

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 631**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/78** (2006.01)

**G01N 33/18** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 21/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2019 PCT/GB2019/050002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019 WO19138211**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2019 E 19704377 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3737933**

54 Título: **Pruebas de calidad del agua**

30 Prioridad:

**09.01.2018 GB 201800303**

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

**16.04.2024**

73 Titular/es:

**MOLENDOTECH LIMITED (100.0%)  
Brixham Laboratory, Freshwater Quarry  
Brixham, Devon TQ5 8BA, GB**

72 Inventor/es:

**JACKSON, SIMON;  
SATTAR, ANAS y  
BRADLEY, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 965 631 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**

Pruebas de calidad del agua

5 Esta invención se relaciona con un método y aparato para uso en pruebas de calidad del agua y otros fluidos, y en particular a pruebas de contaminación fecal de los mismos. La invención se relaciona con un método y aparato simples que permiten realizar pruebas de contaminación fecal en el sitio del cual se toma una muestra de agua o similar, estando disponible rápidamente el resultado de la prueba, proporcionando así una indicación sustancialmente en tiempo real de la contaminación fecal del agua u otra muestra. Las referencias aquí a las pruebas de calidad del agua pretenden referirse a las pruebas de la presencia de contaminación fecal del agua u otro fluido, logradas mediante el uso de bacterias indicadoras fecales como indicador de la presencia de dicha contaminación.

10 Hay una serie de aplicaciones en las que se desea poder proporcionar una indicación de la calidad del agua y, en particular, de la contaminación fecal de la misma. A modo de ejemplo, cuando se van a realizar actividades acuáticas tales como natación, surf, vela y similares, existe el deseo de poder obtener una indicación de la calidad del agua en la que se van a realizar las actividades para proporcionar una indicación de si la calidad del agua es lo suficientemente buena como para permitir que se lleven a cabo las actividades. Cuando se utiliza agua u otro fluido en la producción de alimentos o bebidas, existe la necesidad de poder garantizar que la calidad del agua o similar sea lo suficientemente alta y, en particular, que la contaminación fecal de la misma sea lo suficientemente baja, para permitir que se lleven a cabo las etapas de producción sin afectar negativamente la calidad del alimento o bebida bajo producción. Una aplicación en la que es deseable garantizar que la calidad del agua cumpla una especificación predeterminada es el lavado de frutas o verduras, u otros productos alimenticios tales como hojas de ensalada o similares, antes de envasarlos para la venta. Dicho lavado puede realizarse en la región en la que se cultivan los productos, y si la calidad del agua en ese lugar es variable, entonces es deseable poder realizar controles periódicamente para garantizar, sustancialmente en tiempo real, que la calidad del agua es lo suficientemente alta como para permitir su uso en el proceso de producción que se lleva a cabo. Sin la realización de dichas pruebas, los productos pueden contaminarse inadvertidamente por el uso de agua de calidad inaceptable, lo que los vuelve inadecuados para el consumo o requiere la adopción de medidas de limpieza adicionales. Otra aplicación en la que se pueden realizar pruebas de la calidad del agua es en la prueba de suministros de agua potable no tratados o rotos, por ejemplo, provenientes de pozos, ríos, tuberías, tanques y otras fuentes. Se ha demostrado que el lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un indicador útil de la contaminación fecal y puede usarse como tal para detectar la presencia de contaminación fecal en la calidad del agua.

30 El documento US9664663 describe un régimen de prueba de agua que es adecuado para uso en ciertas aplicaciones de este tipo, el método que implica tomar una muestra del agua a analizar, diluir la muestra, aplicar un reactivo a la muestra de agua y calentar la muestra de agua durante un período de tiempo predeterminado. El reactivo es sensible a la presencia de LPS bacteriano, cambia de color en caso de que se detecte la presencia de LPS, y la presencia de LPS se utiliza como marcador para proporcionar una indicación de la calidad del agua al proporcionar una indicación del nivel de bacterias fecales en el mismo. La presencia del LPS en presencia del reactivo hace que la muestra de agua cambie de color, y el color de la muestra de agua se puede utilizar para proporcionar una indicación de la calidad del agua en el lugar de la prueba.

Los documentos US5386287, CN202189009U y JP2015021906 describen métodos y aparatos de prueba.

Un objeto de la invención es proporcionar un método, haciendo uso del régimen de prueba descrito en el documento US9664663, que es simple y cómodo de usar.

40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de prueba de la calidad del agua como se define en la reivindicación 1 adjunta. Como se analizó anteriormente, el método de prueba de calidad del agua opera para detectar el nivel de contaminación fecal del agua y, por lo tanto, proporciona una indicación de la presencia de unidades de bacterias vivas formadoras de colonias en el agua. No está destinado a detectar la presencia de otra contaminación.

La muestra de agua o similar se puede diluir con agua, si se desea.

45 El reactivo puede estar en forma de comprimido o en polvo, o podría estar en forma líquida. El reactivo puede contener un conservante como manitol para aumentar la vida útil del reactivo.

El color o la oscuridad se pueden detectar utilizando un detector adecuado.

50 Un método de este tipo es ventajoso porque el reactivo puede proporcionarse en una forma que sea conveniente para su uso. El uso de un comprimido es ventajoso porque se utilizará la dosis correcta de reactivo. De manera similar, donde el reactivo está preenvasado en otras formas de dosis única o dentro de una cámara de reacción de un solo uso, se puede garantizar que esté presente la cantidad correcta de reactivo.

El reactivo está preferentemente liofilizado y puede procesarse para tomar forma de comprimido o puede preenvasarse dentro de una cámara de reacción de un solo uso.

El análisis del color u oscuridad de la solución de reacción se puede realizar usando un espectrofotómetro.

En la cámara de reacción está presente otro reactivo para estabilizar la solución de reacción e interrumpir la reacción.

Si se desea, se puede añadir otro reactivo adicional para presentarlo en la cámara de reacción, por ejemplo, para mejorar o simplificar la lectura del cambio de color u oscuridad.

5 La etapa de incubación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 15 a 45 ° C, preferiblemente a 37 ° C, y preferiblemente se lleva a cabo durante un período de tiempo en la región de 5 a 60 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 minutos.

La invención se relaciona además con un aparato de prueba como se define en la reivindicación 6 adjunta.

10 El reactivo puede estar en forma de comprimido, colocada dentro de la cámara de reacción. Sin embargo, se pueden usar otras formas, incluidos polvos y líquidos. Alternativamente, el reactivo puede estar preenvasado dentro de una cámara de reacción de un solo uso.

Un aparato de este tipo es cómodo de utilizar ya que el operador sólo necesita realizar un número mínimo de etapas. De este modo se reduce el riesgo de que un error del operador dé lugar a resultados inexactos.

La invención se relaciona además con un reactivo LAL o TAL suministrado en forma de comprimido o suministrado dentro de cámaras de reacción de un solo uso. El reactivo se suministra preferentemente en forma liofilizada.

15 La invención se describirá con más detalle, a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un diagrama que ilustra un método de acuerdo con una realización de la invención;

La figura 2 es un diagrama que ilustra un aparato de acuerdo con una realización de la invención; y

La figura 3 es un diagrama que ilustra un método que puede usarse en la producción del reactivo en forma de comprimido que puede usarse en el método y aparato de la invención.

20 Con referencia en primer lugar a la Figura 1, un método de acuerdo con una realización de la invención consiste en las etapas de agregar una muestra 10 de agua de una fuente de agua u otro fluido a probar a una cámara 12 de reacción. En la disposición mostrada, la cámara de reacción tiene la forma de un tubo de ensayo. Se apreciará, sin embargo, que la cámara 12 de reacción puede adoptar otras formas. También situada dentro de la cámara 12 de reacción hay un comprimido 14 de un reactivo. Aunque se muestra un comprimido 14, se apreciará que el reactivo  
25 puede estar en otras formas, por ejemplo, puede estar en forma de polvo o líquido.

La muestra 10 de agua podría tomar la forma de agua extraída de un cuerpo de agua tal como un lago, río, una piscina o el mar en el que se va a realizar una actividad.

30 Alternativamente, podría comprender agua del grifo de un suministro de agua en tuberías, agua extraída de un pozo o perforación, o agua de un tanque de agua, depósito de almacenamiento o similar. Además, la muestra puede ser de otros fluidos procedentes, por ejemplo, de la industria de alimentos y bebidas. Se apreciará que estos son simplemente ejemplos y que la muestra puede tomarse de una variedad de otras fuentes, dependiendo de la aplicación en la que se vaya a emplear la invención. Si se desea, la muestra se puede diluir con agua antes de realizar la prueba.

35 El reactivo comprende una enzima derivada de *Limulus Polyphemus* (LAL) o una enzima derivada de *Tachypleus tridentatus* (TAL) que está preferiblemente liofilizada y formada en un comprimido de tamaño de dosis única. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, puede adoptar otras formas. Si lo desea, puede contener un conservante para aumentar su vida útil. Por ejemplo, se puede utilizar manitol.

40 La cámara 12 de reacción que contiene la muestra 10 y el comprimido 14 se incuba a una temperatura en el intervalo de 15 a 45 ° C durante un período de 5 a 60 minutos. Preferiblemente, la incubación se realiza a una temperatura de 37 ° C durante aproximadamente 30 minutos. Después de la incubación, el reactivo dentro del comprimido 14 habrá reaccionado con la muestra 10, formando una solución 10a de reacción coloreada. El color u oscuridad de la solución de reacción 10a proporciona una indicación del nivel de LPS presente dentro de la muestra. El nivel de LPS se puede utilizar como marcador para proporcionar una indicación del nivel de bacterias fecales dentro de la muestra y, por tanto, para proporcionar una indicación de la calidad del agua de la muestra.

45 En la disposición de la Figura 1, el color u oscuridad de la solución de reacción 10a, después de completar la etapa de incubación, se identifica usando un dispositivo 16 espectrofotómetro portátil. A modo de ejemplo, el dispositivo 16 espectrofotómetro puede disponerse para irradiar la solución de reacción 10a con luz de una longitud de onda predeterminada, y para cuantificar la reflectancia o absorción de la luz por la solución 10a, proporcionando una indicación del color u oscuridad de la solución 10a de reacción. Se puede utilizar la comparación del nivel de reflectancia o absorción con información de referencia para proporcionar un resultado indicativo de la calidad del agua de la muestra 10. En particular, proporciona una indicación de la presencia de contaminación fecal en la muestra de  
50 agua.

5 El método descrito aquí anteriormente es ventajoso porque es sencillo de utilizar. Es de forma de una sola etapa, requiriendo simplemente la adición de la muestra 10 a una cámara de reacción que contiene o está precargada con una dosis del reactivo. La provisión del reactivo en forma de comprimido 14 asegura que esté presente la cantidad correcta de reactivo, y el uso del espectrofotómetro permite una evaluación precisa del color u oscuridad de la muestra 10. De este modo, el método permite comprobar la calidad del agua con un mayor nivel de precisión.

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, puede ser necesario diluir la muestra antes de exponerla al reactivo. Esto puede ser necesario cuando la muestra es, por ejemplo, en forma salina.

10 Para mejorar aún más la precisión con la que se puede medir la calidad del agua, el método puede incluir una etapa de agregar uno o más reactivos adicionales a la muestra. A modo de ejemplo, los reactivos adicionales pueden incluir un reactivo de parada que funciona para interrumpir la reacción entre la muestra 10 y el comprimido 14. Alternativa, o adicionalmente, los reactivos adicionales pueden servir para mejorar el cambio de color u oscuridad, para permitir una mejor discriminación de estos y, por tanto, permitir una indicación más precisa de la calidad del agua.

15 Si bien en la descripción anterior el reactivo está en forma de comprimido 14, se apreciará que la invención también es aplicable a disposiciones en las que el reactivo está en otras formas de dosis única, tales como en paquetes adecuados de polvo o líquido de dosis única, o está preenvasado, sellado dentro de una cámara de reacción de un solo uso. Al igual que con el uso de un comprimido, esto es ventajoso porque ayuda a garantizar que se utilice la cantidad correcta de reactivo en la prueba, mejorando la precisión con la que se puede medir la calidad del agua. Tiene además la ventaja de que se pueden evitar errores derivados del uso de una cámara de reacción contaminada. Cuando se preenvasa de esta manera, el reactivo podría tomar la forma de, por ejemplo, un polvo o un líquido.

20 El reactivo se puede obtener, como se muestra en la Figura 3, solubilizando un reactivo LAL o TAL liofilizado con 1 a 3 ml de agua libre de pirógenos. La cantidad de agua puede variarse para tener en cuenta las variaciones en el reactivo LAL o TAL suministrado. Normalmente se utilizarán 2.6 ml. A continuación, se dividen alícuotas del reactivo solubilizado, por ejemplo, en dosis de 100 µl. Se pueden añadir al reactivo uno o más conservantes tales como manitol para prolongar la vida útil del polvo o comprimido liofilizado. Luego, el reactivo se congela a, por ejemplo, -20 ° C o menos, durante al menos 5 horas y se liofiliza durante al menos 24 horas para formar un polvo. El polvo puede formarse en comprimidos 14 de dosis individuales o puede envasarse y sellarse dentro de tubos de ensayo de dosis individuales, de un solo uso o similares.

30 El método descrito aquí anteriormente se presta para uso en un aparato de prueba automatizado, por ejemplo, de la forma mostrada en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, el aparato 20 comprende una carcasa 22 dentro de la cual está situado un depósito 24 de muestra. Un dispositivo 26 dosificador, por ejemplo, en forma de una bomba de desplazamiento positivo accionada por un motor paso a paso, es operable para suministrar una cantidad controlada y predeterminada de una muestra 10 de agua desde el depósito 24 a una cámara 12 de reacción en forma de un tubo de ensayo extraíble que contiene un comprimido 14 del reactivo como se describe aquí anteriormente, o un tubo de ensayo de un solo uso preenvasado con una dosis única del reactivo como se describe aquí anteriormente. El aparato 35 20 comprende además un calentador 28 que puede funcionar para calentar la muestra, y una sonda 30 de temperatura que puede funcionar para medir la temperatura de la muestra. El dispositivo 26 dosificador y el calentador 28 son controlables mediante una unidad 32 de control que recibe información de temperatura desde la sonda 30. La unidad 32 de control incorpora un temporizador.

40 El aparato 20 comprende además un dispositivo 16 espectrofotómetro operable bajo el control de la unidad 32 de control para determinar el color u oscuridad de la solución de reacción resultante del uso del aparato.

45 En uso, la cámara 12 de reacción y el comprimido 14 se colocan dentro del aparato 20, y una cantidad de agua, cuya calidad se va a probar, se coloca dentro del depósito 24. Se ordena a la unidad 32 de control que realice pruebas del agua, y esto se lleva a cabo controlando el dispositivo 26 dosificador para transferir una cantidad medida de agua a la cámara 12 de reacción que contiene el comprimido 14, controlando el calentador 28, usando la salida de la sonda 30, para incubar la muestra a la temperatura deseada durante el período de tiempo deseado para formar una solución de reacción coloreada, y luego usar el espectrofotómetro para determinar, a partir del color u oscuridad de la solución de reacción, el nivel de bacterias fecales presentes dentro de la muestra y, por tanto, la calidad del agua de la que se toma la muestra. El aparato 20 también puede conectarse, por ejemplo, a través de un puerto USB o mediante un dispositivo Bluetooth para permitir que los datos se exporten para su análisis y registro en sitios remotos.

50 Se apreciará que al automatizar muchas de las etapas de la prueba, la prueba puede ser realizada por una persona sin entrenamiento especializado, en un entorno que no sea un laboratorio, al mismo tiempo que se garantiza que los resultados de la prueba se consigan con un nivel aceptable de precisión.

55 Aunque anteriormente se describe aquí una realización específica de la invención, se apreciará que se pueden realizar varias modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de prueba de calidad del agua que comprende las etapas de colocar una muestra (10) de agua dentro de una cámara (12) de reacción que contiene una dosis única de un reactivo, o colocar la muestra de agua dentro de una cámara de reacción de un solo uso preenvasada con una dosis única del reactivo, la cámara (12) de reacción o  
5 cámara de reacción de un solo uso que contiene además un reactivo adicional para estabilizar la muestra (10), incubando la muestra (10) a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo predeterminado para formar una solución (10a) de reacción coloreada, y usando el color u oscuridad resultante de la solución (10a) de reacción para proporcionar una indicación de la calidad del agua, en donde el reactivo es sensible a la presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS), cambiando de color u oscuridad en el caso de que se detecta la presencia de LPS,  
10 utilizándose la presencia de LPS como marcador para proporcionar una indicación de la calidad del agua proporcionando una indicación del nivel de bacterias fecales en la muestra, comprendiendo el reactivo una enzima derivada de *Limulus Polyphemus* (LAL) o *Tachypleus Tridentatus* (TAL), el reactivo adicional interrumpe la reacción entre la muestra y el reactivo.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo se liofiliza o se prepara en forma de comprimido.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el análisis del color o la oscuridad de la solución (10a) de reacción se realiza utilizando un espectrofotómetro.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se añade o está presente otro reactivo adicional en la cámara (12) de reacción para mejorar o simplificar la lectura del cambio de color u oscuridad de la muestra.
- 20 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 15-45 ° C, durante un período de tiempo en la región de 5 a 60 minutos.
6. Un aparato de prueba adaptado para realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que comprende una cámara (12) de reacción, un reactivo ubicado dentro de la cámara (12) de reacción, que contiene además la cámara (12) de reacción un reactivo adicional, medios dosificadores para agregar una cantidad medida de  
25 una muestra (10) a la cámara (12) de reacción, un calentador para calentar la cámara de reacción para permitir la incubación de la muestra (10) ubicada en la misma a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo predeterminado, y un espectrofotómetro operable para permitir el análisis del color de la muestra, después de la incubación, para determinar una indicación de la calidad del agua de la muestra, en donde el reactivo es sensible a la presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS), cambiando de color u oscuridad en el caso de que se detecte la presencia de LPS, utilizándose la presencia de LPS como marcador para proporcionar una indicación de la calidad  
30 del agua proporcionando una indicación del nivel de bacterias fecales en la muestra, comprendiendo el reactivo una enzima derivada de *Limulus Polyphemus* (LAL) o *Tachypleus Tridentatus* (TAL), el reactivo adicional que sirve para estabilizar la muestra e interrumpir la reacción entre la muestra y el reactivo.
7. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el reactivo está en forma de comprimido, colocada dentro de la cámara (12) de reacción.
- 35 8. Un aparato de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el reactivo está preenvasado dentro de una cámara (12) de reacción de un solo uso.

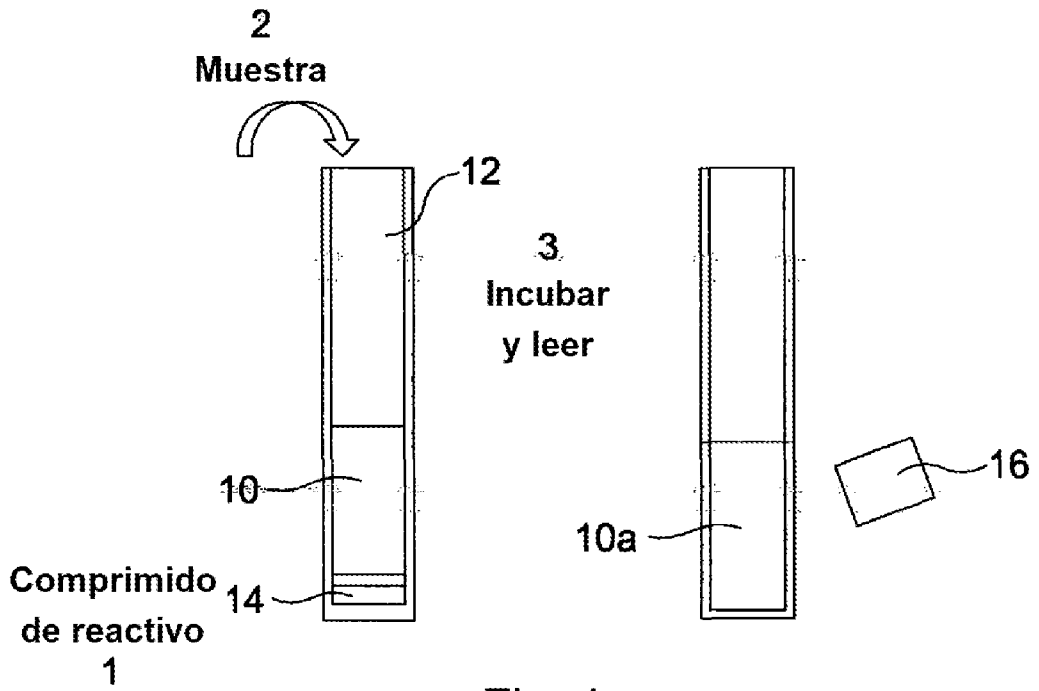


Fig. 1

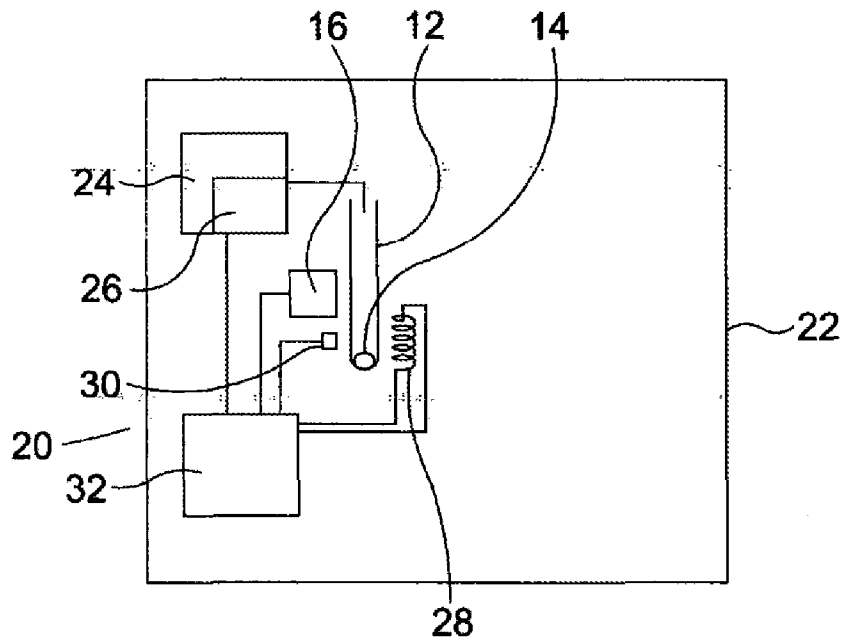


Fig. 2

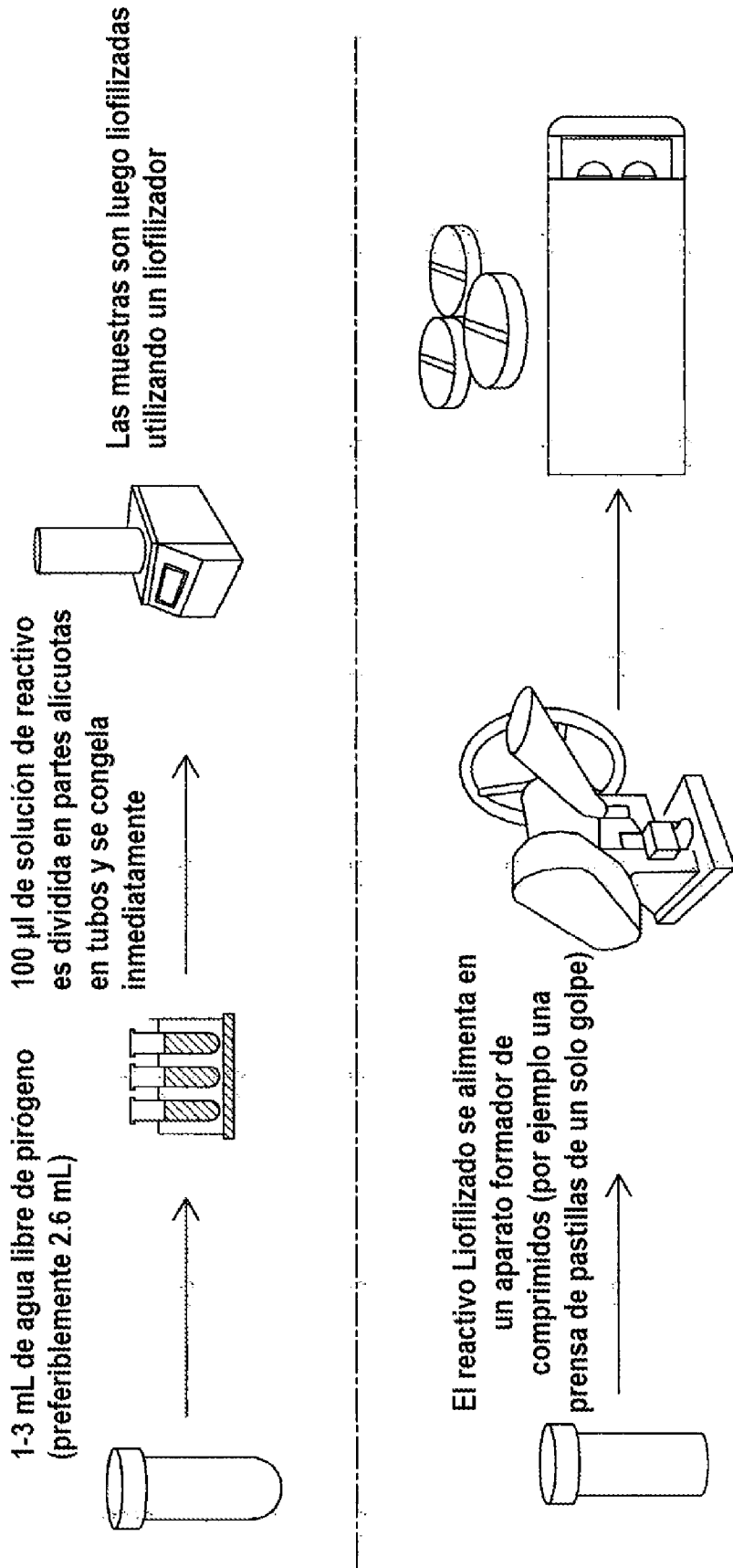


Fig. 3