



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 828**

51 Int. Cl.:
G01N 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07290215 .8**

96 Fecha de presentación : **20.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1826548**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Método y dispositivo de análisis microbiológico rápido.**

30 Prioridad: **24.02.2006 FR 06 50646**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.02.2010

73 Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

72 Inventor/es: **Grinon, Raphaël y**
Olivier, Stéphane

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 332 828 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).

ES 2 332 828 T3

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo de análisis microbiológico rápido.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo y a un método de análisis microbiológico rápido.

Actualmente, en el marco de las actividades industriales y médicas, el control de la calidad microbiológica de líquidos, gases o superficies, tiene que ajustarse a unas normas estrictas.

10 Por ello, las autoridades industriales y sanitarias y de seguridad tienen que poder disponer de herramientas para detectar una contaminación microbiológica lo más rápido posible, para poder aplicar con tiempo un remedio con un coste reducido.

15 En la práctica, la vigilancia microbiológica se realiza sobre un medio gelificado, sobre el cual los microorganismos que se han recogido sobre una membrana microporosa, se cultivan hasta que son visibles a simple vista.

20 El tiempo de incubación varía de un microorganismo a otro, pero generalmente es de al menos 24 horas y a veces más largo para microorganismos de crecimiento más lento (por ejemplo, las microbacterias) o porque los microorganismos están sometidos a estrés debido a sus condiciones ambientales.

25 Un modo de acelerar la detección, es reducir la duración mínima del cultivo (o incluso eliminarlo totalmente, en el caso de determinados microorganismos) basando la detección de los microorganismos en su actividad metabólica.

30 Un marcador metabólico universal, generalmente el trifosfato de adenosina (ATP), contenido en microorganismos vivos, se mide poniéndole en contacto con un reactivo que revela la presencia de ATP por luminiscencia, de modo que se puede detectar la presencia de microorganismos sin tener que esperar a que se formen las colonias sobre un medio gelificado y que sean visibles a simple vista.

35 La cantidad de luz emitida es una función de la masa del ATP y, por lo tanto, del número de microorganismos.

40 Ya se conoce en la técnica el dispositivo para la detección microbiológica rápida, Milliflex®, del solicitante que incluye:

45 - una estación en la cual un volumen de líquido se filtra a través de una membrana para capturar sobre la membrana del filtro cualquier microorganismo contenido en ese líquido;

50 - una estación para rociar un agente adaptado para hacer que el ATP de esos microorganismos sea accesible y un reactivo para revelar la presencia de ATP por luminiscencia, enfrente de la cual, el técnico coloca la membrana, después de la etapa de filtración, para que los reactivos se depositen sucesivamente; y

55 - una estación de medición de la cantidad de luz emitida en respuesta al depósito del reactivo, para revelar la presencia de ATP por luminiscencia, enfrente de la cual, el técnico coloca la membrana después de la etapa de rociado, recogiendo la luz emitida por la membrana con una cámara CCD, tratando y después analizado para detectar la presencia de microorganismos sobre la membrana.

60 El documento de patente de EE.UU. 3.940.250 sobre el que se basa el preámbulo de la reivindicación 1, describe otro dispositivo detector microbiológico rápido que comprende una estación de rociado y una estación de medición, para películas enrolladas en ambos lados.

65 El objetivo de la invención es proporcionar un dispositivo del mismo tipo que sea compacto y rápido, y que ofrezca una alta eficacia.

Para ello, se propone un dispositivo para el análisis microbiológico rápido, de un soporte microporoso, que tiene dos caras enfrentadas, adaptadas para retener microorganismos, que incluye:

70 - unos medios para sujetar dicho soporte en una posición predeterminada en la cual una primera cara de dichas caras enfrentadas de dicho soporte, está en una primera posición predeterminada y una segunda cara de dichas caras enfrentadas de dicho soporte está en una segunda posición predeterminada;

75 - una estación de rociado sobre dicho soporte, de un reactivo para revelar la presencia de ATP por luminiscencia, estando dicha estación enfrente de dicha primera posición; y

80 - una estación de medición de dicha luminiscencia, enfrente de dicha segunda posición;

85 caracterizado porque dicha estación de rociado y dicha estación de medición están una frente a otra;

por lo que dicho dispositivo es adecuado para analizar soportes cuando dicha luminiscencia se emite por lo menos en el lado enfrentado al lado en el que se pulveriza dicho reactivo.

ES 2 332 828 T3

Ya que la luz es emitida por el soporte en el lado que está enfrente de la estación de medición, la estación de medición y la estación de rociado están dispuestas cada una en un lugar óptimo para satisfacer sus funciones respectivas, simultáneamente.

5 Así, la estación de medición está situada lo más cerca posible del soporte, para recoger la mayor cantidad posible de luz emitida, sin estar impedida por la estación de rociado y sin impedir la pulverización.

De acuerdo con las características de la invención, que se prefieren por razones de sencillez y comodidad en la fabricación y en el uso:

10

- dicha estación de rociado está alineada con dicha primera posición;

- dicha estación de medición está alineada con dicha segunda posición;

15

- dichos medios de sujeción incluyen una placa que tiene un orificio en su centro;

- dicha placa incluye una pestaña anular alrededor de dicho orificio;

- dicha estación de medición incluye un fotomultiplicador y un miembro de cierre;

20

- dicho miembro de cierre incluye una placa fina opaca, móvil entre una posición en la que está lejos de dicho fotomultiplicador y una posición en la que aísla dicho fotomultiplicador de la luz;

- dicha estación de rociado incluye una boquilla de pulverización;

25

- dicho dispositivo incluye además, una estación de lisis de los microorganismos;

- dicha estación de lisis incluye una caja de microondas y un magnetrón;

30

- dicha caja de microondas tiene forma de paralelepípedo;

- dicha caja incluye un primer cuerpo de caja, un segundo cuerpo de caja y una abrazadera a la cual están unidos dichos primer y segundo cuerpos de la caja;

35

- dicha caja tiene una ventana en dicha abrazadera entre dichos primer y segundo cuerpos de la caja;

- dicha ventana se abre sobre dicha estación de rociado y dicha estación de medición;

- dichos medios de sujeción están adaptados para mover dicho soporte desde dicha posición predeterminada a una posición en la que dicho soporte está en el interior de dicha estación de lisis;

40

- dichos medios de sujeción están conectados con una cinta a un motor; y/o

- dicho reactivo se basa en luciferina-luciferasa.

45

Un segundo aspecto de la invención consiste en un método de análisis microbiológico rápido de un soporte susceptible de contener microorganismos, caracterizado porque incluye:

- la etapa de obtener un dispositivo del tipo anterior;

50

- la etapa de situar dicho soporte en dicha posición predeterminada;

- la etapa de rociar dicho reactivo sobre dicho soporte; y

55

- y simultáneamente a dicha etapa de rociado, la etapa de medición de la cantidad de luz emitida como respuesta a dicho reactivo.

La configuración del dispositivo con la estación de rociado situada enfrente de la estación de medición, indica que las etapas de rociado y de medición se pueden efectuar simultáneamente y de forma óptima durante el desarrollo del método.

60

Según las características que se prefieren por razones de sencillez y de comodidad para la fabricación y el uso, se selecciona como soporte una membrana microporosa.

Las características y las ventajas de la invención se revelan con la siguiente descripción, que se ofrece a modo de ejemplo preferido pero no limitativo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

65

- la figura 1 es una vista en perspectiva, de un dispositivo para análisis microbiológico rápido, que muestra un carro móvil del dispositivo en una posición en la cual recibe una unidad de filtro;

ES 2 332 828 T3

- la figura 2 es una vista en perspectiva a una escala mayor que en la figura 1, de este dispositivo en una sección de un plano vertical centrado en la trayectoria del carro;

5 - las figuras 3 y 4 son vistas similares a la figura 2, pero que muestran respectivamente la posición que ocupa el carro móvil cuando se coloca en una primera y en una segunda posición de tratamiento de una membrana de la unidad de filtro;

10 - las figuras 5 y 6 son dos vistas en perspectiva de una sección con diferentes ángulos y a una escala mayor que la figura 3;

15 - la figura 7 es un cronograma que muestra, con una escala de tiempo común (el eje de abscisas) y una escala de porcentaje común (el eje de ordenadas), cómo varían en función del tiempo, cuando la membrana que incluye la unidad de filtración se calienta hasta una temperatura de 90°C, la tasa de actividad remanente de un reactivo depositado previamente sobre la membrana y la tasa de lisis de un primer y segundo tipo de microorganismos presentes sobre la membrana;

20 - la figura 8 es un cronograma que muestra con una escala de tiempo común (el eje de abscisas), cómo varían respectivamente la cantidad relativa de luz emitida por la membrana y su entorno inmediato, antes, durante y después del depósito de un reactivo que revela la presencia de ATP mediante luminiscencia, y la cantidad de luz que se habría emitido sin el depósito de este reactivo;

25 - la figura 9 es un cronograma similar al de la figura 8, pero que muestra de forma aislada cómo varía, en función del tiempo, la cantidad de luz emitida solamente por la puesta en contacto del reactivo que revela la presencia de ATP de los microorganismos en la membrana;

30 - la figura 10 es un diagrama de bloques del dispositivo, que muestra en particular un microordenador del dispositivo;

35 - la figura 11 es un diagrama de flujo que muestra las operaciones efectuadas por el microordenador sobre los datos suministrados por un fotomultiplicador del dispositivo; y

40 - la figura 12 es un cronograma que muestra, con una escala de tiempo común, (el eje de abscisas), como varía la cantidad de luz emitida por la membrana y su entorno inmediato, para diferentes cantidades iniciales de ATP indeseado, antes, durante y después del depósito del reactivo, para revelar la presencia de ATP por luminiscencia.

45 El dispositivo de análisis rápido 1 de una unidad de filtro 15 incluye una estación de rociado 2, una estación de lisis 3 y una estación de medición de la luz 4.

50 La estación de rociado 2 y estación de medición 4 están una enfrente de la otra y la estación de lisis 3 está en la proximidad de las estaciones 2 y 4.

55 La estación de rociado 2 incluye una boquilla de pulverización 21 conectada por un conducto 22 a un matraz, no mostrado.

60 La boquilla de pulverización 21 tiene una cabeza cónica 25 y está fijada por medio de una placa 23 a un bastidor del dispositivo (no mostrado).

65 El matraz al que se conecta el conducto 22, contiene un reactivo para revelar la presencia de ATP por la luminiscencia, a base de agua, un complejo de luciferina-luciferasa y magnesio. El matraz es portador de un chip de RFID en el que se almacenan informaciones relativas al reactivo, tal como el volumen inicial de reactivo contenido en el matraz, la fecha de caducidad del reactivo o el número de ciclos que se pueden realizar usando el volumen restante de reactivo en el matraz.

70 La estación de lisis 3 incluye una caja 30 de forma generalmente paralelepípeda y un magnetrón 31 (representado en la figura 1 con su panel de control electrónico) conectado por un cable coaxial (no mostrado) a una antena (no visible) en el interior de la caja 30.

75 El magnetrón 31 y su panel de control se montan, de forma similar a la placa 23 de la boquilla 21, sobre el bastidor del dispositivo (no mostrado).

80 La caja 30 tiene un cuerpo de la caja superior 28, un cuerpo de la caja inferior 29 y una abrazadera con sección en U 32.

85 Cada cuerpo de la caja tiene generalmente forma paralelepípeda y tiene una cara abierta.

90 El cuerpo de la caja 28 (respectivamente 29) tiene alrededor de su cara abierta, una pestaña de contorno rectangular 41 (respectivamente 42), conectada transversalmente con el resto del cuerpo de la caja.

ES 2 332 828 T3

La abrazadera en forma de “U” 32, tiene dos grandes ramas 43 conectadas entre sí por una pequeña rama transversal 45.

5 En el estado ensamblado, cada pestaña 41, 42 coopera con las ramas de la abrazadera 32, de modo que las caras abiertas de los cuerpos de la caja 28 y 29, están dispuestas una enfrente de la otra.

Los cuerpos de la caja 28, 29 y la abrazadera 32 de la caja 30, tienen dimensiones tales, que el magnetrón 31 produce ondas estacionarias en la cavidad delimitada por la caja 30.

10 En el estado ensamblado, el espacio en el lado de la caja opuesto a la rama 45, entre las ramas 43 y entre las pestañas 41 y 42, está abierto en dirección hacia la estación de rociado 2 y la estación de medición 4, en virtud de una ventana 39.

15 En la proximidad de la ventana 39 hay una aleta 68 para bloquear cerrando esta ventana, para aislar la estación de rociado 2 y la estación de medición 4 de la interferencia electromagnética generada por el magnetrón 31.

La estación de medición 4 incluye un fotomultiplicador 50 que atraviesa una tabla 51 y un elemento de cierre 52 (figura 6).

20 El fotomultiplicador 50 es un fotomultiplicador 9266B de Electron Tubes®.

El elemento de cierre 52 se muestra con detalle en la figura 6 e incluye una placa opaca 53, una varilla 56, una manivela 55 y un motor 54.

25 La placa 53 es móvil y está alojada en una cavidad formada en la tabla 51 y está conectada por la varilla 56 a la manivela 55.

El dispositivo 1 también incluye un carro 5 que tiene una placa 12 y un reborde 9 (figuras 2 a 4). La placa 12 está fijada al reborde 9 por dos tornillos 7 (figura 1).

30 Un orificio cilíndrico en la placa 12 se abre a cada lado de la placa.

Este orificio está flanqueado por una pestaña anular 13 rebajada en relación con cada lado de la placa 12.

35 El rebajo en el lado de la placa 12 que está enfrente del fotomultiplicador 50, aloja una ventana de vidrio 17.

La unidad de filtro 15 incluye un cuerpo 18 alrededor de una membrana microporosa 19 que tiene dos caras enfrentadas 10 y 11.

40 El reborde 9 en el carro 5 está conectado por una cinta 64, fijada al reborde por un tornillo 8 y por un conjunto de poleas 62, 63 y 67 a un motor 65 (figuras 1 y 2), situadas fuera de la caja 30, en la proximidad de la rama 45 de la abrazadera 32.

45 La cinta 64 tiene una sección curva para presentar una resistencia a la flexión que le permita transmitir una fuerza de empuje, a la vez está adaptada para ser enrollada alrededor de una polea.

La cinta 64 atraviesa la caja 30 por medio de la ventana 39 y por un agujero oblongo 46 formado en la rama pequeña 45 de la abrazadera 32 (figuras 2 a 4).

50 El carro 5 se fija a la cinta para mover el carro entre una posición de recepción (figuras 1 y 2), una primera posición de tratamiento (figuras 3, 5 y 6) y una segunda posición de tratamiento (figura 4).

55 El dispositivo 1 también incluye en el lado opuesto al motor 65, una ventana 60 y una tapa 61 adaptada para que cuando se cierra, la ventana 60 sea estanca a la luz.

En la posición de recepción, con la tapa 61 abierta, la placa 12 sobresale del dispositivo a través de la ventana 60.

60 En la primera posición de tratamiento, el carro 5 está entre la boquilla 21 y el fotomultiplicador 50, con el resultado de que en esta posición, la estación de rociado 2 está enfrente y alineada con la cara 10 de la membrana 19, mientras que la estación de medición 4 está enfrente y alineada con la cara 11 de la membrana a través de la ventana 17.

La cinta 64 atraviesa totalmente la caja 30 en la posición de recepción y en la primera posición de tratamiento.

65 En la segunda posición de tratamiento, el carro 5 está en el interior de la caja 30 de la estación de lisis 3, de modo que la membrana 19 está situada completamente en el interior de esta caja y el reborde 9 está entre las pestañas 41 y 42.

ES 2 332 828 T3

Los sensores en las distintas estaciones de tratamiento vigilan el estado operativo del dispositivo, particularmente un lector/escritor de RFID al lado del matraz que contiene el reactivo, una pluralidad de sensores de la posición del carro y una pluralidad de sensores de la temperatura (para el fotomultiplicador y el magnetrón, por ejemplo).

5 La estación de rociado 2, la estación de lisis 3, la estación de medición 4, los motores 54 y 65 y los diversos los sensores están conectados a un microordenador 82, tal y como se muestra en el diagrama de bloques de la figura 10.

10 El microordenador 82 está adaptado particularmente para ejecutar las instrucciones para el comienzo o la parada de un ciclo de análisis, para recibir instrucciones de un técnico a través de una interfaz hombre-máquina 85 y para almacenar los datos que vienen del fotomultiplicador en una memoria. El microordenador 82 también está adaptado para presentar visualmente en una pantalla 83 y/o para imprimir a través de una impresora de etiquetas 84, la información destinada al técnico (por ejemplo el progreso del ciclo actual, el número de ciclos aún disponibles en el matraz, el resultado de los análisis precedentes, y diferentes informes de alarma y de mantenimiento del dispositivo).

15 A continuación, se describe el funcionamiento del dispositivo 1.

Antes de realizar un ciclo de análisis, el técnico recoge cualquier microorganismo que pueda estar presente en un líquido o en un gas, o en una superficie sobre la membrana microporosa 19 de la unidad de filtro 15.

20 Después de seleccionar la placa apropiada 12 para cooperar con el cuerpo 18 de la unidad de filtro y atornillarla en el reborde 9, el técnico coloca a continuación la unidad de filtro 15 sobre el carro móvil 5 (que está ahora en la posición de recepción representada en las figuras 1 y 2), centrándola en relación con la pestaña 13, apoyándose entonces el borde inferior del cuerpo 18 de la unidad 15, sobre esta pestaña.

25 Usando una interfaz hombre-máquina, el técnico ordena a continuación el comienzo de un ciclo de análisis de la membrana.

Particularmente, el técnico elige entre tres ciclos diferentes, a saber un ciclo sin tratamiento previo, un ciclo con tratamiento previo "manual" y un ciclo con tratamiento previo automático.

30 Las diferentes etapas del ciclo con tratamiento previo manual se describen a continuación.

Inicialmente, el módulo de control acciona el motor 65 para que las poleas 62, 63 y 67 sometan al carro móvil 5 a un movimiento de traslación.

35 Este mueve el carro desde su posición de recepción hasta su primera posición de tratamiento (figura 3), entre el módulo de rociado 2 y el módulo de medición 4. Durante este movimiento, cuando el carro 5 ha pasado completamente a través de la ventana 60, la tapa 61 del dispositivo, que es por resorte, se cierra y las etapas posteriores se realizan en un entorno cerrado y oscuro.

40 En la primera posición de tratamiento, la estación 2 pulveriza un volumen predeterminado de reactivo. La boquilla de pulverización 21 se diseña para que deposite microgotitas del reactivo de forma homogénea y regular sobre toda la membrana 19. Con el rociado de microgotitas se divide suficientemente el volumen de líquido depositado, para evitar cualquier riesgo de dilución.

45 El reactivo se pone a continuación en contacto con el ATP indeseado, sobre la membrana, que no proviene de los microorganismos que retiene, sino de la contaminación externa, por ejemplo durante el transporte o la filtración.

50 Poniendo en contacto el reactivo con el ATP indeseado, se produce una reacción química que genera la luz y consume el ATP indeseado. El ATP indeseado consumido de este modo, no interferirá con las etapas posteriores del ciclo de análisis.

El reactivo no interacciona con el ATP de los microorganismos, porque en esa etapa del ciclo, todavía está protegido del reactivo por las paredes celulares de los microorganismos.

55 Cuando se pulveriza el reactivo, el módulo de control acciona el motor 65 para que el carro móvil 5 entre en la caja 30 a través de la ventana 39, para empezar con la segunda posición de tratamiento, en el interior de la cavidad de microondas de la estación de lisis 3.

60 Cuando el carro 5 se introduce en la caja 30, la aleta 68, que es por resorte, se cierra para aislar la caja 30 del resto del dispositivo y para minimizar la interferencia electromagnética causada por la emisión de microondas.

65 El magnetrón 31 emite a continuación un campo mono-onda de modo que una onda incidente se propaga en la cavidad de microondas, formada por la caja 30. En la caja ondas se establecen estacionarias (como resultado de la reflexión de la onda incidente sobre las superficies de la caja 30).

Las porciones de las pestañas 41 y 42 situadas en la proximidad de la ventana 39 y de la abertura 46, también ayudan para minimizar la pérdida de campo magnético a través de estas aberturas.

ES 2 332 828 T3

Las moléculas polarizadas (particularmente el agua contenida en la membrana después de la filtración y/o aportada por el primer rociado de reactivo), excitadas por el campo de microondas, calientan la membrana 19 hasta una temperatura de aproximadamente 90°C.

5 A esa temperatura, el reactivo sobre la membrana se elimina rápidamente, tal y como se muestra en la curva 75 en la figura 7, lo que representa la proporción de reactivo que todavía está activo (nivel de actividad remanente) en función del tiempo.

10 Después de 6 segundos de exposición a esta temperatura, el 20% del reactivo se ha eliminado, después de 15 segundos el 90% del reactivo se ha eliminado y después de 17 segundos, se ha eliminado todo el reactivo.

15 La cinética de la lisis de los microorganismos a esta temperatura es más lenta. Las curvas 76 y 77 en la figura 7 representan el porcentaje de microorganismos que experimentan la lisis en función del tiempo y para dos tipos de microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae* en el caso de la curva 76 y *Cryptococcus* en el caso de la curva 77). Nótese que en el momento en el que se elimina todo el reactivo, solamente una pequeña cantidad de microorganismos ha experimentado la lisis.

20 Así, las paredes celulares de la mayoría de los microorganismos no han experimentado la lisis (y, por lo tanto, el ATP de los microorganismos no se ha vuelto accesible) en el momento en el que se elimina el reactivo depositado previamente. De este modo, la porción principal del ATP de los microorganismos no es consumida por el reactivo.

Además, la eliminación del reactivo se acelera porque el incremento de la temperatura conduce a una sequedad parcial de la membrana 19, volviendo al calor más eficaz para eliminar el reactivo.

25 El calentamiento por microondas representa una entrada de únicamente la cantidad necesaria de energía, que es una función de la cantidad de agua presente en la membrana, sin producir calor residual que podría interferir con las etapas siguientes del proceso.

30 Después de esta etapa de calentamiento, el ATP de los microorganismos que han experimentado la lisis, está accesible para ser analizado. El motor 65 es accionado a continuación para mover el carro 5 fuera de la caja 30 y volver a la primera posición de tratamiento, después de lo cual, el motor 54 del elemento de cierre 52 de la estación de medición, es accionado para girar la manivela 55 y mover la placa opaca 53 hasta una posición alejada del fotomultiplicador 50 (figura 3).

35 El fotomultiplicador mide después la cantidad de luz que recibe a través de la ventana 17, emitida por los materiales situados en el "campo de visión" del fotomultiplicador (aquí, la membrana 19 y su entorno inmediato).

40 Las operaciones realizadas con el microordenador cuando se abre el elemento de cierre, se describen a continuación haciendo referencia al diagrama de flujo de la figura 11.

En la operación 90, desde un tiempo t_1 (aquí, 30 s) hasta un t_2 (aquí, 300 s), el microordenador registra los datos medidos, transmitidos por el fotomultiplicador.

45 En un tiempo t_0 posterior a t_1 y anterior a t_2 (figura 8), la estación de rociado 2 efectúa una segunda deposición regular y homogénea de microgotitas del reactivo contenido en el matraz, sobre toda la membrana 19, mientras que continúa el registro de la cantidad de luz.

La luz es emitida desde ambos lados de la membrana 19 y de la placa 12, gracias al poco espesor de la membrana y al orificio formado en la placa 12 para este fin.

50 La cantidad de luz registrada en forma de unidad de luz relativas (ULR) en función del tiempo, se indica con la curva 78 en la figura 8, que muestra que la cantidad de luz disminuye regular y logarítmicamente en el instante t_0 que se corresponde con el instante en el que se rocía el reactivo sobre la membrana.

55 Esta fase que disminuye se corresponde con la pérdida de excitación por la emisión fosforescente de fotones emitidos de forma natural por el material situado en el campo de visión del fotomultiplicador.

Más allá del instante t_0 , tiene lugar una transición brusca en la emisión de luz, debido a que el reactivo entra en el contacto con el ATP de los microorganismos, que se ha vuelto accesible por la etapa de lisis.

60 Después de esta transición brusca, la cantidad de la luz vuelve a disminuir logarítmicamente.

Usando los datos registrados, el microordenador realiza la operación 91 y extrapola en función del tiempo la cantidad de luz que habría sido emitida si el reactivo no se hubiera depositado sobre la membrana.

65 En el ejemplo presente, esta operación se basa en los datos registrados desde t_1 (50 s) hasta t_0 (100 s) y a partir de los datos registrados desde $t_3 = t_0 + x$ hasta t_2 (300 s), en donde x se elige de modo que t_3 sea suficientemente lejano de t_0 para que se considere que a partir de t_3 , la adición de reactivo tiene una influencia despreciable (aquí, $t_3 = 250$

ES 2 332 828 T3

s). El microordenador deduce a partir de los datos registrados los coeficientes de una función logarítmica que varía globalmente entre t_1 y t_0 y entre t_3 y t_2 como la cantidad de luz representada por la curva 78.

En el ejemplo presente, esta función es $Q(t) = -16518 \cdot \ln(t) + 120334$ y está representada por la curva 79 en la figura 8; aquí el coeficiente de correlación entre los datos registrados y los datos procedentes de la función extrapolada es 0,09994 en los intervalos de tiempo $[t_1, t_0]$ y $[t_3, t_2]$.

Las curvas 78 y 79 difieren significativamente entre sí, durante un intervalo de tiempo en el que el límite inferior es el instante t_0 (100 s) en el que se pulveriza el reactivo (aquí, el intervalo [100 s, 150 s]).

El microordenador determina entonces, con la operación 92, a partir de las cantidades de luz registradas y extrapoladas, representadas respectivamente por las curvas 78 y 79, un conjunto de valores en función del tiempo representativo de la cantidad de luz que proviene solamente de la puesta en contacto del ATP de los microorganismos con el reactivo. Ese conjunto de valores está representado por la curva 80 en la figura 9.

En el ejemplo presente, el microordenador calcula la diferencia, para cada instante entre t_1 a t_2 , en el que se ha registrado un valor de cantidad de luz, entre ese valor y el valor dado por la función de extrapolación $Q(t)$ en el mismo instante.

Esta sustracción punto a punto, permite filtrar numéricamente el ruido de fondo luminoso indeseado (también denominado “disminución del ruido blanco”) para obtener el conjunto de valores correspondiente a la cantidad de luz que proviene solamente del ATP de los microorganismos.

La filtración del ruido de fondo elimina los efectos de las condiciones de almacenamiento (cuya influencia es importante para la emisión de la luz natural), de la naturaleza del producto depositado o filtrado sobre la membrana (que emite luz por sí mismo, dependiendo de su composición), y de las condiciones experimentales del análisis (estanqueidad a la luz, perturbaciones térmicas, eficacia del fotomultiplicador).

La cantidad de luz filtrada de este modo se integra a continuación entre los instantes t_1 y t_2 (operación 93) y una prueba (94) compara los resultados de esta integración con un umbral que se corresponde a la sensibilidad requerida por el usuario para detectar el microorganismo.

Entre otras cosas, el valor de este umbral se elige en función del tipo de microorganismo que se va a detectar, ya que la masa de ATP contenida en los microorganismos puede variar significativamente de un tipo de microorganismo a otro.

Si el resultado de esta integración es superior al valor umbral, el ATP que origina esta luz se considera que proviene de la presencia de microorganismos sobre la membrana.

Inversamente, si el resultado de esta integración es inferior al valor umbral, se estima entonces que el ATP no está presente en cantidades suficientes para considerar que estén presentes microorganismos (o presentes en cantidades suficientemente elevadas) sobre la membrana.

El microordenador muestra entonces la información apropiada en la pantalla del dispositivo, al realizar la operación 95 o la operación 96, en función del resultado de la prueba 94.

Una vez que se ha realizado el análisis, el módulo de control mueve el carro 5 desde la primera posición de tratamiento hasta la posición de recepción, en la cual el técnico puede retirar la unidad de filtro 15 que se ha analizado y sustituirla por la siguiente unidad que se va a analizar.

La disposición de la estación de medición 4 y de la estación de rociado 2, en relación con la membrana 19, en la primera posición de tratamiento, indica que el fotomultiplicador 50 está lo más cerca posible de la membrana 19 y dispuesto transversalmente a la misma, sin estar obstaculizado por la estación de rociado y sin obstaculizar la estación de rociado. Esta disposición permite recoger el máximo de luz y, por lo tanto, optimiza la sensibilidad de la detección del fotomultiplicador.

Por otra parte, usando un elemento de cierre que tiene una placa opaca delgada y un mecanismo remoto de apertura y cierre, se reduce adicionalmente la distancia entre el fotomultiplicador 50 y la membrana 19 y se incrementa de este modo la sensibilidad de la detección.

La configuración del dispositivo, la etapa de tratamiento previo y el tratamiento de los datos de las señales luminosas registradas, hacen que el dispositivo de detección sea altamente sensible.

Un dispositivo del tipo anterior puede detectar la presencia de sólo aproximadamente diez femtogramos de ATP.

Esta sensibilidad implica que se puede detectar una amplia variedad de microorganismos y se puede detectar la presencia de un solo microorganismo sobre la membrana, sin incubación.

ES 2 332 828 T3

Las etapas de tratamiento previo realizadas en el caso de un ciclo automático, se describen a continuación.

El ciclo de análisis automático asegura que se consuma todo el ATP indeseado.

5 En la figura 12, que representa la cantidad de luz registrada antes y después de depositar un reactivo en el instante t_0 , para diferentes cantidades de ATP indeseado que no se han consumido (170 fg en el caso de la curva 78A, 66 fg en el caso de la curva 78B, 52 fg en el caso de la curva 78C y 18 fg en el caso de la curva 78D), el ATP indeseado que no se ha consumido puede estar presente en grandes cantidades y causar análisis erróneos (detección de “falsos positivos”: se detecta la presencia de microorganismos aunque la membrana no contiene ninguno).

10 Por lo tanto, es beneficioso proporcionar al usuario un ciclo que confirme que la etapa de tratamiento previo ha consumido todo el ATP indeseado.

15 Antes de efectuar la lisis de los microorganismos, cuando el carro 5 se sitúa en la primera posición de tratamiento y simultáneamente al rociado del reactivo, se abre el elemento de cierre 52 para que el fotomultiplicador 50 mida continuamente la cantidad de luz emitida por la membrana y su entorno inmediato, durante la etapa de rociado. El microordenador compara esta medición con un valor umbral predeterminado y la pulverización del reactivo continúa mientras que la cantidad de luz medida por el fotomultiplicador sea superior a ese umbral.

20 Cuando la cantidad de luz medida cae por debajo del umbral, la masa no consumida de ATP indeseado, que todavía está presente sobre la membrana, se estima que se ha vuelto despreciable y se detiene la pulverización. A continuación, se mueve el carro hacia la segunda posición de tratamiento, para continuar con el ciclo del análisis.

25 En una variante, en vez de integrar todos los valores correspondientes a la cantidad de luz representada por la curva 80, el microordenador puede seleccionar el valor máximo de ese conjunto y compararlo con un valor umbral predeterminado.

En otra variante, el calentamiento de la membrana se realiza con rayos infrarrojos.

30 En otra variante, la etapa de termólisis se sustituye por una etapa de rociado de un reactivo que permite o bien la lisis química de los microorganismos o bien volver la membrana permeable a los microorganismos para hacer que el ATP que contienen sea accesible al reactivo, para revelar el ATP por luminiscencia que se pulveriza posteriormente.

35 En otra variante, se emplea el dispositivo para realizar el recuento de microorganismos sobre la membrana, sustituyendo el fotomultiplicador por una cámara CCD o bien tratando y/o analizando la membrana varias veces, una región elemental cada vez.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Dispositivo para el análisis microbiológico rápido de un soporte microporoso (19) que tiene dos caras opuestas (10, 11) adaptadas para retener microorganismos, que incluye:

- unos medios (5) para sujetar dicho soporte (19) en una posición predeterminada en la cual una primera cara (10) de dichas caras enfrentadas de dicho soporte (19), está en una primera posición predeterminada y una segunda cara (11) de dichas caras enfrentadas de dicho soporte (19) está en una segunda posición predeterminada;

10 - una estación (2) para rociar sobre dicho soporte (19) un reactivo para revelar la presencia de ATP por luminiscencia, estando dicha estación (2) enfrente de dicha primera posición; y

- una estación (4) para medir dicha luminiscencia, enfrente de dicha segunda posición;

15 **caracterizado** porque dicha estación de rociado y dicha estación de medición están una enfrente de la otra;

por lo que dicho dispositivo es adecuado para analizar soportes cuando dicha luminiscencia es emitida por lo menos en el lado enfrentado al lado en el que se pulveriza dicho reactivo.

20 2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha estación de rociado (2) está alineada con dicha primera posición.

25 3. Dispositivo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicha estación de medición (4) está alineada con dicha segunda posición.

4. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dichos medios de sujeción incluyen una placa (12) que tiene un orificio en su centro.

30 5. Dispositivo según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicha placa (12) incluye una pestaña anular (13) alrededor de dicho orificio.

6. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dicha estación de medición incluye un fotomultiplicador (50) y un elemento de cierre (52).

35 7. Dispositivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dicho elemento de cierre (52) incluye una placa opaca delgada (53) móvil entre una posición en la cual está alejada de dicho fotomultiplicador (50) y una posición en la cual aísla dicho fotomultiplicador (50) de la luz.

40 8. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque dicha estación de rociado (2) incluye una boquilla de pulverización (21).

9. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque incluye adicionalmente una estación de lisis de los microorganismos (3).

45 10. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque dicha estación de lisis incluye una caja de microondas (30) y un magnetrón (31).

50 11. Dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado** porque dicha caja de microondas (30) tiene forma de paralelepípedo.

12. Dispositivo según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dicha caja (30) incluye un primer cuerpo de la caja (28), un segundo cuerpo de la caja (29) y una abrazadera (32) a la que se unen dichos primer y segundo cuerpos de la caja.

55 13. Dispositivo según la reivindicación 12, **caracterizado** porque dicha caja (30) tiene una ventana (39) entre dichos primer y segundo cuerpos de la caja.

60 14. Dispositivo según la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicha ventana (39) se abre sobre dicha estación de rociado (2) y dicha estación de medición (4).

15. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizado** porque dichos medios de sujeción (5) están adaptados para mover dicho soporte desde dicha posición predeterminada hasta una posición en la cual dicho soporte (19) está en el interior de dicha estación de lisis (3).

65 16. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque dichos medios de sujeción (5) están conectados con una cinta (64) a un motor (65).

ES 2 332 828 T3

17. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque dicho reactivo se basa en luciferina-luciferasa.

5 18. Método de análisis microbiológico rápido de un soporte susceptible de contener microorganismos, **caracterizado** porque incluye:

- la etapa de proporcionar un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;

10 - la etapa de colocar dicho soporte (19) en dicha posición predeterminada;

- la etapa de rociar dicho reactivo sobre dicho soporte (19); y

15 - simultáneamente a dicha etapa de rociado, la etapa de medición de la cantidad de luz emitida como respuesta a dicho reactivo.

19. Método según la reivindicación 18, **caracterizado** porque como soporte se selecciona una membrana microporosa (19).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

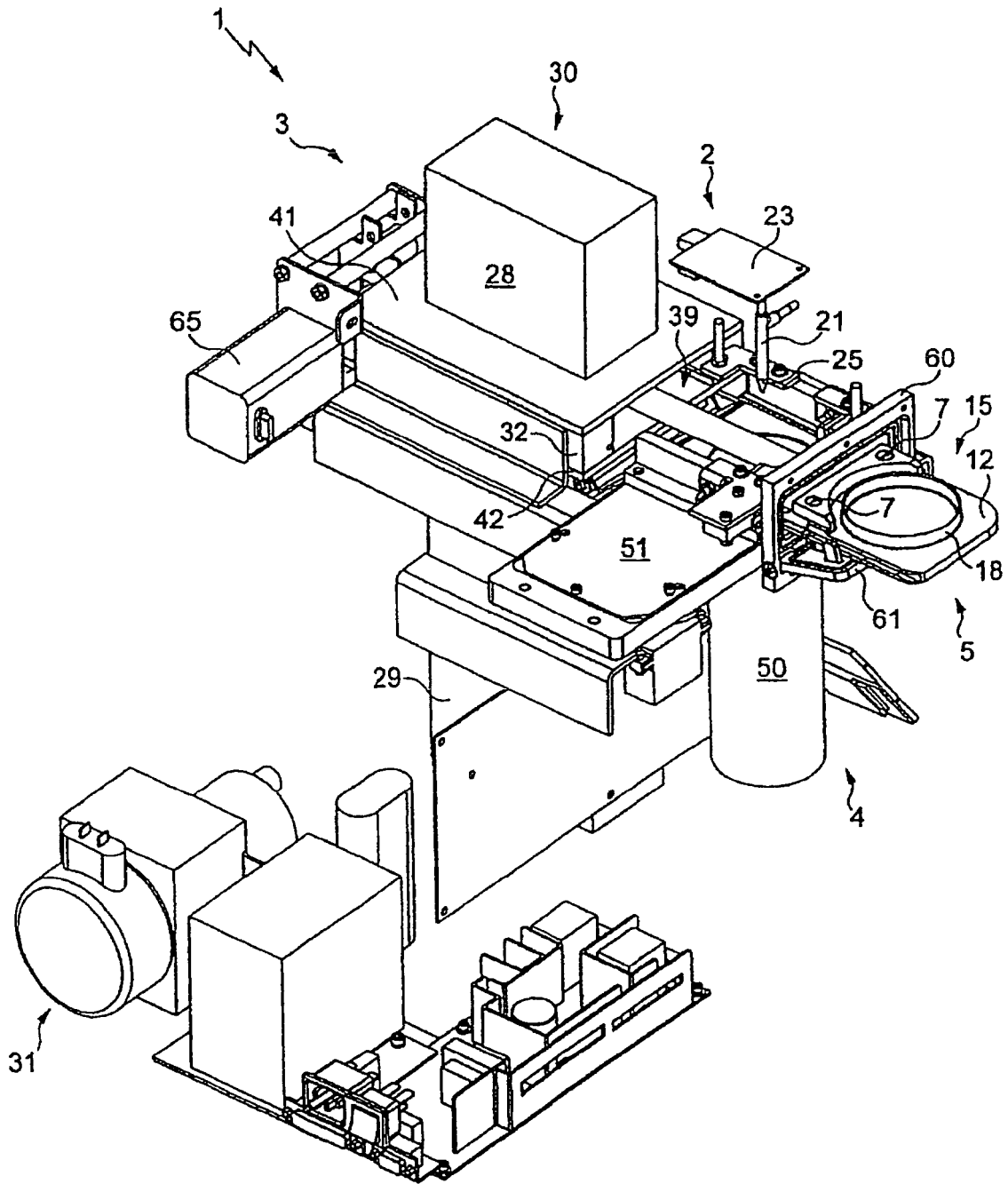


Fig. 1

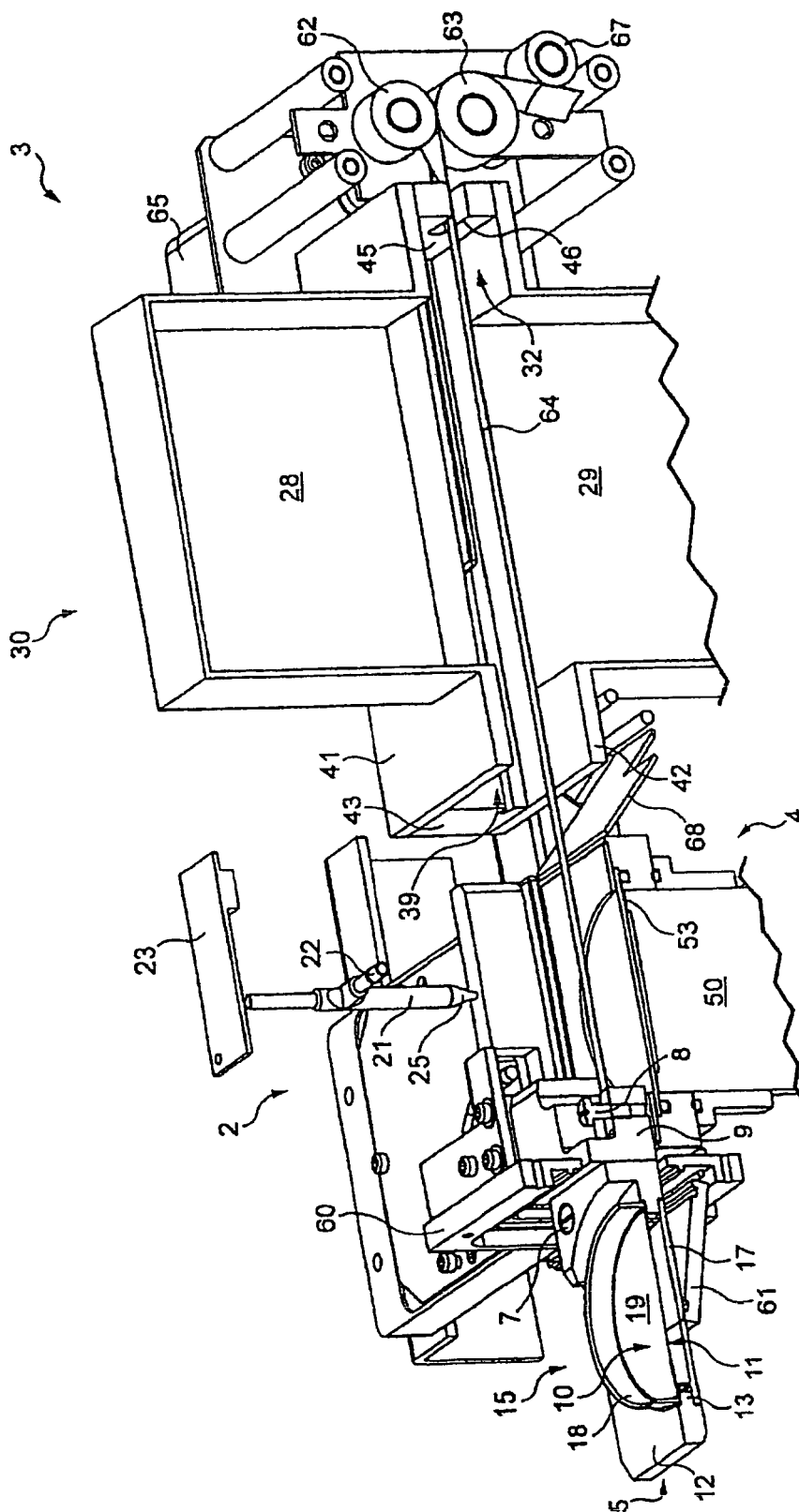


Fig. 2

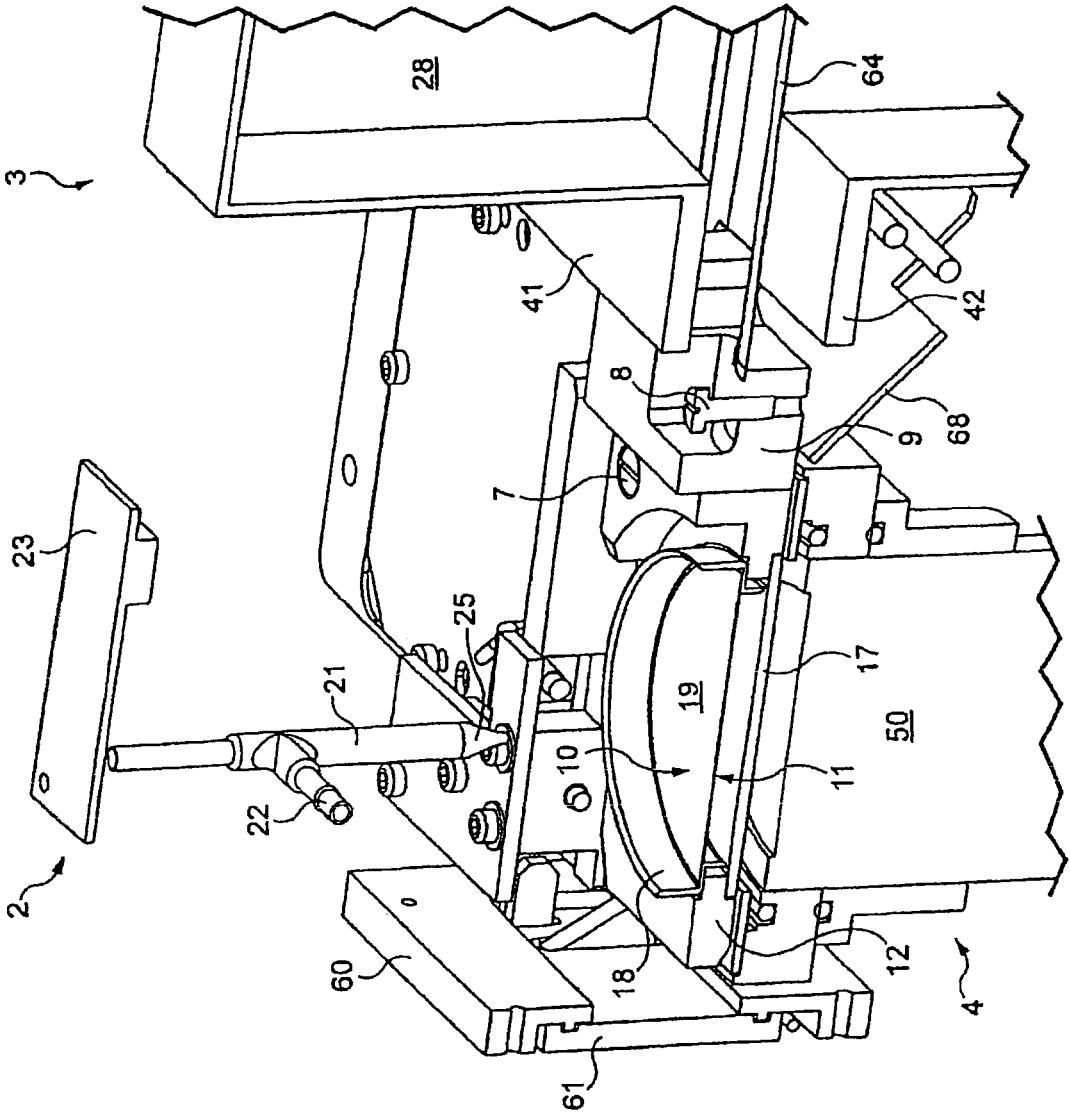


Fig. 5

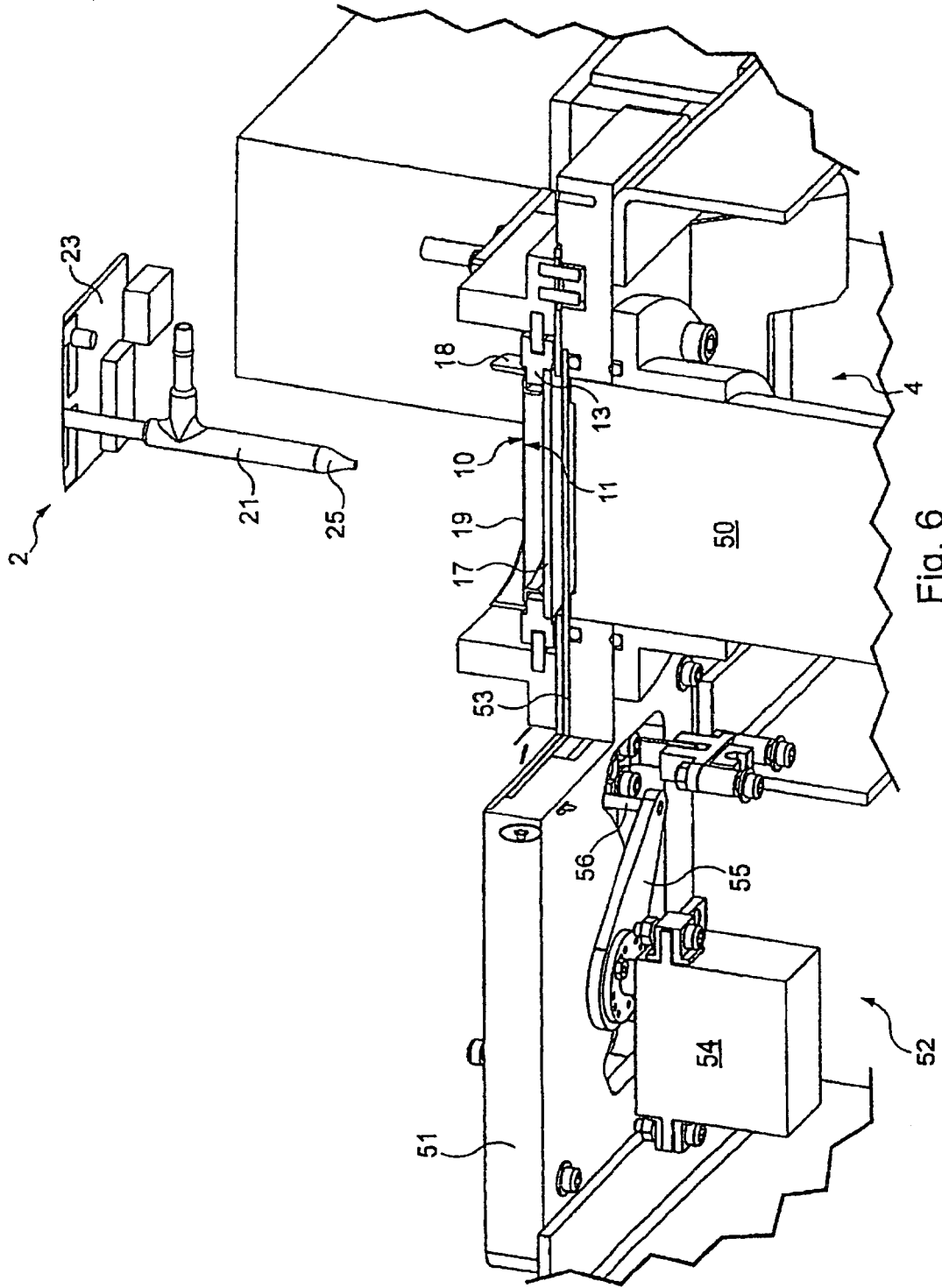


Fig. 6

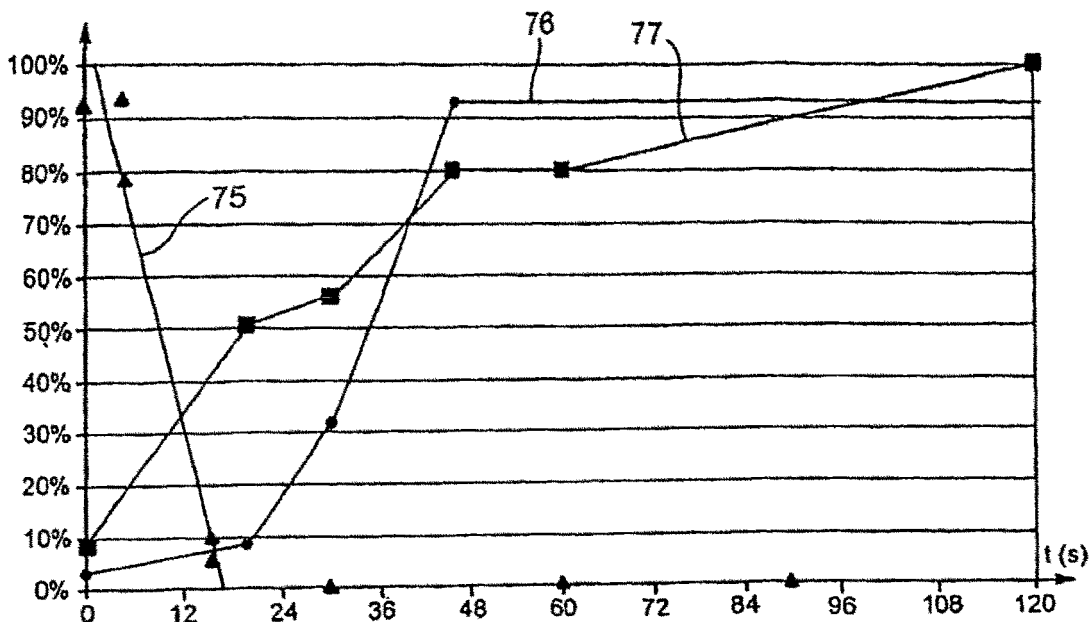


Fig.7

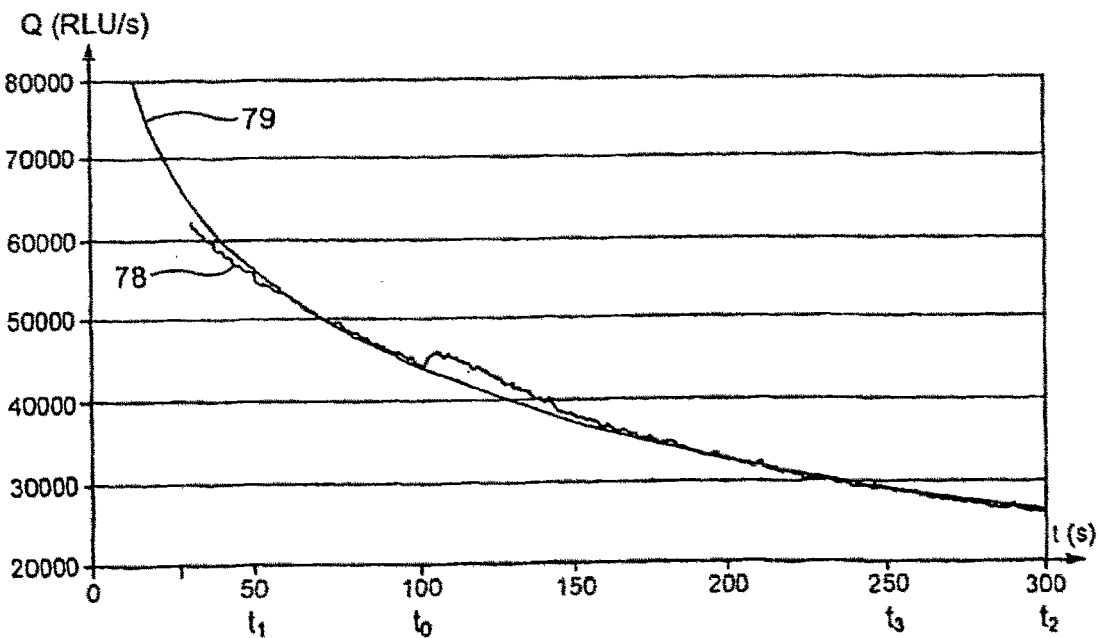
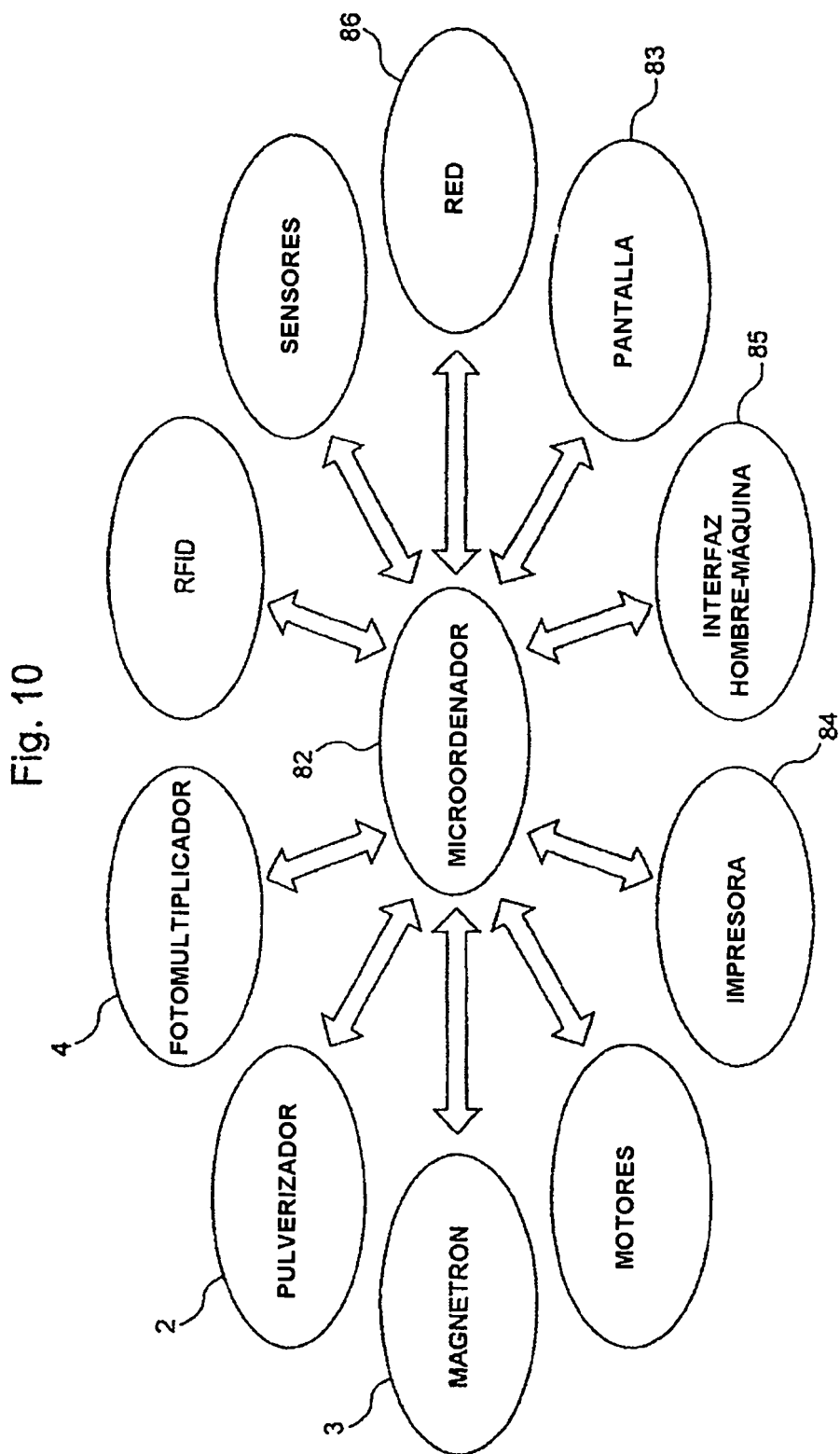
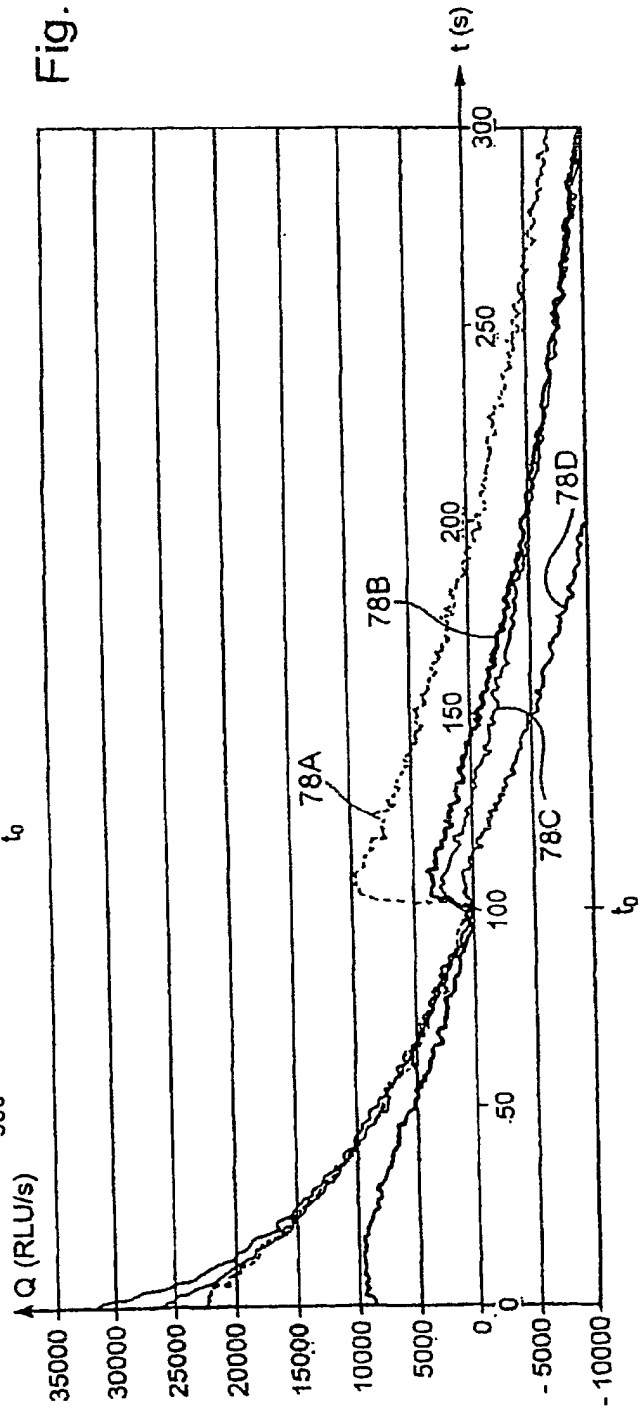
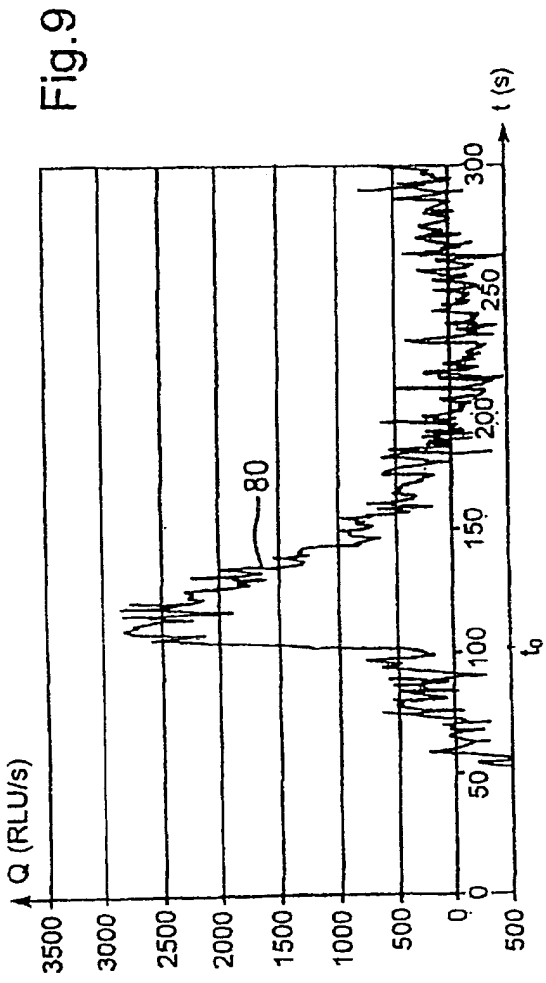


Fig.8





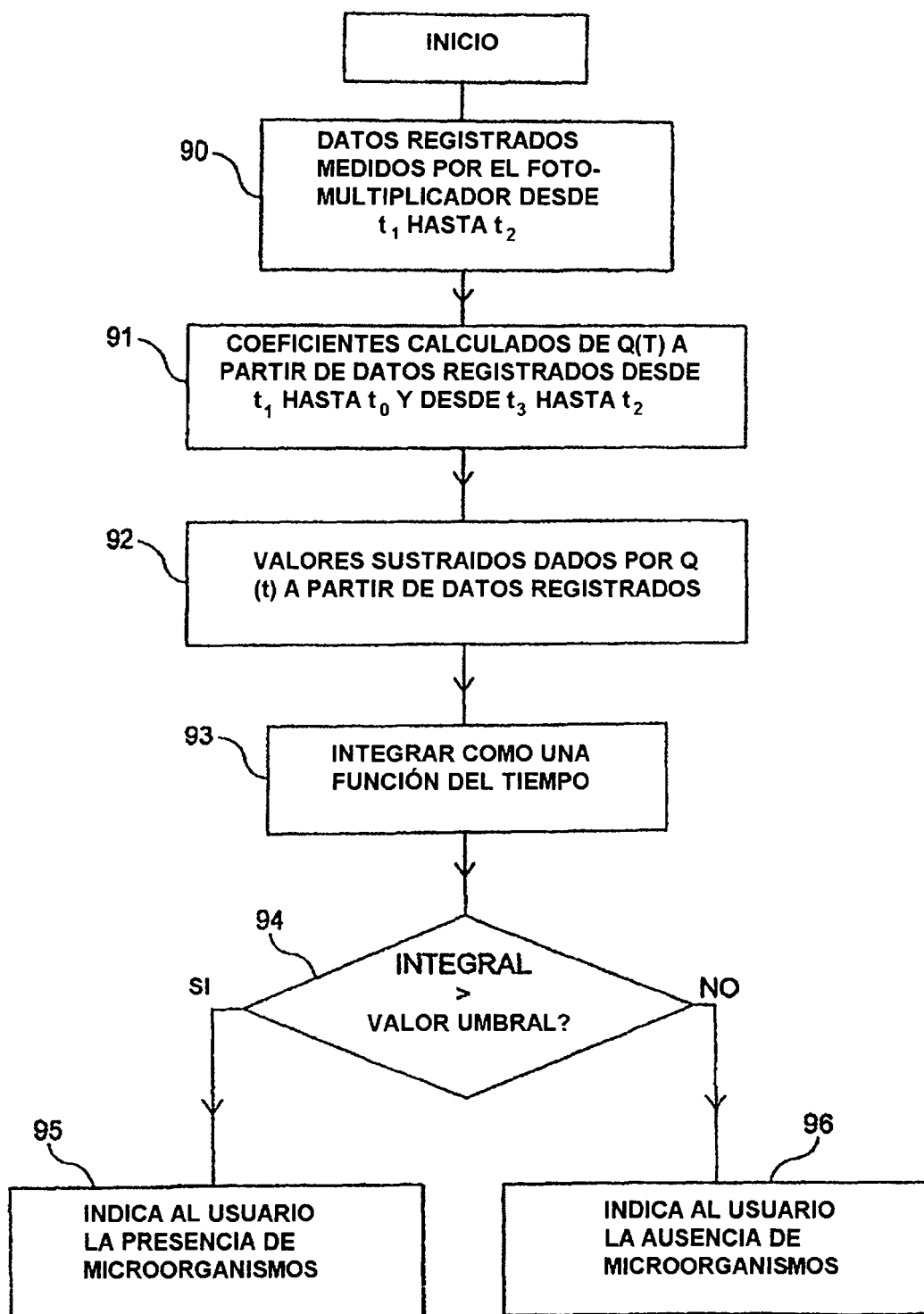


Fig. 11