembre de 2016, divulga la detección de movimientos de bacterias sobre un cubreobjetos aminofuncionalizado, en donde se usó un microscopio de reflexión interna total basado en lentes de objetivo para medir fluctuaciones bacterianas relacionadas con su actividad metabólica.

20 El documento WO 2007/077218 A1 divulga diferentes disposiciones para detectar luz dispersada y/o de guía de ondas de muestras en un biochip usando un campo evanescente para iluminar las muestras.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 y 8.

Un primer aspecto de la invención proporciona un aparato como se define en la reivindicación 1.

Con tal disposición, se proporciona un aparato más simple para detectar resistencia antimicrobiana.

25 La luz del volumen de unión a bacterias puede ser cualquier luz que contenga información con respecto al nivel de vibración de las bacterias. Esta puede ser luz que han dispersado las bacterias debido a su movimiento en el campo evanescente y/o puede ser luz que se ha reflejado totalmente de manera interna y tiene así el perfil de la luz incidente excepto que la luz carece de los fotones que están en la luz dispersada.

30 La fuente de luz puede ser una fuente de luz láser. Con tal disposición, el campo evanescente puede crearse de manera más fiable.

El aparato puede comprender además una lente dispuesta para dirigir la luz desde la fuente de luz hacia el sustrato. Con tal disposición, el campo evanescente puede producirlo la luz que llega en un ángulo más cercano al ángulo crítico.

35 La lente puede ser una lente de apertura numérica alta, que tiene una apertura numérica de 1,4 o más, tal como 1,41. Con tal realización, el campo evanescente puede producirse con un tamaño suficientemente grande.

La lente puede disponerse para recibir luz del volumen de unión a bacterias. Con tal disposición, la luz del volumen de unión a bacterias puede dirigirse hacia el detector sin el uso de un mayor número de lentes.

40 El detector puede ser un detector de fotodiodo de cuadrante. Con tal disposición, puede determinarse el movimiento de las bacterias en cuatro sectores diferentes con el fin de que la vibración de las bacterias en el volumen de unión pueda medirse con más precisión.

La vibración determinada puede ser de una sola bacteria. Con tal disposición, no se requiere cultivo de bacterias de modo que el proceso global de determinación de la resistencia antimicrobiana puede hacerse más rápidamente.

45 El aparato puede comprender además un cubreobjetos dispuesto para soportar el volumen de unión a bacterias. Con tal disposición, se proporciona un soporte transparente para el volumen de unión a bacterias de modo que el campo evanescente puede crearse sin luz procedente de la fuente de luz que se desplaza a través del volumen de unión a bacterias.

La fuente de luz y la lente pueden disponerse para hacer que la luz experimente una reflexión interna total en la superficie del cubreobjetos. Con tal disposición, el campo evanescente puede situarse correctamente para contener bacterias unidas por el volumen de unión a bacterias.

El campo evanescente puede crearse sobre la superficie de un cubreobjetos. Con tal disposición, el campo evanescente está situado correctamente para que se vea afectado por las vibraciones de las bacterias unidas dentro del volumen de unión a bacterias.

5 El campo evanescente puede tener una longitud de desintegración de no más de doscientos nanómetros. Con tal disposición, el campo evanescente no se extenderá mucho más allá de las bacterias, con el fin de que la dispersión de luz pueda estar provocada solamente por las bacterias.

Según la presente invención, el primer detector está dispuesto para recibir luz dispersada por las bacterias en el volumen de unión. Con tal disposición, las bacterias pueden analizarse con menos procesamiento.

10 Según la presente invención, el aparato comprende además un segundo detector dispuesto para recibir luz de la fuente de luz que ha experimentado reflexión interna total, que no está dispersada por las bacterias. Con tal disposición, el segundo detector proporciona una comprobación para determinar si los datos recibidos desde el primer detector son correctos y pueden usarse para medir las fluctuaciones de las bacterias.

15 El aparato puede comprender además una segunda fuente de luz, estando dispuesta la segunda fuente de luz para dirigir la luz a través del cubreobjetos, experimentando la luz de la segunda fuente de luz múltiples reflexiones internas dentro del cubreobjetos. Con tal disposición, pueden detectarse las vibraciones de múltiples bacterias con el fin de dar una determinación de la resistencia antimicrobiana con el aparato en uso durante un tiempo más corto. El cubreobjetos puede estar formado por un material dieléctrico que tiene un índice de refracción mayor de 1,6. Con una disposición de este tipo, las reflexiones internas totales pueden producirse de manera fiable.

20 El aparato puede comprender además una segunda fuente de luz y una guía de ondas óptica dispuesta para soportar el volumen de unión a bacterias, la segunda fuente de luz dispuesta para dirigir la luz a través de la guía de ondas óptica. Con tal disposición, se proporciona una disposición alternativa sin el uso de un cubreobjetos.

La guía de ondas óptica puede ser cónica en un punto dentro del campo evanescente. Con tal disposición, el aparato puede ser más sensible a las vibraciones de las bacterias dentro del campo evanescente, teniendo una relación señal-ruido mayor.

25 El aparato puede comprender además un dispositivo de obtención de imágenes CMOS o CCD dispuesto para observar las bacterias. Con tal disposición, puede hacerse una medición manual del nivel de vibración con el fin de comprobar un resultado automatizado.

30 Las vibraciones dentro de cada bacteria pueden registrarse y almacenarse como grabación de video. La grabación puede tener una alta resolución de manera que un observador pueda analizar visualmente las vibraciones. Con tal disposición, el vídeo puede analizarse para dar una medición de la actividad bacteriana alternativamente o además de la medición obtenida del detector sensible a la posición.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método como se define en la reivindicación 8.

35 La luz detectada puede ser cualquier luz que contenga información con respecto al nivel de vibración de las bacterias. Según la presente invención, la luz detectada es luz que han dispersado las bacterias debido a su movimiento en el campo evanescente y luz que se ha reflejado totalmente de manera interna y tiene así el perfil de la luz incidente excepto que la luz carece de los fotones que están en la luz dispersada.

Con tal disposición, se proporciona un método más sencillo para determinar la resistencia antimicrobiana. La determinación puede comprender determinar el movimiento de las bacterias en tres dimensiones. Con tal disposición, puede obtenerse una imagen más precisa del movimiento de las bacterias.

40 La determinación puede comprender determinar el movimiento de bacterias individuales. Con tal disposición, no hay necesidad de cultivar y, por lo tanto, puede reducirse el tiempo total requerido para la determinación de la resistencia antimicrobiana.

La disposición puede comprender absorber las bacterias al cubreobjetos. En tal disposición, las bacterias pueden estar adecuadamente restringidas a permanecer dentro del campo evanescente.

45 El método puede comprender además determinar el estado vital de las bacterias a partir de las vibraciones. Con tal disposición, puede hacerse una determinación más completa con respecto a la resistencia antimicrobiana.

La luz puede ser luz láser. Con tal disposición, el campo evanescente puede producirse fiablemente.

50 La luz puede dirigirse hacia el cubreobjetos mediante una lente y la lente también está dispuesta para recibir luz del cubreobjetos. Con tal disposición, la luz puede dirigirse adecuadamente sobre el cubreobjetos y dirigirse hacia un detector sin el uso de dos lentes. El detector puede ser un detector de fotodiodo de cuadrante. Con tal disposición, puede detectarse el movimiento de las bacterias entre cuatro cuadrantes diferentes con el fin de dar una imagen completa de la vibración de las bacterias.

El campo evanescente puede tener una longitud de desintegración de no más de doscientos nanómetros. Con tal disposición, el campo evanescente está dimensionado apropiadamente de tal manera que la luz no se dispersa por elementos distintos de bacterias.

5 Según la presente invención, la primera luz detectada es luz que han dispersado las bacterias en el volumen de unión a bacterias. Con tal disposición, las bacterias pueden analizarse con menos procesamiento de los datos.

Según la presente invención, el método comprende además detectar la segunda luz de la fuente de luz, que ha experimentado una reflexión interna total y no está dispersada por las bacterias, con un segundo detector. Con tal disposición, se proporciona un sistema para comprobar los datos producidos por el primer detector con el fin de proporcionar un resultado más fiable.

10 El método puede comprender además dirigir la luz desde una segunda fuente de luz a través del cubreobjetos, experimentando la luz desde la segunda fuente de luz múltiples reflexiones internas totales dentro del cubreobjetos. Con tal disposición, pueden detectarse dispersiones de múltiples bacterias para dar una determinación de la resistencia antimicrobiana con menos tiempo empleado usando el aparato.

15 El método puede comprender además dirigir luz desde una segunda fuente de luz a través de una guía de ondas óptica, experimentando la luz de la fuente de luz múltiples reflexiones internas totales dentro de la guía de ondas óptica. Con tal disposición, se proporciona un método alternativo que no requiere el uso de un cubreobjetos.

La guía de ondas óptica puede ser cónica en un punto dentro del campo evanescente. Con tal realización, el aparato puede ser más sensible a la vibración de bacterias para dar una mayor sensibilidad para determinar la resistencia antimicrobiana.

20 La determinación puede llevarse a cabo mediante un procesador. Con tal disposición, la determinación puede llevarse a cabo más rápidamente.

El método puede comprender además añadir un antimicrobiano al cubreobjetos. Con tal disposición, puede hacerse una determinación con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana.

25 La disposición de bacterias sobre el cubreobjetos puede comprender además poner en contacto una porción de las bacterias con un antimicrobiano y tener una porción de las bacterias sin contacto con el antimicrobiano. Con tal disposición, puede hacerse más rápidamente una determinación con respecto a la resistencia antimicrobiana.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirán realizaciones de la invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra una disposición global según una realización de la invención.

30 La figura 2 muestra un dibujo detallado de una disposición de cubreobjetos o guía de ondas según una realización alternativa de la invención.

La figura 3 muestra un dibujo detallado de una disposición de guía de ondas cónica en una realización alternativa de la invención.

Descripción detallada de la realización/realizaciones

35 La figura 1 muestra un sistema global para observar vibraciones de bacterias 26 con el fin de determinar la resistencia antimicrobiana.

En un sistema de detección antimicrobiano 10, se encuentra una fuente 12 de luz, que es preferentemente una fuente de luz láser, por ejemplo, que tiene una longitud de onda de 561 nanómetros. La fuente 12 de luz produce un haz 14 de luz que se refracta a continuación por una lente 16. La lente 16 puede ser una lente de apertura numérica alta, combinada con aceite de inmersión 40 que refracta el haz 14 de luz de tal manera que la luz incide en la superficie superior de un cubreobjetos 20 en un ángulo mayor que el ángulo crítico y se refleja totalmente de manera interna. Un experto en la técnica entenderá que el ángulo crítico es una función de los índices de refracción del cubreobjetos 20 y el medio por encima del cubreobjetos 20.

45 Mientras que la lente 16 que tiene una abertura numérica igual a la del medio por encima de la lente 16 (aproximadamente 1,33 si el medio es agua) daría como resultado una reflexión interna total y la creación de un campo evanescente, la lente 16 que tiene una abertura numérica de 1,4 o mayor puede producir un campo evanescente de tamaño apropiado para el análisis de bacterias.

50 El cubreobjetos 20 puede ser un cubreobjetos de vidrio delgado disponible comercialmente. El cubreobjetos 20 también puede proporcionarse por separado del resto del sistema 10 e intercambiarse por diferentes cubreobjetos que tienen diferentes bacterias y diferentes grosores según requiera cada usuario. Aunque el cubreobjetos 20 puede no ser parte del sistema 10, el sistema 10 incluye un soporte 18 de cubreobjetos. Por lo tanto, el sistema 10 puede

disponerse de manera que el sistema 10 funcione correctamente cuando el cubreobjetos 20 se coloque sobre el soporte 18 de cubreobjetos, sin que el cubreobjetos 20 este presente en el momento de la disposición.

- 5 La luz 14 incidente sobre la superficie superior del cubreobjetos 20 forma un campo evanesciente 22 que forma un círculo sobre la superficie del cubreobjetos con una distribución de intensidad gaussiana y una longitud de desintegración máxima de aproximadamente 200 nanómetros. Son posibles otras configuraciones para el campo evanesciente 22; por ejemplo, el campo puede ser elíptico y tener una distribución de intensidad no gaussiana. El campo evanesciente 22 interactúa con objetos sobre la superficie del cubreobjetos tales como bacterias 26.
- 10 Las bacterias 26 se unen elásticamente al cubreobjetos 20 usando anticuerpos 24 de manera que las bacterias permanecen aproximadamente en el centro del campo evanesciente 22. El cubreobjetos 20 puede prepararse limpiando en primer lugar usando etanol, luego agua destilada y secando en una corriente de nitrógeno. La superficie se functionaliza entonces con amino usando clorhidrato de etanolamina, lo que da como resultado una cobertura de grupos amino unidos covalentemente al vidrio al que pueden unirse los anticuerpos 24. Los anticuerpos 24 usados deben ser los específicamente dirigidos para unirse a las bacterias 26.
- 15 El cubreobjetos 20 puede formar un sustrato y los anticuerpos 24 sobre el cubreobjetos 20 pueden formar un volumen de unión a bacterias para unir las bacterias 26 en su sitio.
- En uso, la luz que han dispersado las bacterias se transmite entonces desde el cubreobjetos como luz dispersada 28. La luz pasa a través de la lente 16 y hacia un primer detector 32, que puede ser un detector de fotodiodo de cuadrante, que produce entonces datos 36 para proporcionarlos a un sistema informático 38.
- 20 Un fotodetector de cuadrante puede monitorizar tanto la intensidad de luz como la posición de la intensidad de pico. Por lo tanto, puede usarse un fotodetector de cuadrante para determinar la distancia desde el cubreobjetos 22 hasta las bacterias 26 por la magnitud de la intensidad de pico de la luz detectada. La posición de las bacterias 26 dentro del plano del cubreobjetos 22 puede determinarse entonces por la posición de la intensidad de pico detectada. Alternativamente, puede usarse una matriz de fotodetectores tales como CMOS o CCD para determinar la posición de las bacterias.
- 25 La luz que se ha reflejado por la superficie superior del cubreobjetos 20 se transmite desde el cubreobjetos como un haz 30 de luz no dispersada, que, opcional o alternativamente, también pasa a través de la lente 16 y hasta un segundo detector 34. El segundo detector 34 produce segundos datos 37 que se transfieren a un sistema informático tal como el sistema informático 38. Como entenderá el experto, en otros ejemplos, que no son según la presente invención, puede omitirse el primer detector 32 o el segundo detector 34 del sistema, pero según la presente invención, se usan ambos detectores. El segundo detector 34 puede ser un fotodetector de cuadrante idéntico al del primer detector 32, o puede ser una matriz de fotodetectores.
- 30 Para dirigir la luz desde la fuente 12 de luz hasta el cubreobjetos 20 y desde el cubreobjetos 20 hasta los fotodetectores 32, 34, el sistema puede comprender espejos 39.
- 35 El sistema informático 38 contiene un medio legible por ordenador no transitorio y un procesador, contenido el medio legible por ordenador no transitorio instrucciones para el análisis de los datos 36, 37 por el procesador con el fin de proporcionar resultados a un técnico para su análisis.
- 40 Cuando se usa el sistema 10, las bacterias 26 pueden disponerse sobre el cubreobjetos 20 usando los anticuerpos 24 y las vibraciones de las bacterias 26 pueden registrarse y almacenarse por el sistema informático 38. A continuación, puede añadirse un antimicrobiano a la superficie del cubreobjetos 20 y la vibración posterior de las bacterias 26 sobre el cubreobjetos 20 puede registrarse mediante el sistema informático 38.
- 45 Si las bacterias 26 se disponen en un entorno líquido, entonces el antimicrobiano puede añadirse al entorno líquido, ya sea parcial o totalmente. Si el antimicrobiano se añade sólo a una parte del entorno, entonces las bacterias 26 pueden separarse espacialmente sobre el cubreobjetos 20 de modo que pueden analizarse al mismo tiempo un grupo de bacterias 26 sin contacto con el antimicrobiano y un grupo de bacterias 26 en contacto con el antimicrobiano. Alternativamente, puede estar presente un grupo de bacterias 26 sin contacto con el antimicrobiano antes de la adición del antimicrobiano y las mismas bacterias 26 pueden observarse después de la adición del antimicrobiano.
- 50 Si los dos grupos de bacterias 26 están separadas en el espacio (se analizan al mismo tiempo), entonces puede producirse un ahorro de tiempo, mientras que si los dos grupos están separados en el tiempo, entonces puede usarse un tamaño de muestra mayor.
- 55 Una vez que el sistema informático 38 recoge los datos 36, 37, se procesan. En el procesamiento, el nivel de actividad de las bacterias 26 después de la adición del antimicrobiano puede compararse con el nivel de actividad de las bacterias 26 antes de la adición del antimicrobiano.
- Si el nivel de actividad de una bacteria ha aumentado significativamente, entonces puede suponerse que la bacteria se ha liberado del anticuerpo 24 y el resultado puede descartarse. Si el nivel de actividad ha permanecido aproximadamente constante, entonces puede considerarse que la bacteria no se va a afectada por el

antimicrobiano, y si la bacteria ha reducido significativamente su actividad, entonces puede considerarse que la bacteria se ha visto afectada por el antimicrobiano. Los antimicrobianos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos.

La determinación de si un cambio en un nivel de actividad es significativo puede determinarse mediante pruebas estadísticas estándar, tal como requiriendo que el cambio sea mayor del 5 % para que sea significativo y determinando de otro modo que el nivel está aproximadamente sin cambios.

El análisis anterior puede repetirse hasta que pueda alcanzarse una determinación en cuanto a si las bacterias presentan o no resistencia antimicrobiana.

La figura 2 muestra una imagen aumentada de una disposición 100 de cubreobjetos o guía de ondas que incluye un cubreobjetos 116, que funciona como una guía de ondas alargada. Para funcionar como una guía de ondas, el cubreobjetos 116 puede tener un índice de refracción mayor de 1,6 y, opcionalmente, ser un cubreobjetos de zafiro. El cubreobjetos funcionará entonces como una guía de ondas en el aparato 10 de la figura 1, en particular en presencia de aceite de inmersión 40.

Una segunda fuente 112 de luz proporciona luz 114 que entra en el cubreobjetos 116 y experimenta múltiples reflexiones internas totales. Cuando se somete a las múltiples reflexiones internas totales, la luz 114 crea un campo evanescente 118, que contiene bacterias 122 unidas al cubreobjetos por anticuerpos 120. Como anteriormente, la actividad de las bacterias 122 dentro del campo evanescente 118 da como resultado dispersión de la luz 114. La luz sale del cubreobjetos 116 como un haz 115 de luz, que se ve afectado por las bacterias 122. Un detector 124 de luz recibe el haz 115 de luz.

La segunda fuente 112 de luz puede ser una fuente de luz láser igual a la primera fuente 12 de luz, y el detector 124 de luz puede ser un fotodetector de cuadrante o uno o más de detectores CMOS O CCD, que pueden tener las mismas propiedades que los detectores primero y segundo 32, 34. Alternativamente, puede usarse un detector más simple que mida sólo la intensidad de la luz pero no la posición.

La disposición 100 de cubreobjetos mostrada en la figura 2 puede combinarse con el sistema 10 de la figura 1 o puede usarse por sí sola, según se requiera. Si la disposición 100 de cubreobjetos de la figura 2 se combina con el sistema 10 de la figura 1, entonces la luz dispersada por las bacterias 122 puede detectarse por los detectores de luz de la figura 1.

En uso, el campo evanescente producido por el haz 114 de luz en el cubreobjetos 116 de la disposición 100 de cubreobjetos puede abarcar múltiples bacterias de manera que la luz se dispersa por más de una única bacteria. Por lo tanto, el haz 115 de luz que sale del cubreobjetos 116 y se detecta por el detector 124 de luz contiene datos producidos por interacciones relacionadas con múltiples bacterias 122.

En la figura 3 se muestra una guía 216 de ondas óptica cónica. El sistema 200 de la figura 3 es similar al sistema 100 de la figura 2. En este sistema, una fuente 212 de luz proporciona un haz 214 de luz que experimenta múltiples reflexiones internas totales dentro de la guía 216 de ondas óptica y crea un campo evanescente 218 que contiene bacterias 222 unidas a la fibra óptica 216 por anticuerpos 220. Las vibraciones de las bacterias 222 dan como resultado cambios en el haz de luz 214, lo que da como resultado un haz 215 de luz diferente que sale de la fibra óptica 216, que se detecta por el detector 224.

La guía 216 de ondas cónica difiere del cubreobjetos 116 debido a los lados cónicos de la guía 216 de ondas cónica. El estrechamiento de la guía 216 de ondas cónica da como resultado que la guía de ondas sea más delgada en el medio, de manera que el sistema global puede ser más sensible a las vibraciones dentro del campo evanescente 218. Aunque el estrechamiento se muestra en ambos lados de la guía 216 de ondas cónica, el estrechamiento puede tener lugar en un solo lado o en ambos lados. Si el estrechamiento tiene lugar en un solo lado, entonces este lado puede ser el lado superior o el lado inferior.

La guía 216 de ondas no debe tener ningún revestimiento en el exterior, ya que esto permite que el campo evanescente 218 se exponga de manera que las bacterias 222 puedan disponerse dentro del campo evanescente.

El procesamiento para las disposiciones 100 y 200 de cubreobjetos puede ser sustancialmente similar y diferente del procesamiento para el sistema 10. En el procesamiento de los datos producidos a partir de las disposiciones 100 y 200 de cubreobjetos, cada conjunto de datos contiene detalles de múltiples bacterias y vibraciones agregadas. Por lo tanto, el análisis adopta una visión general más amplia, con actividad calculada para conjuntos de bacterias en lugar de para bacterias individuales. Por lo tanto, existe menos necesidad de repetir lecturas con los datos producidos por las disposiciones 100 y 200 de cubreobjetos.

Cuando aparece la palabra "o", debe interpretarse que significa "y/o" de manera que los elementos a los que se hace referencia no son necesariamente excluyentes mutuamente y pueden usarse en cualquier combinación apropiada.

Aunque la invención se ha descrito anteriormente con referencia a una o más realizaciones preferidas, se apreciará que pueden realizarse diversos cambios o modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato que comprende:

un sustrato que define un volumen de unión a bacterias sobre el mismo;

5 una fuente (12) de luz dispuesta para emitir luz (14) hacia el sustrato, de manera que la luz se refleja totalmente de manera interna sobre la superficie del sustrato para crear de ese modo un campo evanescente (22), de manera que el volumen de unión a bacterias está dentro del campo evanescente;

10 un detector (32) dispuesto para recibir luz dispersada (28) desde el volumen de unión a bacterias y emitir primeros datos (36);

15 un segundo detector (34), dispuesto para recibir luz (30) desde la fuente (12) de luz que ha experimentado una reflexión interna total dentro del sustrato, que no está dispersada por las bacterias (26) y emitir segundos datos (37); y

un sistema informático (38) dispuesto para recoger los primeros y segundos datos (36, 37), comprendiendo el sistema informático (38) un procesador, estando configurado el procesador para determinar un nivel de vibración de bacterias (26) dentro del volumen de unión a bacterias en tres dimensiones a partir de los primeros datos (36) y para determinar si los primeros datos (36) recibidos desde el primer detector (32) son correctos basándose en los segundos datos (37).

2. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además una lente (16) dispuesta para dirigir la luz desde la fuente (12) de luz hacia el sustrato, opcionalmente, en donde la lente tiene una apertura numérica de al menos 1,4.

20 3. El aparato de la reivindicación 2, en donde la lente (16) está dispuesta para recibir luz del volumen de unión a bacterias.

4. El aparato de cualquier reivindicación anterior, en donde la vibración determinada es de una sola bacteria.

25 5. El aparato de cualquier reivindicación anterior, en donde el sustrato está formado por un cubreobjetos (20) dispuesto para soportar el volumen de unión a bacterias, y

en donde el campo evanescente se crea sobre la superficie del cubreobjetos.

25 6. El aparato de la reivindicación 5, que comprende además una segunda fuente (112) de luz, estando dispuesta la segunda fuente de luz para dirigir la luz a través del cubreobjetos (20), experimentando la luz de la segunda fuente (112) de luz múltiples reflexiones internas totales dentro del cubreobjetos (20), opcionalmente en donde el cubreobjetos está formado a partir de un material dieléctrico que tiene índice de refracción mayor de 1,6.

30 7. El aparato de cualquier reivindicación anterior, que comprende además una segunda fuente (112, 212) de luz y en donde el sustrato funciona como una guía (116, 216) de ondas óptica dispuesta para soportar el volumen de unión a bacterias, estando la segunda fuente (112, 212) de luz dispuesta para dirigir la luz a través de la guía (116, 216) de ondas óptica, opcionalmente, en donde la guía (216) de ondas óptica se estrecha en un punto dentro del campo evanescente.

8. Un método que comprende:

35 disponer una o más bacterias (26) sobre una superficie de un cubreobjetos (20);

dirigir la luz (14) desde una fuente (12) de luz hacia el cubreobjetos (20) para que se refleje totalmente de manera interna sobre la superficie del cubreobjetos y crear de ese modo un campo evanescente (22) sobre la superficie del cubreobjetos, estando las bacterias dentro del campo evanescente;

detectar una primera luz (28) del campo evanescente que han dispersado las bacterias;

40 detectar una segunda luz (30) de la fuente de luz que se ha reflejado totalmente de manera interna dentro del cubreobjetos (20) y no dispersada por las bacterias;

emitir primeros datos (36) basándose en la primera luz detectada (28);

emitir segundos datos (37) basándose en la segunda luz detectada (30);

recoger los primeros y segundos datos (36, 37);

45 determinar un nivel de vibración de las bacterias a partir de los primeros datos detectados (36); y

determinar si los primeros datos (36) son correctos basándose en los segundos datos (37) y pueden usarse para medir las fluctuaciones de las bacterias a partir de la segunda luz detectada.

9. El método de la reivindicación 8, en donde la determinación comprende determinar el movimiento de las bacterias (26) en tres dimensiones, y/o en donde la determinación comprende determinar el nivel de vibración de bacterias individuales, y/o, en donde la luz se dirige hacia el cubreobjetos mediante una lente (16) y la lente también se dispone para recibir luz del cubreobjetos.

5 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, que comprende además dirigir la luz desde una segunda fuente de luz (112) a través del cubreobjetos, experimentando la luz de la segunda fuente de luz múltiples reflexiones internas totales dentro del cubreobjetos.

10 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además dirigir luz desde una segunda fuente (112, 212) de luz a través del cubreobjetos que funciona como una guía (116, 216) de ondas óptica, experimentando la luz de la segunda fuente de luz múltiples reflexiones internas totales dentro de la guía (216) de ondas óptica, opcionalmente, en donde la guía de ondas óptica se estrecha en un punto dentro del campo evanescente.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende además obtener y almacenar una grabación de vídeo que muestra la vibración de las bacterias (26) a partir de la luz detectada.

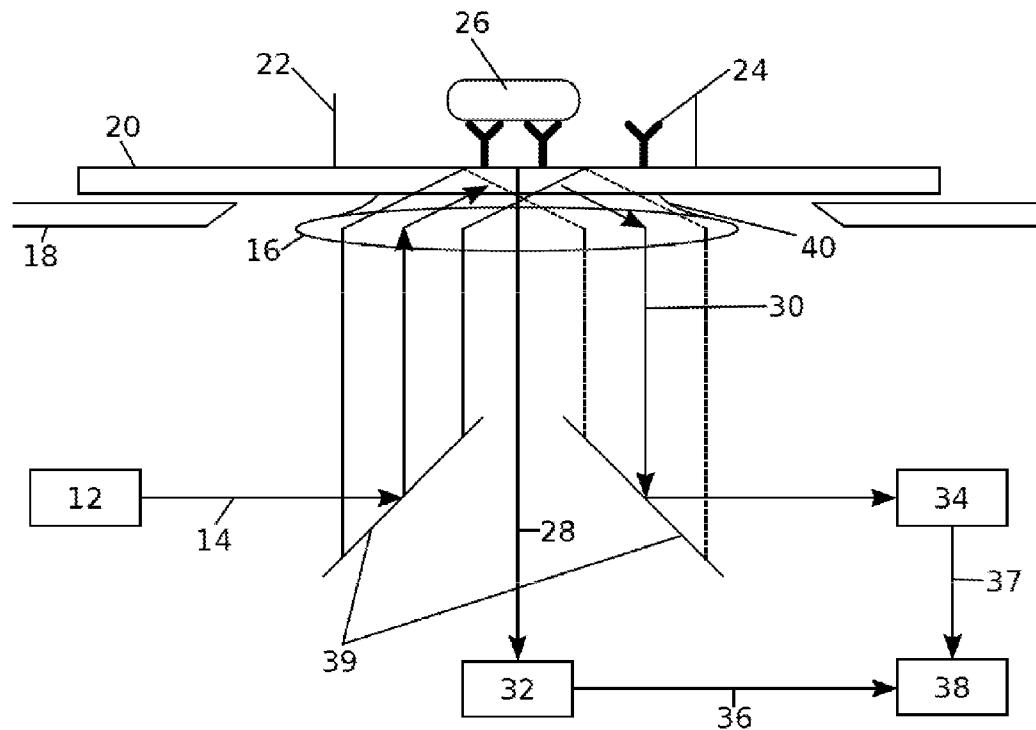


Fig. 1

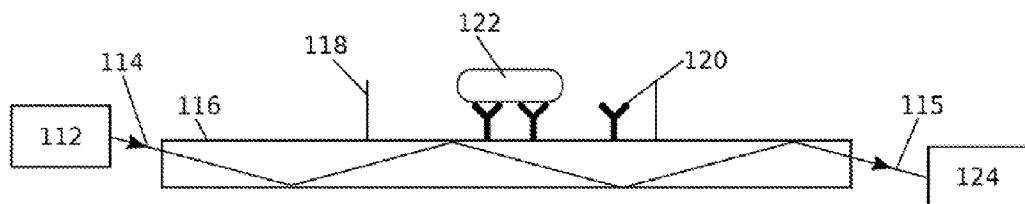


Fig. 2

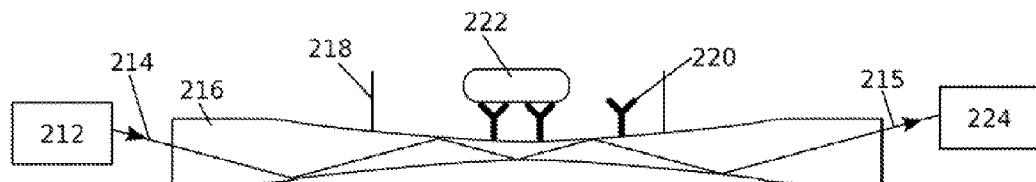


Fig. 3