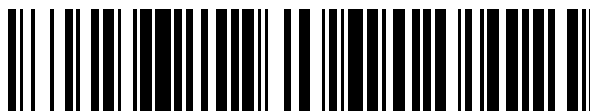


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 364 561**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/24 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05706799 .3**
96 Fecha de presentación: **28.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1725676**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **Medida de la contaminación**

30 Prioridad:
01.03.2004 DK 200400348
03.03.2004 US 549158 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
MYCOMETER A/S
Lersö Parkalle 40 Ö
2100 Copenhagen, DK

72 Inventor/es:
REESLEV, Morten y
MILLER, Morten

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 364 561 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

Medida de la contaminación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la vigilancia y control ambiental, especialmente a la determinación de contaminantes en muestras ambientales. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento sencillo, versátil, sólido, fiable y rápido que proporciona una medición precisa de la contaminación (microbiana), que se puede llevar a cabo in situ. La invención además proporciona un kit que es útil para realizar dichas mediciones.

Antecedentes de la invención

10 Para abordar el problema de la contaminación bacteriana se han desarrollado varias metodologías de pruebas. Los procedimientos clásicos se basan en el cultivo de las bacterias en un medio nutritivo que soporta el crecimiento. Tras aproximadamente 2-14 días, las bacterias capaces de crecer en medio sólido se han multiplicado hasta un nivel en el que las colonias se hacen visibles y se pueden contar, y las bacterias capaces de crecer en medio líquido se pueden medir mediante, por ejemplo, densidad óptica o peso seco. Se han realizado esfuerzos para acelerar y simplificar el proceso de detección. Entre estos esfuerzos hay procedimientos basados en las mediciones de radiometría, impedancia, quimioluminiscencia y fluorescencia.

15 Los enfoques radiométricos para identificar la contaminación bacteriana usan incorporación de un nutriente radiactivo por las bacterias. Las bacterias radiomarcadas se pueden aislar y cuantificar siguiendo el radiomarcaje. Esta metodología tiene varios inconvenientes indeseables. Aunque es muy sensible, usa radioisótopos, que pueden ser caros y difíciles de manipular.

20 Los procedimientos basados en la impedancia eléctrica normalmente incluyen una etapa de cultivo. A medida que los microorganismos crecen, se pueden detectar cambios en la impedancia del medio nutritivo y se correlacionan con el crecimiento microbiano. Los procedimientos basados en la impedancia eléctrica, aunque más rápidos que el cultivo clásico, todavía son lentos e implican un periodo de incubación de 1-4 días.

25 El ATP se detecta mediante quimioluminiscencia. La detección y/o cuantificación de las bacterias mediante el uso de detección de ATP es rápida y se puede realizar en minutos. No obstante, el ATP es ubicuo y la cinética de la luminiscencia derivada del ATP es compleja, calidades que reducen la solidez de los procedimientos basados en este principio. Además, el retorno del ATP en las células es muy rápido y el contenido de ATP de las células puede experimentar enormes variaciones en un periodo corto de tiempo, por ejemplo cuando las células pasan de crecer a morir de hambre.

30 Se han descrito varios procedimientos en la técnica anterior basados en la degradación enzimática de un sustrato de umbeliferona marcado con fluorescencia, con monitorización concomitante de la fluorescencia derivada de la umbeliferona liberada. La detección o cuantificación de las bacterias mediante el uso de actividad enzimática también puede ser susceptible a interferencias por fuentes no bacterianas, aunque esta a interferencia parecer ser menos significativa. Además, la cantidad del producto (fluorescencia) formado por unidad de tiempo es lineal. La interferencia minimizada y la simple cinética hace que las mediciones de bacterias mediante el uso de actividad enzimática sean más sólidas.

35 El documento WO 03/012397 (Matsushita Seiko Co., Ltd.), que es un miembro de la familia del último documento publicado US 2004/0219628 (Tashiro et al.), divulga un chip que recoge microorganismos en el que los microorganismos presentes en una muestra quedan atrapados y después se detectan por color, fluorescencia o luminiscencia. La cuantificación de los microorganismos se proporciona atrapando dichos microorganismos en un filtro, seguido de tinción. Como alternativa, la cuantificación de los microorganismos atrapados en el filtro de recolección se consigue mediante coloración diferencial de las diversas clases de microorganismos, tanto vivos como muertos, mediante la aplicación de diferentes compuestos colorantes. Además, las células viables se detectan mediante coloración usando compuestos que reaccionan con las enzimas presentes en las células microbianas para formar productos coloreados o fluorescentes. Varios ejemplos incluyen derivados de 4-metilumbeliferona.

40 La patente de EE.UU. nº 4,591,554 (Koumura et al.) divulga un procedimiento para detectar rápido microorganismos usando derivados de umbeliferona no fluorescentes, tales como 4-metil-umbeliferil-β-D-galactósido, 4-metil-umbeliferil-α-D-galactósido, 4-metil-umbeliferil-fosfato y 4-metil-umbeliferil-pirofosfato. La fluorescencia del resto de umbeliferona liberado se induce a 360 nm y se monitoriza a 450 nm. La potenciación de la sensibilidad se obtiene mediante una etapa de cultivo durante 1-12 horas.

45 La patente de EE.UU. nº 5,518,894 (Berg) divulga un procedimiento rápido para detectar la presencia de bacterias coliformes. Este procedimiento comprende una etapa de concentración (filtración) en combinación con una etapa de cultivo para aumentar el número de bacterias diana presentes. La fluorescencia del derivado de umbeliferona

hidrolizado se monitoriza como indicación de la presencia de bacterias coliformes.

La patente de EE.UU. nº 5,610,029 (Ehrenfeld et al.) divulga un medio de cultivo para detectar la presencia o ausencia de microorganismos diana en una muestra. Este medio de cultivo incluye nutrientes y factores de crecimiento, así como un metabolito fluorescente (4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronido).

5 Todos los procedimientos mencionados anteriormente basados en la detección de la actividad enzimática fluorogénica usan una etapa de cultivo que normalmente conduce a un tiempo de rendimiento total de 6-72 horas, que, en muchos casos, no satisface las demandas de rendimiento de un procedimiento rápido, sin mencionar un procedimiento que se realice in situ.

10 La patente de EE.UU. nº 5,089,395 (Snyder et al.) divulga el uso de un derivado de umbeliferona no fluorescente que se convierte enzimáticamente en un producto fluorescente para detectar la presencia de bacterias. En este procedimiento no hay etapa de cultivo ni de concentración. Debido a la falta de estas etapas, el procedimiento no es muy sensible y requiere una concentración elevada de bacterias de al menos 1000/ml y, normalmente, una concentración mayor.

15 La patente de EE.UU. nº 5.968.762 (Jadamec et al.) divulga un procedimiento que usa un derivado de umbeliferona no fluorescente que se convierte enzimáticamente en un producto fluorescente para detectar la presencia de bacterias. La invención se refiere a medir la proporción entre la intensidad de la fluorescencia del producto fluorescente metabolizado a una longitud de onda específica y el conjugado fluorescente metabolizable a una segunda longitud de onda. Se da un tiempo de detección de aproximadamente 80 minutos para detectar una concentración de 310 (ufc/ml) (ufc= unidad formadora de colonias).

20 La filtración en membrana de muestras líquidas se usa habitualmente para investigar muestras líquidas con bacterias. El filtro de membrana estéril se coloca en un dispositivo cerrado que se puede esterilizar y las bacterias se recogen en el filtro. Después, el filtro se puede colocar en un medio nutritivo que contiene agar en el que las colonias se pueden contar tras un procedimiento de cultivo. EL filtro también se puede tratar con un pigmento fluorogénico que se incorpora en las bacterias, que después se puede contar mediante fluorescencia inducida por láser. Todos los microbiólogos que usan filtración en membrana están familiarizados con los cuidados que hay que tomar para asegurar una manipulación estéril de los filtros. Al detectar pequeñas cantidades de bacterias, una etapa de filtración puede introducir fácilmente contaminaciones, lo que convierte al procedimiento en poco fiable y muy dependiente de las habilidades del técnico.

30 De acuerdo con lo anterior, en la técnica lo que se necesita es un procedimiento rápido para detectar la presencia de bacterias en una muestra que sea sencillo de realizar, sólido y fiable.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es abordar una serie de los inconvenientes y defectos mencionados anteriormente en la técnica anterior proporcionando un procedimiento rápido, fiable, versátil y sólido para determinar la presencia de microorganismos y otros contaminantes en una muestra.

Sumario de la invención

35 La presente invención se basa en la sorprendente demostración de que una etapa de cultivo como se ha descrito anteriormente se puede excluir completamente si, en su lugar, se realiza una efectiva etapa de concentración de microorganismos por medio de filtración o procedimientos análogos a la filtración. Esto implica dos ventajas principales sobre la técnica anterior, ya que 1) aumenta la sensibilidad, lo que permite reducciones significativas en el tiempo de detección, y 2) elimina compuestos o partículas en la muestra que pueden interferir en, por ejemplo, la detección fluorogénica debido a la inactivación o autofluorescencia o en una inmunodetección debido a las sustancias de reacción cruzada del medio de cultivo.

45 Normalmente, la presente invención usa una unidad de filtración cerrada desechable que no sería aplicable si tras la filtración se fuera a realizar un cultivo o recuento con láser. La presente invención proporciona una manipulación fácil, sólida y fiable de la esterilidad de las muestras durante todo el proceso de análisis. Esto lo convierte en un procedimiento de campo portátil ideal.

50 Los microorganismos y otros contaminantes se pueden concentrar en un gran volumen que hace posible una detección rápida de concentraciones bajas, de hecho, la sensibilidad del procedimiento se fija exclusivamente por el número mínimo de contaminantes que tiene que retener el filtro y por las propiedades físicas del filtro, es decir el tamaño de los volúmenes que pueden pasar a través del filtro al tiempo que se conserva la integridad estructural del mismo. Por tanto, es un aspecto significativo de la presente invención que no hay ningún límite inferior de la concentración bacteriana requerida en el líquido para poder cuantificar la cantidad de poblaciones microbianas/bacterias diana viables. Por tanto, el procedimiento se puede usar para detectar bacterias en un líquido

con una cantidad de, como máximo, 1000 bacterias/ml, pero son posibles cantidades menores, tales como, como máximo 100 bacterias/ml, como máximo 10 bacterias/ml e incluso menos de 1 bacteria/ml.

La presente invención permite, por ejemplo, la cuantificación de microorganismos en muestras recogidas de varias fuentes y en varias formas. La muestra puede ser líquida, por ejemplo agua de bebida, agua caliente etc., agua industrial, por ejemplo agua de procesamiento y muestras de agua de limpieza in situ (CIP), agua farmacéutica, 2) aire, por ejemplo aire interior, aire industrial, aire de ambientes de trabajo muy contaminados, aire de instalaciones de producción industrial, 3) muestras sólidas extraíbles, por ejemplo alimentos, sedimentos y material vegetal etc., 4) superficies, por ejemplo superficies de edificios, materiales de construcción y superficies de trabajo, etc.

Por tanto, e su más amplio y más general ámbito, la presente invención se refiere a un procedimiento de reparación de muestras para un medio sospechoso de contener contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) pasar un volumen conocido de dicho medio a través de un filtro desde un lado influente a un lado efluente, concentrando, de este modo, los contaminantes en el lado influente del filtro, b) poner en contacto el lado influente del filtro con un vehículo líquido que contiene al menos un sustrato que mediante la interacción con los contaminantes produce cada uno un resto detectable y c) permitir interactuar al sustrato con los contaminantes en el lado influente del filtro durante un periodo de tiempo, siendo dicho periodo de tiempo suficiente para permitir detectar en el vehículo líquido el resto detectable.

También es parte de la invención un kit para determinar contaminantes en un medio, comprendiendo el kit 1) al menos un dispositivo de filtro que comprende un filtro con un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para retener los contaminantes en el lado influente del filtro, 2) medios para hacer pasar un volumen conocido de medio a través del filtro, 3) un agente que, después de la interacción con los contaminantes, liberará un resto detectable, cuya cantidad puede correlacionarse con la cantidad de contaminantes que han interactuado con el agente y 4) instrucciones que definan las etapas para a) obtener un volumen conocido y hacerlo pasar a través del dispositivo de filtro estéril, b) poner en contacto el lado influente del filtro con el agente, c) permitir que el agente interactúe con contaminantes que puedan estar en el lado influente del filtro y d) detectar cuantitativamente el resto detectable.

Por último, la invención también se refiere al uso de un dispositivo de filtro estéril cerrado tal como un recipiente de reacción para una reacción entre contaminantes retenidos en el dispositivo y un sustrato que libera un resto detectable cuando se pone en contacto con los contaminantes.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: Gráfico que muestra la relación lineal entre recuentos de placas heterotróficas calculadas (HPC) en series de dilución de agua de bebida, indicadas como unidades formadoras de colonias por ml de muestra de agua y la actividad de fosfatas alcalina (actividad APasa), determinada mediante la fluorescencia producida mediante escisión enzimática del sustrato de la APasa 4-metilumbeliferilfosfato, indicado como unidades de fluorescencia/min/ml.

Fig. 2: Gráfico que muestra la relación lineal entre el tiempo de incubación y la actividad APasa, determinada mediante la fluorescencia producida mediante escisión enzimática del sustrato de la APasa 4-metilumbeliferilfosfato, indicado como unidades de fluorescencia/min/ml.

Fig. 3: Gráfico que muestra una correlación lineal positiva muy significativa entre la actividad APasa en agua caliente potable, determinada por la fluorescencia producida mediante escisión enzimática del sustrato de la APasa 4-metilumbeliferilfosfato, indicado como unidades lógicas (unidades de fluorescencia/hora/100 ml) y log₁₀ (unidades de fluorescencia/30 minutos/250ml), respectivamente y HPC indicado por el log₁₀ (ufc/ml de muestra de agua).

Fig. 4: Gráfico que muestra una correlación lineal positiva muy significativa entre la actividad APasa en agua de bebida, determinada por la fluorescencia producida mediante escisión enzimática del sustrato de la APasa 4-metilumbeliferilfosfato, indicado como unidades log₁₀ (unidades de fluorescencia/hora/100 ml) y log₁₀ (unidades de fluorescencia/30 minutos/250ml), respectivamente y HPC indicado por el log₁₀ (ufc/ml de muestra de agua).

Fig. 5: Gráfico que muestra una correlación lineal positiva muy significativa entre la actividad APasa en agua caliente potable, determinada por la escisión enzimática del sustrato de la APasa 4-metilumbeliferilfosfato, indicado como log₁₀ (unidades de fluorescencia/hora/100 ml) y recuentos directos en naranja acridina (AODC) indicados como log₁₀ (células bacterianas/ml)..

Fig. 6: Gráfico que muestra una correlación lineal positiva muy significativa entre biomasa de esporas (medida en ng) del hongo *Penicillium commune* y la actividad de la enzima N-acetilhexosaminidasa (medida por la escisión enzimática del sustrato 4-metilumbeliferil-β-N-acetilglucosaminida).

Divulgación detallada de la invención

A continuación se presentan una serie de definiciones con el fin de definir las metas y objetivos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término “contaminantes” se refiere a constituyentes indeseados de origen biológico en de una muestra. Ejemplos no limitantes de contaminantes son microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, pero también fragmentos de dichos microorganismos. Los contaminantes no patogénicos pueden ser indeseados porque son perjudiciales para la calidad de un producto cuando aparecen en él (ejemplos son microorganismos contaminantes en una fermentación controlada, microorganismos contaminantes en productos alimentarios que influyen sobre el gusto y el aspecto etc.).

Un microorganismo “viable” es, en el presente contexto, un microorganismo o espora que, en el correcto conjunto de circunstancias es, o se puede convertir en, metabólicamente activo. Por tanto, el término incluye dentro de su alcance microorganismos que se pueden cultivar fácilmente, pero también aquéllos que solo se multiplicarán en circunstancias difíciles de reproducir en cultivo.

El término “filtro” es, en el presente contexto, un dispositivo que excluye el paso de partículas más grandes que un cierto tamaño. No obstante, el término también puede abarcar un dispositivo que excluye el paso de material que tenga una especificidad de unión significativa por una pareja de unión (tal como un receptor, un anticuerpo o fragmentos de los mismos). Por tanto, el término también abarca dispositivos que normalmente no se consideran “filtros”, por ejemplo membranas de centrífugas y ultracentrífugas, membranas impregnadas con parejas de unión específicas, tales como anticuerpos u otras sustancias específicamente de unión. “Filtros” especializados contemplados en la presente invención pueden también incluir columnas para cromatografía de afinidad, las características importantes de un “filtro” de acuerdo con la presente invención son que puede retener contaminantes de interés y permitir una posterior reacción in situ entre un sustrato y una enzima específicos de los contaminantes, de modo que se pueda realizar fácilmente una medición posterior de un resto detectable derivado de sustrato, véase más adelante.

El término “sustrato” significa un agente químico que sufre una conversión catalizada por enzimas en su estructura química.

El término “resto detectable” indica una entidad química que es el resultado de una conversión catalizada por enzimas de un sustrato, en el que la entidad química comprende una característica física o química que se puede detectar y que no es detectable en el sustrato. Ejemplos son restos fluorescentes, restos luminiscentes y restos que se unen con especificidad alta a una pareja de unión.

El término “señal” quiere decir la característica mensurable de un resto detectable tal y como se registra en un sistema de medición adecuado.

Formas preferidas de realización del procedimiento de la invención

Normalmente, los contaminantes se seleccionan del grupo que consiste en bacterias; hongos tales como hongos filamentosos y levaduras, algas, protozoos, esporas de bacterias, esporas de hongos y polen, y fragmentos de los mismos. No es necesario mencionar que no todos estos contaminantes son patógenos, pero que su presencia en algunos ambientes es muy indeseable o incluso dañina. La presencia de microorganismos contaminantes en fermentación industrial es un ejemplo entre muchos en el que el impacto económico y práctico de la presencia de contaminantes es enorme, pero también en la producción de alimentos y en la producción de productos que deben su valor a sus características estéticas, los contaminantes pueden ser la causa de pérdidas económicas.

Se ha demostrado que fragmentos de microorganismos y de esporas son agentes desencadenantes de enfermedades respiratorias graves, tales como el asma, incluso aunque dichos fragmentos (que normalmente consisten en bacterias u hongos muertos que están más o menos rotos) no sean viables, no obstante, pueden estar relacionados con la patología en un grado en el que se requiera su detección y eliminación,

El procedimiento de la invención se puede aplicar a muestras de varias fuentes, siendo la única norma que debe ser posible integrar la muestra que contienen contaminante en un medio cuyas propiedades permita que se pueda pasar a través de un filtro.

Convenientemente, el medio es un medio líquido. Ejemplos no limitantes incluyen agua ambiental, agua de bebida, agua caliente etc., agua industrial, agua de procesamiento, agua de “limpieza in situ”, agua farmacéutica, un extracto líquido de un material sólido, una muestra de superficie suspendida o solubilizada, y productos industriales líquidos, tales como cosméticos, fármacos y productos alimenticios.

Algunos de estos medios líquidos están en forma de muestras directas sin tratar procedentes del ambiente o sistema de interés. Otras muestras tienen que manipularse antes para producir el medio líquido que entra en la etapa a del procedimiento de la invención.

En algunos casos es, por ejemplo deseable, someter el medio a una prefiltración con el fin de realizar una criba de material de tamaño grande que podría interferir en la posterior detección. Dicho prefiltro debería tener un tamaño de

- 5 poro que permita el paso de los contaminantes pero que no permita el paso de materiales de mayor tamaño, tales como partículas sólidas irrelevantes. En algunas realizaciones, esta filtración en dos etapas se puede combinar con la aplicación de las etapas b y c del procedimiento de la invención sobre el prefiltro y el filtro, por el que se ha pasado la muestra prefiltrada (filtro primario). Haciendo esto, se hace posible añadir las dos mediciones para obtener una medida de la contaminación total.
- 10 No obstante, para algunos tipos de muestras, el procedimiento de la invención no se tiene que complementar con ninguna de estas etapas iniciales. Normalmente este es el caso si la muestra en cuestión no contiene ninguna cantidad significativa de material que tenga un tamaño comparable, o mayor que, al de los contaminantes de interés en la muestra; por ejemplo, muchas muestras de agua o aire no necesitarán prefiltración cuando deriven de sistemas en los que la norma general es un elevado grado de pureza (y, por tanto, un grado bajo de contaminación).
- 15 Una muestra de superficie que se puede obtener limpiando un área predefinida de una superficie con un dispositivo/aparato de obtención de muestras que incluya una superficie de absorción o adsorción. El dispositivo de obtención de muestras se coloca después en un recipiente adecuado que contiene un fluido y se agita para inducir la liberación de los contaminantes de la superficie a un líquido y, después, el medio líquido resultante se somete al procedimiento de la presente invención.
- 20 Una muestra de sólidos extraíbles se puede obtener a partir de muestras ambientales, tales como suelo, sedimentos, plantas, ropas (p. ej., prendas estériles), pieles y plumas etc. Los contaminantes de estas muestras ambientales se extraen usando un líquido de extracción y el líquido de extracción se somete después al procedimiento de la invención.
- 25 La muestra puede ser un producto alimentario, por ejemplo un producto alimentario procesado con calor, un componente de alimentos, un producto de pienso y un componente de pienso. También aquí los contaminantes se extraen mediante agitación en un líquido para inducir la liberación de los contaminantes en el líquido de extracción y, después, usar el procedimiento de la presente invención con el líquido.
- 30 También puede ser necesario reducir la viscosidad del medio líquido antes de realizar la etapa a. Este es el caso cuando la muestra es, de hecho, un líquido pero con una viscosidad tan alta que no pasa fácilmente a través del filtro usado de acuerdo con la invención. La viscosidad se puede reducir de varios modos: por medio de dilución o por medio de tratamiento con un agente químico, tal como un agente potenciador de la solubilidad o un detergente.
- 35 Asimismo, los medios gaseosos se pueden someter al procedimiento de la invención. Usando esta realización de la invención se proporciona, por ejemplo, una alternativa a los procedimientos convencionales de medicación de la contaminación del aire y otros gases, por ejemplo cuando muchos procedimientos que se usan en la actualidad proporcionan una medición general de las esporas fúngicas en el aire (como servicio para los alérgicos) cuando se cuentan las esporas, la presente invención permite un medio cómodo, fácil y rápido de obtener el mismo tipo de información en ambientes definidos más pequeños sin la necesidad de equipo especializado, véase, por ejemplo, el Ejemplo 6, en el que se muestra que se pueden determinar los recuentos de esporas por medio de la presente invención.
- 40 Por tanto, el medio gaseoso puede ser aire, tal como el aire de una instalación estéril, el aire de un dispositivo de flujo laminar o ambiental, pero también los gases que se usan en contextos de esterilidad o para aplicación directa a pacientes hospitalizados se pueden someter al procedimiento de la presente invención.
- 45 Con el fin de obtener muestras de gases se pueden aplicar varias metodologías. Una es simplemente usar el filtro estéril en la etapa a en la fase de obtención de muestras forzando el paso del medio gaseoso por el filtro y, después, aplicando las siguientes etapas b y c, en este caso las propiedades del filtro deben ser adecuadas para obtener muestras de gases y el experto será capaz, sin problemas, de seleccionar un filtro adecuado; un dispositivo ampliamente usado para obtener gas y muestras de aire es el casete "Air-O-cell" y el uso de estos también se contempla en el contexto de la presente invención. Como alternativa, el gas se pasa a través de una trampa líquida, facilitando la acumulación de los microbios en el líquido y, después, sometiendo este líquido al procedimiento de la presente invención. En este caso, la muestra es gaseosa, pero el medio es, de hecho, líquido.
- 50 Normalmente, el filtro tendrá un tamaño de poro lo bastante pequeño como para retener sustancialmente todos los contaminantes en el medio. Es decir, todos los contaminantes de interés. En realizaciones de la presente invención en las que sólo es de interés preparar la muestra para permitir la detección de ciertos contaminantes (p. ej., no los fragmentos de bacterias, hongos o esporas mencionados anteriormente), los poros se pueden fijar en un tamaño que permita que dichos contaminantes pasen a través del filtro. No obstante, dado que hay grandes diferencias entre, por ejemplo, células de protozoos y ciertas bacterias, el tamaño de poro del filtro puede variar. Asimismo, con el fin de "capturar" los contaminantes que tienen tamaños definidos, el procedimiento de la invención se puede realizar en varias vías paralelas, cada una usando su propio tamaño de poro en la etapa a; por ejemplo, la simple resta de dos
- 55 medidas obtenidas de diferentes tamaños de poros proporcionará información de la presencia de contaminantes que

tengan un tamaño en el intervalo entre los dos tamaños de poro.

En consecuencia, se prefiere que el tamaño de poro sea, como máximo, de 20 μm , como máximo 10, como máximo 5 y como máximo 3 μm . Para retener esporas o fragmentos de microorganismos se prefiere un tamaño de poro todavía menor.

- 5 Además, en muchas realizaciones, el tamaño de poro deberá ser lo bastante grande para dejar que el resto detectable atraviese el filtro; esto es esencial cuando se realiza una posterior detección del medio líquido que se ha evacuado forzándolo a través y lejos del filtro. En este contexto, el tamaño de poro es de al menos 0,1 μm (pero puede ser mayor, como de al menos 0,22 μm , o de al menos 0,45 μm), pero, de nuevo, el tamaño de poro depende de la elección del resto detectable.
- 10 El al menos un sustrato usado de acuerdo con la invención puede producir de forma conveniente el resto detectable escindiéndose (o, de otro modo, convertido químicamente) por acción de una enzima característica de los contaminantes. Mediante esto se quiere decir que la enzima en cuestión es bioquímicamente activa en los contaminantes que son objetivos su determinación. Se debe tener en cuenta que la presente invención permite la detección de contaminación total y la detección de contaminación con ciertas subpoblaciones o especies de
- 15 contaminantes. En el primer caso, será conveniente usar un sustrato que sea convertido por una enzima conservada filogenéticamente, es decir una enzima o actividad enzimática que exista en forma altamente homóloga en casi todos los contaminantes de origen biológico, es decir en la mayoría de los microorganismos vivos o viables. En el último caso, será conveniente usar un sustrato que sea convertido por una enzima que sea altamente específica de los contaminantes relevantes. En cualquier caso, la enzima normalmente se selecciona del grupo consistente en
- 20 carbohidrasas, proteasas, lipasas, esterases, amidasas, sulfatasas, nucleasas y fosfatasa, tales como la fosfatasa alcalina.

En realizaciones preferidas, la enzima que procesa el sustrato la expresan de forma constitutiva los microorganismos. Esto tiene la ventaja de que si la inducción de la producción enzimática en los contaminantes es innecesaria, es además relevante destacar que la inducción de la actividad enzimática podría ser una fuente de error e incertidumbre porque el control de la inducción podría ser difícil de conseguir.

25

Por tanto, las enzimas que se pueden usar en el presente procedimiento incluyen las producidas de forma natural en una célula microbiana/bacteriana y de acuerdo con la invención, actividades enzimáticas detectables son, preferentemente, actividades que se expresan de forma constitutiva, que se expresan en todas las fases de crecimiento de la población microbiana/bacterias diana y/o que se expresan de forma independiente del estado fisiológico de la población microbiana/bacterias diana. La actividad enzimática puede ser intracelular y/o extracelular.

30 Por tanto, el procedimiento puede incluir la detección y cuantificación de una actividad enzimática seleccionada de enzimas que hidrolizan sustratos que proporcionan elementos nutritivos esenciales para el crecimiento de la población microbiana/bacterias diana. En el presente contexto, la expresión "elementos nutritivos esenciales" indica nutrientes tal como se define en Brock et al., *Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA; Por tanto, elementos nutritivos esenciales incluyen nutrientes sin los cuales una célula no puede crecer e incluyen macronutrientes además de micronutrientes. De acuerdo con esto, el presente procedimiento se puede basar en la detección de una enzima microbiana/bacteriana implicada en, por ejemplo, el metabolismo de los hidratos de carbono, las proteínas, el fosfato y el sulfato. Una realización del procedimiento preferida actualmente es, como se verá a partir de los ejemplos, la detección e enzimas fosfatasa microbianas. En concreto, es interesante

40 detectar fosfatasa alcalina implicada en el metabolismo del fosfato, incluyendo la hidrólisis de ésteres fosfato, incluidos los ésteres de alcoholes primarios y secundarios, alcoholes de azúcar, alcoholes cíclicos, fenoles y aminas, que liberan fosfato inorgánico. La enzima también hidroliza los polifosfatos PP_1 y la transferencia de un grupo PO_4^{3-} de PP_1 (y de una serie de nucleósido di y trifosfatos y de manosa-6-fosfato) a la glucosa, formando glucosa-6-fosfato. Como será evidente a partir de los ejemplos, las mediciones de la actividad de fosfatasa alcalina de acuerdo con la presente invención proporcionan una sólida medición del número de microbios.

45

Sustancias preferidas son los sustratos fluorogénicos o cromogénicos que producen productos azules, verdes y rojos (fluorescentes o luminiscentes etc.) como resto detectable. La detección de emisión de luz es un modo muy cómodo y rápido de obtener información de la presencia de restos relevantes. Sustratos útiles en este contexto se divulgan en *Molecular Probes: Handbook of fluorescent probes and research products*, novena edición, autor: Richard P. Haugland, capítulo 10, páginas 397-448.

50

Es especialmente preferido usar sustratos seleccionados del grupo consistente en sal disódica de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato; sal amónico de 9h-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-ona-7-il) fosfato; sal tetraamónica de fluoresceína difosfato; un derivado de metilumbeliferilo tal como 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato, sal trihidrato de 4-metilumbeliferil fosfato, ácido libre de -metilumbeliferil fosfato; sal de dilitio de -metilumbeliferil fosfato, -metilumbeliferil- β -N-acetilglucosaminida y trifluorometilumbeliferil fosfato; sales de 4-nitrofenil fosfato; y resorufin fosfato.

55

- 5 En cualquier caso, con independencia del sustrato escogido, el resto detectable deberá ser detectable, preferentemente, en una cantidad de, como máximo, 100 picomoles, preferentemente, como máximo, 50 picomoles, más como máximo, 20 picomoles e incluso más preferentemente como máximo 10 picomoles y, más preferentemente, como máximo, 1 picomol. Cuando menor es el límite de detección para un resto seleccionable determinado, mayor es la sensibilidad del procedimiento de la invención.
- 10 De acuerdo con la invención, es posible usar un único sustrato, pero también es posible usar al menos dos sustratos que producen restos detectables que proporcionan señales que se pueden combinar en un único valor de señal medido. Con esto se quiere decir que la señal obtenida de estos restos se puede medir dentro de la misma ventana de medición y, por tanto, integrar en una única medición (un simple ejemplo sería que los restos son idénticos aunque se originen a partir de la conversión de diferentes sustratos con enzimas diferentes). Por tanto, este es un medio práctico para obtener información sobre la contaminación total en la muestra, especialmente en los casos en los que no es factible usar un único sustrato con el fin de obtener esta información.
- 15 También es posible usar al menos dos sustratos que producen restos detectables que proporcionan señales distinguibles. Esto proporciona la ventaja de que se pueden determinar de forma individual varios grupos de contaminantes diferentes.
- 20 Una característica muy atractiva del presente procedimiento es que permite determinar mejor los microorganismos viables. En una serie de procedimientos de la técnica anterior, las etapas que incluyen cultivo tienen los inconvenientes de que pueden no permitir el cultivo de microorganismos y, de hecho, incluso pueden matar ciertos microorganismos, simplemente puede ser imposible entrar condiciones de crecimiento en las que puedan crecer todos los microorganismos hasta un nivel detectable y, por tanto, la distribución relativa de los microorganismos antes y después del cultivo no es idéntica. Por consiguiente, las mediciones de la técnica anterior no proporcionan una determinación precisa de todos los microorganismos relevantes en una muestra, pero solo los que se pueden cultivar en un conjunto dado de circunstancias. La presente invención no sufre este inconveniente, ya que la etapa de concentración no favorece o desfavorece a ningún contaminante y dado que la siguiente etapa de reacción del sustrato con el medio de muestra no tiene ningún impacto negativo sobre ningún microorganismo en el medio. Por tanto, se prefiere que los contaminantes sean microorganismos viables (o, en otras palabras, que el resultado final de una medición en una muestra que ha pasado hasta la etapa c es una medición que refleja el contenido de microorganismos viables.
- 25 Con el fin de obtener una medición fiable de los microorganismos viables, los sustratos mencionados anteriormente se seleccionarán para usar los que son convertidos por enzimas características de microorganismos viables – un ejemplo podría ser una enzima de expresión constitutiva que tiene un recambio elevado en un microorganismo metabólicamente activo.
- 30 En la práctica de la invención, es deseable que la cantidad de sustrato en el vehículo líquido no limite la velocidad de producción del resto detectable, ya que esto tiene la consecuencia de que solo la cantidad de enzima convertidora (y, por tanto, la cantidad de contaminantes) fijará la velocidad de producción. Normalmente, la combinación sustrato/enzima se escogerá de modo que se garantice que la velocidad de producción del resto detectable es una función (preferentemente lineal) de la cantidad de contaminantes en el volumen conocido del medio.
- 35 En muchos casos, será relativamente sencillo garantizar que la cantidad de resto detectable que se produce se pueda traducir en un "número contaminante". Por ejemplo, puede bastar para proporcionar un resultado cualitativo (del tipo "contaminación" o "no contaminación") porque es simplemente de interés determinar si se ha superado o no un determinado valor umbral. En otros casos, el conocimiento del tipo de muestra y del sistema del que derivó garantizar que un único pase del procedimiento de la invención proporciona una determinación precisa del recuento de contaminación, simplemente es cuestión de asegurar un exceso de sustrato en la etapa b de modo que la enzima se satura.
- 40 No obstante, puede ser necesario realizar el procedimiento en paralelo para pasar varios volúmenes diferentes de medio a través de los filtros en la etapa a, para garantizar que al menos uno de los volúmenes contiene una serie adecuada de contaminantes. Una alternativa a ello es tomar varias muestras de medio que tienen el mismo volumen en la etapa a y, después, añadir una cantidad diferente de sustrato en la etapa b.
- 45 El periodo de tiempo al que se hace referencia en la etapa c es el intervalo de tiempo que permite la formación de cantidades suficientes del resto detectable para hacer posible la detección del mismo. Este intervalo de tiempo es, convenientemente, menos de 24 horas, pero normalmente es mucho más corto, tal como, como máximo, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, y 1 hora. Normalmente, el intervalo de tiempo no será menor de 5 minutos y, en la mayoría de los casos, no es inferior a 20 minutos.
- 50 En realizaciones preferidas de la presente invención, el filtro es parte de un dispositivo de filtro cerrado y estéril. La esterilidad del dispositivo de filtro garantiza que no afectará a la proporción señal:ruido en una medición posterior, ya
- 55

que no contribuye con los propios contaminantes. La naturaleza cerrada del dispositivo sirve al mismo objetivo, pero también se añade a la facilidad de uso del procedimiento de la invención, ya que la unidad de filtro facilita una manipulación fácil, práctica y estéril de la muestra.

5 Dispositivos preferidos son dispositivos de filtro cerrados, estériles y desechables, especialmente los que integran el filtro y una carcasa de filtro en una unidad estructural cerrada irreversible; dichos dispositivos de filtro no se pueden abrir sin dañar la carcasa de filtro, están comercialmente disponibles tales como los usados en los ejemplos del presente documento. Dado su pequeño tamaño (normalmente el eje transversal más largo del dispositivo de filtro cerrado estéril no supera una longitud de 10 cm, pero existen dispositivos de filtro más pequeños que no superan una longitud de 9 u 8 o 7 o 6 o incluso 5 cm), son muy adecuados para la preparación de la muestra en el lugar. Un
10 dispositivo de filtro estéril se puede seleccionar de unidades de filtro cerradas/selladas comercialmente disponibles para la filtración de líquidos. El material de membrana se puede seleccionar de cualquier material de membrana disponible, incluyendo Durapore® (PVDF) de baja unión a proteínas, membranas de nylon, membranas de LCR (PTFE) hidrófilas de baja unión a proteínas, acetato de celulosa etc. Una realización actualmente preferida de acuerdo con la invención es el uso de la membrana Express® PES.

15 Es posible usar filtros equipados con una ventana que, por ejemplo, permita mediciones de fluorescencia que se van a realizar directamente sobre el vehículo líquido dentro de la carcasa de filtro, esta realización de la invención es especialmente preferida en contextos en los que es de interés seguir monitorizando la conversión del sustrato para liberar el resto detectable, véase más adelante.

20 En muchas realizaciones de la presente invención, la interacción de la etapa c se termina interrumpiendo el contacto entre el sustrato y los contaminantes. Esta interrupción se puede obtener evacuando el vehículo líquido del dispositivo de filtro al tiempo que se retienen los contaminantes en el dispositivo de filtro. Simplemente verter o succionar el líquido del filtro en un contenedor sin contaminantes es uno modo de conseguir este resultado, pero se prefiere evacuar el vehículo líquido del dispositivo de filtro en la dirección desde el lado influente al efluente del filtro, normalmente realizado aplicando una presión elevada sobre el lado influente del filtro o aplicando una presión menor
25 sobre el lado del efluente del filtro. La presión elevada se puede obtener presionando aire o un volumen conocido de un líquido (p. ej., un tampón adecuado u otro disolvente, tal como agua) a través del filtro desde el lado influente.

También es posible terminar la interacción en la etapa c por otros medios. Se puede terminar en el filtro, por ejemplo inactivando física o químicamente el sustrato o las enzimas.

30 Por último, de acuerdo con la invención también es posible no terminar la interacción en todos (relevante en sistemas en los que la conversión del sustrato se busca periódica o continuamente).

Fase de detección

La invención también comprende, tras la etapa c, una etapa adicional d) que abarca detectar, cuantitativa o cualitativamente, el resto detectable en el vehículo líquido y correlacionar la detección del resto con la cantidad o presencia de contaminantes en la muestra.

35 Dicha detección se puede realizar de una serie de modos convencionales conocidos en general por el experto en la técnica.

Además de basarse en la detección de una actividad enzimática microbiana/bacteriana correlacionada con la cantidad de, por ejemplo, la población microbiana/bacterias diana viables, el presente procedimiento incluye cualquier otro procedimiento de ensayo que permita la detección de enzimas que se correlacionan con la cantidad de
40 los contaminantes. Dichos procedimientos incluyen, como ejemplos, detectar la cantidad de enzima microbiana/bacteriana inmunológicamente y la detección de las secuencias de ADN y/o ARN que codifican la actividad enzimática de interés. Dichos procedimientos se pueden basar en procedimientos bien conocidos en la técnica e, incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos, marcados opcionalmente con restos detectables y el uso de sondas oligonucleotídicas que hibridan de forma selectiva con las secuencias de ADN o ARN.

45 La determinación puede ser inmunológica o por cualquier otro procedimiento adecuado que detecta la interacción entre el resto detectable y una pareja de unión específica (es decir: interacciones con el receptor, interacciones del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, reacciones de inactivación o potenciación en las que el resto detectable inactiva o potencia una señal estándar a través de algún tipo de interacción etc.). No obstante, se prefiere que la detección en la etapa d se realice midiendo la fluorescencia característica del resto detectable. Este es un
50 procedimiento rápido, fiable y fácil de usar que no requiere ninguna habilidad concreta de la persona que realice la medición.

Como se ha mencionado anteriormente, la fluorescencia en la etapa d se puede medir directamente sobre el vehículo líquido sin una interrupción del contacto entre el vehículo líquido y los contaminantes. Normalmente, esto se realizará cuando la conversión del sustrato se vigile continuamente o varias veces, de modo que se puede establecer

una relación con el tiempo y la cantidad de resto detectable. Si esta relación es lineal, dado el valor de fluorescencia para un punto de tiempo dado se puede correlacionar fácilmente con una curva estándar sobre la fluorescencia frente al número de contaminantes.

5 La medición de la fluorescencia es una técnica bien conocida en la materia y requiere excitación de un fluoróforo con ondas electromagnéticas (normalmente luz ultravioleta o visual) que tiene un alongitud de onda más corta que la emisión fluorescente a partir del fluoróforo excitado. Las longitudes de onda de excitación y de fluorescencia son específicas para cada fluoróforo y el experto en la técnica sabrá como elegir longitudes de onda adecuadas para ambos fines.

10 En general, se prefiere que la correlación en la etapa d comprenda el uso de una curva estándar predeterminada que exprese la relación entre la cantidad de contaminantes y la cantidad de resto detectable en condiciones estándar (tales como el tiempo de reacción, la temperatura etc.).

15 De acuerdo con la invención, la detección se puede realizar en un sistema de microtitulación (especialmente adecuado cuando el resto detectable se determina mediante su interacción con otra sustancia, como un anticuerpo). En versiones especiales de esta realización, el vehículo líquido se pasa directamente desde el lado del efluente del filtro a la placa de microtitulación, un efecto que se puede conseguir integrando el filtro con la placa de microtitulación.

Potenciación de la señal

20 Puede ser ventajoso someter los contaminantes a una influencia de potenciación de la señal, antes de la etapa a o en la etapa b, esto puede aumentar la sensibilidad global en una detección posterior o favorecer la posterior detección de tipos específicos de contaminantes o reducir la detección de tipos específicos de contaminantes,

25 Dicha influencia de potenciación de la señal normalmente se selecciona de una sustancia de potenciación enzimática, una temperatura o intervalo de temperatura selectiva, un pH selectivo, una concentración de sales selectiva, un potenciador del crecimiento no selectivo y una sustancia de potenciación del crecimiento selectiva. El experto en la técnica conoce las diversas posibilidades disponibles y podrá seleccionarlas en relación con la muestra concreta, contaminante de interés, combinación sustrato/enzima y procedimiento de detección.

También es posible potencia la señal mediante una incubación del medio antes de la etapa a. Esta incubación abarca, preferentemente,

-tratamiento con una sustancia inductora enzimática, de modo que potencia la detección del resto detectable (y, por tanto, se estimula un efecto potenciador general por la conversión de sustrato) y/o

30 -someter al medio a una sustancia selectiva para levaduras, hongos o bacterias (esto tiene el efecto de favorecer la detección de ciertos contaminantes) y/o

35 -someter al medio a un potenciador no selectivo del crecimiento para microorganismos (también, un efecto potenciador general ya que el número total de contaminantes aumenta/propaga esta opción, no obstante, deberá evitarse si el resultado deseable debe reflejar el número "verdadero" de microorganismos viales en la muestra, véase el razonamiento anterior) y/o

-someter al medio a una sustancia capaz de extraer enzimas celulares (comparable con la primera alternativa, ya que también estimula la conversión de sustrato en la etapa b).

Kit de la invención

La presente invención también contempla un kit para determinar contaminantes en un medio, comprendiendo el kit

- 40
- al menos un dispositivo de filtro que comprende un filtro con un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para retener los contaminantes en el lado influente del filtro,
 - medios para hacer pasar un volumen conocido de medio a través del filtro,
 - un agente (p. ej., un sustrato como se ha indicado anteriormente) que, tras interacción con los contaminantes liberará un resto detectable, cuya cantidad se puede correlacionar con la cantidad de
- 45
- instrucciones que definan las etapas para a) obtener un volumen conocido y hacerlo pasar a través del dispositivo de filtro estéril, b) poner en contacto el lado influente del filtro con el agente, c) permitir que el agente interactúe con contaminantes que puedan estar en el lado influente del filtro y d) detectar cuantitativamente el resto detectable.

5 Todos los rasgos que caracterizan este kit concreto se han descrito con detalle anteriormente, lo que significa que las divulgaciones anteriores en relación con los dispositivos de filtro estériles, los agentes que producen un resto detectable etc. se aplican *mutatis mutandis* al kit de la invención y se pueden usar como constituyentes en el mismo, y significa que las instrucciones corresponderán a las enseñanzas del presente documento en relación con el ejercicio del procedimiento de la invención, aplicándose estas enseñanzas *mutatis mutandis* al kit de la invención.

Preámbulo de los ejemplos

Materiales y procedimientos

Medios usados

10 R2A Agar contenía (g/litro): Extracto de levadura 0,5; Proteosa Peptona 0,5; hidrolizable de caseína 0,5; Glucosa 0,5; Almidón soluble 0,5; Piruvato sódico 0,3; hidrógeno fosfato de dipotasio 0,3; sulfato de magnesio 0,05; Agar-agar 12,0.

Agar extracto de levadura (g/litro): Triptona (peptona de caseína pancreática) 6,0; extracto de levadura deshidratado 3,0; Agar-agar 15,0.

Agua potable/agua caliente (g/litro): Extracto de levaduras 0,125.

15 Medio de dilución (g/litro); cloruro sódico 8,5; Peptona (de caseína pancreática.)1,0.

Todas las sustancias químicas, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.

Enumeración de bacterias cultivables

20 La enumeración de microorganismos cultivables, recuento en placa heterotrófica (HPC), en agua de bebida se realizado de acuerdo con la norma europea DS/EN ISO 6222. Las muestras se transfirieron a frascos de tapa azul esterilizados en autoclave/lavados con ácido y se almacenaron a 5 °C antes del análisis. Todas las muestras se analizaron en un plazo de 4-5 horas desde la obtención. En una placa petri se introdujo un volumen de la muestra de ensayo en bruto o muestra de ensayo diluida con peptona. Después se añadieron 15-20 ml del medio extracto de levadura molido y se mezcló cuidadosamente mediante rotación suave. El medio se dejó reposar. Se invirtieron las
25 placas y se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 68 ± 4 horas y a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 44 ± 4 horas. Los resultados se expresan como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra de agua (ufc/ml).

30 La enumeración de microorganismos cultivables en agua caliente potable se realizó en un laboratorio comercial (Eurofins, Dinamarca) de acuerdo con procedimientos normalizados de trabajo (norma danesa DSF5984). Los resultados se indican como ufc/ml en muestras de agua a cuatro temperaturas de incubación (37, 44, 55 y 65°C). La incubación con el número más elevado de ufc/ml estimadas se usó en el análisis de datos.

Recuento directo de bacterias usando tinción con naranja acridina (AODC)

35 Los recuentos bacterianos totales se obtuvieron usando el recuento directo en naranja acridina (AODC). Alícuotas se filtraron en filtros de policarbonato negro Nuclepore de $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro a presión máxima de 150 mmHg. Después, los filtros se lavaron con dos volúmenes de 8 ml de tampón (citrate-fosfato, pH 5,2). Después, los filtros se tiñeron durante 3 minutos con naranja de acridina (concentración final 0,02 %), después se lavaron dos veces con 3 ml de agua esterilizada Milli-Q y se montaron en portaobjetos de microscopio. Los filtros se analizaron usando microscopía de epifluorescencia. Para cada portaobjetos se observaron al menos 10 campos de microscopio y se contó al menos 400 células por filtro. El número de bacterias se calculó como el número de células bacterianas por ml de muestra de ensayo.

Determinación de la actividad enzimática en una muestra de ensayo líquida usando el sustrato del modelo de enzima marcada con 4-metilumbeliferilo.

45 Una muestra de ensayo líquida se filtra a Través de una unidad de filtro en jeringuilla Millex estéril de 33 mm y $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.). Usando una jeringuilla de plástico reutilizable, la unidad de filtro se satura después con un tampón adecuado que contiene el sustrato enzimático. El filtro se incubaba durante un periodo de tiempo fijo. La mezcla de incubación se lava después usando 2 ml de un tampón de glicina-NaOH a pH 10,6 o se obtiene directamente de la unidad de filtro aplicando presión de aire usando una jeringuilla de plástico reutilizable. Se obtiene un alícuota con una pipeta y se transfiere a una cubeta de fluorescencia de plástico de 10 x 10 mm Sarstedt, Alemania) o a una cubeta de 100 microlitros (Turner Blossystems, USA), respectivamente. La salida de fluorescencia se mide en un fluorómetro adaptado MycoMeter (Turner Biosystems, USA) a una longitud de onda de excitación de
50 365 nm y a una longitud de onda de emisión de 465 nm. La actividad enzimática se indica como la fluorescencia producida por el fluoróforo 4-metil-umbeliferona liberado tras la escisión enzimática del derivado 4-metilumbeliferilo. La

actividad se indica como unidades de fluorescencia/unidad de tiempo/ml.

Ejemplo 1

Linealidad entre la actividad APasa y el número de bacterias en series de dilución de agua de bebida

5 Se obtuvieron muestras de agua de bebida del grupo en el laboratorio MycoMeter y se añadió extracto de levadura hasta una concentración final de 125 mg/l. Después, la muestra se incubó a temperatura ambiente. El crecimiento bacteriano se monitorizó mediante mediciones de la DO a 620 en un espectrofotómetro. Cuando el crecimiento bacteriano alcanzó la fase log tardía (DO= 0,04), se obtuvieron muestras de agua de bebida para la determinación de recuentos de placa heterotrófica (HPC). Alícuotas del agua de bebida se diluyeron 100, 250, 500, 750 y 1000 veces con agua de bebida filtrada esterilizada en autoclave. Después se determinó la actividad de la fosfatasa alcalina (APasa) por triplicado para cada dilución de acuerdo con el procedimiento estándar descrito en la sección anterior de materiales y procedimientos.

15 Se realizó la media de seis determinaciones por duplicado de los HCP en la muestra de agua incubada y fue 77×10^5 ufc/ml. Este resultado de HPC se usó para calcular las ufc/ml para cada dilución de la muestra de agua incubada. La Fig. 1 demuestra la linealidad entre la actividad APasa y los HPC, calculado a partir de las diluciones del agua de bebida. Los datos del experimento 1 se usaron para calcular el número mínimo detectable de bacterias en una muestra de agua de bebida. El número mínimo detectable de bacterias fue 21 ufc/ml en una muestra de agua de bebida con el procedimiento estándar descrito para la presente invención y calculado a partir de los datos del experimento 1.

20 Simplemente aumentando o disminuyendo el tiempo de contacto entre la muestra y el sustrato enzimático y/o aumentando o disminuyendo la cantidad de agua filtrada se puede aumentar o disminuir el límite de detección de acuerdo con la demanda o los requisitos. Como ejemplo, una muestra de agua de bebida de 1 bacteria/ml se puede detectar filtrando 1 litro de muestra de agua de bebida y se incubaba durante 2,6 horas. Los resultados demuestran la elevada sensibilidad y reproducibilidad de las determinaciones de la actividad APasa, así como una fuerte relación lineal entre la actividad APasa ($r = 0,99$, $p < 0,001$) y un elevado abanico de concentraciones bacterianas calculadas. 25 Asimismo, los datos demuestran que la sensibilidad del procedimiento se puede aumentar simplemente incrementando el volumen de la muestra.

Ejemplo 2

Incremento lineal de la actividad APasa con el tiempo de incubación en una muestra de agua de bebida a la que se añade una cantidad mínima de extracto de levadura

30 Se obtuvieron muestras de agua de bebida del grupo en el laboratorio MycoMeter y se añadió extracto de levadura hasta una concentración final de 125 mg/l. Después, la muestra se incubó a temperatura ambiente. El crecimiento bacteriano se monitorizó mediante mediciones de la DO a 620 en un espectrofotómetro. Cuando el crecimiento bacteriano alcanzó la fase log tardía (DO= 0,04), se obtuvieron muestras de agua para la determinación de la actividad APasa de acuerdo con el procedimiento estándar descrito en la sección de materiales y procedimientos. El agua de bebida se diluyó 100 veces con agua de bebida filtrada y esterilizada en autoclave. La actividad APasa se determinó después por triplicado con tiempos de incubación variables de 15, 30, 45 y 60 minutos. La Fig. 2 muestra un gráfico de dispersión de la actividad APasa frente al tiempo de incubación. Los resultados demuestran la relación lineal entre el tiempo de incubación y la actividad APasa. Asimismo, los resultados demuestran que la sensibilidad del procedimiento se puede aumentar simplemente incrementando el tiempo de contacto entre la muestra y la molécula sustrato.

Ejemplo 3

Correlación entre la actividad APasa y las unidades formadoras de colonias estimadas de bacterias cultivables en agua caliente potable

45 Las muestras de agua se obtuvieron de sus salidas de agua en un hospital durante un periodo de un año. Las muestras de agua se analizaron para detectar la actividad APasa en 24 horas. Un laboratorio comercial realizó recuentos HPC de acuerdo con la norma danesa DSF 5984 descrita en la sección de materiales y procedimientos. La Fig. 3 muestra un gráfico de dispersión de la actividad APasa y los HPC. El resultado demuestra una correlación lineal positiva ($r = 0,93$, $p < 0,001$) entre la actividad APasa y los HPC en agua caliente potable.

Ejemplo 4

50 *Correlación entre la actividad APasa y las unidades formadoras de colonias estimadas de bacterias cultivables en agua de bebida*

Las muestras se obtuvieron de una serie de sistemas de agua de bebida, incluidos domicilios privados, de empresas

5 y edificios públicos. Los análisis se realizaron en un plazo de 2-12 horas desde la obtención. Las muestras de agua de bebida se conservaron a 5 °C hasta su análisis. La enumeración de bacterias cultivables y la determinación de la actividad APasa se realizó de acuerdo con los procedimientos estándar descritos en la sección de materiales y procedimientos anterior. La Fig. 4 muestra un gráfico de dispersión de la actividad APasa y los HPC en muestras de agua de bebida. El resultado demuestra una correlación lineal positiva ($r = 0,85$, $p < 0,001$) entre la actividad APasa y los HPC.

Ejemplo 5

Correlación entre la actividad APasa y el recuento directo con naranja acridina (AODC) en agua caliente potable

10 Las muestras se obtuvieron de una serie de sistemas de agua de bebida, incluidos domicilios privados, de empresas y edificios públicos. Los análisis se realizaron en un plazo de 24 horas desde la obtención de la muestra. El AODC se realizó como se ha descrito en la sección de materiales y procedimientos anterior. La Fig.5 muestra un gráfico de dispersión de la actividad APasa y el AODC en agua caliente potable. El resultado demuestra una fuerte correlación lineal positiva ($r = 0,78$, $p < 0,001$) entre la actividad APasa y los AODC.

Ejemplo 6

Linealidad entre la actividad de N-acetilhexosaminidasa y la biomasa de esporas fúngicas

15 Se preparó una suspensión de esporas fúngicas a partir de cultivos de agar (agar con extracto de malta) con el hongo *Penicillium commune*.

20 La biomasa de las esporas de la suspensión se determinó filtrando 6 ml de la suspensión de esporas a través de un filtro de membrana de nylon previamente pesado ($0,45 \mu\text{m}$) y se secó a 60 °C durante 24 horas. Una serie de diluciones de suspensiones de esporas se prepararon por duplicado transfiriendo 50 μl , 100 μl , 250 μl y 500 μl de la suspensión de esporas, respectivamente, a tubos de cultivo individuales. Las suspensiones de esporas se diluyeron hasta un total de 3 ml añadiendo agua destilada esterilizada en autoclave a cada uno de los tubos de cultivo.

25 La actividad de la enzima *N-acetilhexosaminidasa* de la suspensión de esporas se analizó como se describe en sección de materiales y procedimientos anterior, con las modificaciones siguientes: La unidad de filtro se saturó con un tampón adecuado que contiene el sustrato enzimático 4-metilumbeliferil- β -N-acetilglucosaminido. Tras incubar, la mezcla de incubación se obtuvo directamente de la unidad de filtro aplicando presión usando una jeringuilla de plástico reutilizable. Después, se analizó un alícuota de 100 μl mediante transferencia a una cubeta de plástico que contiene 2 ml del tampón adecuado a pH 10,6.

30 La fuerte correlación lineal positiva ($r = 0,9975$; $P < 0,001$) entre la biomasa de esporas y la actividad N-acetilhexosaminidasa se muestra en el gráfico de dispersión de la Fig. 6.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de preparación de muestras para un medio sospechoso de contener contaminantes, comprendiendo el procedimiento a) pasar un volumen conocido de dicho medio a través de un filtro desde un lado influente a un lado efluente, concentrando, de este modo, los contaminantes en el lado influente del filtro, b) poner en contacto el lado influente del filtro con un vehículo líquido que contiene al menos un sustrato que mediante la interacción con los contaminantes produce cada uno un resto detectable y c) permitir interactuar al sustrato con los contaminantes en el lado influente del filtro durante un periodo que sea suficiente para permitir detectar en el vehículo líquido el resto detectable.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, antes de la etapa a, el medio se pasa a través de un filtro previo que no retiene los contaminantes, pero retiene partículas más gruesas.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, seleccionándose los contaminantes del grupo que consiste en bacterias; hongos tales como hongos filamentosos y levaduras, algas, protozoos, esporas de bacterias, esporas de hongos y polen, y fragmentos de los mismos.
- 15 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio es un medio líquido.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el medio líquido se selecciona del grupo que consiste en agua ambiental, agua potable, agua caliente, agua industrial, agua de proceso, agua de limpieza in situ, en extracto líquido de un material sólido, una muestra de superficie suspendida o solubilizada y productos industriales líquidos tales como cosméticos, productos farmacéuticos y productos alimentarios.
- 20 6. El procedimiento según la reivindicación 4-5, en el que la viscosidad del medio líquido se reduce antes de la etapa a.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que la viscosidad se reduce mediante dilución o mediante tratamiento con un agente químico, tal como un agente adyuvante de la solubilidad o un detergente.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el medio es un medio gaseoso.
- 25 9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el medio gaseoso es aire, tal como aire procedente de una instalación estéril, de un dispositivo de flujo de aire laminar o aire ambiental.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el filtro tiene un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para retener sustancialmente todos los contaminantes presentes en el medio.
- 30 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el filtro tiene un tamaño de poro lo suficientemente grande como para permitir que el resto detectable pase a través del filtro.
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el tamaño de poro es como máximo de 20 μm .
13. El procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, en el que el tamaño de poro es al menos de 0,1 μm .
14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un sustrato produce el resto detectable, siendo escindido mediante una enzima que es característica para los contaminantes.
- 35 15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que la enzima está seleccionada del grupo que consiste en carbohidrasas, proteasas, lipasas, esterases, amidasas, sulfatasas, nucleasas y fosfatasas tales como fosfatasa alcalina.
16. El procedimiento según la reivindicación 14 ó 15, en el que la enzima es expresada constitutivamente por microorganismos.
- 40 17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que al menos un sustrato es un sustrato fluorógeno o cromógeno que produce productos fluorescentes azules, verdes y rojos como resto detectable.
- 45 18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en el que al menos un sustrato se selecciona del grupo que consiste en sal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato de disodio; sal 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-ona-7-il)-fosfato de amonio; sal fluoresceína-difosfato de tetraamonio; un derivado demetilumbeliferilo, tal como fosfato de 6,8-difluoro-4-metilumbeliferilo, sal trihidrato de 4-metilumbeliferil-fosfato de dicitohexilamonio, ácido libre de fosfato de 4-metilumbeliferilo; sal 4-metilumbeliferilfosfato de dilitio, 4-metilumbeliferil- β -N-acetilglucosamida y fosfato de troflurometilumbeliferilo, sales de fosfato de 4-nitrofenilo y fosfato de resorufina.

19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14-18, en el que el resto detectable es detectable en una cantidad de como máximo 100 picomoles, preferentemente como máximo de 50 picomoles, más preferentemente como máximo de 20 picomoles e incluso más preferentemente como máximo de 10 picomoles y del modo más preferente de como máximo 1 picomol.
- 5 20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones preferentes, en el que se usan al menos dos sustratos que producen restos detectables que proporcionan señales que pueden combinarse en un valor único de señal medida.
21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que se usan al menos dos sustratos que producen restos detectables que proporcionan señales distinguibles.
- 10 22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los contaminantes son microorganismos viables.
23. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cantidad de sustrato en el vehículo líquido no limita la velocidad de producción del resto detectable.
- 15 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que la velocidad de producción del resto detectable es una función de la cantidad de contaminantes en el volumen conocido del medio.
25. El procedimiento según la reivindicación 24, en el que la función es lineal.
26. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que varios volúmenes conocidos diferentes del medio se pasan cada uno a través de un filtro en la etapa a, para asegurar que al menos uno de los volúmenes contiene un número adecuado de contaminantes.
- 20 27. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el filtro es parte de un dispositivo de filtro estéril cerrado.
28. El procedimiento según la reivindicación 27, en el que el dispositivo de filtro estéril cerrado es desechable.
29. El procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, en el que el dispositivo de filtro estéril cerrado integra al filtro y a una carcasa de filtro en una unidad estructural cerrada irreversible.
- 25 30. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en el que el eje transversal más largo del dispositivo de filtro estéril cerrado no excede los 10 cm de longitud.
31. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la interacción de la etapa c se concluye interrumpiendo el contacto entre el sustrato y los contaminantes.
- 30 32. El procedimiento según la reivindicación 31, en el que la interrupción se logra evacuando el vehículo líquido desde el dispositivo de filtro mientras se retienen los contaminantes en el dispositivo de filtro.
33. El procedimiento según la reivindicación 32, en el que el vehículo líquido se evacua desde el dispositivo de filtro en la dirección que va desde el lado influente al efluente del filtro.
34. El procedimiento según la reivindicación 33, en el que la evacuación se logra aplicando una presión elevada sobre el lado influente del filtro o aplicando una presión reducida sobre el lado efluente del filtro.
- 35 35. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, en el que la interacción de la etapa c se concluye sobre el filtro o en el que la interacción no se concluye.
36. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende, después de la etapa c, una etapa d) posterior que implica detectar, cuantitativa o cualitativamente, el resto detectable en el vehículo líquido y correlacionar la detección del resto con la cantidad o presencia de contaminantes en la muestra.
- 40 37. El procedimiento según la reivindicación 36, en el que la detección de la etapa d se realiza midiendo la característica de fluorescencia del resto detectable.
38. El procedimiento según la reivindicación 37, en el que la fluorescencia se mide en la etapa d directamente sobre el vehículo líquido sin una interrupción del contacto entre el vehículo líquido y los contaminantes.
- 45 39. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 36-38, en el que la correlación de la etapa d comprende el uso de una curva estándar predeterminada que expresa la relación entre la cantidad de contaminantes y la cantidad de resto detectable en condiciones estándar.

40. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 36-39, en el que la detección se realiza en un sistema de microvaloración.
41. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los contaminantes se someten a una influencia potenciadora de la señal, bien antes de la etapa a o bien en la etapa b.
- 5 42. El procedimiento según la reivindicación 41, en el que la influencia potenciadora de la señal aumenta la sensibilidad total en una detección subsiguiente o favorece la detección subsiguiente de tipos específicos de contaminantes, o reduce la detección de tipos específicos de contaminantes.
43. El procedimiento según la reivindicación 41, en el que la influencia potenciadora de la señal está seleccionada de una sustancia potenciadora enzimática, una temperatura selectiva o un intervalo de temperatura selectivo, un pH selectivo, una concentración de sal selectiva, un potenciador del crecimiento no selectivo y una sustancia potenciadora del crecimiento selectiva.
- 10 44. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a está precedida por una incubación del medio.
45. El procedimiento según la reivindicación 44, en el que la incubación implica
- 15 - el tratamiento con una sustancia inductora de enzimas potenciando, por lo tanto, la detección del resto detectable y/o
- someter al medio a una sustancia selectiva para levadura, hongos o bacterias y/o
- someter al medio a un potenciador de crecimiento no selectivo para microorganismos y/o
- someter al medio a una sustancia capaz de extraer enzimas celulares.
- 20 46. Un kit para determinar contaminantes en un medio, comprendiendo el kit
- al menos un dispositivo de filtro estéril que comprende un filtro con un tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para retener los contaminantes en el lado influente del filtro,
- medios para hacer pasar un volumen conocido de medio a través del filtro,
- 25 - al menos un agente que, después de la interacción con los contaminantes, liberará un resto detectable, cuya cantidad puede correlacionarse con la cantidad de contaminantes que han interactuado con el agente, e
- instrucciones que establezcan las etapas para a) obtener un volumen conocido y hacerlo pasar a través del dispositivo de filtro estéril, b) poner en contacto el lado influente del filtro en el dispositivo de filtro con el agente, c) permitir que el agente interactúe con contaminantes que puedan estar en el lado influente del filtro y d) detectar cuantitativamente el resto detectable.
- 30 47. Uso de un dispositivo de filtro estéril cerrado tal como un recipiente de reacción para una reacción entre contaminantes retenidos en el dispositivo y un sustrato que libera un resto detectable cuando se pone en contacto con los contaminantes.

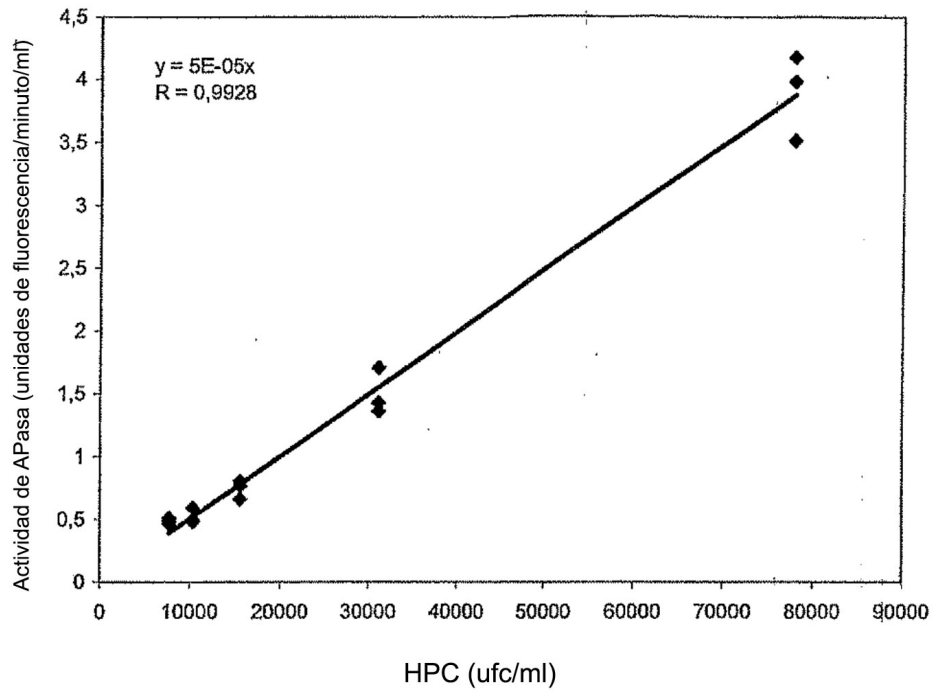


Fig. 1

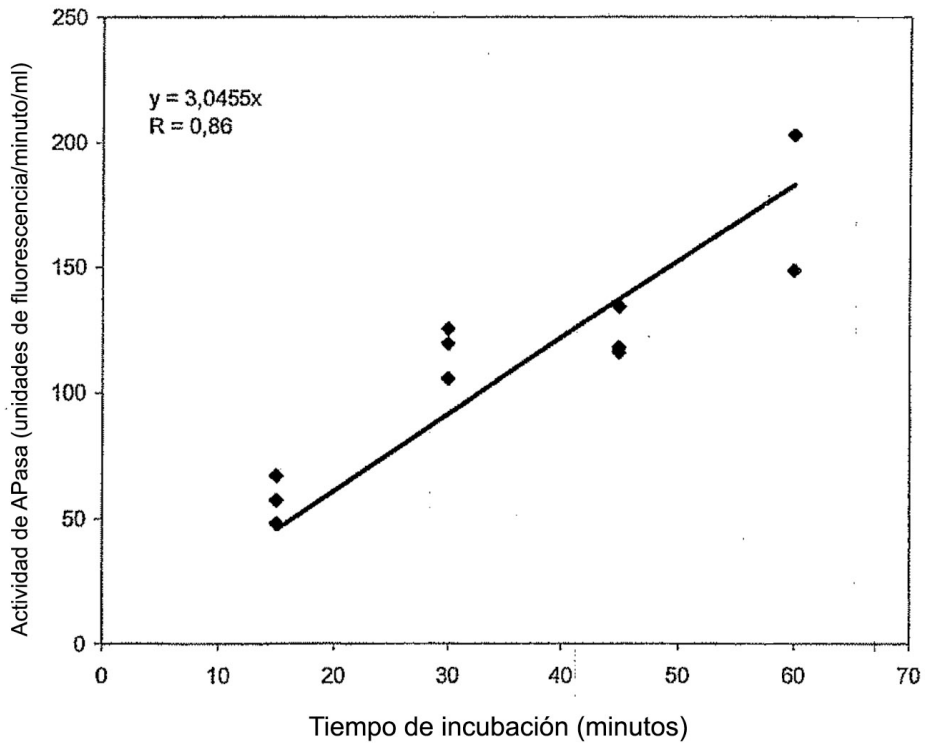


Fig. 2

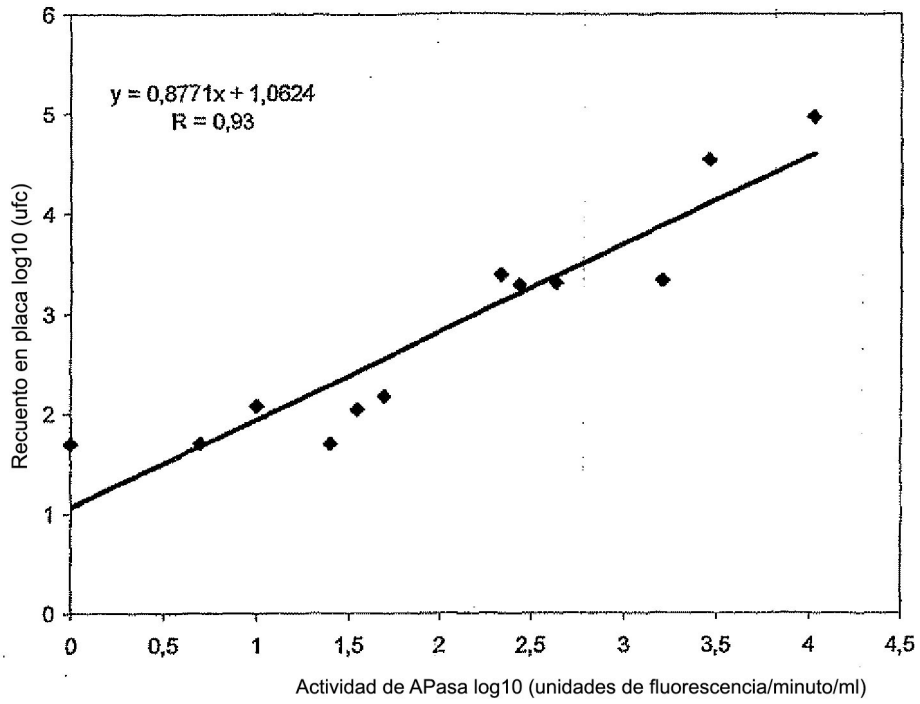


Fig. 3

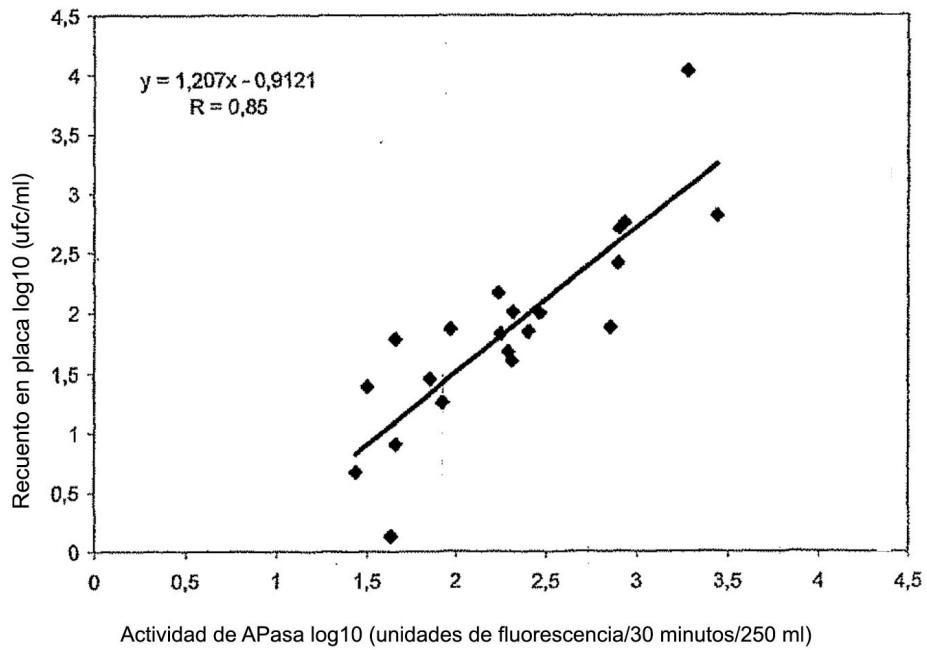


Fig. 4

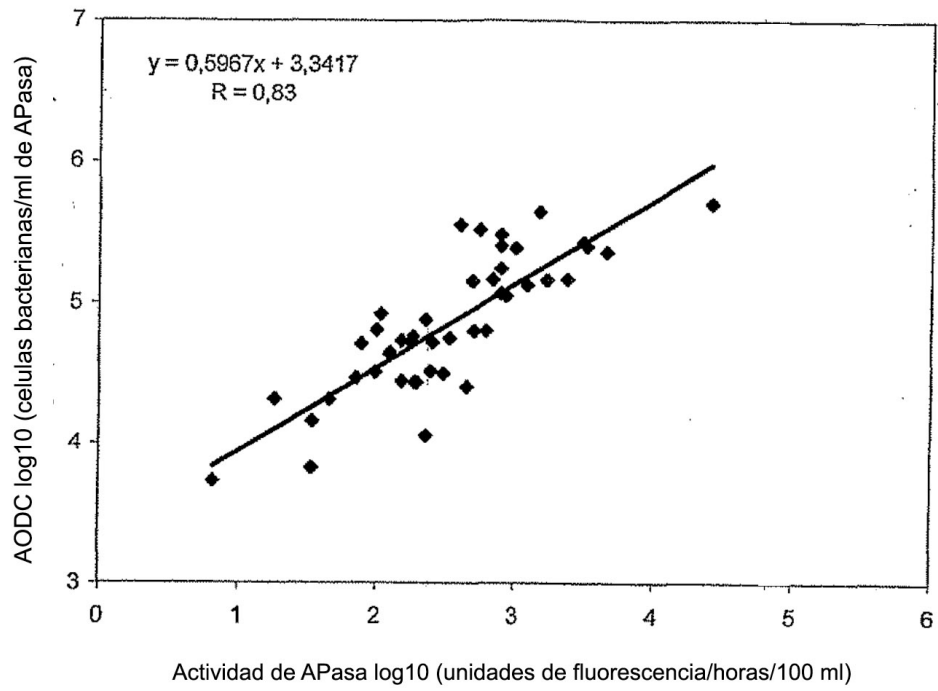


Fig. 5

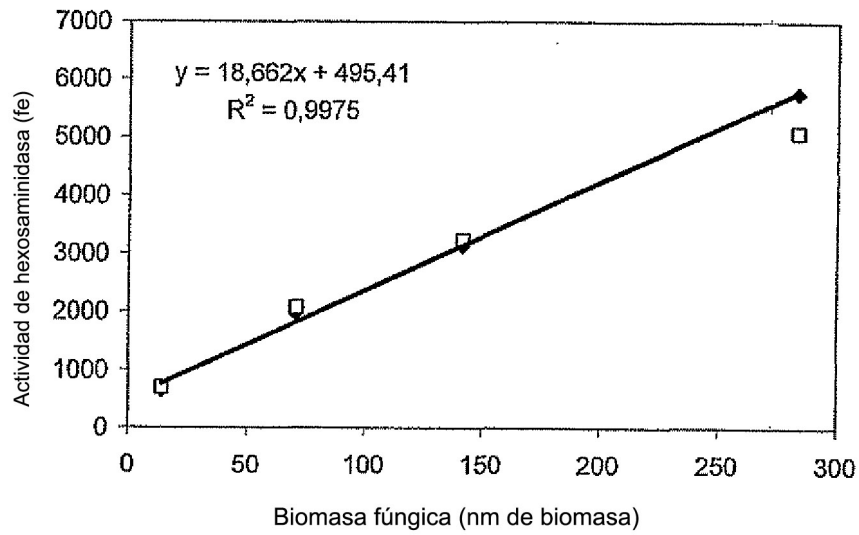


Fig. 6