



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 748**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02758725 .2**

96 Fecha de presentación : **24.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1412470**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Procedimiento automatizado para detectar organismos patógenos en agua.**

30 Prioridad: **24.07.2001 FR 01 09841**
24.07.2001 US 307171 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2011

73 Titular/es: **Société d'Aménagement Urbain et Rural**
1, avenue Eugène Freyssinet
78280 Guyancourt, FR

72 Inventor/es: **Huau, Marie-Christine y**
Schalkhammer, Thomas

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

La presente invención se refiere al sector técnico general de la detección de organismos patógenos en agua.

En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento totalmente automatizado para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua. La invención se refiere también a un dispositivo para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua, para llevar a cabo este procedimiento.

La presencia de agentes patógenos en redes de suministro de agua, tales como redes de agua potable o aguas industriales, genera riesgos reales para la salud de los seres humanos. De este modo, las redes de suministro de agua, en gran parte, contienen organismos patógenos, tales como virus, bacterias, protozoos, hongos, amebas o gusanos, que son capaces de provocar varias enfermedades en los humanos. Entre estas enfermedades, se pueden mencionar, *inter alia*, el cólera, la fiebre tifoidea, la diarrea, la disentería, la legionelosis, o la gastroenteritis.

Entre los organismos patógenos responsables de dichas enfermedades, se pueden mencionar más particularmente los protozoos *Cryptosporidium* (parvum) y *Giardia Lamblia*, que se originan ambos en residuos fecales humanos y animales y que son una de las causas principales de enfermedades gastrointestinales, los protozoos *Toxoplasma gondii* y *Naegleria fowleri*, que se originan también en residuos fecales humanos y animales y que provocan varias enfermedades importantes, *Cyclospora*, que provocan diarrea, y bacterias coliformes, en particular *Escherichia coli*, que se encuentran por toda la biosfera y cuya detección es importante ya que se considera que no son agentes patógenos típicos, sino organismos que indican la contaminación del agua, puesto que provocan enfermedades únicamente en concentraciones muy elevadas. En el contexto de la presente invención, con el fin de simplificarla, todos los organismos que indican contaminación del agua y todos los organismos patógenos realmente responsables de enfermedades en humanos se incluirán en la expresión "organismos patógenos". Entre los organismos patógenos responsables de enfermedades, se pueden mencionar también las bacterias *Salmonella*, incluyendo los serotipos *S. enteridis*, *S. enterica*, *S. typhi* y *S. paratyphi*, que son la causa del 70% de las enfermedades bacterianas de origen alimentario, en particular la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea, y que son la causa de un número elevado de muertes, *Helicobacter pylori*, que es un organismo vinculado a la causa de por lo menos el 75% de todas las úlceras de estómago y a dos tipos de cáncer de estómago, y que es también la causa de un número elevado de muertes, y *Legionella*, que se encuentra en áreas naturales y también en sistemas de calentamiento de agua, y que provoca la enfermedad del legionario, y también virus de origen humano y animal, y, en particular, virus de hepatitis A, virus de tipo Norwalk, rotavirus, adenovirus, enterovirus y reovirus. Los virus Norwalk en particular provocan enfermedades gastrointestinales esporádicas y epidémicas con diarrea. En Estados Unidos, se detectaron aproximadamente 200.000 de estos últimos por año.

Dada la presencia de varios agentes patógenos en todas las redes de suministro de agua, estas últimas se deberían controlar y posiblemente desinfectar antes de que el agua proveniente de estas redes se pueda considerar como agua potable. Con respecto a las redes de aguas residuales o de suministro de agua de refrigeración, y también las redes de producción de energía, en particular, las redes de producción de energía nuclear, en ocasiones es necesario analizar el agua, e incluso desinfectarla, antes de que la misma se pueda reutilizar o desechar hacia el entorno circundante.

La detección de la presencia de organismos patógenos, en particular la detección de organismos altamente patógenos de crecimiento lento, que son los más difíciles de detectar, representa por lo tanto un desafío importante en las áreas del tratamiento del agua, de la distribución del agua y del control de la calidad del agua. Las técnicas convencionales para detectar agentes patógenos, desarrolladas hasta la fecha, presentan varios inconvenientes: no se usan continuamente o en tiempo real, tienen una sensibilidad relativamente baja con respecto a organismos patógenos y demuestran ser largas y caras en términos de material y personal.

Una primera técnica conocida usa el recuento de microorganismos que se desarrollan después de cultivar la muestra en varios medios nutrientes selectivos. Esta técnica es sencilla pero presenta riesgos considerables de error y de artefactos (especificidad deficiente de criterios morfológicos, ausencia de desarrollo de microorganismos de crecimiento lento, crecimiento exponencial en el medio nutriente de cepas bacterianas que, en realidad, están en la fase de latencia del crecimiento en la muestra). Adicionalmente, su tiempo de respuesta es generalmente mayor que 24 horas.

Una segunda técnica, que usa la medición de una o más actividad/actividades enzimáticas, permite la cuantificación rápida de poblaciones de microorganismos vivos (microorganismos que se pueden cultivar y/o microorganismos que se encuentran en forma viable pero que no se pueden cultivar) (WO 90/100983). Esta técnica en particular permite la monitorización de un conjunto de poblaciones, pero no posibilita la obtención de un grado muy preciso de especificidad.

Una tercera técnica, que usa sondas inmunológicas, tiene un tiempo de respuesta que es frecuentemente mayor que 24 horas, y normalmente carece de sensibilidad y especificidad (se pueden observar artefactos debidos a reacciones cruzadas).

La patente US nº 6.187.530 da a conocer un automuestreador acuático para registrar la presencia de microorganismos en muestras de agua. El agua recogida se hace pasar a través de un filtro de disco y el filtrado se hace pasar a sensores químicos aguas abajo. Las partículas recogidas en el filtro de disco se pueden someter a uno o más reactivos para aplicar sondas moleculares que marcan especies específicas o provocan lisis celular in situ. Después de descargar el filtro de disco, se examinan las células mediante microscopía electrónica.

Otras técnicas recientes usan sondas de oligonucleótidos específicas que en general se marcan para permitir su detección después de la hibridación con sus dianas. Se han desarrollado dos tipos principales de sonda de oligonucleótidos: sondas con ADN (o los ARNm que se corresponden con los mismos) como diana, y sondas con ARNr (ARN ribosómicos como diana). No obstante, las sondas con ADN o ARNm, aunque son potencialmente muy específicas, tienen el inconveniente de ser relativamente insensibles debido al bajo número de copias de ADN (o ARNm) por célula microbiana.

Existe, por lo tanto, una necesidad de desarrollar un procedimiento y un dispositivo para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua, no presentando dicho procedimiento y dicho dispositivo los inconvenientes de los planteamientos de la técnica anterior y posibilitando, por lo tanto, que se lleve a cabo la detección en continuo de varios microorganismos patógenos en el agua en un periodo de tiempo muy breve (menor que 6 horas), de forma menos costosa y con una sensibilidad y una especificidad elevadas, haciendo que resulte posible obtener un límite de detección de 1 organismo en 100 ml de muestra de agua analizada y que se respeten, por lo tanto, las normativas impuestas sobre la calidad del agua potable.

La presente invención satisface esta necesidad. El presente solicitante ha descubierto por lo tanto, de forma sorpresiva, que esto se podría llevar a cabo con la ayuda de un procedimiento y un dispositivo, controlados de forma completamente automática, que se pueden usar a escala industrial, preferentemente adoptando como base la técnica de amplificar ADN o ARN que usa una reacción en cadena de polimerasa (PCR), o una técnica similar.

Por lo tanto, el procedimiento según la presente invención está completamente automatizado y no contiene ninguna etapa manual. Se basa en la detección de secuencias de ADN o ARN específicas para ciertos microorganismos patógenos. En la técnica anterior ya se ha descrito la automatización de ciertas etapas individuales, pero hasta ahora no se ha diseñado nunca la automatización de la totalidad de las etapas secuenciales del procedimiento según la presente invención. De este modo, la extracción sobre un soporte sólido y la purificación de ácidos nucleicos presentes en una muestra de líquido ya han sido automatizadas y se han descrito en las solicitudes de patente WO 00/75623 y WO 97/10331. De modo similar, en la solicitud de patente WO 00/33962 ya se han diseñado la automatización de la amplificación de ácidos nucleicos llevada a cabo por una reacción en cadena de polimerasa (PCR), y también la detección de organismos por fluorescencia. No obstante, hasta el momento no se han superado nunca los problemas que se encuentran al llevar a cabo la automatización de las cinco etapas secuenciales del procedimiento según la presente invención.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua, que comprende la sucesión de las etapas tal como se define en la reivindicación 1.

El agua analizada en el procedimiento para detectar la presencia de organismos patógenos se puede tomar de redes de suministro, tales como redes de agua potable, redes de aguas industriales o residuales, redes de suministro de agua de refrigeración, o redes de producción de energía, en particular redes de producción de energía nuclear.

Los organismos patógenos detectados son preferentemente bacterias, virus, hongos y/o protozoos.

El volumen de partida de la muestra de agua es mayor que 50 mililitros, preferentemente entre 100 ml y 10 litros, más preferentemente entre 2 y 3 litros.

Según la presente invención, en el procedimiento de detección es necesaria la amplificación de ácidos nucleicos con el fin de poder detectar un mínimo de un agente patógeno, y preferentemente entre 1 y 5 agentes patógenos, en la muestra de agua analizada.

La amplificación de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real. La PCR es una técnica de amplificación usada comúnmente. La técnica de PCR (Rofls *et al.*, 1991) requiere la elección de pares de cebadores de oligonucleótidos que bordean el fragmento que se debe amplificar. Los principios generales y las condiciones para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos por PCR son bien conocidos para aquellos expertos en la materia, y se describen, en particular, en las patentes US nº 4.683.202; nº 4.683.195 y nº 4.965.188.

Se pueden usar ventajosamente otras técnicas similares para amplificar ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) como alternativa a la PCR (de tipo PCR) que usa pares de cebadores de secuencias nucleotídicas. La expresión "de tipo PCR" pretende designar todos los métodos que usan reproducciones directas o indirectas de secuencias de ácidos nucleicos, o en los cuales se han amplificado los sistemas de marcado, siendo conocidas estas técnicas, evidentemente, para aquellos expertos en la materia. Se pueden mencionar, en particular, la técnica SDA (Amplificación por Desplazamiento de Cadenas) (Walker *et al.*, 1992), la técnica TAS (Sistema de Amplificación Basado en Transcripción) descrita por Kwoh *et al.* (1989), la técnica 3SR (Replicación de Secuencia Autosostenida) descrita por Guatelli *et al.* (1990), la técnica NASBA (Amplificación Basada en Secuencias de Ácido Nucleico) descrita por Kievitis *et al.* (1991), la técnica TMA (Amplificación Mediada por Transcripción), la técnica LCR (Reacción en Cadena de la Ligasa) descrita por Landegren *et al.* (1988), la técnica RCR (Reacción en Cadena de Reparación) descrita por Segev (1992), la técnica CPR (Reacción Cíclica con Sondas) descrita por Duck *et al.* (1990) y la técnica de amplificación de replicasa Q-beta descrita por Miele *et al.* (1983). Algunas de estas técnicas han sido mejoradas desde entonces. Por lo tanto, según la presente invención, la detección específica de agentes patógenos se puede llevar a cabo usando dichas técnicas para amplificar ácidos nucleicos a alta velocidad.

Al comparar la técnica de amplificación por PCR o mediante una técnica similar, tal como la NASBA, con técnicas convencionales para detectar agentes patógenos, tales como el cultivo celular, el presente Solicitante ha descubierto que es posible reducir el espacio de tiempo requerido para el ensayo desde unas pocas semanas o unos pocos días a unas pocas horas. Adicionalmente, la amplificación por PCR o una técnica similar resulta sencilla de llevar a cabo y los costes iniciales, igual que los costes posteriores para llevar a cabo la PCR, demuestran ser considerablemente menores que los costes generados para llevar a cabo técnicas de cultivo celular. Adicionalmente, una PCR se puede usar para identificar una forma específica de los agentes patógenos que se encuentran en el agua. Se puede usar por lo tanto para detectar el estado infeccioso de un organismo, demostrando la presencia o ausencia de ADN o de ARN específico para el agente patógeno. La amplificación por PCR según la invención posibilita también la obtención de un procedimiento con una alta sensibilidad, de forma ventajosa mayor que 1 picogramo, e incluso de forma más ventajosa mayor que unos pocos femtogramos de ácidos nucleicos.

El presente solicitante ha descubierto también que el uso de la amplificación por PCR (o una técnica similar) seguida por una detección específica *in situ*, en tiempo real, por ejemplo por fluorescencia, produce datos analíticos referentes a la detección y a la identificación de los organismos de una manera más rápida y más precisa que cualquier otro sistema de detección basado en biochips. Los biochips posibilitan la detección de un número mucho mayor de especies patógenas que el detectado usando la PCR en continuo, pero, sobre la base de agentes patógenos conocidos (que se pueden someter a prueba de forma más eficaz como grupos), la PCR en tiempo real es mucho más eficaz y proporciona una especificidad mejor que los biochips hibridados convencionales. Adicionalmente, la hibridación de chips, que permite que los microorganismos se hagan entrar en contacto con una sonda de ADN y/o ARN, dura varias horas, e incluso, con frecuencia, incluye una incubación durante la noche, lo cual es significativamente más largo que la amplificación en tiempo real del ADN o del ARN.

Se puede usar una gran variedad de cebadores para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente por PCR, según la presente invención, estando ya disponibles algunos de estos cebadores en bases de datos o en la literatura, y habiéndose desarrollado ya algunos otros para organismos específicos.

Se puede usar una PCR anidada, dividiendo la PCR en dos etapas, para obtener una selectividad máxima con respecto a los agentes patógenos cuya detección en el agua se pretende. La primera PCR se lleva a cabo con la muestra completa (típicamente varios tubos de entre 100 y 200 microlitros con solamente unas pocas moléculas de ADN) usando un conjunto de cebadores degenerados y una máquina termocicladora convencional. Después de una amplificación durante unos pocos ciclos (por ejemplo, entre 10 y 15 ciclos) a una temperatura elevada (entre 75 y 100°C), el fluido, que contiene entonces por lo menos varios miles de copias de cada ADN, se puede dividir en un cierto número de viales en una segunda máquina de PCR, usando unos medios de muestreo y distribución automáticos, tales como un robot. A continuación, a cada vial se le adiciona un segundo conjunto de cebadores, y a continuación se lleva a cabo una segunda amplificación de ácidos nucleicos usando una detección en continuo, por ejemplo, por fluorescencia. Por lo tanto, será posible usar la primera amplificación para amplificar ácidos nucleicos de grupos de agentes patógenos usando un conjunto de cebadores (degenerados) universales, mientras que la segunda amplificación posibilitará la determinación, de forma precisa, de las especies presentes en la muestra analizada, usando un conjunto de cebadores que son específicos de los agentes patógenos cuya detección se pretende. En esta forma de realización particular de la presente invención, la detección se lleva a cabo mientras se efectúa la segunda PCR mientras que no se lleva a cabo ninguna detección mientras se efectúa la primera PCR, que únicamente amplifica ácidos nucleicos.

Mientras que en el sector médico se utiliza el análisis de muestras de sangre de entre unos pocos microlitros y unos pocos mililitros, en las investigaciones y el control relacionados con el entorno, se analizan habitualmente muestras que tienen volúmenes que pueden llegar hasta varias decenas de litros. No obstante, las técnicas directas para romper las células de los organismos abriéndolas no se pueden llevar a cabo sobre unos volúmenes tan elevados, y los organismos patógenos, cuya detección se pretende según el procedimiento de la presente invención, se deben concentrar a la baja hasta volúmenes menores que 100 ml antes de que se les pueda aplicar el resto del tratamiento. Adicionalmente, las normas medioambientales imponen que se debe demostrar que un organismo está ausente en 100 ml de muestra de agua analizada. La dificultad en la concentración de organismos patógenos obtenidos a partir de muestras del orden de un litro de agua es la pérdida del menor número posible de organismos al mismo tiempo que la reducción del volumen de la muestra hasta un volumen de aproximadamente cien ml.

Según la presente invención, la concentración de los organismos patógenos se lleva a cabo por precipitación, coprecipitación o precipitación por inclusión. Dicha concentración de organismos partiendo de volúmenes de muestras de aproximadamente un litro posibilita, por lo tanto, disponer de un procedimiento altamente sensible y respetar las normas impuestas sobre la calidad del agua. Específicamente, cuanto mayor sea el volumen de una muestra, mayor será la sensibilidad y más precisos serán los datos analíticos. Adicionalmente, el procedimiento de detección según la presente invención posibilita detectar la presencia de menos de 10 organismos en volúmenes de muestras iniciales de entre 100 ml y 10 litros, preferentemente entre 2 y 3 litros. Además, aunque los instrumentos de la competencia usan o bien filtración o bien captura mediante partículas magnéticas como primera etapa de concentración, la precipitación por inclusión resulta más eficaz en términos de atrapar una amplia variedad de organismos, y más económica, y permite el tratamiento de muestras altamente contaminadas. Según la presente invención, la concentración de los organismos patógenos incluye el muestreo automático de muestras de agua analizadas.

Todavía más ventajosamente, la concentración de los organismos patógenos se puede llevar a cabo en presencia de iones metálicos y de carbonato divalentes, seleccionados, de forma ventajosa, de entre el grupo constituido por carbonato de calcio, carbonato de estroncio y carbonato de bario. El medio de reacción se lleva a una

temperatura relativamente alta, preferentemente comprendida entre aproximadamente 40 y 60 °C, para permitir la formación rápida, en unos pocos minutos, de un precipitado que contiene varios agentes patógenos, simplemente por sedimentación y sin fuerza gravitacional adicional. Para obtener una sedimentación eficaz, los reactivos, tales como los iones de carbonato divalentes, no se adicionan al medio de reacción todos a la vez, sino que se adicionan paso a paso. Después de la formación del precipitado, en el cual se adsorben los diversos agentes patógenos de la muestra de agua o dentro del cual quedan atrapados estos últimos, el líquido sobrenadante se retira y el precipitado se disuelve en un ácido, tal como ácido fórmico. A continuación, el medio de reacción que contiene el precipitado disuelto se neutraliza con un agente tampón.

De forma ventajosa, la etapa para romper las células abriéndolas, que viene a continuación de la correspondiente a la concentración de los organismos patógenos, se puede llevar a cabo por molienda con perlas agitadas. A efectos de la presente invención, la expresión "romper las células abriéndolas" pretende significar la ruptura o lisis de las células de los organismos patógenos, destinada a liberar el contenido, y en particular los ácidos nucleicos, de estas células. Las condiciones de funcionamiento para esta etapa se ajustan con el fin de evitar cualquier modificación de los ácidos nucleicos. La etapa para romper las células abriéndolas se lleva a cabo usando volúmenes de muestras analizadas de aproximadamente entre 10 y 100 ml, preferentemente de 50 ml, y se ha diseñado para tener lugar preferentemente en un sistema semicontinuo usando perlas agitadas por una fuente intensa de energía con el fin de provocar una ruptura de las células de los organismos por medio de colisiones e impactos directos. Las partículas para la división con abertura, se mantienen en la cámara divisora (cámara de fractura), mientras que las células que han sufrido la ruptura tras las colisiones generadas por las partículas, y los ácidos nucleicos liberados por lo tanto desde las células, se liberan de la cámara de fractura, permitiendo de este modo que la molienda de las perlas funcione de una manera semicontinua.

Ventajosamente, las perlas se pueden agitar con ultrasonidos (lo cual generalmente deriva en fragmentos de ADN bastante pequeños de aproximadamente entre 100 y 200 bp), por agitación mecánica o por vibración mecánica, preferentemente durante aproximadamente hasta diez minutos o una cifra similar. Todavía más ventajosamente, según la presente invención, las perlas se agitan por agitación o vibración mecánica, usado por ejemplo una configuración giratoria, lo cual deriva generalmente en un tamaño de fragmentos de ADN de entre 200 y 2.000 kB. El aumento de temperatura creado durante la agitación y colisión de las partículas también parece contribuir a la eficacia de la rotura que deja abiertas las células. La adición de agentes químicos o de enzimas, tales como proteasas, también puede fomentar la división con abertura de las células, en particular mediante la digestión de las paredes celulares.

De forma ventajosa, durante la rotura con abertura de las células, o tras la rotura con abertura de las células y antes de la concentración del ADN y/o del ARN, al medio de la reacción que contiene las células se le puede adicionar por lo menos un agente caotrópico, de forma ventajosa una sal de guanidina, tal como tiocianato de guanidina, y por lo menos un agente modificador de la adsorción, de forma ventajosa un alcohol tal como etanol, preferentemente con la ayuda de bombas y válvulas, con el fin de facilitar la extracción de ADN y/o de ARN de las células y para inactivar las nucleasas, que son enzimas capaces de destruir los ácidos nucleicos. La sal de guanidina, tal como tiocianato de guanidina, se adiciona preferentemente, según la presente invención, con una concentración mayor que un mol por litro. Todavía de forma más ventajosa, al medio de reacción que contiene las células de los organismos patógenos se le puede adicionar una mezcla de agente caotrópico y agente modificador de la adsorción.

De forma ventajosa, la etapa para concentrar ADN y/o ARN, que viene a continuación de la correspondiente para romper las células abriéndolas, se puede llevar a cabo mediante adsorción reversible de los ácidos nucleicos sobre un soporte sólido que contiene un material adsorbente, seguida por la elución de estos ácidos.

Es necesario tener cuidado para evitar que los ácidos nucleicos queden atrapados en las paredes del sistema por adsorción fuerte o irreversible. Especialmente las superficies metálicas tales como los tubos, anillos o recipientes de acero inoxidable, tienen una tendencia elevada a atrapar los ácidos nucleicos y, por lo tanto, de forma ventajosa deben ser evitados. De este modo, todas las piezas metálicas adsorbentes, de forma ventajosa se evitan o eluyen después del contacto con ADN.

Según la presente invención, la etapa para concentrar ADN y/o ARN se corresponde con la extracción y purificación de ADN y/o ARN.

El material adsorbente es de forma ventajosa un material vítreo, que comprende preferentemente grupos hidroxilo tratados superficialmente, o un compuesto basado en sílice.

La elución de los ácidos nucleicos se lleva a cabo de forma ventajosa mediante lavado del material adsorbente usando por lo menos un disolvente que contiene iones monovalentes, seleccionados ventajosamente de entre el grupo constituido por tiocianato de sodio, tiocianato de potasio y EDTA. Por lo tanto, el disolvente según la invención es, de forma ventajosa, un agente complejante realizado con iones monovalentes.

El presente Solicitante ha descubierto por lo tanto, por sorpresa, que la elución de los ácidos nucleicos del soporte de adsorción no se puede llevar a cabo sin la conversión previa del complejo de ácidos nucleicos y de iones divalentes, formado durante la primera etapa de concentración de los organismos, en un complejo consistente en ácidos nucleicos e iones monovalentes. Específicamente, el complejo de ácidos nucleicos y de iones divalentes está unido fuertemente al soporte sólido de adsorción y no se puede desorber y a continuación eluir simplemente mediante un lavado usando un disolvente. La desorción, seguida por la elución, de los ácidos nucleicos resulta solamente posible adicionando un agente complejante realizado con iones monovalentes. De este modo, un agente de este tipo posibilita el

intercambio de los iones divalentes, unidos a los ácidos nucleicos, con iones monovalentes, y la formación, por lo tanto, de un complejo nuevo que se puede desorber mucho más fácilmente que el complejo de ácidos nucleicos/iones divalentes. Después de llevar a cabo el intercambio iónico, se adiciona a continuación un disolvente para finalizar la elución de los ácidos nucleicos. Este disolvente debe ser compatible con la etapa de amplificación que viene a continuación de la etapa destinada a concentrar los ácidos nucleicos, y se selecciona de forma ventajosa de entre el grupo constituido por agua o un tampón diluido.

Según la presente invención, el procedimiento también puede contener una etapa para concentrar el volumen con el fin de obtener volúmenes de aproximadamente cien μ l hasta menos que 1 ml, de forma ventajosa menos que 100 μ l, antes de llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos y después de la etapa destinada a concentrar los ácidos nucleicos.

La etapa para detectar los organismos patógenos, que viene a continuación de la correspondiente a la amplificación de ácidos nucleicos, puede ser una detección en continuo (tiempo real), in situ. La etapa para detectar los organismos patógenos se lleva a cabo preferentemente por fluorescencia, por luminiscencia o por espectrometría de masas. También se puede llevar a cabo mediante otras técnicas de detección bien conocidas para aquellos expertos en la materia, tales como los correspondientes a la hibridación sobre chips o a la amplificación enzimática.

La detección se puede llevar a cabo in situ por fluorescencia. Para obtener una señal de detección, durante la etapa de amplificación se puede adicionar por lo tanto CyberGreen u otro fluoróforo de intercalación bicatenario, posibilitando que se indique el éxito de la amplificación mediante un aumento fuerte de la fluorescencia durante el ciclo. Específicamente, los cebadores marcados usando los fluoróforos hibridan específicamente con el ADN diana de la muestra. Como la reacción de amplificación de PCR genera un número elevado de copias del ADN diana, es posible por lo tanto obtener una cuantificación de la intensidad de la señal de fluorescencia, que está en correlación directa con la cantidad inicial de ADN diana en la muestra analizada.

Para obtener una detección multiespecífica, es decir, detección específica para varios agentes patógenos, en un único vial y para aumentar la especificidad con respecto a estos agentes patógenos, en caso de que sea necesario, a los diversos viales usados durante la amplificación se les pueden adicionar balizas moleculares o trazadores similares. Es posible usar una instrumentación convencional para detectar hasta cuatro especies diferentes por vial.

El procedimiento de detección también puede contener una etapa de filtración previa, antes de llevar a cabo la etapa destinada a concentrar los organismos patógenos. La utilidad de dicha filtración se puede demostrar cuando se analizan muestras de agua bruta o de agua superficial, particularmente muestras contaminadas y cargadas con sustancias problemáticas tales como arena.

El procedimiento de detección también puede contener una etapa previa para tratar la muestra de agua mediante choque térmico y/o mediante un estrés nutricional, y/o adicionando un compuesto químico de inducción de genes con el fin de inducir el ARN de genes específicos y de detectar los organismos patógenos viables en dicha muestra de agua. Específicamente, un choque térmico (un aumento de la temperatura durante unos momentos) o la adición de un compuesto químico induce un conjunto de proteínas, permitiendo, por lo tanto, que se efectúe una reacción de RT (transcriptasa inversa) como primera etapa, cuando se lleva a cabo la primera PCR, lo cual posibilita por lo tanto la obtención de una señal específica de organismos viables. La reacción de RT permite la transformación de ARN en ADN. Si se demuestra que es necesario, se pueden adicionar ADNasas para destruir el ADN nativo. Se obtiene especificidad induciendo un ADN que es específico en un grado elevado.

Un choque térmico se puede llevar a cabo por un impulso de calor durante menos de 3 horas, de forma ventajosa a una temperatura de entre 30 y 50 °C.

Se puede adicionar un compuesto químico de inducción de genes. Dicho compuesto posibilita la inducción del ARN de genes específicos. El compuesto es de forma ventajosa un elemento nutriente, tal como lactosa, o un inductor dirigido, tal como IPTG (Isopropil-(beta)-D-tiogalactopiranosido). Este compuesto químico permite un aumento elevado del nivel de ARN específicos en las células. La duración de la inducción depende del organismo, pero típicamente está aproximadamente entre 2 minutos y 1 hora. Las proteínas inducidas por calor, tales como dnaJ, grpE, hscB, hslJ, hslV, htpG, htpX, htrB, htrC, pphA, pphB, rpoE, degP, groEL, clpA, dnaK, inpA/B y otras proteínas de choque térmico (por ejemplo de las clases pequeñas de HSP, HSP 60, HSP 70, HSP 90, HSP 100 y ubiquitina), son dianas eficaces.

La inducción del ARN de genes específicos también se puede llevar a cabo mediante irradiación de UV, usando sustancias tóxicas como, por ejemplo, cis-platino, anisomicina, tunicamicina, arsenitos, por choque osmótico, mediante etanol o mediante un medio mínimo con, por ejemplo, glicerol como fuente de carbono. A efectos de la presente invención, la expresión "medio mínimo" pretende significar un medio que contiene la cantidad mínima de agentes químicos necesarios para que los organismos sobrevivan.

La inducción es una prueba directa de la viabilidad de la célula. Además, se puede detectar así ARN en forma de muchas copias con una sensibilidad mayor en comparación con el ADN. Aunque la detección de ADN es importante, puesto que el ADN está presente en cada célula en una cantidad fija y, por lo tanto, resulta sencillo realizar una correlación entre el ADN y el número de células, el propio ARN se puede inducir en diversos niveles, posibilitando de este modo la detección de la viabilidad de los organismos patógenos.

De forma ventajosa, el compuesto químico de inducción de genes puede ser lactosa o IPTG para inducir el ARN lac Z. El operón lac Z, que tiene una secuencia única en un cierto número de organismos patógenos, constituye de

hecho una diana útil. La duración de la inducción es aproximadamente unos pocos minutos.

La detección de los organismos patógenos viables en una muestra de agua se lleva a cabo después de haber obtenido una señal de ADN representativa de la presencia de organismos patógenos en dicha muestra de agua. Por lo tanto, la totalidad de las etapas secuenciales del procedimiento para detectar la presencia de organismos patógenos se puede llevar a cabo en primer lugar con el fin de obtener una conclusión sobre la posible contaminación de la muestra de agua analizada. A continuación, si se obtiene una señal de ADN, se lleva a cabo nuevamente la totalidad de las etapas secuenciales del procedimiento excepto una etapa previa destinada a tratar la muestra de agua mediante choque térmico y/o adicionando un compuesto químico de inducción de genes con el fin de inducir el ARN de genes específicos. A continuación, la señal de ADN se compara con la señal de ARN y seguidamente se pueden obtener datos de viabilidad fiables.

De forma ventajosa, el sistema lógico de control consta de por lo menos un ordenador, por ejemplo, del tipo PC, que controla la totalidad de las etapas. De este modo, el sistema lógico de control posibilita el control de las diversas etapas del procedimiento y, al final del procedimiento, la recepción de los datos analíticos referentes a la detección de los organismos.

De forma ventajosa, los datos analíticos referentes a la detección de los organismos se transfieren automáticamente a un sistema de control central. De forma ventajosa, este sistema de control central consta de por lo menos un ordenador. Este sistema de control central podrá agrupar entre sí, analizar y controlar la totalidad de los datos analíticos, por ejemplo, usando bases de datos, e incorporar estos datos en modelos matemáticos que posibilitarán la predicción del nivel de contaminación de las redes de agua analizadas, el tipo de microorganismo presente en estas redes y también la tasa de supervivencia de estos microorganismos.

De forma ventajosa, el procedimiento puede funcionar de forma continua y autónoma durante un periodo de tiempo mayor que o igual a un día, preferentemente entre tres días y siete días. Por ejemplo, este periodo de tiempo depende del número de reactivos usados. Adicionalmente, una muestra de agua determinada se puede someter a ensayo y analizar varias veces al día usando el procedimiento de detección según la presente invención. Para realizar esto, se usan secuencias de ADN específicas (cebadores) y, si fuera necesario, se pueden desarrollar cebadores nuevos. La duración del ensayo para un ciclo de prueba usando el procedimiento según la presente invención se optimiza en un periodo de tiempo que es del orden del tiempo de duplicación de la mayoría de los organismos (de 2 a 6 horas).

Además, un objetivo de la presente invención es un dispositivo, según se define en la reivindicación 19, para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua.

De forma ventajosa, la unidad para amplificar los ácidos nucleicos (4) puede constar de por lo menos una máquina termocicladora de reacción en cadena de polimerasa. La máquina de PCR lleva a cabo ciclos de amplificación secuenciales, efectuándose cada ciclo en un intervalo determinado de temperatura y durante un periodo determinado de tiempo. Si fuera necesario, según la presente invención, la unidad de amplificación consta de dos máquinas termocicladoras de reacción en cadena de polimerasa con el fin de obtener una selectividad máxima con respecto a los agentes patógenos cuya detección en el agua se pretende. Las dos máquinas se usan entonces secuencialmente. La transferencia de los ácidos nucleicos desde una máquina a la otra se lleva a cabo usando medios automáticos de muestreo y distribución (8) y un sistema lógico de control (6) que controla estos medios.

Se puede usar una máquina termocicladora con detección integrada en continuo para detectar la amplificación del ADN específico. Este tipo de máquina consta por lo tanto de una máquina termocicladora de PCR con una cámara integrada de detección en continuo. Cuando se lleva a cabo una PCR anidada, la segunda PCR se lleva a cabo en este tipo de máquina, llevándose a cabo la primera PCR en una máquina termocicladora convencional de reacción en cadena de polimerasa. Dicha máquina se puede adquirir en ciertas empresas tales como Biorad, Cepheid, Perkin Elmer o Roche Molecular Biochemicals. En esta forma de realización particular de la presente invención, la unidad (4) de amplificación y la unidad de detección (5) están agrupadas conjuntamente en la misma máquina.

De forma ventajosa, la unidad para concentrar los organismos patógenos (1) es un reactor realizado con metal, que comprende un sistema para introducir la muestra de agua, que consta de forma ventajosa de válvulas, un sistema para introducir varios reactivos, que consta de forma ventajosa de tubos, de válvulas y de bombas rotativas o accionadas por levas, un sistema de agitación, un sistema para evacuar el líquido sobrenadante, que consta de forma ventajosa de tubos y de válvulas, un sistema para evacuar el precipitado, que consta de forma ventajosa de válvulas y de bombas y situado de forma ventajosa en la parte inferior del reactor, y un sistema de calentamiento que consta de forma ventajosa de una camisa de calentamiento (vaina) situada en torno al reactor.

El reactor está realizado con metal, de forma ventajosa con acero inoxidable, con el fin de obtener una resistencia elevada a los reactivos químicos introducidos en dicho reactor. El reactor, de forma ventajosa, tiene un volumen de entre 100 ml y 10 litros, preferentemente entre 1 y 3 litros. Los propios tubos están realizados, de forma ventajosa, con acero o con plástico.

La introducción de la muestra de agua según la presente invención se lleva a cabo automáticamente a través de válvulas que se abren y cierran con la ayuda del sistema lógico de control (6). La introducción de los diversos reactivos requeridos para concentrar los organismos patógenos se lleva a cabo usando tubos, válvulas y bombas rotativas o accionadas por levas, activándose también dichas válvulas y bombas por medio del sistema lógico de control (6). La agitación y el calentamiento son controlados también por el sistema lógico de control (6). La temperatura interna

del reactor se controla de forma ventajosa usando sensores.

De forma ventajosa, la unidad para romper las células (2) abriéndolas contiene un molino de perlas. De forma ventajosa, las perlas usadas son químicamente inertes y deberían ser suficientemente sólidas como para provocar la ruptura de las células. Las perlas usadas según la presente invención son de forma ventajosa perlas pequeñas, tales como perlas poliméricas, por ejemplo, de plástico, cuyo diámetro puede ir desde unos pocos mm hasta unas pocas decenas de μm . Para mejorar la división con abertura de las células de los organismos patógenos, las perlas son agitadas por una fuente intensa de energía. Las posibles fuentes de energía para agitar las perlas pueden ser fuentes de ultrasonidos, agitadores del tipo agitador rotatorio, dispositivos del tipo Ultradurax, dispositivos del tipo sonotrodo o dispositivos vibradores vigorosos.

De forma ventajosa, la unidad para concentrar ADN y/o ARN (3) contiene uno o más soporte(s) sólido(s) que contiene(n) un material de adsorción reversible para ácidos nucleicos, de forma ventajosa, una pasta vítrea. Por lo tanto, los ácidos nucleicos se pueden concentrar, por ejemplo, usando una columna de absorción porosa que contiene un material vítreo, que comprende preferentemente grupos hidroxilo tratados superficialmente, o un material basado en sílice, lo cual permitirá la adsorción reversible de los ácidos nucleicos al soporte sólido.

Todavía de forma más ventajosa, los soportes sólidos constan de placas de microtitulación que contienen multipocillos, de forma ventajosa placas de 60, 96 ó 384 pocillos, que contienen ellas mismas materiales adsorbentes. Cada pocillo se corresponde con una microcolumna de adsorción reversible.

Todavía de forma más ventajosa, los pocillos de las placas de microtitulación se usan solamente una vez y se mueven automáticamente con el fin de recibir la muestra de líquido que se origina en la unidad para romper las células de los organismos abriéndolas. Se puede inyectar aire comprimido para transportar el fluido hacia los pocillos. La placa está referenciada con respecto a un sistema de coordenadas XY, correspondiéndose la X con el eje a lo largo de la anchura de la placa y correspondiéndose la Y con el eje a lo largo de la placa.

El movimiento automático de la placa, y consecuentemente el de los pocillos que están unidos a los pocillos, tiene lugar a lo largo de los ejes X e Y, por ejemplo, usando el brazo de un autómatas. El movimiento automático se puede activar por medio del sistema lógico del control según la presente invención. En una forma de realización particular de la presente invención, el movimiento automático se lleva a cabo usando un autómatas, que se controla usando un sistema lógico de control (6) que consta de forma ventajosa de un ordenador. De forma ventajosa, el autómatas tiene un brazo que se puede mover en el entorno según un sistema de referencia XYZ.

De forma ventajosa, los pocillos de las placas de microtitulación (o gradillas) se pueden proteger contra la evaporación con una gota de fluido que tenga una densidad específica baja con una tapa transparente.

Después de la elución de las diversas muestras de ácidos nucleicos presentes en los pocillos usados durante la adsorción, todas las muestras líquidas se agrupan conjuntamente para poder llevar a cabo las etapas posteriores con el fin de amplificar los ácidos nucleicos y detectar los organismos patógenos.

De forma ventajosa, la unidad de detección (5) consta de un detector de fluorescencia. De forma ventajosa, el detector de fluorescencia comprende una unidad óptica, tal como una cámara electrónica, que puede registrar los fotones que provienen de los fluoróforos y convertirlos en electrones. Posteriormente, la imagen electrónica es leída y transferida al sistema lógico de control (6).

El funcionamiento del dispositivo según la invención se pondrá más claramente de manifiesto al leer la descripción que se proporciona a continuación en la presente memoria haciendo referencia a la figura 1 adjunta, que ilustra esquemáticamente una forma de realización particular de la presente invención.

El dispositivo de detección según la presente invención comprende por lo menos una unidad para concentrar los organismos patógenos (1), una unidad para romper las células, abriéndolas, de los organismos patógenos (2), una unidad para concentrar (adsorber y a continuación eluir) los ácidos nucleicos (3), una unidad para amplificar los ácidos nucleicos (4), una unidad para detectar los ácidos nucleicos (5), un sistema lógico de control (6) que consta de un ordenador de tipo PC que controla el dispositivo completo, medios de bombeo (7), unos medios automáticos de muestreo y distribución (8) que constan de un autómatas, un sistema de control central (9) comunicado por interfaz con una red (13) que posibilita la transferencia de los datos desde el sistema lógico de control (6) hacia el sistema de control central (9) que consta de un ordenador de tipo PC, un área de refrigeración (10), un sistema de entrada y salida para la muestra (11) de agua y un área (12) para almacenar los reactivos requeridos para las unidades (1), (2), (3), (4) y (5).

De forma ventajosa, la muestra que contiene los organismos patógenos circula desde la unidad destinada a concentrar los organismos patógenos (1) hacia la entrada de la unidad destinada a amplificar los ácidos nucleicos (4), a través de las unidades destinada a romper las células (2) abriéndolas y destinada a concentrar los ácidos nucleicos (3), usando medios de bombeo (7) que constan ventajosamente de tubos equipados de válvulas y/o bombas. De este modo, los medios de bombeo (7) forman un sistema fluídico que puede conectar las unidades (1), (2), (3) y (4). Los medios de bombeo (7) según la invención se activan y controlan mediante el sistema lógico de control (6).

De forma ventajosa, según la presente invención, después de que se haya(n) concentrado el ADN y/o el ARN, los ácidos nucleicos se manipulan, desde la entrada de la unidad destinada a amplificar los ácidos nucleicos (4) hacia la salida de la unidad destinada a detectar los ácidos nucleicos (5), usando medios automáticos de muestreo y distribución (8) que constan ventajosamente de un autómatas. De este modo, las unidades (4) y (5) no están conectadas directamente entre sí (sistema no fluídico). Los medios automáticos de muestreo y distribución según la invención se

activan y controlan mediante el sistema lógico de control (6).

De forma ventajosa, el sistema lógico de control (6) puede constar de por lo menos un ordenador, ventajosamente del tipo PC, que gestiona y controla el dispositivo completo y que recibe, controla y procesa la totalidad de los datos analíticos referentes a la detección de los organismos patógenos.

5 De forma ventajosa, el sistema lógico de control (6) está comunicado por interfaz con una red para transferir, de forma automática o bajo demanda, los datos analíticos referentes a la detección de los organismos hacia un sistema de control central (9).

10 De forma ventajosa, el sistema de control central (9) puede constar de por lo menos un ordenador. Este sistema de control central (9) puede obtener y registrar datos analíticos, y a continuación puede analizarlos y controlarlos.

De forma ventajosa, el dispositivo también puede contener un área de refrigeración (10) para almacenar los reactivos sensibles, preferentemente un bloque de refrigeración, que está protegido contra la condensación del vapor.

15 De forma ventajosa, el dispositivo puede estar conectado directamente a la red de suministro de agua potable para un muestreo automático. De este modo, el dispositivo de detección según la presente invención hace que resulte posible someter a prueba, de una manera completamente automatizada, muestras tomadas de diferentes redes de suministro, tales como la red de agua potable. También se puede reutilizar muchas veces sin necesidad de cambiar las diversas unidades usadas.

Típicamente, la sucesión de las diversas etapas del procedimiento de detección se puede llevar a cabo de forma ventajosa de la manera siguiente:

20 1. La unidad (1) para concentrar los organismos patógenos se enjuaga, se limpia y a continuación se llena con un volumen de entre 100 ml y 5 litros de agua, preferentemente de entre 2 y 3 litros de agua. El agua se introduce en el reactor usando válvulas, cuya abertura se activa mediante un ordenador (6).

25 2. Se adicionan varios reactivos, tales como carbonato de sodio y acetato de calcio, al reactor a través de válvulas y bombas rotativas, que se controlan mediante el ordenador (6). A continuación, se forma un precipitado por inclusión en la parte inferior de la cámara, en el cual se adsorben las células y los ácidos nucleicos de los organismos patógenos.

3. El líquido sobrenadante se deja ir, por ejemplo por acción de gravedad, usando un tubo y una válvula.

4. El precipitado se disuelve usando un ácido, adicionado al reactor a través de una bomba que se activa mediante el ordenador (6). Se adiciona también de la misma manera un agente tampón.

30 5. La solución que contiene los organismos patógenos se transfiere hacia la unidad (2) para romper las células de los organismos abriéndolas, que consta de un molino de perlas, por la acción de la gravedad o a través de la acción de una bomba controlada por el ordenador (6). En esta fase, el volumen de solución que entra en el molino de perlas está entre 10 y 100 ml, preferentemente 50 ml.

35 6. Las células se rompen abriéndose por molienda sobre unas perlas agitadas, por medio de energía mecánica, por ejemplo con un agitador rotatorio o de vibración o una fuente de ultrasonidos.

7. A continuación, las células que han sufrido la ruptura se transfieren, a través de una bomba controlada por el ordenador (6), hacia un recipiente realizado con plástico, de aproximadamente 100 ml.

8. Se adicionan un agente caotrópico y un agente de modificación de adsorción a través de válvulas y bombas que se controlan mediante el ordenador (6).

40 9. A continuación, el ADN y/o el ARN de las células se adsorbe en un soporte sólido, de forma ventajosa sobre placas de microtitulación que contienen pocillos, conteniendo a su vez dichos pocillos un material adsorbente tal como un material vítreo. Se puede inyectar aire comprimido para transportar el fluido hacia los pocillos, y se usa un sistema de referencia XY o XYZ para manipular la matriz de columnas adsorbentes. Los pocillos, que son, cada uno de ellos, microcolumnas, se pueden manipular por lo tanto usando un autómatas activado por el ordenador (6), de manera que el brazo de dicho autómatas mueve la placa que contiene los pocillos según un sistema de referencia XY o XYZ.

45 10. A continuación, se adiciona un agente complejante monovalente a través de válvulas y bombas controladas por el ordenador (6), con el fin de sustituir los iones divalentes complejados con los ácidos nucleicos, por iones monovalentes. Así, el complejo de ácidos nucleicos/iones monovalentes formado de esta manera está todavía unido a las columnas de adsorción en esta fase.

50 11. A continuación, los ácidos nucleicos se eluyen adicionando un tampón, tal como TRIS/EDTA, o agua mediante el uso de bombas rotativas.

12. Los ácidos nucleicos se reservan en un tubo manipulado, por ejemplo, por un autómatas. A partir de esta fase, todas las manipulaciones se llevan a cabo usando unos medios automáticos de muestreo y distribución, tales como un autómatas (8).

55 13. Opcionalmente, y si se demuestra que es necesario, el volumen total de solución que contienen los diversos ácidos nucleicos reservados y eluidos se reduce con el fin de alcanzar volúmenes de aproximadamente cien µl

o una cifra similar hasta menos que 1 ml, antes de llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos o varias amplificaciones realizadas en paralelo.

14. Los ácidos nucleicos se transfieren a una máquina termocicladora usando el autómatas (8), y a continuación se lleva a cabo en la máquina la primera amplificación adicionando, en primer lugar, los reactivos para realizar la PCR, tales como el tampón de PCR, el conjunto de cebadores 1, la TAQ y los nucleótidos.

15. La mezcla de ácidos nucleicos amplificada una primera vez se separa a continuación en varios viales con el fin de detectar una serie de organismos con la máxima sensibilidad con respecto a los agentes patógenos cuya detección se pretende.

16. A continuación se lleva a cabo una segunda amplificación en tiempo real en una segunda máquina termocicladora adicionando, en particular, el conjunto de cebadores 2 (TAQ y nucleótido). Se adicionan también agentes de visualización y detección, tales como agentes de fluorescencia. De este modo, los agentes de detección podrán hibridarse con los fragmentos amplificados de los microorganismos. Todas las manipulaciones de las muestras (transferencias, adición de los diversos reactivos, etcétera) se llevan a cabo usando el autómatas (8) antes mencionado.

17. La fluorescencia se detecta in situ durante la segunda amplificación (detección en continuo).

18. Los datos analíticos referentes a la detección de los organismos patógenos se visualizan en el ordenador (6) y se transfieren a un sistema de control central (9). Todas las etapas secuenciales del procedimiento se gestionan y controlan usando un sistema lógico de control (6) que consta de un ordenador.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con carácter no limitativo e ilustran la presente invención.

EJEMPLOS DE PUESTA EN PRÁCTICA DE LA INVENCION

Ejemplo 1: precipitación por inclusión de agentes patógenos

En primer lugar, en un reactor de 2 litros se recibe una muestra de agua, tomada directamente de la red de suministro de agua potable, del entorno o que se origina en un laboratorio o en otra fuente, y la misma se calienta a 50 °C.

Se adicionan primero 10 ml de TRIS 1 M (agente tampón) para lograr un pH de 8.5, seguidos por 25 ml de acetato de calcio 1 M. A continuación, los dos compuestos se mezclan rápidamente, y seguidamente se detiene la mezcla.

A continuación, se adicionan 10 ml de Na_2CO_3 1 M, y se deja que los diversos compuestos reaccionen durante 3 minutos. A continuación, se lleva a cabo cuidadosamente la mezcla durante aproximadamente 5 segundos, seguida por la adición de 10 ml de Na_2CO_3 , y seguidamente se deja que el medio de reacción reaccione durante otros 3 minutos. La mezcla se lleva a cabo suavemente pero de manera suficiente, y se deja nuevamente que el medio de reacción reaccione durante otros 10 minutos. Se adicionan 7,5 ml de acetato de calcio 1 M, y los mismos se dejan reaccionar durante 3 minutos. Se lleva a cabo la mezcla cuidadosamente, se adicionan 10 ml de Na_2CO_3 , y nuevamente se deja que la mezcla reaccione durante 5 minutos.

El sobrenadante se decanta abriendo una válvula. El precipitado se disuelve adicionando 13 ml de ácido fórmico 20%. A continuación, la mezcla se tampona adicionando TRIS base 2 M para incrementar el pH a 7,2.

Ejemplo 2: amplificación por PCR y detección

2.1 Se usa una máquina termocicladora con detección integrada en continuo, tal como la máquina LightCycler vendida por Roche Molecular Biochemicals, para detectar la amplificación del ADN específico. Se manipulan 32 muestras en paralelo, y se llevan a cabo 40 ciclos de amplificación a una temperatura elevada (entre 90 °C y 100 °C), durando los 40 ciclos aproximadamente 45 minutos. La amplificación y la detección tienen lugar en tubos capilares. El límite de detección es aproximadamente un organismo patógeno.

2.2 Como alternativa, también es posible usar el sistema de detección ABI prism 7700 vendido por PE Biosystems, que procesa 96 muestras en paralelo (dos horas), durante 40 ciclos para la detección de más de 10 muestras en un vial, durante aproximadamente 2,5 horas.

De este modo se obtienen sensibilidades del orden de unos pocos femtogramos de ADN/ARN total (que es equivalente a una célula individual). El límite de detección es aproximadamente un organismo patógeno.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua, que comprende la sucesión de las siguientes etapas:
 - concentración de los organismos patógenos de una muestra de agua, en la que la concentración de los organismos patógenos se lleva a cabo por precipitación, coprecipitación o precipitación por inclusión,
 - rotura con abertura de las células de los organismos patógenos,
 - concentración de ADN y/o de ARN,
 - por lo menos una amplificación de ácidos nucleicos, y
 - una detección cualitativa y/o cuantitativa de ADN y/o ARN representativo de la contaminación del agua por dichos organismos patógenos; en el que
 - todas las etapas secuenciales del procedimiento se controlan de manera completamente automática usando un sistema lógico de control.
2. Procedimiento de detección según la reivindicación 1, caracterizado porque los organismos patógenos detectados son bacterias, virus, hongos y/o protozoos.
3. Procedimiento de detección según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el volumen de partida de la muestra de agua es superior a 50 mililitros.
4. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la amplificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.
5. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la concentración se lleva a cabo en presencia de iones de carbonato y metálicos divalentes seleccionados, de forma ventajosa, de entre el grupo constituido por carbonato de calcio, carbonato de estroncio y carbonato de bario.
6. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la rotura con abertura de las células se lleva a cabo por molienda sobre perlas agitadas.
7. Procedimiento de detección según la reivindicación 6, caracterizado porque las perlas se agitan por ultrasonidos, por agitación mecánica o por vibración mecánica.
8. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque, durante la rotura con abertura, o después de la rotura con abertura de las células y antes de la concentración de ADN y/o de ARN, se adicionan al medio de reacción que contiene las células por lo menos un agente caotrópico, de forma ventajosa una sal de guanidina, tal como tiocianato de guanidina, y por lo menos un agente de modificación de la adsorción, de forma ventajosa, un alcohol tal como etanol.
9. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de ADN y/o de ARN se lleva a cabo por adsorción reversible de los ácidos nucleicos sobre un soporte sólido que contiene un material adsorbente, seguida por una elución de estos ácidos.
10. Procedimiento de detección según la reivindicación 9, caracterizado porque la elución de los ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante lavado del material adsorbente usando por lo menos un disolvente que contiene iones monovalentes, de forma ventajosa seleccionados de entre el grupo constituido por tiocianato de sodio, tiocianato de potasio y EDTA.
11. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la detección de los organismos patógenos es una detección en continuo, de forma ventajosa llevada a cabo por fluorescencia, por luminiscencia o por espectrometría de masas.
12. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende además una etapa de filtración previa.
13. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende además una etapa previa para tratar la muestra de agua mediante choque térmico y/o mediante un estrés nutricional y/o adicionando un compuesto químico de inducción de genes con el fin de inducir el ARN de genes específicos y de detectar los organismos patógenos viables en dicha muestra de agua.
14. Procedimiento de detección según la reivindicación 13, caracterizado porque el choque térmico se lleva a cabo mediante un impulso de calor durante menos de 3 horas.
15. Procedimiento de detección según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque el compuesto químico de inducción de genes es lactosa o IPTG para inducir el ARN lac Z.
16. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el sistema lógico de control consta de un ordenador del tipo PC.
17. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los datos analíticos referentes a la detección de los organismos se transfieren automáticamente a un sistema de control central.

18. Procedimiento de detección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el procedimiento puede funcionar de manera continua y autónoma durante un periodo de tiempo mayor que o igual a un día, preferentemente desde tres días a más de siete días.
19. Dispositivo para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra de agua, que comprende:
- 5 una unidad para concentrar los organismos patógenos (1),
 - una unidad para romper células de los organismos patógenos (2),
 - una unidad para concentrar ADN y/o ARN (3),
 - una unidad para amplificar ácidos nucleicos (4), y
 - una unidad para detectar cualitativa y/o cuantitativamente ADN y/o ARN (5) representativo de la contaminación
- 10 del agua por dichos organismos patógenos;
- por lo menos un sistema lógico de control (6) que controla de forma completamente automática las etapas de tratamiento secuenciales llevadas a cabo por las unidades (1) a (5),
 - unos medios de bombeo (7),
 - unos medios automáticos de muestreo y distribución (8), y
 - 15 un sistema de control central (9);
- caracterizado porque la unidad para concentrar los organismos patógenos está adaptada para precipitación, coprecipitación o precipitación por inclusión.
20. Dispositivo de detección según la reivindicación 19, caracterizado porque la unidad para amplificar los ácidos nucleicos (4) consta de por lo menos una máquina termocicladora de reacción en cadena de polimerasa.
- 20 21. Dispositivo de detección según la reivindicación 19 ó 20, caracterizado porque la unidad para concentrar los organismos patógenos (1) es un reactor realizado con metal, que comprende un sistema para introducir la muestra de agua, un sistema para introducir varios reactivos, un sistema de agitación, un sistema para evacuar el líquido sobrenadante, un sistema para evacuar el precipitado, de forma ventajosa situado en la parte inferior del reactor, y un sistema de calentamiento que, de forma ventajosa, consta de una camisa de calentamiento situada en torno al reactor.
- 25 22. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizado porque la unidad para romper las células (2) abriéndolas contiene un molino de perlas.
23. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, caracterizado porque la unidad para concentrar ADN y/o ARN (3) comprende uno o más soporte(s) sólido(s) que contiene(n) un material de adsorción reversible para ácidos nucleicos, de forma ventajosa, un material vítreo.
- 30 24. Dispositivo de detección según la reivindicación 23, caracterizado porque los soportes sólidos están constituidos por unas placas de microtitulación que contienen multipocillos, de forma ventajosa, placas de 60, 96 ó 384 pocillos.
25. Dispositivo de detección según la reivindicación 24, caracterizado porque los pocillos de las placas de microtitulación se usan solamente una vez y se mueven automáticamente para recibir la muestra de líquido que se origina en la unidad destinada a romper las células de los organismos abriéndolas.
- 35 26. Dispositivo de detección según la reivindicación 25, caracterizado porque el movimiento automático de los pocillos se lleva a cabo usando un autómeta.
27. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, caracterizado porque la unidad de detección (5) está constituida por un detector de fluorescencia, que comprende de forma ventajosa una cámara electrónica.
- 40 28. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, caracterizado porque la muestra que contiene los organismos patógenos circula desde la unidad destinada a concentrar los organismos patógenos (1) hacia la entrada de la unidad destinada a amplificar los ácidos nucleicos (4), a través de las unidades destinadas a romper las células (2) abriéndolas y a concentrar los ácidos nucleicos (3), usando unos medios de bombeo (7) que, de forma ventajosa, están constituidos por unos tubos equipados con válvulas y/o bombas.
- 45 29. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 28, caracterizado porque después de que se haya(n) concentrado el ADN y/o el ARN, los ácidos nucleicos se manipulan, desde la entrada de la unidad destinada a amplificar los ácidos nucleicos (4) hacia la salida de la unidad destinada a detectar los ácidos nucleicos (5), usando unos medios automáticos de muestreo y distribución (8) que, de forma ventajosa, están constituidos por un autómeta.
- 50 30. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 29, caracterizado porque el sistema lógico de control (6) consta de por lo menos un ordenador del tipo PC que controla el dispositivo completo.
31. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, caracterizado porque el sistema lógico de control (6) está comunicado por interfaz con una red para transferir, de forma automática o por demanda, los datos analíticos referentes a la detección de los organismos hacia un sistema de control central (9).
32. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 31, caracterizado porque el sistema de

control central (9) consta de por lo menos un ordenador.

33. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 32, caracterizado porque el dispositivo contiene además un área de refrigeración (10) para almacenar los reactivos sensibles, preferentemente un bloque de refrigeración.

- 5 34. Dispositivo de detección según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 33, caracterizado porque el dispositivo está conectado directamente a la red de suministro de agua potable para un muestreo automático.

1 / 1

