



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 924**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06824280 .9**

96 Fecha de presentación : **23.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1869204**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54

Título: **Método para la detección de ATP en una muestra con la ayuda de luminiscencia, y programa informático para llevarlo a cabo.**

30

Prioridad: **25.11.2005 NL 1030525**

73

Titular/es: **AMIRIS B.V.
Bosheide 49
6373 CK Landgraaf, NL**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

72

Inventor/es:
Rijkx, Joseph, Maria, Franciscus, Donatus

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

74

Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

ES 2 358 924 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de ATP en una muestra con la ayuda de luminiscencia, y programa informático para llevarlo a cabo.

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método para la detección de ATP en una muestra con la ayuda de luminiscencia, y un programa informático para llevarlo a cabo.

10 **[0002]** Se han dictado diversos reglamentos gubernativos relativos a la presencia de contaminantes que afectan a diversos sectores industriales, tales como la industria alimentaria y de las bebidas, así como las industrias clínica, farmacéutica y cosmética. Esto incluye, por ejemplo, la obligación de comprobar (o de ocuparse de que se efectúe su comprobación) la presencia de contaminantes tales como células microbianas (por ejemplo, bacterias, levaduras y hongos) en todos los productos. En ciertas condiciones, la presencia de dichas células microbianas en los productos puede provocar una descomposición acelerada del producto. Estas células microbianas pueden constituir igualmente un importante riesgo para la salud de los consumidores que consumen el producto.

15 **[0003]** Los métodos convencionales para la detección de la contaminación microbiana implican el crecimiento de las células microbianas hasta que estas pueden ser distinguidas a simple vista. La desventaja de esto es que dichos procesos resultan lentos y puede tardarse varios días en obtener resultados. Estas pérdidas de tiempo hacen que dichos procesos resulten costosos.

20 **[0004]** Por lo tanto, se conoce desde hace algún tiempo, por ejemplo a través de la patente estadounidense 4.303.752 la utilización de un método de detección de contaminación microbiana en productos, que está basado en la medición del trifosfato de adenosina (ATP) molecular que se encuentra presente en las células microbianas vivas. El ATP puede detectarse en un lapso de tiempo de varios segundos en presencia un reactivo de luminiscencia consistente, por ejemplo, en una combinación de la luciferasa enzimática y su cofactor, la luciferina. La reacción resultante, a la que se suele denominar la "reacción de la luciérnaga", genera inmediatamente una emisión de luz conocida como luminiscencia del ATP. La cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de ATP contenida en la muestra. La luminiscencia puede medirse con la ayuda de un instrumento de medida, tal como un luminómetro, por ejemplo.

25 **[0005]** Gracias al documento CH 678065 se conoce la forma de extraer el ATP añadiendo en primer lugar un agente de extracción somático, con lo que se liberará el ATP somático, y posteriormente, un reactivo de luminiscencia. Como resultado de ello se medirá la cantidad combinada de ATP libre y ATP somático. A continuación, dicho ATP combinado podrá eliminarse mediante hidrólisis. Posteriormente, podrá añadirse un agente de extracción microbiano para producir la liberación del ATP microbiano, midiéndose a continuación dicho ATP.

30 **[0006]** A través de Schram y otros, Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, parte 4, páginas. 390-398, 1989, se conoce una mejora del método descrito en CH 678 065, utilizando dicho método ATP-asa de mamíferos.

[0007] Gracias al documento US 6951723 se conoce un método para medir el ADP (difosfato de adenosina), un producto de la descomposición del ATP, o para convertir el ADP en ATP y medirlo posteriormente.

35 **[0008]** No obstante, pueden plantearse graves problemas cuando dichos métodos convencionales de luminiscencia del ATP se utilizan para detectar la presencia de células microbianas vivas en productos.

40 **[0009]** En primer lugar, el ATP se da no solamente en células microbianas vivas, sino también en otras células no microbianas, a las que se denomina células somáticas. Dichas células somáticas suelen formar parte integrante del producto. Los productos alimenticios y las bebidas, por ejemplo, pueden contener células vegetales, por ejemplo, células de frutas en zumos de frutas, que contienen importantes cantidades de ATP, que normalmente se denomina ATP somático.

[0010] Un producto también puede contener el denominado ATP libre, que es un ATP que se da libremente en una muestra y procede de células microbianas y/o somáticas "muertas" y/o rotas y/o dañadas.

45 **[0011]** Por lo tanto, en una muestra pueden darse tres posibles fuentes de ATP, a saber, ATP libre, ATP microbiano contenido en las células microbianas y ATP somático contenido en las células somáticas, siendo los tres tipos de ATP químicamente idénticos e indistinguibles. Por lo tanto, el ATP libre y el somático habrán de eliminarse antes de que pueda detectar el ATP microbiano, a fin de determinar la presencia de células microbianas.

50 **[0012]** Un segundo problema que ha de resolverse en relación con la determinación del ATP microbiano es que el ATP microbiano que contienen las células no se encuentra inmediatamente disponible para activar la reacción de luciérnaga para producir luminiscencia. Para ello, el ATP microbiano que contienen las células microbianas debe en primer lugar liberarse o extractarse de la célula microbiana, ya que la reacción de luciérnaga sólo tendrá lugar si el ATP está libremente disponible en la muestra para formar un complejo con el reactivo de luminiscencia (el denominado "complejo de ATP"). Esta liberación suele efectuarse mediante los denominados agentes de extracción, por ejemplo, compuestos cuaternarios de amonio, que actúan como si "perforasen" la membrana celular y/o la pared celular de las células microbianas y/o somáticas para que el ATP pueda fluir de su interior. Las células somáticas

son más vulnerables a dichos agestes de extracción que las células microbianas, y por tanto, el ATP somático contenido en las células somáticas se liberará en primer lugar, antes de que el ATP se libere de las células microbianas. La liberación del ATP somático ocultará posteriormente la emisión de luz del correspondiente ATP microbiano, o inducirá a resultados positivos falsos.

5 **[0013]** Los problemas precedentes han sido resueltos por la técnica anterior utilizando, en primer lugar, un agente de extracción menos potente que es adecuado tan sólo para liberar ATP somático de las células somáticas sin romper las células microbianas. El resultado es una muestra que contiene ATP libre y ATP somático liberado en el que el ATP microbiano está contenido únicamente en células microbianas vivas e intactas. Una vez liberado este ATP somático, el ATP somático liberado y el ATP libre ya presente deben eliminarse antes de que el ATP
10 microbiano pueda liberarse de las células microbianas para proceder a su medición. El ATP somático liberado y el ATP libre se eliminan tratando la muestra con una enzima normalmente denominada ATP-asa, siendo un ejemplo de ello la apirasa. La apirasa puede descomponer selectivamente el ATP libre contenido en una muestra sin descomponer el ATP que contiene las células vivas intactas, como las células microbianas. Normalmente, este es el método estándar utilizado en este campo.

15 **[0014]** Se entiende que las células intactas son células cuya pared celular y/o membrana celular se encuentra aún intacta y que por consiguiente no han liberado ATP en su entorno. Las células que ya no están "vivas" suelen fragmentarse y, por consiguiente, liberan el ATP que contienen.

[0015] La desventaja del método que se ha mencionado es que la apirasa sigue estando activa después de haberse descompuesto el ATP libre y el ATP somático liberado. Esto significa que cuando se añade un agente de extracción microbiano y se libera el ATP microbiano de las células microbianas, este será parcialmente descompuesto por la apirasa presente. Por consiguiente, la apirasa ejerce una influencia negativa sobre los resultados de la medida, porque el valor de la luminiscencia obtenido será inferior a lo esperado. Concretamente, en los casos en los que tan sólo se encuentra presente una pequeña cantidad de células microbianas, esto puede conducir a unos resultados falsamente negativos, ya que todo el ATP microbiano habrá sido descompuesto por la
20 apirasa antes de que sea posible medirlo mediante la luminiscencia. Dicha situación no resulta deseable, debido a que la presencia imperceptible de las células microbianas puede provocar riesgos para la salud del usuario, deterioro y/o pérdida de aroma.

[0016] Por lo tanto, es necesario disponer de un método para medir el ATP microbiano de forma rápida y fiable.

[0017] Además, es necesario un método en el que no se obtengan resultados falsamente negativos.

30 **[0018]** Otro de los objetos de la presente invención consiste en permitir una medición rápida y precisa de distintos tipos de células microbianas y distinguirlos entre sí. Es necesario un método que permita distinguir entre sí, por ejemplo, las bacterias, levaduras y hongos, así como un método para distinguir diferentes tipos de bacterias y levaduras, por ejemplo, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero también las diferentes bacterias Gram-positivas entre sí.

35 **[0019]** Otro de los objetos de la presente invención consiste en determinar la cantidad de ATP libre y la cantidad de ATP somático microbiano presentes en una muestra.

[0020] Uno o más de los siguientes objetivos se consiguen mediante el método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.

40 **[0021]** En la presente invención se añade de este modo una reacción de luminiscencia a una muestra que no se ha sometido a tratamiento previo alguno con un agente de extracción, por ejemplo, un agente de extracción microbiano o somático.

[0022] Por lo general, es preferible que la muestra se encuentre en estado líquido, es decir, en suspensión emulsión o solución. Las muestras que ya son líquidas en estado natural pueden utilizarse como tales. Entre los ejemplos podemos citar la leche, el vino, el zumo de frutas, las lociones y similares. Las muestras que no son naturalmente líquidas o que son menos líquidas se llevan preferiblemente a su estado líquido mediante técnicas de suspensión, emulsión o disolución. Entre los ejemplos podemos citar las verduras, frutas, natas y similares. Pueden someterse a prueba muestras de piensos o bebidas, así como muestras procedentes de otros ámbitos, como muestras clínicas, farmacéuticas o cosméticas.

50 **[0023]** La utilización del presente método permite determinar la cantidad de ATP libre existente en la muestra, ya que a la muestra no se añaden agente de extracción ni apirasa antes de medir con posterioridad la luminiscencia de la muestra que no ha sido tratada. Dicha determinación del ATP libre no se ha llevado nunca a cabo en la técnica anterior.

55 **[0024]** La cantidad de ATP libre medida de acuerdo con el presente método constituye una medida del estado higiénico de, por ejemplo, una fábrica y/o el equipo con el que se ha procesado una muestra específica, y aporta pistas sobre cualquier tipo de evento contaminante de la materia prima que se haya producido anteriormente y que no se habría percibido en caso de haberse utilizado el método de acuerdo con el estado de la técnica. Esto se

explicará a continuación. El método de acuerdo con el estado de la técnica no es capaz de medir el ATP libre. Esto significa que si, antes de ser suministrada a una fábrica se ha calentado una muestra contaminada a una temperatura determinada, matando las células microbianas presentes en ella, esta operación no puede demostrarse con el método de acuerdo con el estado de la técnica. Esto es posible con el método de acuerdo con la presente invención, ya que se determina el ATP libre, que constituye una medida de la cantidad de células “muertas” o “dañadas” (“no intactas”) que contiene o que ha contenido la muestra habiéndose liberado el ATP (“ATP libre”) a partir de dichas células no intactas. Por lo tanto, la presente invención es capaz de demostrar la contaminación producida en una etapa anterior. De este modo, puede determinarse, por ejemplo, si la leche se ha sometido a un tratamiento por calor a fin de matar cualquier célula microbiana antes de su entrega a la central. Cuando se utiliza el método acorde con el estado de la técnica, dicha leche se clasificará como “sin contaminar”, mientras que esa leche, con el método de la presente invención, se clasificaría como que “ha estado contaminada”. Por tanto, el presente método se puede utilizar para demostrar que hay algo “equivocado” en una muestra determinada (basándose en el hecho de que el valor de la luminiscencia del testigo será superior a un valor estándar) aun cuando el producto ya no contenga ninguna célula microbiana intacta. Una muestra sin contaminar puede ya contener una cierta cantidad de ATP libre resultante de la preparación del producto. Esta cantidad debe tomarse posteriormente como la “estándar” y tan sólo un aumento con respecto al valor estándar indicará la existencia de contaminación.

[0025] Otra ventaja de la presente invención es que se ha eliminado (casi) por completo la utilización de la apirasa, habiéndose reducido el número de objeciones asociadas, como los resultados falsamente negativos y los prolongados períodos de espera. La utilización del método de la presente invención reduce el tiempo del análisis a aproximadamente menos de un minuto, en comparación con los tiempos de análisis de entre 15 y 40 minutos en el caso de pruebas convencionales de luminiscencia del tipo que se ha descrito anteriormente. No obstante, en casos especiales puede seguir siendo preferible utilizar pequeñas cantidades de apirasa, por ejemplo si se espera encontrar presente una gran cantidad de ATP somático y libre. Dicha gran cantidad de ATP produciría tanta luminiscencia que la relación señal/ruido del ATP microbiano a medir quedaría perturbada. En estos casos podría utilizarse la apirasa, pero el efecto de la apirasa puede determinarse y evaluarse de una forma muy sencilla mediante medidas más o menos continuas de la luminiscencia a lo largo del tiempo del análisis, por lo que no se obtendrán resultados falsamente negativos.

[0026] La presente invención puede utilizarse para medir el ATP en una multitud de productos. Las posibles aplicaciones se encuentran en la industria alimentaria (leche y otros productos lácteos, vino, sopas, verduras y zumos y productos a base de frutas y similares) la industria cosmética (detergentes, lociones corporales, lápices de labios, productos de protección solar, productos para el cuidado del cabello y similares), la industria agrícola (frescura de la flor cortada mediante la comprobación de la savia del tallo, frutas, verduras y similares) y la industria clínica (muestras de sangre, muestras de orina y otras muestras similares) y en la industria farmacéutica (medicamentos y similares).

[0027] El método de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo preferiblemente de forma que la luminiscencia se mide durante un período de, al menos, 10 segundos. Preferiblemente, la luminiscencia se mide durante un período de al menos 20 segundos, y concretamente, durante un período de, al menos, 60 segundos.

[0028] Mediante la medición de la luminiscencia con cierta regularidad o de forma continua a lo largo de un período de tiempo determinado, se obtiene información acerca de factores tales como la frecuencia a la que se libera el ATP de las células somáticas, en comparación con las células microbianas, así como entre diferentes tipos de células somáticas y células microbianas.

[0029] La luminiscencia se mide de forma más o menos continua a fin de obtener la luminiscencia en función del tiempo, por ejemplo, representándola en una curva en la que la luminiscencia está en función del tiempo. A partir de la forma de esta curva puede obtenerse información, por ejemplo, acerca de la frecuencia a la que se libera el ATP procedente de las diversas células somáticas y/o microbianas, lo que aporta información sobre el tipo de células. Esta medición continua también es importante cuando se utiliza la apirasa, en cuyo caso se observará una disminución de la luminiscencia a lo largo del tiempo. También es posible medir la luminiscencia durante un período de tiempo determinado, dejando pasar un cierto intervalo entre las mediciones individuales. Véanse también los ejemplos en los que se explica este proceso.

[0030] En la presente invención, las células microbianas presentes se identifican a partir de la luminiscencia en función del tiempo a través de una comparación con los valores de referencia en función del tiempo. Por ejemplo, estos valores de referencia son curvas estándar de distintos tipos de bacterias y levaduras. De dicha comparación puede inferirse, por ejemplo, si se encuentra presente una bacteria o levadura específica, o ambas, e incluso qué tipo de bacteria se encuentra presente. Esto hace que el presente método resulte adecuado para identificar con precisión diferentes tipos de células microbianas, como por ejemplo, levaduras y bacterias, como la *Candida albicans* (levadura), el *Clostridium sporogenes* (bacteria Gram-positiva), el *Geobacillus stearothermophilus* (bacteria Gram-positiva), el *Bacillus.cereus* (bacteria Gram-positiva), el *Bacillus subtilis* (bacteria Gram-positiva) y la *Escherichia coli* (bacteria Gram-negativa).

[0031] La ventaja de este método de identificación es que la presencia de células microbianas peligrosas puede distinguirse de la presencia de las células microbianas favorables, e incluso necesarias. Un ejemplo de esto lo

constituye la distinción entre una bacteria no deseada y que provoca la descomposición y las levaduras que son necesarias para la fermentación, que pueden estar presentes en las uvas prensadas durante el proceso de fabricación del vino. El método acorde con el estado de la técnica sólo puede revelar la presencia de células microbianas, pero no puede distinguir entre la bacteria y la levadura. Por tanto, la presente invención proporciona una solución, al posibilitar dicha distinción. En algunos procesos de fabricación de vino, éste se embotella muy poco después de su prensado. En estos casos, no es sólo necesario que se encuentre presente la levadura adecuada, sino que la levadura también debe eliminarse en la medida adecuada con anterioridad al proceso de embotellado, para impedir la posterior fermentación en la botella, y por tanto, la explosión de la botella, que podía ser un inconveniente e incluso peligrosa. Por tanto, la presente invención también puede utilizarse durante el proceso de fabricación del vino, para demostrar la presencia de diferentes bacterias y hongos en las distintas etapas.

[0032] Mediante la presente invención es posible trabajar con una serie de valores estándar de luminiscencia que se pueden determinar para los diferentes tipos de productos, por ejemplo, valores estándar de muestras sin contaminar, por ejemplo midiendo muestras esterilizadas, pero también valores estándar de muestras que contengan, por ejemplo, células somáticas. Estos valores estándar pueden determinarse con anterioridad al método acorde con la presente invención, o pueden proporcionarse junto con este programa informático. Por ejemplo, es preferible determinar tres valores estándar para una muestra sin contaminar (valor muestra testigo o valor negativo), notablemente un primer valor estándar que se calcula como el valor medio del valor medido de un producto comparable, pero esterilizado, durante un intervalo de 0 a 5 segundos, un segundo valor estándar correspondiente al intervalo de 5 a 10 segundos y un tercer valor estándar en el intervalo de 15 a 20 segundos. No obstante, será evidente que estos intervalos de tiempo y el número de valores estándar puede ser determinado por una persona versada en la materia, en función del producto que va a analizarse y de la contaminación prevista.

[0033] En una realización del presente método, se añade un agente de extracción somático a la misma muestra después de añadir el reactivo de luminiscencia, para formar un complejo de ATP, en el que se mide la luminiscencia del complejo de ATP formado en la muestra de este modo. Por lo tanto, en esta realización es preferible añadir una cantidad excesiva de reactivo de luminiscencia en comparación con el ATP libre presente, de forma que quede suficiente reactivo de luminiscencia no aglutinado para el aglutinamiento del ATP somático liberado.

[0034] El complejo de ATP formado es por tanto un complejo entre el reactivo de luminiscencia que ya se encontraba presente en la muestra y el ATP liberado de las células somáticas. De este modo, la cantidad de ATP somático en la muestra puede determinarse mediante la luminiscencia. Este complejo de ATP se añade al complejo de ATP previamente formado entre el reactivo de luminiscencia y el ATP libre, como se ha descrito anteriormente.

[0035] Dicha realización del presente método sólo se lleva a cabo si se encuentran (o pueden encontrarse) células somáticas en el producto, lo que por ejemplo, puede esperarse en el caso de bebidas que contengan zumos de fruta, y en menor medida, en productos cosméticos.

[0036] Mediante esta realización, la cantidad de ATP libre de una muestra se mide por primera vez tras añadir el reactivo de luminiscencia, tras lo cual se añade posteriormente un agente de extracción somático a la misma muestra, preferiblemente durante la medición de la luminiscencia, por ejemplo mediante una bomba de inyección conectada al luminómetro utilizado. El agente de extracción somático dañará y/o romperá la pared celular y/o la membrana de las células somáticas, provocando la liberación de ATP somático procedente de las células somáticas, como resultado de lo cual, la cantidad de ATP somático liberado se aglutinará y se medirá posteriormente mediante luminiscencia.

[0037] En otra realización del presente método, se añade un agente de extracción microbiano a la muestra tratada de esta forma con agente de extracción somático, a fin de liberar el ATP microbiano. Este ATP microbiano liberado se aglutinará formando un complejo con el reactivo de luminiscencia, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra.

[0038] En esta realización, el ATP se libera en primer lugar de cualesquiera células somáticas y se procede a su medición, liberándose el ATP de las células microbianas presentes y procediéndose a su medición.

[0039] En otra realización del presente método se añade un agente de extracción microbiano a la muestra después de añadir el reactivo de luminiscencia a fin de liberar el ATP microbiano. El ATP microbiano liberado formará un complejo de ATP con el reactivo de luminiscencia, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra.

[0040] Después de que se haya determinado la cantidad de ATP libre en el producto, como se ha descrito anteriormente, puede utilizarse inmediatamente un agente de extracción microbiano para dañar y romper las células microbianas de la muestra. Esto provoca la liberación del ATP microbiano, que puede medirse posteriormente en forma de un complejo de ATP utilizando la luminiscencia. De este modo se puede determinar la presencia de cualquier ATP microbiano.

[0041] La presente invención se refiere a un método en el que la luminiscencia a lo largo del tiempo medida en la muestra se compara con uno o más valores de referencia de la luminiscencia en función del tiempo, al menos para una célula seleccionada de las células somáticas y células microbianas, determinándose si la luminiscencia medida

en función del tiempo se corresponde con el valor de referencia, en cuyo caso se determina si la célula que tiene dicho valor de referencia se encuentra presente en la muestra.

5 **[0042]** La presente invención también se refiere a un programa informático utilizado para llevar a cabo un método de detección del ATP en una muestra, en el que se añade un reactivo de luminiscencia a la muestra que no ha sido sometida a un tratamiento previo con un agente de extracción para formar un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra utilizando un luminómetro para obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP libre, comparándose dicho valor medido de ATP libre con un valor estándar, determinándose que el ATP se encuentra presente a una mayor concentración si el valor medido de ATP libre es superior al valor estándar. “A una mayor concentración” se entiende como una cantidad de ATP que es mayor que la que ya se encuentra presente en una muestra testigo sin contaminar. Cuando el ATP se encuentra presente con una concentración mayor, esto supone la presencia de células somáticas y/o microbianas.

10 **[0043]** El valor estándar es el valor de la luminiscencia de una muestra testigo sin contaminar. Este valor estándar se puede determinar como ya se ha indicado anteriormente. Si se obtiene un valor medido del ATP libre que es más o menos equivalente al valor estándar, la muestra no contiene una mayor concentración de ATP libre. En este caso, la muestra se evaluará como “sin contaminar con ATP libre”. Si se obtiene un valor medido de ATP libre que es superior al valor estándar, la muestra se evaluará como “posiblemente (ha sido) contaminada”.

15 **[0044]** En una realización del programa informático, se añade a la muestra un agente de extracción somático después de añadir el reactivo de luminiscencia para formar un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra utilizando un luminómetro para obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP somático, comparándose dicho valor medido de ATP somático con el valor medido de ATP libre obtenido como se ha descrito anteriormente, determinándose que el ATP somático se encuentra presente si el valor medido de ATP somático es superior al valor medido de ATP libre.

20 **[0045]** Si se obtiene un valor medido del ATP somático que es más o menos equivalente al valor del ATP libre, la muestra no contiene ATP somático. En este caso, la muestra se evaluará como “sin contaminar con células somáticas”. Si se obtiene un valor medido de ATP somático que es superior al valor medido de ATP libre, la muestra se evaluará como “contaminada con células somáticas”. Esto no tiene por qué representar un problema, ya que las células somáticas resultan esenciales en ciertos casos, por ejemplo, en los zumos de frutas.

25 **[0046]** En la anterior realización del programa informático, se añade un agente de extracción microbiano a la muestra después de añadir el agente de extracción somático, a fin de formar un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra utilizando un luminómetro para obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP microbiano, comparándose dicho valor medido de ATP microbiano con el valor medido de ATP somático, determinándose que el ATP microbiano se encuentra presente si el valor medido de ATP microbiano es superior al valor medido de ATP somático.

30 **[0047]** En otra realización del programa informático, se añade un agente de extracción microbiano a la muestra después de añadir el agente de extracción somático, a fin de formar un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra utilizando un luminómetro para obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP microbiano, comparándose dicho valor medido de ATP microbiano con el valor medido de ATP libre, como se ha descrito anteriormente, determinándose que el ATP microbiano se encuentra presente si el valor medido de ATP microbiano es superior al valor medido de ATP libre.

35 **[0048]** Si se obtiene un valor medido del ATP microbiano que es más o menos equivalente al valor medido del ATP libre y/o del ATP somático, en función del método utilizado, la muestra no contendrá ATP microbiano. En este caso, la muestra se evaluará como “sin contaminar con células microbianas”. Si se obtiene un valor medido de ATP microbiano que es superior al valor medido del ATP libre o del ATP somático, en función del método empleado, la muestra se evaluará como “contaminada con células microbianas”. Esto no tiene por qué representar un problema, ya que las células microbianas resultan esenciales en ciertos casos, por ejemplo, las levaduras del vino. En este caso se puede determinar qué tipos y especies de células microbianas se encuentran presentes utilizando una serie de curvas estándar correspondientes a las mediciones de la luminiscencia de diferentes tipos de bacterias y levaduras, como se explicará más adelante.

40 **[0049]** En otra realización del presente programa informático, la luminiscencia se mide de forma más o menos continua durante un período de, al menos, 10 segundos, preferiblemente, durante un período de, al menos, 20 segundos, y concretamente, durante un período de, al menos, 60 segundos, a fin de obtener la luminiscencia en función del tiempo, comparándose los datos de la medición con uno o más valores de referencia en función del tiempo, por ejemplo una o más curvas estándar para los diferentes tipos de células microbianas, y eventualmente somáticas (como ciertos tipos de bacterias, levaduras y similares) determinándose qué tipos de células microbianas, y eventualmente somáticas, se encuentran presentes en la muestra.

Ejemplos

45 **[0050]** La presente solicitud se explicará en mayor profundidad a continuación, haciendo referencia a una serie de ejemplos no limitativos. Estos ejemplos pretenden explicar la presente invención. En cada uno de los ejemplos 1 a

11, se han inoculado en una cantidad de leche ciertos tipos de células microbianas, tales como bacterias, levaduras y mezclas de las mismas, utilizándose como muestra. A continuación, la leche contaminada se somete al método de acuerdo con la presente invención. Los resultados de las medidas de luminiscencia se muestran en las figuras. Mediante el uso del método acorde con la invención, se demuestra en qué medida se encuentra contaminada la leche. De este modo, puede analizarse una muestra de leche que contenga contaminantes desconocidos, buscando la posible presencia de contaminación microbiana. Se han verificado muestras adicionales en los Ejemplos 12 a 13.

Materiales utilizados

[0051] En los ensayos correspondientes a los Ejemplos 1 a 11 se ha utilizado leche entera como sustrato, concretamente leche UHT con un contenido de grasa del 3,5%. En el ensayo del ejemplo 12 se ha comprobado una muestra cosmética, a saber, una loción para manos. En el ensayo del ejemplo 13 se ha comprobado una muestra farmacéutica, a saber, una solución de ácido acetilsalicílico (aspirina) en agua. Se ha utilizado un reactivo de luciérnaga de luciferina-luciferasa, con una emisión de luz estable (adecuada para la luminiscencia del ATP) como reactivo de luminiscencia. El reactivo está contenido en una solución tampón tris-EDTA con un pH de 7,75. La apirasa obtenida a partir de patata y contenida en una solución tampón tris-EDTA con un pH de 7,75 se utiliza como reactivo de apirasa. Una mezcla de compuestos cuaternarios de amonio y tensioactivos en agua se utiliza como agente de extracción microbiano. Como agente de extracción somático se utiliza una mezcla de detergentes en agua.

[0052] Como luminómetro se utilizará un luminómetro controlado por ordenador, con un fotomultiplicador de bajo ruido para el recuento de los fotones individuales (PromiLite III de promicol). El suministro de reactivos a la muestra se controla mediante bombas de inyección. La muestra se introduce en una placa de microtitulación de 96 pocillos, introduciéndose cada muestra en un pocillo independiente.

[0053] En cada uno de los ejemplos 1 a 11, se utiliza en cada prueba una muestra testigo, denominada "NEG" o negativa en los diagramas. Esto significa que dicha muestra no contiene ATP microbiano ya que es una leche esterilizada sin inocular, por lo que está exenta de contaminación microbiana. Esta solución testigo se obtiene mediante incubación de un brik de leche sin abrir (brik de cartón de 1 litro) a 32° C durante 24 horas. Además de la muestra testigo, se utilizan en cada ejemplo una o más muestras contaminadas, que se han inoculado con uno o más tipos de bacterias, levaduras y/o mezclas de las mismas. En los diagramas se denominan "POS-BAC", "POS-YEAST" y "POS-MIX", respectivamente. Los diagramas muestran la unidad de luminiscencia relativa en función del tiempo, expresada en segundos. Las medidas se encuentran en los ejemplos realizados durante 20 o 60 segundos. Las medidas de los ejemplos 12 a 13 no se muestran en los diagramas. Los ejemplos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13 constituyen ejemplos que no son acordes con la invención. Los ejemplos 3, 9, 11 sí son acordes con la invención.

Ejemplo 1

[0054] Preparación de "POS-BAC": se preparó un cultivo de la bacteria *Bacillus subtilis* en un medio de resucitación, incubándose a 32° C durante 24 horas. A continuación se añadieron 50 µm del cultivo a 20 ml de leche y se incubaron a 32° C durante 24 horas. Dicha muestra debe considerarse como una muestra no tratada previamente con un agente de extracción.

[0055] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-BAC" a una placa de microtitulación, sometiéndose a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la siguiente secuencia de proceso:

- Conexión del contenedor con el reactivo de luminiscencia a la bomba de inyección 1
- Conexión del contenedor con el agente de extracción microbiano a la bomba de inyección 2
- Inyección de 50 µl del reactivo de luminiscencia
- Espera de 2,05 segundos
- Inicio de la medición en el instante $t = 0$ con un intervalo de medición de 0,4 segundos.
- Inyección de 50 µl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el momento $t = 5$ segundos.
- Final de la medición en el instante $t = 20$ segundos.

[0056] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias ("POS-BAC").

[0057] De la figura 1 puede inferirse que en el intervalo de tiempo transcurrido entre $t = 0$ a $t = 5$, el valor de "POS-BAC" será algo superior que el valor de "NEG", lo que significa que la leche contaminada con bacterias contiene una cierta cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células bacterianas que ya han muerto, lo que puede

servir como aviso de una posible contaminación de la leche. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y que va a provocar la liberación del ATP microbiano presente se añade en el momento $t = 5$. Puede inferirse del diagrama que algunas de las células microbianas ya han liberado su ATP al cabo de un segundo (tiempo $t=6$). Este proceso de liberación del ATP microbiano dura aproximadamente hasta el momento $t = 10$. Tras esto, la luminiscencia permanece constante, lo que demuestra que se ha liberado la totalidad del ATP microbiano.

[0058] Puede inferirse claramente a partir de la figura 1 que el método de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para determinar la presencia de contaminación bacteriana en la leche.

Ejemplo 2

[0059] Preparación de "POS-YEAST": se preparó un cultivo de una variedad de levadura silvestre que suele aparecer como un contaminante natural de los zumos de frutas en un medio de resucitación, incubándose a 26° C durante 24 horas. A continuación se añadieron 50 μ m del cultivo a 20 ml de leche y se incubaron de nuevo a 26° C durante 24 horas. Dicha muestra debe considerarse como una muestra no tratada previamente con un agente de extracción. Este ejemplo se diferencia del ejemplo 1 en que se ha utilizado levadura en lugar de bacterias.

[0060] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 μ l de leche "NEG" y 50 μ l de leche "POS-YEAST" a una placa de microtitulación, sometiéndose a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 1.

[0061] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo ("NEG") se comparan con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura ("POS-YEAST").

[0062] De la figura 2 puede inferirse que en el intervalo de tiempo transcurrido entre $t = 0$ a $t = 5$, el valor de "POS-YEAST" será algo superior que el valor de "NEG", lo que significa que la leche contaminada con levadura contiene una cierta cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células de levadura que ya han muerto, lo cual puede servir como aviso de una posible contaminación de la leche. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y que va a provocar la liberación del ATP microbiano presente se añade en el momento $t = 5$. Puede inferirse del diagrama que se produce un descenso en la luminiscencia inmediatamente después de haber añadido el agente de extracción microbiano. Esta disminución puede atribuirse a dos factores, siendo el primero el efecto de dilución y el segundo, el denominado efecto de enfriamiento. También puede apreciarse que una parte de las células microbianas han liberado su ATP tan sólo al cabo de aproximadamente 5 segundos (tiempo $t = 10$), es decir, más lentamente que en el caso de las bacterias véase el ejemplo 1). Este proceso de liberación del ATP microbiano persiste hasta el final del análisis ($t=20$).

[0063] Puede inferirse claramente a partir de la figura 2 que el método de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para determinar la presencia de contaminación de la leche causada por levaduras.

Ejemplo 3

[0064] Preparación de "POS-MIX": se preparó un cultivo de leche "POS-BAC" preparada de acuerdo con el ejemplo 1, y de leche "POS-YEAST" de acuerdo con el ejemplo 2, de forma que las cantidades estimadas de ATP microbiano procedente de ambos tipos de contaminantes microbianos sean del mismo orden de magnitud (bacterias:levadura 1:30). Dicha muestra debe considerarse como una muestra no tratada previamente con un agente de extracción. Este ejemplo se diferencia de los ejemplos 1 y 2 en que se ha utilizado una combinación de levadura y bacterias.

[0065] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 μ l de leche "NEG" y 50 μ l de leche "POS-MIX" a una placa de microtitulación, sometiéndose a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 1.

[0066] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo ("NEG") se comparan con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias y levadura ("POS-MIX").

[0067] De la figura 3 puede inferirse que en el intervalo de tiempo transcurrido entre $t = 0$ y $t = 5$, el valor de "POS-MIX" será algo superior que el valor de "NEG", lo que significa que la leche contaminada con levadura y bacterias contiene una cierta cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células microbianas que ya han muerto, lo cual puede servir como aviso de una posible contaminación de la leche. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y que va a provocar la liberación del ATP microbiano presente se añade en el momento $t = 5$. Puede inferirse del diagrama que se produce un descenso en la luminiscencia inmediatamente después de haber añadido el agente de extracción microbiano, como se describió en el ejemplo 2. Una parte de las células microbianas ya han liberado su ATP tan sólo al cabo de aproximadamente 1 segundo (tiempo $t = 6$). Este proceso de liberación del ATP microbiano dura hasta el instante $t=10$.

[0068] Puede inferirse claramente a partir de la figura 3 que el método de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para determinar la presencia de contaminación de la leche causada tanto por bacterias como por levaduras.

5 **[0069]** En las figuras 4A y 4B se muestran conjuntamente los diagramas de los ejemplos 1, 2 y 3 en un diagrama para que se aprecien las diferencias. La figura 4B es una ampliación de la figura 4A. En esta se muestra que existe una diferencia sustancial entre los resultados de la leche contaminada con bacterias y con levadura. La leche contaminada con bacterias muestra un perfil de luminiscencia que se caracteriza por un rápido aumento de la luminiscencia tras la adición de agente de extracción microbiano, por el rápido establecimiento de un valor constante de la luminiscencia y por un valor de la luminiscencia más elevado, mientras que la leche contaminada por levaduras muestra un perfil con una lenta disminución de la luminiscencia, después de añadir el agente de extracción microbiano, sin que se establezca un valor de luminiscencia constante a lo largo de un intervalo de tiempo de 20 segundos, y también con un valor de luminiscencia más bajo.

10 **[0070]** Esta comparación muestra claramente que el presente método no es sólo adecuado para demostrar la presencia de contaminación microbiana, sino también para determinar qué tipo de contaminante (levaduras, bacterias, o una combinación de ambas) se encuentra presente.

Ejemplo 4

15 **[0071]** Preparación de "POS-BAC": se preparó un cultivo de la bacteria *Bacillus cereus* (ATCC 11778) en un medio de resucitación, incubándose a 32° C durante 24 horas. A continuación se añadieron 50 µm del cultivo a 20 ml de leche y se incubaron a 32° C durante 24 horas. Dicha muestra debe considerarse como una muestra no tratada previamente con un agente de extracción. La diferencia con el ejemplo 1 radica en la utilización de un tipo de bacteria diferente.

20 **[0072]** Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-BAC" a una placa de microtitulación, sometándose a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la siguiente secuencia de proceso:

- 25
- Conexión del contenedor con el reactivo de luminiscencia a la bomba de inyección 1
 - Conexión del contenedor con el agente de extracción microbiano a la bomba de inyección 2
 - Inyección de 50 µl del reactivo de luminiscencia
 - Espera de 2,05 segundos
 - Inicio de la medición en el instante $t = 0$ con un intervalo de medición de 1,2 segundos.
- 30
- Inyección de 50 µl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el instante $t = 5$ segundos.
 - Final de la medición en el momento $t = 60$ segundos.

[0073] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias ("POS-BAC").

35 Ejemplo 5

[0074] Preparación de "POS-BAC (tratada con apirasa)"; se preparó una leche "POS-BAC" como la que se describe en el ejemplo 4.

40 **[0075]** Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-BAC" (tratada con apirasa) a una placa de microtitulación. Se añadieron cantidades de 50 µl de apirasa a cada pocillo, incubándose durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se sometieron a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 4.

[0076] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo ("NEG") se comparan con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias ("POS-BAC (tratada con apirasa)").

45 **[0077]** Puede inferirse a partir de la curva "POS-BAC" (ejemplo 4) de la figura 5 que tras un rápido aumento de la luminiscencia durante el intervalo de tiempo transcurrido entre $t = 6$ a $t = 10$, la luminiscencia permanece constante durante algún tiempo (hasta $t = 20$), tras lo cual se observa un descenso en la luminiscencia. No se sabe a qué puede atribuirse dicho descenso, pero los inventores opinan que puede producirse cierta descomposición del complejo formado por el ATP microbiano y el reactivo de luminiscencia.

5 **[0078]** A partir de la curva “POS-BAC (tratada con apirasa)” (ejemplo 5) de la figura 5 puede inferirse que tras un aumento comparablemente rápido de la luminiscencia en el intervalo de tiempo transcurrido entre $t = 6$ y $t = 10$, el valor de la luminiscencia es inferior al del “POS-BAC”. Esto significa que el tratamiento con apirasa de acuerdo con el ejemplo 5 tiene como consecuencia un valor inferior, provocado por la descomposición del ATP microbiano provocada por la apirasa presente. Además, la luminiscencia no alcanza un valor constante, sino que disminuye a lo largo del tiempo con mayor rapidez que el “POS-BAC” de acuerdo con el ejemplo 4, que no ha sido sometido a ningún tratamiento con apirasa. Esto demuestra que los inconvenientes de la apirasa pueden ser resueltos, al menos parcialmente, por la presente invención. En este ejemplo, el tratamiento con apirasa provoca una menor luminiscencia, pero es evidente que en el caso de que tan sólo se encuentre presente una pequeña cantidad de células microbianas, el tratamiento con apirasa podría incluso inducir a un resultado “falsamente” negativo.

[0079] Por ello, puede inferirse claramente a partir de la figura 5 que el método de acuerdo con la presente invención resuelve los problemas que representa el tratamiento con apirasa de acuerdo con el estado de la técnica, al menos parcialmente.

Ejemplo 6

15 **[0080]** Preparación de “POS-YEAST”; se preparó una leche “POS-YEAST” como la que se describió en el ejemplo 2.

[0081] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 μ l de leche “NEG” y 50 μ l de leche “POS-YEAST” a una placa de microtitulación, y las muestras se sometieron a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 4.

20 **[0082]** Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo (“NEG”) se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura (“POS-YEAST”).

Ejemplo 7

25 **[0083]** Preparación de “POS-YEAST (tratada con apirasa)”; se preparó una leche “POS-YEAST” como la que se describe en el ejemplo 4.

[0084] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 μ l de leche “NEG” y 50 μ l de leche “POS-YEAST” (tratada con apirasa) a una placa de microtitulación. Se añadieron cantidades de 50 μ l de apirasa a cada pocillo, incubándose durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se sometieron a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 4.

30 **[0085]** Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo (“NEG”) se comparan con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura (“POS-YEAST (tratada con apirasa)”).

[0086] Puede inferirse a partir de la curva “POS-YEAST” (ejemplo 6) de la figura 6 que se observa un ligero aumento de la luminiscencia, que dura hasta el fin de la medición, en $t = 60$.

35 **[0087]** Puede inferirse a partir de la curva “POS-YEAST (tratada con apirasa)” (ejemplo 7) de la figura 6 que se observan diferencias de menor importancia con respecto a la curva “POS-YEAST” de acuerdo con el ejemplo 6,. El valor último de la luminiscencia es ligeramente inferior en el caso del tratamiento con apirasa, y la forma de la curva es ligeramente diferente.

Ejemplo 8

40 **[0088]** Preparación de “POS-MIX”: se preparó una mezcla de leche “POS-BAC” preparada de acuerdo con el ejemplo 4 y de leche “POS-YEAST” de acuerdo con el ejemplo 6, de forma que la cantidad estimada de ATP microbiano de ambos tipos de contaminantes microbianos sea del mismo orden de magnitud (bacterias:levadura = 1:10).

45 **[0089]** Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 μ l de leche “NEG” y 50 μ l de leche “POS-MIX” a una placa de microtitulación, sometiéndose a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 4.

[0090] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo (“NEG”) se comparan con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias y levadura (“POS-MIX”).

50 Ejemplo 9

[0091] Preparación de “POS-MIX” (tratada con apirasa): se preparó una leche “POS-MIX” de acuerdo con el ejemplo 6.

[0092] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 µl de leche “NEG” y 50 µl de leche “POS-MIX (tratada con apirasa)” a una placa de microtitulación. Se añadieron cantidades de 50 µl de apirasa a cada pocillo, incubándose durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se sometieron a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 4.

5 **[0093]** Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo (“NEG”) se comparan con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura y bacterias (“POS-MIX (tratada con apirasa)”).

10 **[0094]** Puede inferirse a partir de la curva “POS-MIX (tratada con apirasa)” (ejemplo 8) de la figura 7 que, tras un rápido aumento de la luminiscencia en el intervalo de tiempo que va de $t = 6$ a $t = 10$, la luminiscencia permanece constante durante algún tiempo (hasta $t = 30$), tras lo cual se observa un aumento adicional de la luminiscencia hasta $t = 60$. Este aumento adicional puede atribuirse a la rotura de las células de levadura presentes y a la liberación del ATP microbiano presente en éstas.

15 **[0095]** Puede inferirse a partir de la curva “POS-MIX (tratada con apirasa)” (ejemplo 9) de la figura 7 que, tras un aumento comparablemente rápido de la luminiscencia en el intervalo de tiempo transcurrido entre $t = 6$ y $t = 10$, el valor de la luminiscencia es inferior al del “POS-MIX”. Adicionalmente se observa una disminución de la luminiscencia, seguido de una ligera subida de la temperatura. Esta disminución puede atribuirse a la descomposición por la apirasa de una parte del ATP presente y el aumento se puede atribuir a la rotura de las células de levadura, como se ha descrito anteriormente. Este aumento y este descenso se contrapesan mutuamente, con lo que se da un resultado falsamente negativo en relación con la presencia de levadura en esta muestra, lo que no se obtiene mediante el método acorde con el ejemplo 8.

20 **[0096]** Cuanto antecede demuestra que el tratamiento con apirasa de acuerdo con el ejemplo 9 arroja un valor inferior, provocado por la descomposición del ATP microbiano liberado causada por la apirasa presente. Esto demuestra que los inconvenientes de la apirasa pueden ser resueltos, al menos parcialmente, por la presente invención.

25 **[0097]** Las figuras 8A y 8B muestran los diagramas de los ejemplos 4 a 9 reunidos en un solo diagrama, para que se aprecien las diferencias. La figura 8B es una ampliación de la figura 8A, que muestra que existe una diferencia sustancial entre los resultados de la leche contaminada por bacterias y con levadura, comparable a la que se ha comentado anteriormente en relación con las figuras 4A y 4B. Esta comparación muestra claramente que el presente método no es sólo adecuado para demostrar la presencia de contaminación microbiana, sino también para determinar qué tipo (levaduras, bacterias, o una combinación de ambas) se encuentra presente.

Ejemplo 10

[0098] Preparación de “POS-YEAST”: se prepara un cultivo como el descrito en el ejemplo 2. A continuación, se añadieron 50µl del cultivo a 20 ml de leche aromatizada con vainilla-limón y se incubó de nuevo a 26° C durante 24 horas. La diferencia con respecto a los anteriores ejemplos es que la muestra contiene células somáticas.

35 **[0099]** Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 µl de leche “NEG” y 50 µl de leche “POS-YEAST” a una placa de microtitulación, sometiéndose a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la siguiente secuencia de proceso:

- Conexión del contenedor con el reactivo de luminiscencia a la bomba de inyección 1
- Conexión del contenedor con el agente de extracción microbiano a la bomba de inyección 2
- 40 • Conexión del contenedor con el agente de extracción somático a la bomba de inyección 3
- Inyección de 50 µl del reactivo de luminiscencia
- Espera de 2,05 segundos
- Inicio de la medición en el instante $t = 0$ con un intervalo de medición de 0,56 segundos.
- Inyección de 50 µl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el instante $t = 3$ segundos.
- 45 • Inyección de 50 µl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el instante $t = 8$ segundos.
- Final de la medición en el instante $t = 28$ segundos.

[0100] Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo (“NEG”) se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura (“POS-YEAST”).

[0101] A partir de la figura 9 se puede inferir que en el intervalo de tiempo transcurrido desde $t = 0$ a $t = 5$, el valor "POS-YEAST" es ligeramente superior al valor "NEG", lo que significa que la leche contaminada con levadura contiene una determinada cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células de levadura que ya han muerto, lo que puede servir como aviso de una posible contaminación de la leche. También puede observarse que la leche "NEG" también contiene una cantidad determinada de ATP, lo que indica la presencia de ATP libre, probablemente ATP somático precedente de células vegetales (aromatizante de vainilla-limón). El agente de extracción somático que va a romper las células somáticas presentes y que va a provocar la liberación del ATP presente se añade en el instante $t = 3$. Puede inferirse del diagrama que se produce un aumento de la luminiscencia inmediatamente después de haber añadido el agente de extracción somático, tanto en la leche "NEG" como en la leche "POS-YEAST", lo que implica que ambas muestras contienen células somáticas, derivadas del aromatizante de vainilla-limón. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y que va a provocar la liberación del ATP presente se añade en el instante $t = 8$. Puede inferirse del diagrama que se produce una disminución de la luminiscencia inmediatamente después de haber añadido el agente de extracción microbiano, como ya se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2. Esta disminución inicial va seguida de un lento aumento de la luminiscencia en el caso de la leche "POS-YEAST", pero no en el caso de la leche "NEG", lo que demuestra que la leche "POS-YEAST" contiene contaminación microbiana y la leche "NEG" no contiene contaminación microbiana. Este proceso de liberación del ATP microbiano en la leche "POS-YEAST" persiste hasta el final del análisis ($t=28$).

[0102] A partir de la figura 9 se puede inferir claramente que el método de acuerdo con la presente invención puede utilizarse para determinar la presencia de contaminación somática y microbiana en la leche en un único proceso de medida, lo que hasta ahora resultaba imposible con el método de acuerdo con el estado de la técnica.

Ejemplo 11

[0103] Como ya se ha indicado anteriormente, el presente método resulta enormemente adecuado para identificar diferentes tipos de levaduras y bacterias. En este ejemplo se compararon entre sí una levadura y tres bacterias Gram-positivas para evaluar si podían distinguirse entre sí en base al presente método.

[0104] Las células microbianas utilizadas son *Candida albicans* (levadura; ATCC 10231), *Geobacillus stearothermophilus* (Bacteria Gram-positiva; ATCC 7953), *Clostridium sporogenes* (Bacteria Gram-positiva; ATCC 19404) y *Bacillus cereus* (Bacteria Gram-positiva; ATCC 11778).

[0105] Preparación de "*C. albicans*": una colonia de la levadura *Candida albicans* en una placa de agar tríptico de soja se introdujo en 9 ml de medio de resucitación y se incubó a 22 a 25° durante 24 horas.

[0106] Preparación de "*G. stearothermophilus*": una colonia de la bacteria *Geobacillus stearothermophilus* en una placa de agar tríptico de soja se introdujo en 9 ml de medio de resucitación y se incubó a 55° durante 24 horas.

[0107] Preparación de "*C. Sporogenes*": una colonia de la bacteria *Clostridium Sporogenes* en una placa de agar-agar sanguíneo se introdujo en 9 ml de un medio consistente en tioglicolato líquido y se incubó a 35° C durante 24 horas.

[0108] Preparación de "*B. Cereus*": una colonia de la bacteria *Bacillus cereus* en una placa de agar-agar tríptico de soja se introdujo en 9 ml de medio de resucitación y se incubó a 35° C durante 24 horas.

[0109] Preparación de "NEG" el medio de resucitación se incubó a 35° C durante 24 horas.

[0110] Medición: se transvasaron mediante pipeta 50 μ l de "*C. albicans*", "*G. stearothermophilus*", "*C. Sporogenes*" y "*B. cereus*" a una placa de microtitulación, y se sometieron a una medición de la luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de proceso descrita en el ejemplo 4.

[0111] Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10A y 10B, en la que el diagrama en el que se presentan los resultados de la medida testigo ("NEG") se comparan con los resultados de la medición de las muestras contaminadas con diversas células microbianas. La figura 10B es una ampliación de la figura 10A.

[0112] A partir de la figura 10B se puede inferir que en el intervalo de tiempo transcurrido desde $t = 0$ a $t = 5$, los valores de "*B. cereus*" y "*Cl. sporogenes*" son ligeramente superiores al valor "NEG", lo que significa que las muestras contaminadas con bacterias contienen una determinada cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células bacterianas que ya han muerto, lo cual puede servir como aviso de una posible contaminación de la muestra. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y que va a provocar la liberación del ATP presente se añade en el instante $t = 5$. Puede inferirse de las Figuras 10A y 10B que una parte de las células microbianas ya han liberado su ATP al cabo de 1 segundo (tiempo $t = 6$). También puede apreciarse claramente que las tasas de liberación de las diferentes células microbianas, como lo indica la inclinación de la curva, son diferentes. La figura 10B muestra claramente que la levadura "*C. albicans*" tiene una inclinación inferior a la de todas las bacterias comprobadas, lo que también se ha demostrado anteriormente, en los ejemplos 1 y 2. También puede observarse que la pendiente de la curva del "*B. cereus*" es mayor que la de la curva del "*G. stearothermophilus*", cuya pendiente, a su vez, es mayor que la de la curva del "*Cl. sporogenes*". El proceso de liberación del ATP microbiano dura aproximadamente hasta que el tiempo $t = 9$ en el caso del "*G. stearophilus*", $t =$

10 en el caso del "*B. cereus*", $t = 17$ en el caso del "*Cl. sporogenes*" y $t = 43$ en el caso del "*C. albicans*". Además, las formas de las curvas de las diferentes células microbianas también son diferentes.

5 **[0113]** Por lo tanto, el tipo de células microbianas en cuestión puede inferirse de la inclinación, de la duración del proceso de liberación y de la forma de la curva. Si se tuviese que medir una muestra con una contaminación desconocida, podría determinarse qué células microbianas contiene a partir de las curvas que se muestran en las figuras 10A y 10B.

10 **[0114]** Mediante el método de la presente invención, es posible llevar a cabo una medición rápida y precisa de los diferentes tipos de células microbianas y distinguirlas, por ejemplo, entre bacterias, levaduras y hongos, y distinguir igualmente entre los distintos tipos de bacterias y levaduras, por ejemplo entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero también entre diferentes bacterias Gram-positivas. Mediante el método de acuerdo con la presente invención también es posible distinguir la cantidad de ATP somático y la cantidad de ATP microbiano, además de la cantidad de agente de extracción libre en productos de una sola muestra.

Ejemplo 12

15 **[0115]** Se suspendió en agua una loción para manos, efectuándose una medición de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 1, al mismo tiempo que también se preparaba una muestra "POST-BAC" añadiendo 50 μl del cultivo del ejemplo 1 con 20 μl de la suspensión. Posteriormente, se midieron una muestra "NEG" y la muestra "POS-BAC", y en base a los resultados (no mostrados) se observa que puede demostrarse claramente la contaminación por bacterias.

Ejemplo 13

20 **[0116]** Se repitió el ejemplo 12, sustituyéndose la suspensión por una solución de ácido acetilsalicílico al 5% en peso en agua. En base a los resultados (no mostrados) se observa que puede demostrarse claramente la contaminación por bacterias.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar ATP en una muestra mediante luminiscencia, que comprende las siguientes etapas:

- 5 1) adición de un reactivo de luminiscencia a una muestra que no ha sido sometida a tratamiento previo alguno con un agente de extracción, a fin de formar un complejo de ATP, y medición de la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 2) adición de un agente de extracción somático a la muestra para formar un complejo de ATP, y medición de la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 3) adición de un agente de extracción microbiano a la muestra para formar un complejo de ATP, y medición de la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 10 4) comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa 3) con un valor estándar de luminiscencia en función del tiempo correspondiente a una muestra testigo sin contaminar a fin de determinar si se encuentran presentes células microbianas;
- 5) identificación de las células microbianas que se encuentran presentes en la muestra mediante comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa 3) con uno o más valores de referencia en función del tiempo correspondientes a las células microbianas;
- 15

2. Método para detectar ATP en una muestra mediante luminiscencia, que comprende las siguientes etapas:

- A) adición de un reactivo de luminiscencia a una muestra que no ha sido sometida a tratamiento previo alguno con un agente de extracción, a fin de formar un complejo de ATP, y medición de la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 20 B) adición de un agente de extracción microbiano a la muestra para formar un complejo de ATP, y medición de la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- C) comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa B) con un valor estándar de luminiscencia en función del tiempo correspondiente a una muestra testigo sin contaminar a fin de determinar si se encuentran presentes células microbianas;
- 25 D) identificación de las células microbianas que se encuentran presentes en la muestra mediante comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa B) con uno o más valores de referencia en función del tiempo correspondientes a las células microbianas;

3. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que la luminiscencia se mide durante un período de al menos 10 segundos.

30 4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la luminiscencia se mide durante un período de al menos 20 segundos.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la luminiscencia se mide durante un período de al menos 60 segundos.

35 6. Método de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye la etapa adicional de identificación de las células somáticas presentes en la muestra mediante comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa 2) con uno o más valores de referencia en función del tiempo correspondientes a células somáticas.

7. Programa informático para implementar un método de acuerdo con la reivindicación 1, ejecutando dicho programa informático las siguientes etapas:

40 I) obtención de un valor medido para la luminiscencia del ATP libre mediante un luminómetro que mida la luminiscencia obtenida en la etapa 1), comparándose dicho valor medido de ATP libre con un valor estándar correspondiente a una muestra testigo sin contaminar, y determinación de la presencia de ATP libre si el valor medido es superior al valor estándar;

45 II) obtención de un valor medido para la luminiscencia del ATP somático mediante un luminómetro que mida la luminiscencia obtenida en la etapa 2), comparándose dicho valor medido de ATP somático con el valor medido del ATP libre obtenido en la etapa I), y determinándose la presencia de ATP somático si el valor medido del ATP somático es más elevado que el valor medido del ATP libre obtenido en la etapa I);

50 III) obtención de un valor medido para la luminiscencia del ATP microbiano mediante un luminómetro que mida la luminiscencia obtenida en la etapa 3), comparándose dicho valor medido de ATP microbiano con el valor medido del ATP somático obtenido en la etapa II), y determinándose la presencia de ATP microbiano si el valor medido del ATP microbiano es más elevado que el valor medido del ATP somático obtenido en la etapa II);

IV) eventualmente, comparación del valor medido del ATP somático en función del tiempo obtenido en la etapa II) con uno o más valores de referencia en función del tiempo correspondientes a células somáticas, a fin de identificar las células somáticas que se encuentran presentes en la muestra;

5 V) comparación del valor medido del ATP microbiano en función del tiempo obtenido en la etapa III) con uno o más valores de referencia en función del tiempo correspondientes a células microbianas, a fin de identificar las células microbianas que se encuentran presentes en la muestra;

8. Programa informático para implementar un método de acuerdo con la reivindicación 2, ejecutando dicho programa informático las siguientes etapas:

10 I) obtención de un valor medido para la luminiscencia del ATP libre mediante un luminómetro que mida la luminiscencia obtenida en la etapa A), comparándose dicho valor medido de ATP libre con un valor estándar correspondiente a una muestra testigo sin contaminar, y determinación de la presencia de ATP libre si el valor medido es superior al valor estándar;

15 II) obtención de un valor medido para la luminiscencia del ATP microbiano mediante un luminómetro que mida la luminiscencia obtenida en la etapa B), comparándose dicho valor medido de ATP microbiano con el valor medido del ATP libre obtenido en la etapa I), y determinándose la presencia de ATP microbiano si el valor medido del ATP microbiano es más elevado que el valor medido del ATP libre obtenido en la etapa I);

III) comparación del valor medido del ATP microbiano en función del tiempo obtenido en la etapa II) con uno o más valores de referencia en función del tiempo correspondientes a células microbianas, a fin de identificar las células microbianas que se encuentran presentes en la muestra;

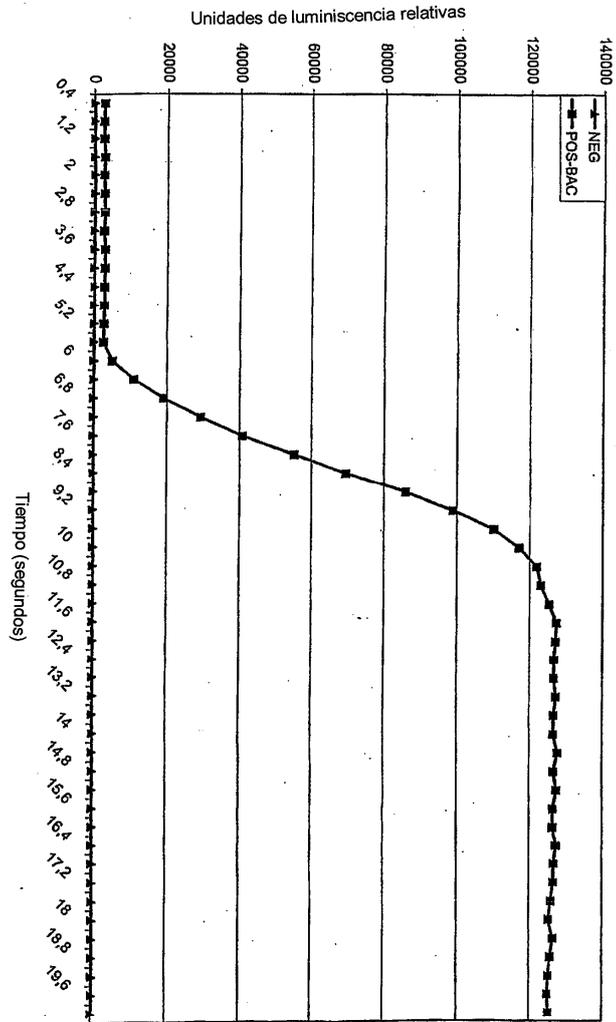


FIGURA 1

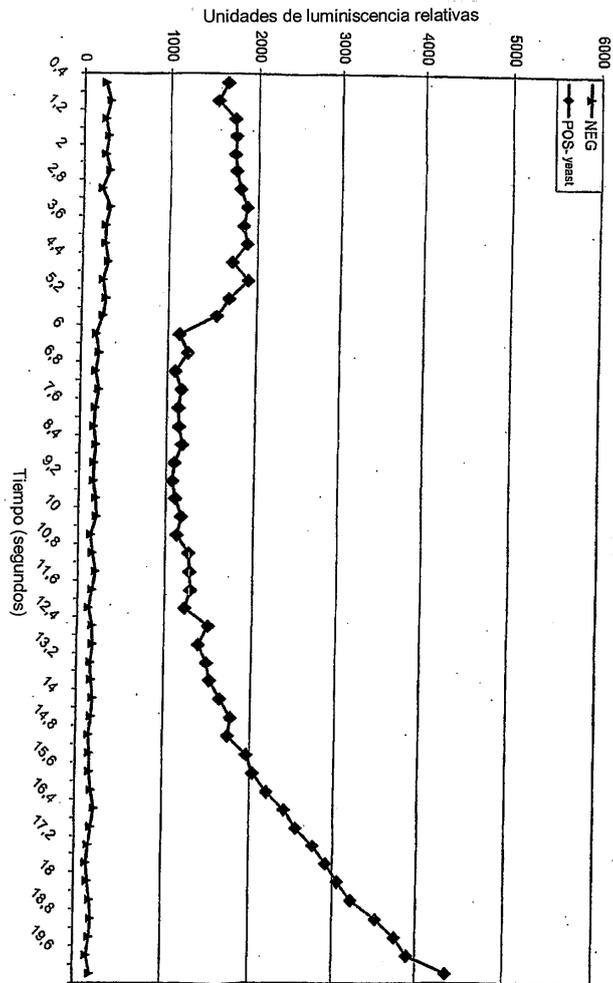


FIGURA 2

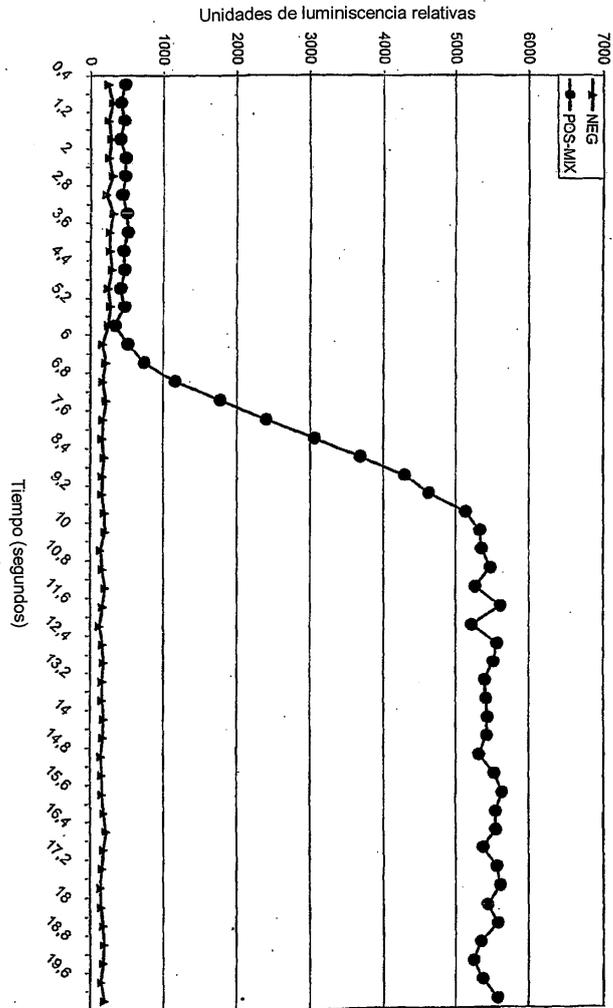


FIGURA 3

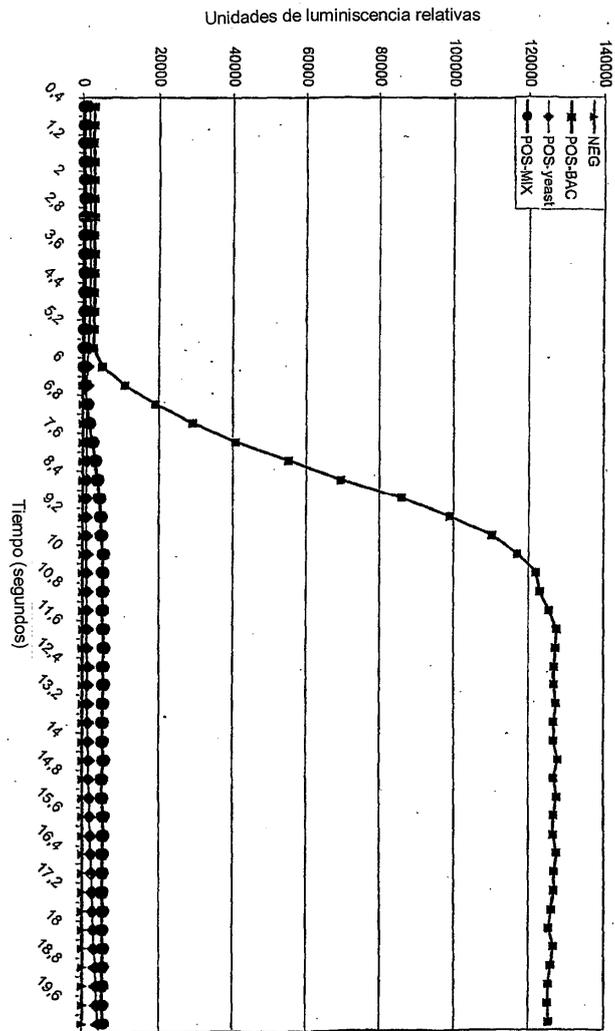


FIGURA 4A

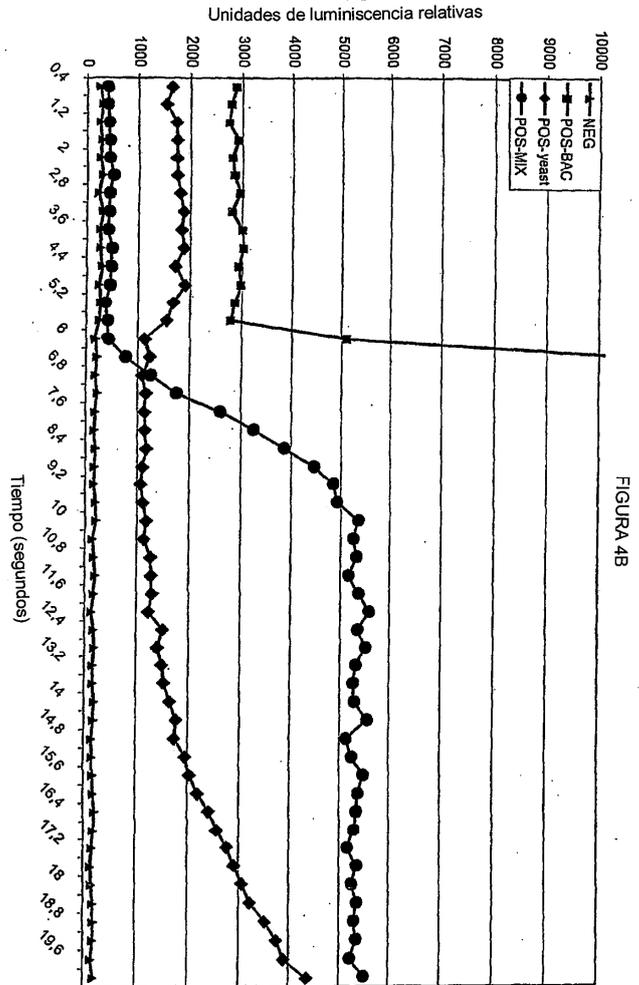


FIGURA 4B

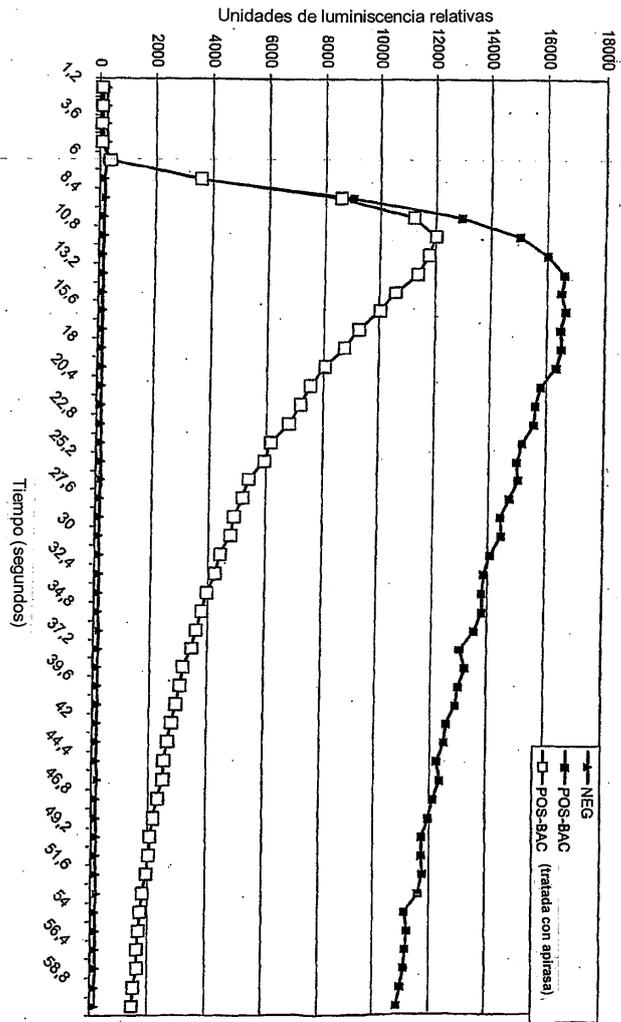


FIGURA 5

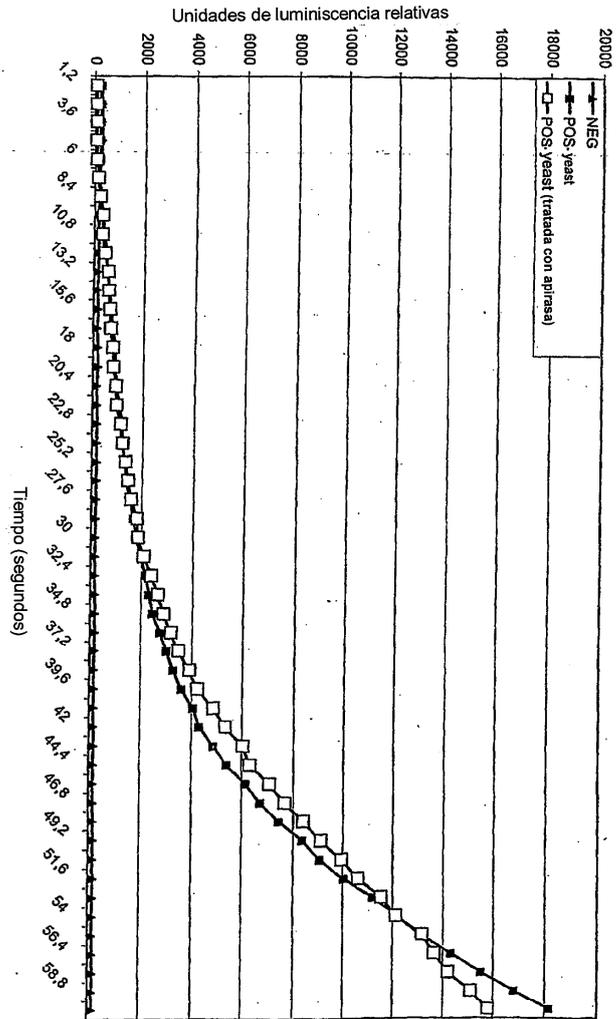


FIGURA 6

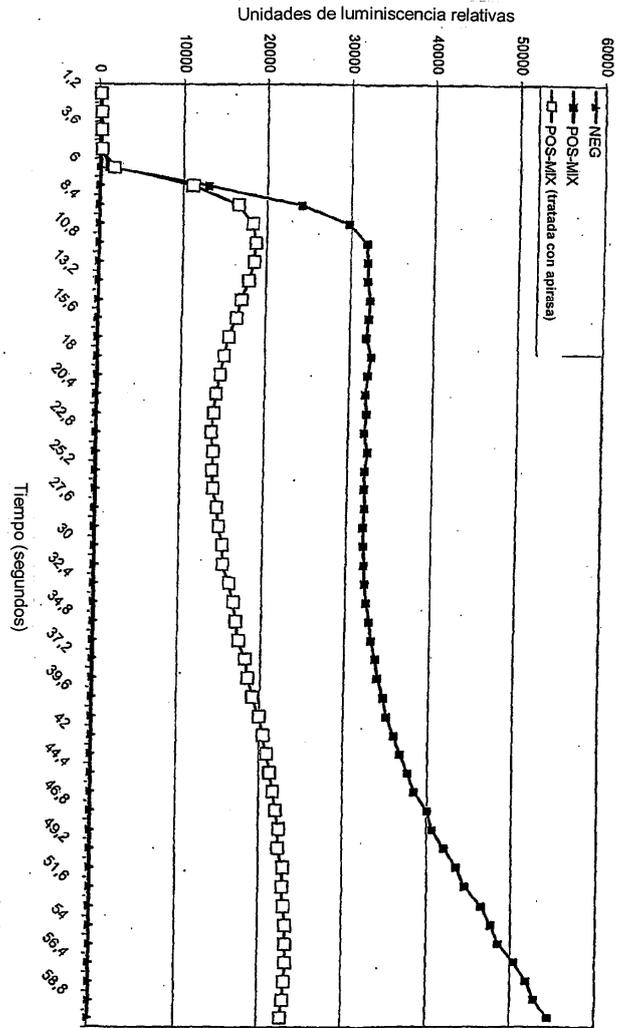


FIGURA 7

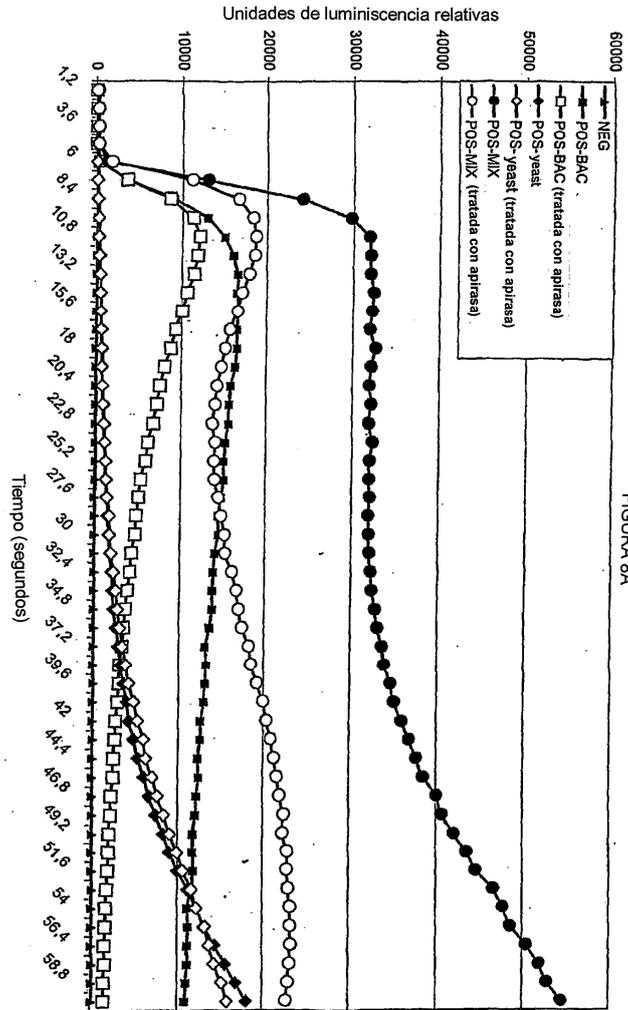


FIGURA 8A

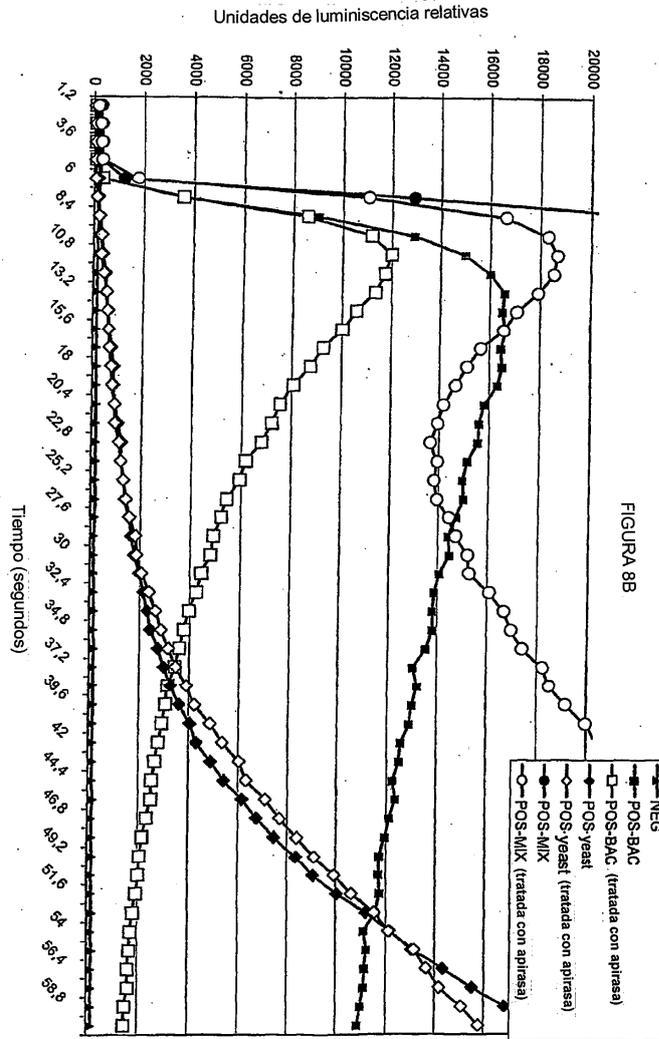


FIGURA 8B

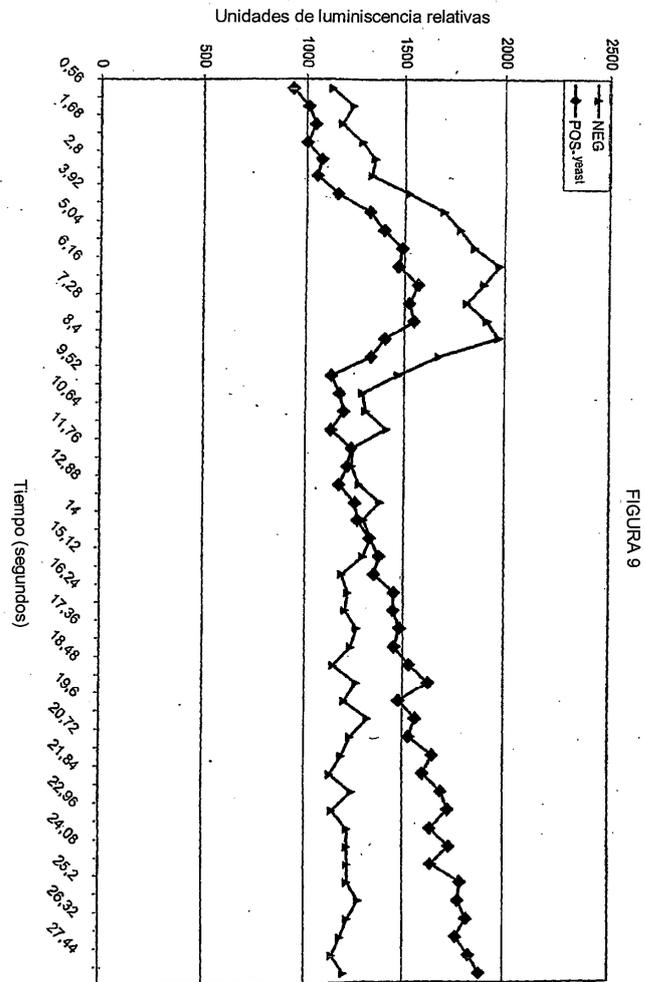


FIGURA 9

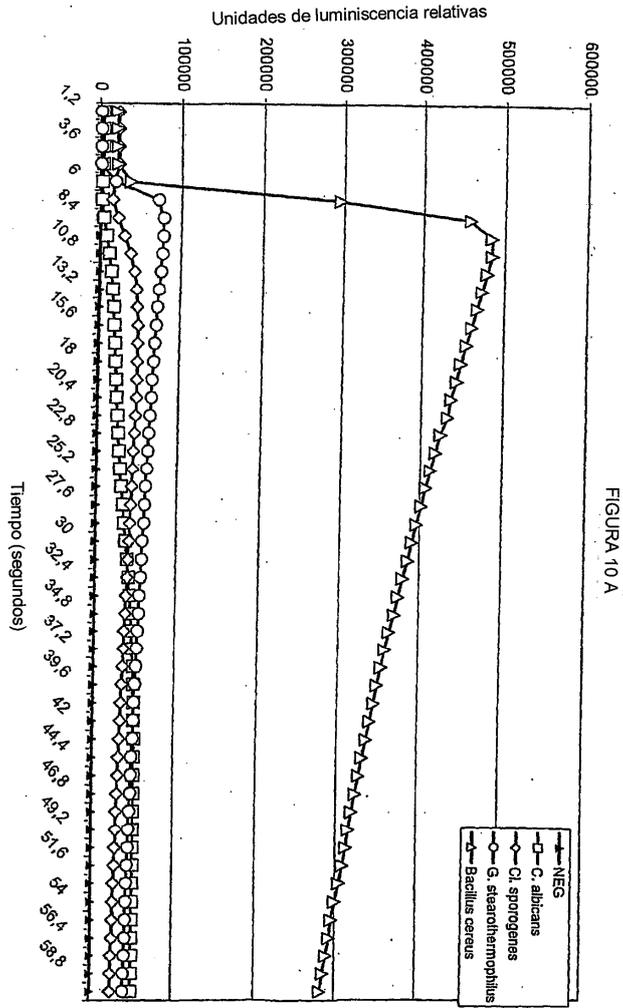


FIGURA 10 A

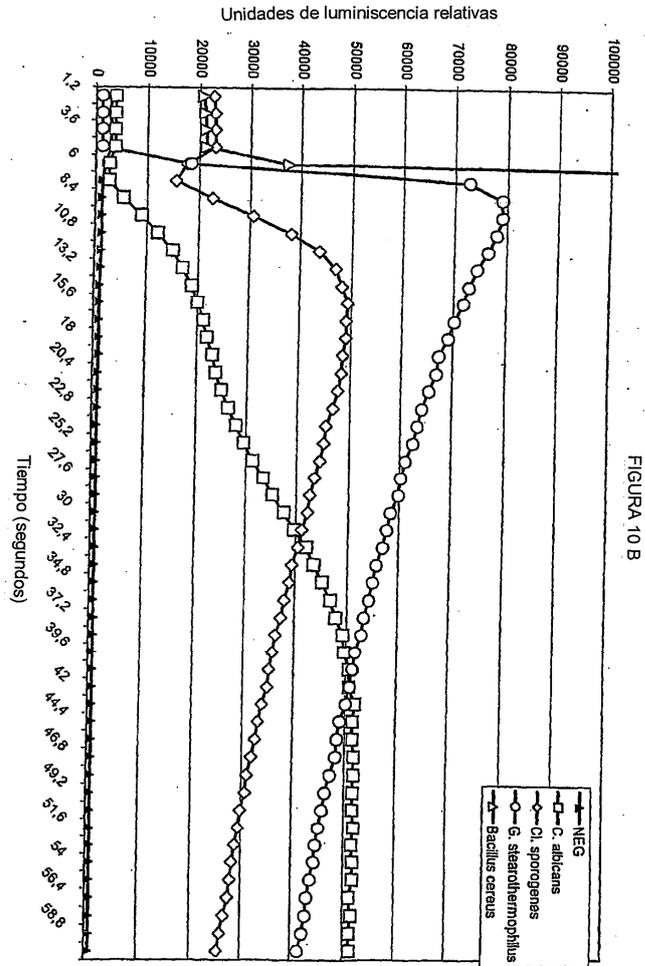


FIGURA 10 B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- US 4303752 A [0004]
- CH 678065 [0005] [0006]
- US 6951723 B [0007]

10 **Bibliografía de patentes citada en la descripción**

- **Schram et al.** Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 1989, 390-398 [0006]