

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 014**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2006 E 10181748 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2388335**

54 Título: **Un procedimiento de detección de ATP en una muestra con la ayuda de luminiscencia**

30 Prioridad:

25.11.2005 NL 1030525

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

09.05.2018

73 Titular/es:

AMIRIS B.V. (100.0%)

Nusterweg 119

6136 KT Sittard, NL

72 Inventor/es:

RIJKX, JOSEPH MARIA FRANCISCUS DONATUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 667 014 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

Un procedimiento de detección de ATP en una muestra con la ayuda de luminiscencia

La presente solicitud se refiere a un procedimiento para la detección de ATP en una muestra con la ayuda de luminiscencia.

5 Varias regulaciones gubernamentales referentes a la presencia de contaminantes se mantienen para diversas industrias, tales como la industria de alimentos y bebidas y las industrias clínica, farmacéutica y cosmética. Esto incluye, por ejemplo, la obligación de someter a ensayo (o concertar el ensayo de) todos los productos para determinar la presencia de contaminantes tales como células microbianas (por ejemplo, bacterias, levaduras y hongos). En ciertas condiciones, la presencia de dichas células microbianas en los productos puede provocar el deterioro precoz de los productos. Estas células microbianas pueden constituir, además, un riesgo significativo para la salud de los consumidores que consumen el producto.

10 Los procedimientos convencionales para la detección de contaminación microbiana implican el cultivo de células microbianas hasta que puedan discernirse con el ojo desnudo. La desventaja de esto es que dichos procedimientos son lentos y obtener resultados puede llevar muchos días. Este aspecto lento hace que dichos procedimientos sean costosos.

15 Por tanto, desde hace algún tiempo se sabe, por ejemplo, por la patente de los EE.UU. 4.303.752, usar un procedimiento para la detección de contaminación microbiana en productos que se basa en la medición de la molécula adenosina trifosfato (ATP), que está presente en células microbianas vivas. El ATP puede detectarse en un lapso de tiempo de varios segundos en presencia de un reactivo de luminiscencia que, por ejemplo, consiste en una combinación de la enzima luciferasa y su cofactor, luciferina. La reacción resultante, que habitualmente se denomina "reacción de luciérnaga", produce inmediatamente una emisión de luz conocida como luminiscencia de ATP. La luz producida es proporcional a la cantidad de ATP contenida en la muestra. La luminiscencia puede medirse con la ayuda de un instrumento de medición, tal como un luminómetro, por ejemplo.

20 Por el documento CH 678 065 se sabe detectar ATP añadiendo primero un agente de extracción somático, dando como resultado la liberación de ATP somático y, posteriormente, un reactivo de luminiscencia. Como resultado, se mide la cantidad combinada de ATP libre y ATP somático. Dicho ATP combinado puede retirarse entonces a través de hidrólisis. Después de eso, puede añadirse un agente de extracción microbiano con el fin de provocar la liberación de ATP microbiano, ATP que se mide posteriormente.

25 Por Schram y col. en *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, parte 4, páginas 390-398, 1989, se conoce una mejora del procedimiento descrito en el documento CH 678 065, procedimiento que emplea ATP-asa de mamífero.

30 Por el documento US 6.951.723 se sabe medir ADP (difosfato de adenosina), un producto de descomposición del ATP, o convertir el ADP en ATP y, posteriormente, medirlo.

35 Sin embargo, pueden producirse problemas significativos cuando dichos procedimientos convencionales para la luminiscencia del ATP se usan para detectar la presencia de células microbianas vivas en productos.

40 En primer lugar, el ATP se produce no solo en células microbianas vivas, sino también en otras células no microbianas, que se denominan células somáticas. Dichas células somáticas con frecuencia forman una parte integral del producto. Los productos alimenticios y las bebidas pueden contener, por ejemplo, células vegetales, por ejemplo, células de frutas en zumos de frutas, que contienen cantidades significativas de ATP denominado habitualmente ATP somático.

Un producto también puede contener el denominado ATP libre, que es ATP que se produce libremente en una muestra y deriva de células somáticas y/o microbianas "muertas" y/o rotas y/o dañadas.

45 De este modo, existen tres posibles fuentes de ATP en una muestra, en concreto, ATP libre, ATP microbiano contenido en células microbianas y ATP somático contenido en células somáticas, tres tipos de ATP que son químicamente idénticos e indistinguibles. De este modo, el ATP libre y somático tendrá que retirarse antes de que el ATP microbiano pueda detectarse con el fin de determinar la presencia de células microbianas.

50 Un segundo problema que tiene que resolverse con respecto a la determinación de ATP microbiano es que el ATP microbiano contenido en células microbianas no está disponible inmediatamente para la activación de la reacción de luciérnaga para producir luminiscencia. Para este fin, el ATP microbiano contenido en células microbianas, en primer lugar, debe liberarse o extraerse de la célula microbiana, debido a que la reacción de luciérnaga solo funcionará si el ATP está libremente disponible en la muestra para formar un complejo con el reactivo de luminiscencia (el denominado "ATP complejo"). Esta liberación se efectúa por lo general mediante los denominados agentes de extracción, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario que por así decirlo "pinchan" una membrana celular y/o pared celular de las células somática y/o microbianas de manera que el ATP puede fluir desde ellas. Las células somáticas son más vulnerables a estos agentes 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 microbiano se libere de las células microbianas. La liberación de este ATP somático en consecuencia ocultará la emisión de luz del ATP microbiano pertinente o conducirá a resultados falsamente positivos.

5 Los problemas anteriores se han resuelto en la técnica anterior, en primer lugar, mediante el uso de un agente de extracción menos potente que solo es adecuado para la liberación de ATP somático de las células somáticas sin romper las células microbianas. Esto da como resultado una muestra que contiene ATP libre y ATP somático liberado en la que el ATP microbiano está contenido solo en las células microbianas vivas, no rotas. Después de que este ATP somático se haya liberado, tanto el ATP somático liberado como el ATP libre ya presente deben eliminarse antes de que el ATP microbiano pueda liberarse de las células microbianas y medirse. El ATP somático liberado y el
10 ATP libre se eliminan mediante el tratamiento de la muestra con una enzima habitualmente denominada ATP-asa, un ejemplo de ésta es la apirasa. La apirasa es capaz de descomponer selectivamente el ATP libre contenido en una muestra sin descomponer el ATP contenido en células vivas no rotas tales como células microbianas. Éste es actualmente el procedimiento habitual utilizado en este campo.

15 Se entiende que las células no rotas son células cuya pared celular y/o membrana celular está todavía intacta y que, por tanto, no han liberado ningún ATP a su entorno. Las células que ya no están "vivas" por lo general descompondrán y, por consiguiente, liberarán el ATP contenido en ellas.

20 La desventaja del procedimiento mencionado anteriormente es que la apirasa permanece activa después de que el ATP libre y el ATP somático liberado se han descompuesto. Esto significa que cuando se añade un agente de extracción microbiano y el ATP microbiano se libera de las células microbianas éste será descompuesto parcialmente por la apirasa presente. La apirasa, por consiguiente, tiene una influencia negativa sobre los resultados de la medición, porque el valor de luminiscencia obtenido será menor de lo esperado. En particular en casos en los que solo una pequeña cantidad de células microbianas está presente, esto puede conducir a resultados falsamente negativos porque todo el ATP microbiano habrá sido descompuesto por la apirasa antes de que sea posible medirlo por medio de luminiscencia. Una situación de este tipo no es deseable porque la presencia imperceptible de células
25 microbianas puede conducir a riesgos sanitarios para el usuario, deterioro y/o pérdida de sabor.

Existe, por tanto, una necesidad de un procedimiento para la medición del ATP microbiano de una manera rápida y fiable.

Existe además una necesidad de un procedimiento en el que no se obtengan resultados falsamente negativos.

30 Otro objetivo de la presente invención es permitir la medición rápida y precisa de diferentes tipos de células microbianas y distinguir las entre sí. Existe una necesidad de un procedimiento para distinguir, por ejemplo, bacterias, levaduras y hongos entre sí, y también un procedimiento para distinguir diferentes tipos de bacterias y levaduras, por ejemplo, bacterias grampositivas y gramnegativas, pero también diferentes bacterias grampositivas entre sí.

35 Otro objetivo de la presente invención es determinar la cantidad de ATP libre y/o la cantidad de ATP somático en una muestra.

Uno o más de los siguientes objetivos se consigue mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 2.

40 En la presente invención, se añade por tanto un reactivo de luminiscencia a una muestra que no se ha sometido a ningún tratamiento previo con un agente de extracción, por ejemplo, un agente de extracción somático o uno microbiano.

45 Por lo general se prefiere que la muestra esté en una forma líquida, es decir, en suspensión, en emulsión o en solución. Las muestras que ya son líquidas de forma natural pueden usarse como tales. Son ejemplos de ello la leche, el vino, el zumo de frutas, las lociones y similares. Las muestras que de forma natural no son líquidas o son menos líquidas antes de la medición preferentemente se llevan a una forma líquida por medio de técnicas de suspensión, emulsión o disolución. Son ejemplos de esto las verduras, las frutas, las cremas y similares. Pueden someterse a ensayo muestras de productos alimenticios o bebidas, así como muestras de otros campos, tales como muestras clínicas, farmacéuticas o de cosméticos.

50 El uso del presente procedimiento hace que sea posible determinar la cantidad de ATP libre en la muestra porque no se añade ningún agente de extracción o apirasa a la muestra antes de medir la luminiscencia de la muestra por consiguiente sin tratar previamente. Dicha determinación de ATP libre nunca se ha realizado en la técnica anterior.

55 La cantidad de ATP libre, medido de acuerdo con el presente procedimiento, es una medida del estado higiénico de, por ejemplo, una fábrica y/o el equipo con el que una muestra particular se ha procesado, y también proporciona una perspectiva de cualquier evento contaminante anterior de las materias primas que permanecería sin percibirse en el caso del uso del procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica. Esto se explicará a continuación. El procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica no es capaz de medir el ATP libre. Esto significa que si, antes de ser suministrada, por ejemplo, a una fábrica, una muestra contaminada se ha calentado a una temperatura

determinada, destruyendo las células microbianas presentes, esto no puede demostrarse con el procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica. Esto es posible con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, porque se determina el ATP libre, que es una medida de la cantidad de células "muertas" o "dañadas" ("rotas") que están o estaban contenidas en la muestra, células rotas de las que se ha liberado el ATP ("ATP libre"). La presente invención, por tanto, es capaz de demostrar la contaminación que se produjo en una etapa anterior. De esta manera, por ejemplo, puede determinarse si la leche se ha sometido a un tratamiento térmico para destruir cualquier célula microbiana antes de ser entregada a la fábrica. Cuando se usa el procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica, dicha leche se clasificará como "no contaminada", mientras que con el procedimiento de acuerdo con la presente invención la leche se clasificará como "ha estado contaminada". El presente procedimiento, de este modo, puede usarse para demostrar que una muestra determinada tiene algo "malo" (basándose en el hecho de que el valor de luminiscencia del blanco será más alto que un valor estándar), a pesar de que el producto ya no contendrá ninguna célula microbiana intacta. Una muestra no contaminada ya puede contener una determinada cantidad de ATP libre resultante de la preparación del producto; esta cantidad ha de tomarse entonces como el "valor estándar" y solo un aumento con respecto al valor estándar indicará entonces contaminación.

Otra ventaja de la presente invención es que el uso de apirasa se ha eliminado (casi) completamente, y las objeciones asociadas, tales como los resultados falsamente negativos y los largos tiempos de espera, se han disminuido. El uso del procedimiento de la presente invención reduce el tiempo de análisis a aproximadamente menos de un minuto en comparación con un tiempo de análisis de 15 a 40 minutos en el caso de los ensayos de luminiscencia convencionales del tipo descrito anteriormente. En casos especiales, sin embargo, todavía puede preferirse usar pequeñas cantidades de apirasa, por ejemplo, si se espera que habrá presente una gran cantidad de ATP somático y libre. Una cantidad tan grande de ATP produciría tanta luminiscencia que la relación señal-ruido del ATP microbiano que se ha de medir se vería perturbada. En un caso de este tipo puede usarse apirasa, pero el efecto de la apirasa puede determinarse y evaluarse de forma sencilla a través de la medición más o menos continua de la luminiscencia en todo el tiempo de análisis, de manera que no se obtendrán resultados falsamente negativos.

La presente invención puede usarse para medir el ATP en una multitud de productos. Las posibles aplicaciones se encuentran en la industria alimentaria (leche y otros productos lácteos, vino, sopa, zumos y productos de verduras y frutas y similares), la industria cosmética (detergentes, loción corporal, barra de labios, productos de protección solar, productos para el cuidado del cabello y similares), la industria agrícola (frescura de flores cortadas mediante el ensayo de la savia de tallos, frutas y verduras y similares) y la industria clínica (muestras de sangre, muestras de orina y otras muestras y similares) y la industria farmacéutica (medicamentos y similares).

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza preferentemente de manera que la luminiscencia se mida durante un período de al menos 10 segundos. Preferentemente, la luminiscencia se mide durante un período de al menos 20 segundos, en particular durante un período de al menos 60 segundos.

Mediante la medición de luminiscencia con una regularidad determinada o de forma continua durante un período de tiempo determinado se obtiene información de factores tales como la velocidad a la que el ATP se libera de las células somáticas en comparación con las células microbianas y entre diferentes tipos de células somáticas y microbianas.

La luminiscencia se mide preferentemente de forma más o menos continua para obtener la luminiscencia en función del tiempo, por ejemplo, representada mediante una curva de la luminiscencia en función del tiempo. De la forma de esta curva puede obtenerse información acerca de, por ejemplo, la velocidad a la que el ATP se libera de las diversas células somáticas y/o microbianas, lo que proporciona información sobre el tipo de células. Esta medición continua también es importante cuando se usa apirasa, en cuyo caso se observa una disminución de la luminiscencia a través del tiempo. También es posible medir la luminiscencia durante un período de tiempo determinado con un intervalo determinado entre las mediciones individuales. Véanse también los ejemplos en los que esto se explica.

En una realización preferida las células microbianas presentes se identifican basándose en la luminiscencia en función del tiempo a través de la comparación con valores de referencia en función del tiempo. Estos valores de referencia son, por ejemplo, curvas estándar de diferentes tipos de bacterias y levaduras. A partir de una comparación de este tipo puede deducirse, por ejemplo, si está presente una bacteria o levadura en particular o ambas, e incluso qué tipo de bacteria está presente. Esto hace que el presente procedimiento sea adecuado para identificar con precisión diferentes tipos de células microbianas, es decir, por ejemplo, levaduras y bacterias, por ejemplo, *Candida albicans* (levadura), *Clostridium sporogenes* (bacteria grampositiva), *Geobacillus stearothermophilus* (bacteria grampositiva), *Bacillus cereus* (bacteria grampositiva), *Bacillus subtilis* (bacteria grampositiva) y *Escherichia coli* (bacteria gramnegativa).

La ventaja de un procedimiento de identificación de este tipo es que la presencia de células microbianas nocivas puede distinguirse de la presencia de células microbianas favorables o incluso necesarias. Un ejemplo de esto es la distinción entre una bacteria no deseada causante de deterioro y la levadura que es necesaria para la fermentación, que pueden estar la dos presentes en las uvas prensadas durante el procedimiento de vinificación. El procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica solo puede revelar la presencia de células microbianas, pero no puede

distinguir entre la bacteria y la levadura. La presente invención, por tanto, proporciona una solución posibilitando hacer dicha distinción. En determinados procedimientos de fabricación de vino, el vino se embotella además muy pronto después del prensado. En dichos casos, no solo es necesario que esté presente la levadura correcta, sino que además la levadura debe retirarse en un grado adecuado antes del procedimiento de embotellado para prevenir la fermentación posterior en la botella, ya que eso conduciría a la formación de gases en la botella y, por tanto, a la explosión de la botella, lo que podría ser desventajoso o incluso peligroso. La presente invención, por tanto, también puede usarse durante los procedimientos de fabricación de vino para demostrar la presencia de diferentes bacterias y hongos en diferentes etapas.

Con la presente invención, es posible trabajar con un número de valores de luminiscencia estándar que pueden determinarse para diferentes tipos de productos, por ejemplo, valores estándar de muestras no contaminadas, por ejemplo, mediante la medición de muestras esterilizadas, pero también valores estándar de muestras que contienen, por ejemplo, células somáticas. Estos valores estándar pueden determinarse antes del procedimiento de acuerdo con la presente invención o pueden proporcionarse junto con el presente programa de ordenador. Por ejemplo, se prefiere determinar tres valores estándar para una muestra no contaminada (valor de blanco o valor negativo), en particular un primer valor estándar que es un valor promedio calculado a partir del valor medido de un producto comparable pero esterilizado en el lapso de tiempo de 0-5 segundos, un segundo valor estándar en el lapso de tiempo de 5-10 segundos y un tercer valor estándar en el lapso de tiempo de 15-20 segundos. Sin embargo, será evidente que estos lapsos de tiempo y el número de valores estándar pueden ser determinados por un experto en la materia dependiendo del producto a analizar y la contaminación esperada.

En una realización preferida del presente procedimiento, se añade un agente de extracción somático a la misma muestra después de la adición del reactivo de luminiscencia con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP, en el que se mide la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra. En esta realización, por tanto, se prefiere añadir una cantidad en exceso de reactivo de luminiscencia en relación con el ATP libre presente, de manera que permanezca suficiente reactivo de luminiscencia sin formar complejo para la formación del complejo de ATP somático liberado.

El complejo de ATP formado en el presente documento es, por tanto, un complejo entre el reactivo de luminiscencia que ya estaba presente en la muestra con el ATP liberado de células somáticas. De esta manera la cantidad de ATP somático en la muestra puede determinarse de este modo por medio de luminiscencia. Este complejo de ATP, por tanto, se añade al complejo de ATP previamente formado entre el reactivo de luminiscencia y ATP libre, como se ha descrito anteriormente.

Solo se necesita realizar una realización preferida de este tipo del presente procedimiento si las células somáticas están (pueden estar) presentes en el producto, lo que puede esperarse, por ejemplo, en bebidas que contengan zumos de frutas, pero en menor grado en productos cosméticos.

Con esta realización la cantidad de ATP libre en una muestra se mide en primer lugar después de la adición de reactivo de luminiscencia, después de lo cual un agente de extracción somático se añade posteriormente a la misma muestra, preferentemente durante la medición de luminiscencia, por medio de, por ejemplo, una bomba de inyección conectada al luminómetro empleado. El agente de extracción somático dañará y/o romperá la pared celular y/o membrana de las células somáticas, provocando que el ATP somático se libere de las células somáticas, como resultado de lo cual la cantidad de ATP somático liberado formará complejo y posteriormente se medirá a través de luminiscencia.

En otra realización preferida más del presente procedimiento se añade un agente de extracción microbiano a la muestra tratada de este modo con de agente de extracción somático con el fin de liberar ATP microbiano. Este ATP microbiano liberado formará complejo con el reactivo de luminiscencia, en el que se mide la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra.

En esta realización el ATP se libera en primer lugar de cualquier célula somática y se mide, en la que el ATP se libera de cualquier célula microbiana que esté presente y se mide.

En otra realización preferida del presente procedimiento se añade un agente de extracción microbiano a la muestra después de la adición del reactivo de luminiscencia con fines de liberación del ATP microbiano. El ATP microbiano liberado formará un complejo de ATP con el reactivo de luminiscencia, en el que se mide la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra.

Después de que la cantidad de ATP libre en el producto se ha determinado como se ha descrito anteriormente, puede usarse inmediatamente un agente de extracción microbiano con el fin de dañar y/o romper las células microbianas en la muestra. Esto provoca la liberación del ATP microbiano, que puede medirse posteriormente en forma de un complejo de ATP mediante el uso de luminiscencia. De esta manera puede determinarse la presencia de cualquier ATP microbiano.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento en el que la luminiscencia en función del tiempo, medida en la muestra, se compara con uno o más valores de referencia para la luminiscencia en función del tiempo para al menos una célula seleccionada entre células somáticas y células microbianas, en el que se determina si la

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

5 También se desvela un programa de ordenador para realizar un procedimiento para detectar ATP en una muestra, en el que se añade un reactivo de luminiscencia a la muestra que no se ha sometido a ningún tratamiento previo con un agente de extracción con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra mediante el uso de un luminómetro con el fin de obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP libre, cuyo valor del ATP libre se compara con un valor estándar, en el que se determina que el ATP está presente en una concentración más alta si el valor medido del ATP libre es mayor que el valor estándar. Se entiende que "en una concentración más alta" es una cantidad de ATP que es mayor que la ya presente en una muestra denominada blanco no contaminada. Cuando el ATP está presente de este modo en una concentración más alta, esto implica la presencia de células somáticas y/o células microbianas.

15 El valor estándar es el valor de luminiscencia de una muestra blanco, no contaminada. Este valor estándar puede determinarse como ya se ha indicado anteriormente. Si se obtiene un valor medido del ATP libre que es más o menos el mismo que el valor estándar, la muestra no contiene una concentración mayor de ATP libre. En un caso de este tipo, la muestra se evaluará como "no contaminada con ATP libre". Si se obtiene un valor medido del ATP libre que es mayor que el valor estándar, la muestra se evaluará como "posiblemente (ha estado) contaminada".

20 En el programa de ordenador que se desvela puede añadirse un agente de extracción somático a la muestra después de la adición del reactivo de luminiscencia con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra con la ayuda de un luminómetro con el fin de obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP somático, valor medido del ATP somático que se compara con el valor medido obtenido para el ATP libre como se ha descrito anteriormente, en el que se determina que el ATP somático está presente si el valor medido del ATP somático es más alto que el valor medido del ATP libre.

25 Si se obtiene un valor medido del ATP somático que es más o menos el mismo que el valor del ATP libre, la muestra no contiene ATP somático. En un caso de este tipo, la muestra se evaluará como "no contaminada con células somáticas". Si se obtiene un valor medido del ATP somático que es mayor que el valor medido del ATP libre, la muestra se evaluará como "contaminada con células somáticas". Esto no tiene por qué ser un problema, ya que las células somáticas son esenciales en algunos casos, por ejemplo, en zumos de frutas.

30 En el programa de ordenador que se desvela puede añadirse un agente de extracción microbiano a la muestra después de la adición del agente de extracción somático, con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra con la ayuda de un luminómetro con el fin de obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP microbiano, valor medido del ATP microbiano que se compara con el valor medido del ATP somático, en el que se determina que el ATP microbiano está presente si el valor medido del ATP microbiano es más alto que el valor medido del ATP somático.

35 En el programa de ordenador que se desvela puede añadirse un agente de extracción microbiano a la muestra después de la adición del reactivo de luminiscencia con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP, midiéndose la luminiscencia del complejo de ATP formado de este modo en la muestra con la ayuda de un luminómetro con el fin de obtener un valor medido para la luminiscencia del ATP microbiano, valor medido del ATP microbiano que se compara con el valor medido del ATP libre como se ha descrito anteriormente, en el que se determina que el ATP microbiano está presente si el valor medido del ATP microbiano es mayor que el valor medido del ATP libre.

45 Si se obtiene un valor medido del ATP microbiano que es más o menos el mismo que el valor medido del ATP libre y/o el ATP somático, dependiendo del procedimiento empleado, ningún ATP microbiano está presente en la muestra. En un caso de este tipo, la muestra se evaluará como "no contaminada con células microbianas". Si se obtiene un valor medido del ATP microbiano que es mayor que el valor medido ya sea del ATP libre o del ATP somático, dependiendo del procedimiento empleado, la muestra se evaluará como "contaminada con células microbianas". Esto no tiene por qué ser un problema, ya que las células microbianas son esenciales en algunos casos, por ejemplo, levaduras en el vino. En un caso de este tipo puede determinarse qué tipos y especies de células microbianas están presentes mediante el uso de una serie de curvas estándar para mediciones de luminiscencia de diferentes tipos de bacterias y levaduras, como se explica a continuación.

50 En el programa de ordenador que se desvela la luminiscencia puede medirse de forma más o menos continua durante un período de al menos 10 segundos, preferentemente al menos 20 y en particular al menos 60 segundos, con el fin de obtener la luminiscencia en función del tiempo, datos de medición que se comparan con valores de referencia en función del tiempo, por ejemplo, una o más curvas estándar para diferentes tipos de células microbianas y opcionalmente somáticas (tales como ciertos tipos de bacterias, levaduras y similares), en el que se determina qué tipos de células microbianas y opcionalmente somáticas están contenidos en la muestra.

Ejemplos

La presente solicitud se aclarará adicionalmente a continuación con referencia a un número de ejemplos no

limitantes. Estos ejemplos tienen por objeto aclarar la presente invención. En cada ejemplo 1-11 se usa como muestra una leche que se ha inoculado con ciertos tipos de células microbianas, tales como bacterias, levaduras o mezclas de las mismas. La leche contaminada después se somete al procedimiento de acuerdo con la presente invención. Los resultados de las mediciones de luminiscencia se muestran en las figuras. Mediante el uso del procedimiento de acuerdo con la presente invención se muestra en qué medida la leche está contaminada. De este modo, puede analizarse una muestra de leche que contiene contaminantes desconocidos para determinar la posible presencia de contaminación microbiana. Se someten a ensayo muestras adicionales en los Ejemplos 12-13.

Materiales empleados

En el ensayo de los Ejemplos 1-11 se usa leche entera como sustrato, en concreto leche UHT con un contenido de grasa del 3,5 %. En el ensayo del Ejemplo 12 se somete a ensayo una muestra cosmética, a saber, una loción de manos. En el ensayo del Ejemplo 13 se somete a ensayo una muestra farmacéutica, a saber, una solución de ácido acetilsalicílico (aspirina) en agua. Se usa un denominado reactivo luciérnaga-luciferina-luciferasa con una emisión de luz estable (apta para luminiscencia de ATP) como el reactivo de luminiscencia. El reactivo está contenido en un tampón tris-EDTA con un pH de 7,75. Se usa apirasa obtenida de patata contenida en un tampón tris-EDTA con un pH de 7,75 como reactivo de apirasa. Se usa una mezcla de compuestos de amonio cuaternario y tensioactivos en agua como agente de extracción microbiano. Se usa una mezcla de detergentes en agua como agente de extracción somático.

Se usa un luminómetro controlado por ordenador con un fotomultiplicador de bajo ruido para el recuento de fotones individuales como luminómetro (PromiLite III de Promicol). Bombas inyectoras controlan el suministro de reactivos a la muestra. La muestra se introduce en una placa de microtitulación de 96 pocillos, introduciéndose cada muestra en un pocillo separado.

En cada uno de los Ejemplos 1-11 una muestra blanco, denominada "NEG" o negativo en los diagramas, se usa en cada ensayo. Esto significa que esta muestra no contiene ATP microbiano, puesto que es una leche estéril no inoculada y, por tanto, está libre de contaminación microbiana. Este blanco se obtiene mediante incubación de un cartón de leche sin abrir (cartón de papel de 1 litro) a 32 °C durante 24 horas. Además del blanco, se usan 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-LEVADURA" y "POS-MEZCLA", respectivamente. Los diagramas muestran la unidad de luminiscencia relativa en función del tiempo en segundos. Las medidas se realizan en los ejemplos durante 20 o 60 segundos. Las mediciones de los Ejemplos 12-13 no se muestran en los diagramas.

Ejemplo 1

Preparación de "POS-BAC": se preparó un cultivo de la bacteria *Bacillus subtilis* en un medio de resucitación y se incubó a 32 °C durante 24 horas. A continuación, se añadieron 50 µl del cultivo a 20 µl de leche y se incubaron a 32 °C durante 24 horas. Una muestra de este tipo ha de considerarse una muestra que no ha sido tratada previamente con un agente de extracción.

Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-BAC" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la siguiente secuencia de procedimiento:

- Conexión de soporte con reactivo de luminiscencia a bomba inyectora 1
- Conexión de soporte con agente de extracción microbiano a bomba inyectora 2
- Inyección de 50 µl de reactivo de luminiscencia
- Retardo de 2,05 segundos
- Inicio de la medición en el tiempo $t = 0$ con un intervalo de medición de 0,4 segundos
- Inyección de 50 µl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el tiempo $t = 5$ segundos
- Fin de la medición en el tiempo $t = 20$ segundos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias ("POS-BAC").

Puede deducirse de la figura 1 que en el intervalo de tiempo desde $t = 0$ hasta $t = 5$ el valor de "POS-BAC" es un poco más alto 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, por tanto, servir como una especie de advertencia de la posible contaminación de la leche. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y provocará la liberación del ATP microbiano presente se añade en el tiempo $t = 5$. Puede deducirse del diagrama que algunas de las células microbianas ya han liberado su ATP después de 1 segundo (tiempo $t = 6$). Este proceso de liberación del ATP microbiano dura aproximadamente hasta el tiempo $t = 10$. Después de esto la luminiscencia permanece constante, lo que demuestra que todo el ATP microbiano se ha liberado.

Puede deducirse claramente de la figura 1 que el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede usarse para determinar la presencia de contaminación bacteriana en la leche.

Ejemplo 2

5 Preparación de "POS-LEVADURA": se preparó un cultivo de una cepa de levadura silvestre que aparece con frecuencia como contaminación natural de zumos de frutas en un medio de resucitación y se incubó a 26 °C durante 24 horas. A continuación, se añadieron 50 µl del cultivo a 20 ml de leche y esto se incubó de nuevo a 26 °C durante 24 horas. Una muestra de este tipo ha de considerarse una muestra que no ha sido tratada previamente con un agente de extracción. Este ejemplo difiere del ejemplo 1 en que se usó levadura en lugar de bacterias.

10 Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-LEVADURA" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el ejemplo 1.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura ("POS-LEVADURA").

15 Puede deducirse de la figura 2 que el valor de "POS-LEVADURA" en el intervalo de tiempo desde $t = 0$ hasta $t = 5$ es un poco más alto 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 que puede, por tanto, servir como una especie de advertencia de la posible contaminación de la leche. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y hará que se libere el ATP microbiano presente se añade en el tiempo $t = 5$. Puede deducirse del diagrama que se produce una disminución en la luminiscencia inmediatamente después de la adición del agente de extracción microbiano. Esta disminución es atribuible a dos factores, siendo el primero un efecto de dilución después de la adición del agente de extracción microbiano y siendo el segundo un efecto denominado de inactivación. También es visible que algunas de las células microbianas han liberado su ATP solo después de aproximadamente 5 segundos (tiempo $t = 10$), lo que es más lento que en el caso de las bacterias (véase el ejemplo 1). Este proceso de liberación del ATP microbiano dura hasta el final del análisis ($t = 20$).

Se puede deducirse claramente de la figura 2 que el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede usarse para determinar la presencia de contaminación por levadura en la leche.

Ejemplo 3

30 Preparación de "POS-MEZCLA": se preparó una mezcla de leche "POS-BAC", preparada de acuerdo con el ejemplo 1 y leche "POS-LEVADURA" de acuerdo con el ejemplo 2 de manera que las cantidades estimadas de ATP micr. de ambos tipos de contaminantes microbianos estuvieran en el mismo orden de magnitud (bacterias:levaduras = 1:30). Una muestra de este tipo ha de considerarse una muestra que no ha sido tratada previamente con un agente de extracción. El Ejemplo 3 se diferencia de los ejemplos 1 y 2 en que se usó una combinación de bacterias y levaduras.

35 Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-MEZCLA" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el Ejemplo 1.

40 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias y levaduras ("POS-MEZCLA").

Puede deducirse de la figura 3 que el valor de "POS-MEZCLA" en el intervalo de tiempo desde $t = 0$ hasta $t = 5$ es ligeramente más alto que el valor de "NEG", lo que significa que la leche contaminada con bacterias y levaduras contiene una cierta cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células microbianas que ya han muerto, lo que puede, por tanto, servir como una especie de advertencia de la posible contaminación de la leche. El agente de extracción microbiano que va a romper las células microbianas presentes y hará que se libere el ATP microbiano presente se añade en el tiempo $t = 5$. Puede deducirse del diagrama que se produce una disminución en la luminiscencia inmediatamente después de la adición del agente de extracción microbiano, como se describe en el ejemplo 2. Algunas de las células microbianas ya han liberado su ATP después de aproximadamente 1 segundo (tiempo $t = 6$). Este proceso de liberación del ATP microbiano dura hasta el tiempo $t = 10$.

50 Puede deducirse claramente de la figura 3 que el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede usarse para determinar la presencia de contaminación tanto por bacterias como por levadura en la leche.

55 En las figuras 4A y 4B los diagramas de los ejemplos 1, 2 y 3 se muestran juntos en un diagrama para ilustrar las diferencias. La Figura 4B es una ampliación de la figura 4A. Esto demuestra 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 caracterizado por un rápido aumento de la luminiscencia después de la adición de

agente de extracción microbiano, el rápido establecimiento de un valor de luminiscencia constante y también un valor de luminiscencia más alto, mientras que la leche contaminada con levadura muestra un perfil con un lento aumento de la luminiscencia después de la adición de agente de extracción microbiano, sin el establecimiento de un valor de luminiscencia constante en el lapso de tiempo de 20 segundos y también con un valor de luminiscencia menor.

Esta comparación muestra claramente que el presente procedimiento no solo es adecuado para demostrar la presencia de contaminación microbiana, sino también para determinar qué tipo (de levaduras o de bacterias o una combinación) está presente.

Ejemplo 4

Preparación de "POS-BAC": se preparó un cultivo de la bacteria *Bacillus cereus* (ATCC 11778) en un medio de resucitación y se incubó a 32 °C durante 24 horas. A continuación, se añadieron 50 µl del cultivo a 20 ml de leche y de nuevo se incubaron a 32 °C durante 24 horas. Una muestra de este tipo ha de considerarse una muestra que no ha sido tratada previamente con un agente de extracción. La diferencia con respecto al ejemplo 1 es que se usó un tipo diferente de bacteria.

Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-BAC" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la siguiente secuencia de procedimiento:

- Conexión de soporte con reactivo de luminiscencia a bomba inyectora 1
- Conexión de soporte con agente de extracción microbiano a bomba inyectora 2
- Inyección de 50 µl de reactivo de luminiscencia
- Retardo de 2,05 segundos
- Inicio de la medición en el tiempo $t = 0$ con un intervalo de medición de 1,2 segundos
- Inyección de 50 µl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el tiempo $t = 5$ segundos
- Fin de la medición en el tiempo $t = 60$ segundos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias ("POS-BAC").

Ejemplo 5

Preparación de "POS-BAC (tratada con apirasa)": se preparó una leche "POS-BAC" como se describe en el ejemplo 4.

Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-BAC (tratada con apirasa)" en una placa de microtitulación. Se añadieron cantidades de 50 µl de apirasa a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos. Las muestras se sometieron posteriormente a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el ejemplo 4.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias ("POS-BAC (tratada con apirasa)").

Puede deducirse de la curva de "POS-BAC" (ejemplo 4) en la figura 5 que, después de un rápido aumento de la luminiscencia en el intervalo de tiempo de $t = 6$ a $t = 10$, la luminiscencia permanece constante durante algún tiempo (hasta $t = 20$), después del cual se observa una disminución de la luminiscencia. No se sabe a qué es atribuible esta disminución, pero los presentes inventores son de la opinión de que puede tener lugar algo de descomposición del complejo formado entre el ATP microbiano y el reactivo de luminiscencia.

Puede deducirse de la curva de "POS-BAC (tratada con apirasa)" (ejemplo 5) en la figura 5 que, después de un rápido aumento comparable en la luminiscencia en el intervalo de tiempo desde $t = 6$ hasta $t = 10$, el valor de luminiscencia es inferior al de "POS-BAC". Esto significa que el tratamiento con apirasa de acuerdo con el ejemplo 5 conduce a un valor inferior, que es provocado por la descomposición del ATP microbiano liberado por la apirasa presente. La luminiscencia además no alcanza un valor constante, sino que disminuye a través del tiempo más rápidamente que "POS-BAC" de acuerdo con el ejemplo 4, que no ha experimentado ningún tratamiento con apirasa. Esto, por tanto, demuestra que las desventajas de la apirasa pueden resolverse al menos en parte mediante la presente invención. En el presente ejemplo el tratamiento con apirasa conduce a una luminiscencia más bajo, pero quedará claro que en un caso en el que solo una pequeña cantidad de células microbianas está presente el tratamiento con apirasa incluso podría conducir a un resultado "falsamente" negativo.

Puede deducirse claramente de la figura 5, por tanto, que el procedimiento de acuerdo con la presente invención resuelve los problemas implicados en el tratamiento con apirasa de acuerdo con el estado de la técnica al menos en parte.

Ejemplo 6

Preparación de "POS-LEVADURA": se preparó una leche "POS-LEVADURA" como se indica en el ejemplo 2.

5 Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-LEVADURA" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el ejemplo 4.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura ("POS-LEVADURA").

Ejemplo 7

10 Preparación de "POS-LEVADURA (tratada con apirasa)": se preparó una leche "POS-LEVADURA" que se describe en el ejemplo 4.

15 Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-LEVADURA (tratada con apirasa)" en una placa de microtitulación. Se añadieron cantidades de 50 µl de apirasa a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos. Las muestras se sometieron posteriormente a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el ejemplo 4.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura ("POS-LEVADURA (tratada con apirasa)").

20 Puede deducirse de la curva de "POS-LEVADURA" (ejemplo 6) en la figura 6 que se observa un lento aumento en la luminiscencia, que dura hasta el final de la medición en $t = 60$.

Puede deducirse de la curva de "POS-LEVADURA (tratada con apirasa)" (ejemplo 7) en la figura 6 que existen diferencias de menor importancia con respecto a la curva de "POS-LEVADURA" de acuerdo con el ejemplo 6. El valor de luminiscencia final es ligeramente menor en el caso del tratamiento con apirasa y la forma de la curva es ligeramente diferente.

Ejemplo 8

Preparación de "POS-MEZCLA": se prepara una mezcla de leche "POS-BAC" preparada de acuerdo con el ejemplo 4 y leche "POS-LEVADURA" de acuerdo con el ejemplo 6 de manera que la cantidad estimada de ATP microbiano de ambos tipos de contaminantes microbianos esté en el mismo orden de magnitud (bacterias:levaduras = 1:10).

30 Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-MEZCLA" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el ejemplo 4.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias y levaduras ("POSMEZCLA").

Ejemplo 9

Preparación de "POS-MEZCLA (tratada con apirasa)": se preparó una leche "POS-MEZCLA" como se describe en el Ejemplo 6.

40 Medición: se pipetearon 50 µl de leche "NEG" y 50 µl de leche "POS-MEZCLA (tratada con apirasa)" en una placa de microtitulación. Se añadieron cantidades de 50 µl de apirasa a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos. Las muestras se sometieron posteriormente a medición de luminiscencia de acuerdo con la misma secuencia de procedimiento que se describe en el ejemplo 4.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con bacterias y levaduras ("POS-MEZCLA (tratada con apirasa)").

45 Puede deducirse de la curva de "POS-MEZCLA" (ejemplo 8) en la figura 7 que, después de un rápido aumento de la luminiscencia en el intervalo de tiempo desde $t = 6$ hasta $t = 10$, la luminiscencia permanece constante durante algún tiempo (hasta $t = 30$), después del cual se observa un aumento adicional de la luminiscencia hasta $t = 60$. Este aumento adicional es atribuible a la rotura de las células de levadura presentes y la liberación del ATP microbiano desde las mismas.

50 Se puede deducir de la curva de "POS-MEZCLA (tratada con apirasa)" (ejemplo 9) en la figura 7 que, después de un

rápido aumento comparable en la luminiscencia en el intervalo de tiempo desde $t = 6$ hasta $t = 10$, el valor de la luminiscencia es inferior al de "POS-MEZCLA". Además, se observa una disminución de la luminiscencia, seguida de un ligero aumento, temporal. Esta disminución es atribuible a la descomposición de algo de ATP presente por la apirasa y el aumento es atribuible a la rotura de células de levadura como se ha descrito anteriormente. Este aumento y disminución se equilibran entre sí, dando como resultado por consiguiente un resultado falsamente negativo para la presencia de levaduras en esta muestra, que no se obtiene con el procedimiento de acuerdo con el ejemplo 8.

La anterior muestra que el tratamiento con apirasa de acuerdo con el ejemplo 9 da como resultado un valor inferior, provocado por la descomposición de ATP microbiano liberado por la apirasa presente. Esto, por tanto, demuestra que las desventajas de la apirasa pueden resolverse al menos en parte mediante la presente invención.

Las figuras 8A y 8B muestran los diagramas de los ejemplos 4-9 juntos en un solo diagrama para ilustrar 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 con bacterias y con levadura, comparable con lo que se ha analizado anteriormente en relación con las figuras 4A y 4B. Esta comparación demuestra claramente que el presente procedimiento es adecuado no solo para demostrar la presencia de contaminación microbiana, sino también para determinar qué tipo (de levaduras o de bacterias o una combinación) está presente.

Ejemplo 10

Preparación de "POS-LEVADURA": se prepara un cultivo como se describe en el ejemplo 2. A continuación, se añadieron 50 μl del cultivo a 20 ml de leche con aroma a vainilla-limón y se incubaron de nuevo a 26 °C durante 24 horas. La diferencia con respecto a los ejemplos anteriores es que esta muestra contiene células somáticas.

Medición: se pipetearon 50 μl de leche "NEG" y 50 μl de leche "POS-LEVADURA" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la siguiente secuencia de procedimiento:

- Conexión de soporte con reactivo de luminiscencia a bomba inyectora 1
- Conexión de soporte con agente de extracción microbiano a bomba inyectora 2
- Conexión de soporte con agente de extracción somático a bomba inyectora 3
- Inyección de 50 μl de reactivo de luminiscencia
- Retardo de 2,05 segundos
- Inicio de la medición en el tiempo $t = 0$ con un intervalo de medición de 0,56 segundos
- Inyección de 50 μl de agente de extracción somático en todos los pocillos en el tiempo $t = 3$ segundos
- Inyección de 50 μl de agente de extracción microbiano en todos los pocillos en el tiempo $t = 8$ segundos
- Fin de la medición en el tiempo $t = 28$ segundos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, en la que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de la leche contaminada con levadura ("POS-LEVADURA").

Puede deducirse de la figura 9 que en el intervalo de tiempo desde $t = 0$ hasta $t = 5$ el valor de "POS-LEVADURA" es ligeramente mayor 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 que puede, por tanto, servir como una advertencia de la posible contaminación de la leche. También puede observarse que la leche "NEG" también contiene una cierta cantidad de ATP, lo que indica la presencia de ATP libre, probablemente ATP somático de células vegetales (aromatizante de vainilla-limón). El agente de extracción somático que romperá las células somáticas presentes y provocará que el ATP presente se libere se añade en el tiempo $t = 3$. Puede deducirse del diagrama que tiene lugar un aumento de la luminiscencia inmediatamente después de la adición del agente de extracción somático, tanto en la leche "NEG" como en la leche "POS-LEVADURA", lo que implica que ambas muestras contienen células somáticas, que derivan del aromatizante de vainilla-limón. El agente de extracción microbiano que romperá las células microbianas presentes y provocará que el ATP presente se libere, se añade en el tiempo $t = 8$. Puede deducirse del diagrama que se produce una disminución en la luminiscencia inmediatamente después de la adición del 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-LEVADURA", pero no en el caso de la leche "NEG", lo que demuestra que la leche "POS-LEVADURA" contiene contaminación microbiana y la leche "NEG" no contiene contaminación microbiana. Este proceso de liberación de ATP microbiano en la leche "POS-LEVADURA" dura hasta el final del análisis ($t = 28$).

Puede deducirse claramente de la figura 9 que el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede usarse para determinar la presencia de contaminación tanto somática como microbiana en la leche en un único procedimiento de medición, que hasta ahora se ha encontrado que es imposible con el procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica.

Ejemplo 11

Como ya se ha indicado anteriormente, el presente procedimiento es muy adecuado para la identificación de diferentes tipos de levaduras y bacterias. En este ejemplo una levadura y tres bacterias grampositivas se compararon entre sí con el fin de evaluar si pueden distinguirse entre sí basándose en el presente procedimiento.

5 Las células microbianas empleadas son *Candida albicans* (levadura; ATCC 10231), *Geobacillus stearothermophilus* (bacteria grampositiva; ATCC 7953), *Clostridium sporogenes* (bacteria grampositiva; ATCC 19404), *Bacillus cereus* (bacteria grampositiva; ATCC 11778).

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

10 Preparación de "*G. stearothermophilus*": se introdujo una colonia de la bacteria *Bacillus stearothermophilus* en una placa de agar-agar soja tríptica en 9 ml de medio de resucitación y se incubó a 55 °C durante 24 horas.

Preparación de "*C. sporogenes*": se introdujo una colonia de la bacteria *Clostridium sporogenes* en una placa de agar-agar sangre en 9 ml de medio de tioglicolato líquido y se incubó a 35 °C durante 24 horas.

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

15 Preparación de "NEG": el medio de resucitación se incubó a 35 °C durante 24 horas.

Medición: se pipetearon 50 µl de "NEG" y 50 µl cada uno de "*C. albicans*", "*G. stearothermophilus*", "*C. sporogenes*" y "*B. cereus*" en una placa de microtitulación y se sometieron a medición de luminiscencia de acuerdo con la secuencia de procedimiento descrita en el ejemplo 4. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10A y 10B, en las que el diagrama que presenta los resultados de la medición del blanco ("NEG") se compara con los resultados de la medición de las muestras contaminadas con diferentes células microbianas. La Figura 10B es una ampliación de la figura 10A.

25 Puede deducirse de la figura 10B que en el intervalo de tiempo desde $t = 0$ hasta $t = 5$ los valores de "*B. cereus*" y "*Cl. Sporogenes*" son ligeramente más altos que el valor de "NEG", lo que significa que las muestras contaminadas con bacterias contienen una cierta cantidad de ATP libre, lo que implica la presencia de células bacterianas que ya han muerto, lo que puede, por tanto, servir como una especie de advertencia de la posible contaminación de la muestra. El agente de extracción microbiano que romperá las células microbianas presentes y hará que el ATP presente se libere, se añade en el tiempo $t = 5$. Puede deducirse de las Figuras 10A y 10B que algunas de las células microbianas ya han liberado su ATP después de 1 segundo (tiempo $t = 6$). También puede observarse claramente que las tasas de liberación de las diferentes células microbianas, como se indica por la inclinación de la curva, difieren. La figura 10B muestra claramente que la levadura "*C. albicans*" tiene una inclinación menor que todas las bacterias sometidas a ensayo, que también ya se ha demostrado anteriormente, en los ejemplos 1 y 2. También puede observarse que la inclinación de la curva de "*B. cereus*" es mayor que la de la curva de "*G. stearophilus*", cuya inclinación es, a su vez, mayor que la de la curva de "*Cl. sporogenes*". El proceso de la liberación de ATP microbiano dura hasta aproximadamente tiempo $t = 9$ en el caso de "*G. stearophilus*", $t = 10$ en el caso de "*B. cereus*", $t = 17$ en el caso de "*Cl. Sporogenes*" y $t = 43$ en el caso de "*C. albicans*". Las formas de las curvas de las diferentes células microbianas además difieren.

40 El tipo de células microbianas en cuestión, por tanto, puede deducirse de la inclinación, la duración del proceso de liberación y la forma de la curva. Si hubiera de medirse una muestra con una contaminación desconocida, puede determinarse qué células microbianas contiene basándose en las curvas mostradas en las figuras 10A y 10B. Con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, es posible realizar una medición rápida y precisa de diferentes tipos de células microbianas y distinguirlas en, por ejemplo, bacterias, levaduras y hongos, y también distinguirlas entre diferentes tipos de bacterias y levaduras, por ejemplo, entre bacterias grampositivas y gramnegativas, pero también entre diferentes bacterias grampositivas. Con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, es además posible distinguir la cantidad de ATP somático y la cantidad de ATP microbiano, además de la cantidad de agente de extracción libre en los productos en una sola muestra.

Ejemplo 12

50 Se suspendió una loción de manos en agua y se hizo una medición como se describe en el Ejemplo 1, mientras que también se preparó una muestra de "POS-BAC" mediante la adición de 50 µl del cultivo de Ejemplo 1 con 20 ml de la suspensión. Posteriormente, se midieron una muestra de "NEG" y la muestra de "POS-BAC", y a partir de los resultados (no mostrados) parece que la contaminación con bacterias puede demostrarse claramente.

Ejemplo 13

55 Se repitió el Ejemplo 12, sustituyéndose la suspensión por una solución al 5 % en peso de ácido acetilsalicílico en agua. A partir de los resultados (no mostrados) parece que la contaminación con bacterias puede demostrarse claramente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de ATP en una muestra por medio de luminiscencia, que comprende las etapas de:

- 5 1) añadir un reactivo de luminiscencia a una muestra que no se ha sometido a ningún tratamiento previo con un agente de extracción con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP y medir la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 10 2) añadir un agente de extracción somático a la muestra obtenida en la etapa 1) con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP y medir la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 15 3) añadir un agente de extracción microbiano a la muestra obtenida en la etapa 2) con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP y medir la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 4) comparar la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa 3) con un valor estándar para la luminiscencia en función del tiempo para una muestra blanco, no contaminada, para determinar si hay presentes células microbianas,

en el que dicho procedimiento es para proporcionar información sobre los tipos de células mediante la obtención de información sobre la velocidad a la que el ATP se libera de las células somáticas y/o microbianas.

2. Un procedimiento de detección de ATP en una muestra por medio de luminiscencia, que comprende las etapas de:

- 20 A) añadir un reactivo de luminiscencia a una muestra que no se ha sometido a ningún tratamiento previo con un agente de extracción con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP y medir la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- 25 B) añadir un agente de extracción microbiano a la muestra obtenida en la etapa A) con el fin de efectuar la formación de un complejo de ATP y medir la luminiscencia en función del tiempo para el complejo de ATP formado de este modo;
- C) comparar la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa B) con un valor estándar para la luminiscencia en función del tiempo para una muestra blanco, no contaminada, para determinar si hay presentes células microbianas;

30 en el que dicho procedimiento es para proporcionar información sobre los tipos de células mediante la obtención de información sobre la velocidad a la que el ATP se libera de las células microbianas.

3. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que no se añade ninguna ATPasa durante el procedimiento.

35 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional de identificación de las células microbianas que están presentes en la muestra mediante la comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa 3) con uno o más valores de referencia en función del tiempo para células microbianas.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional de identificación de las células somáticas que están presentes en la muestra mediante la comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa 2) con uno o más valores de referencia en función del tiempo para células somáticas.

40 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende una etapa adicional de identificación de las células microbianas que están presentes en la muestra mediante la comparación de la luminiscencia en función del tiempo obtenida en la etapa B) con uno o más valores de referencia en función del tiempo para células microbianas.

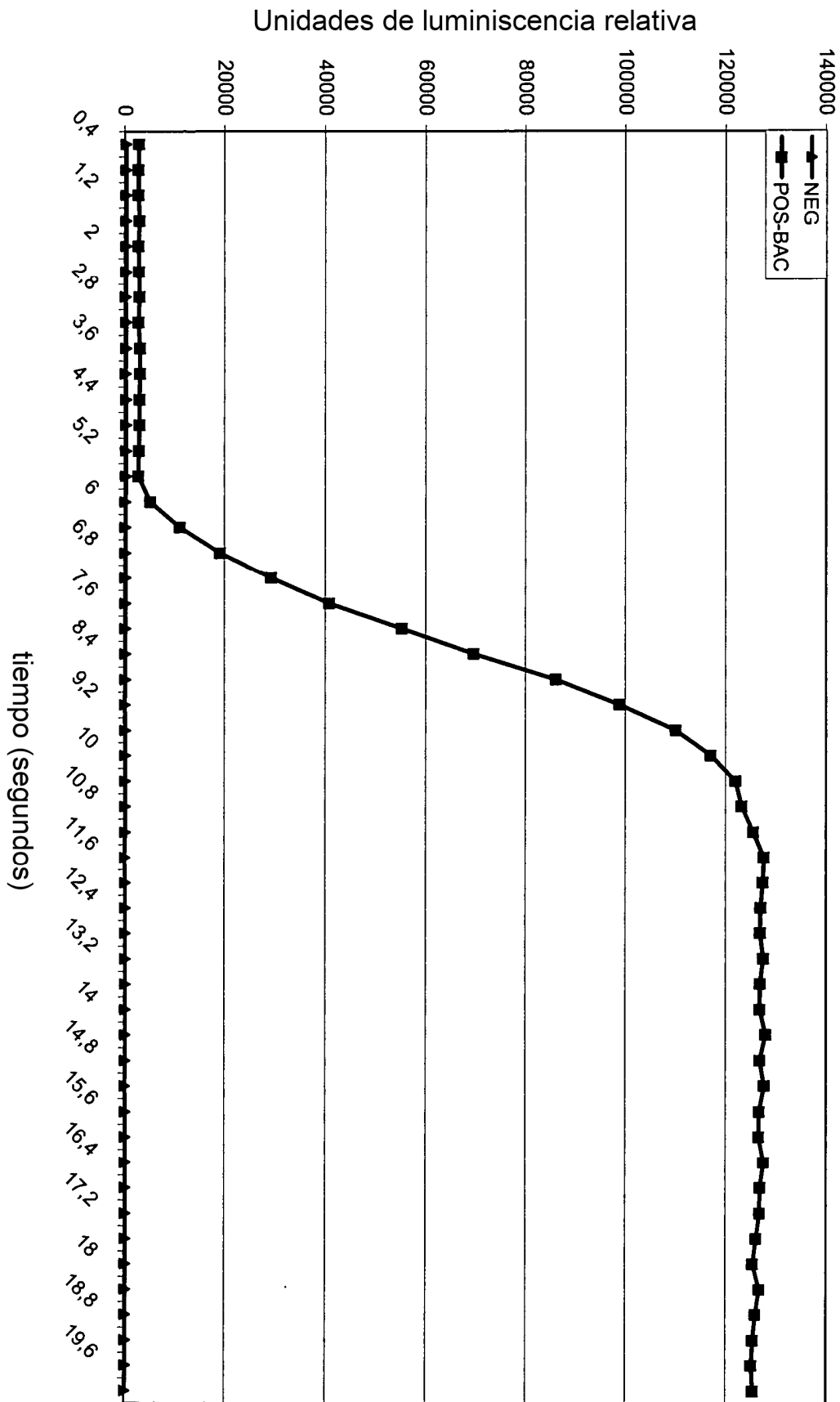


Figura 1

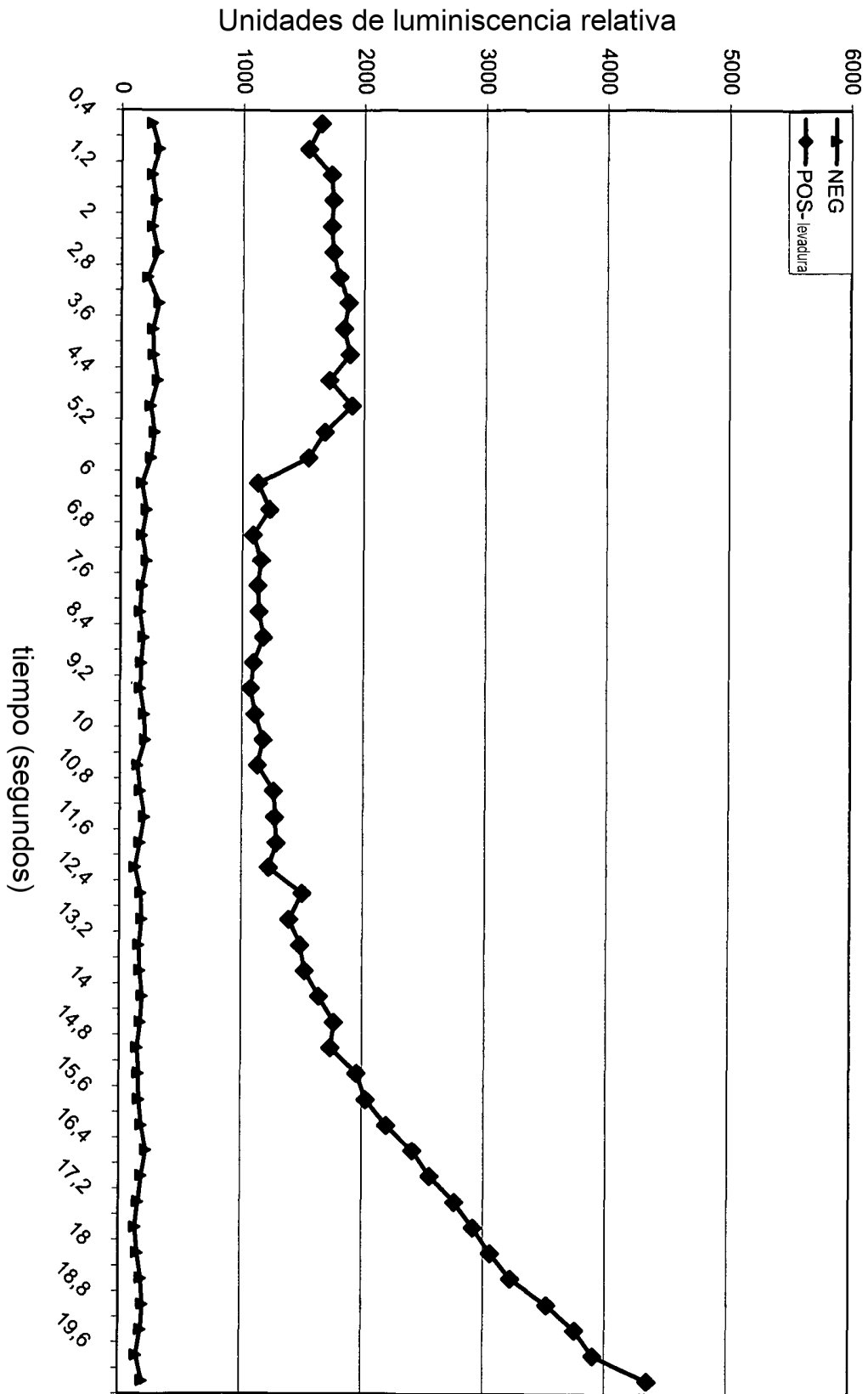


Figura 2

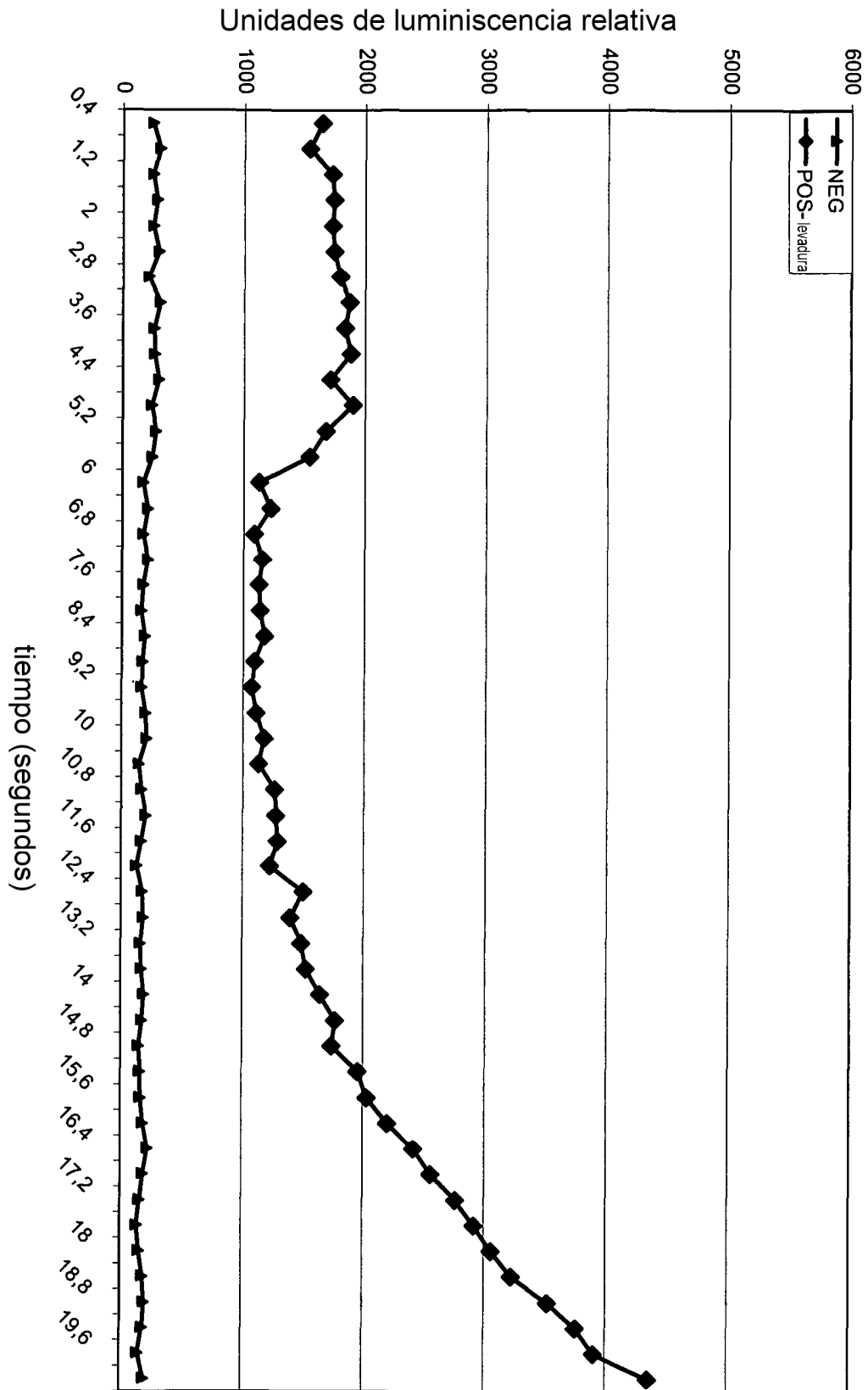


Figura 2

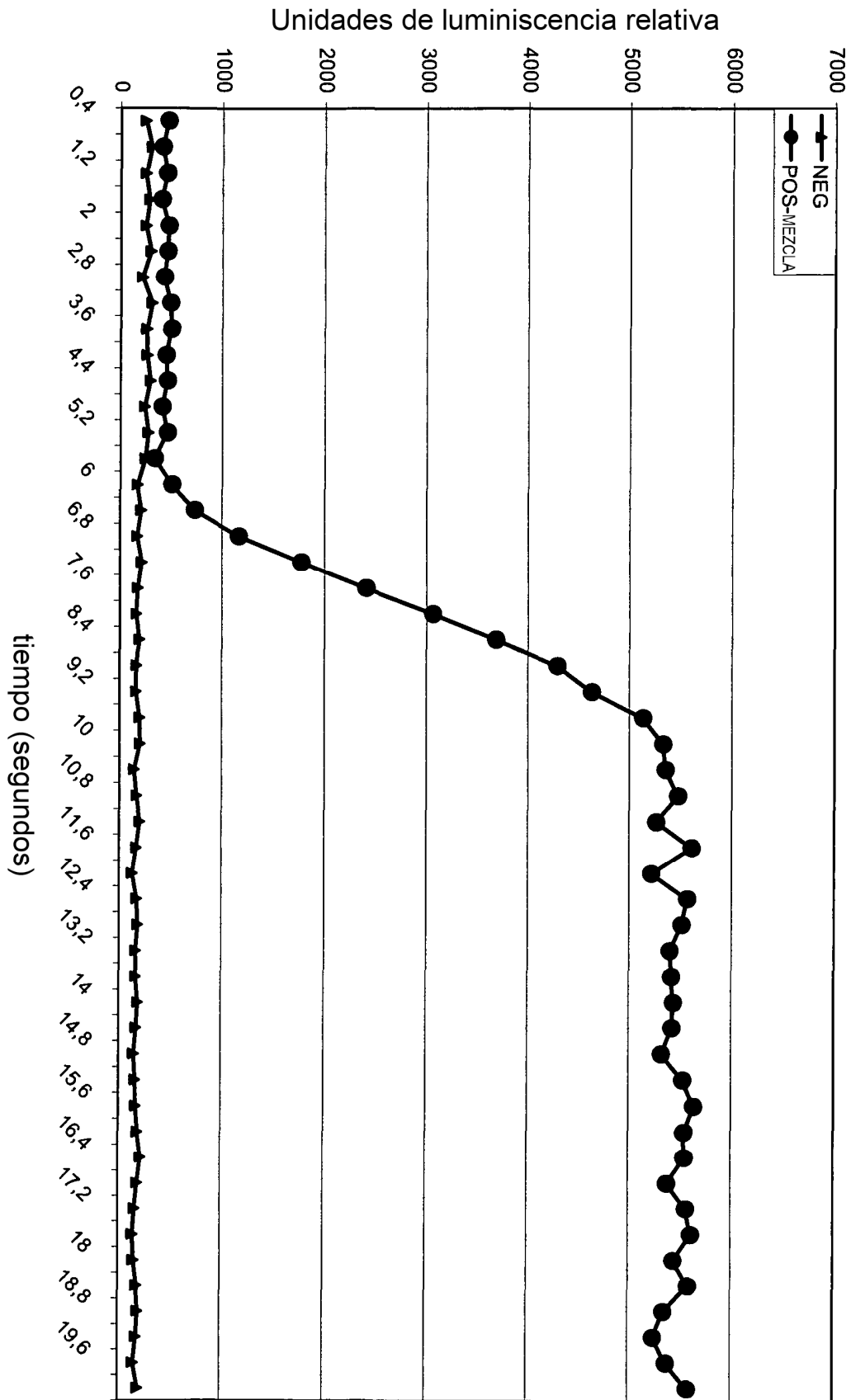


Figura 3

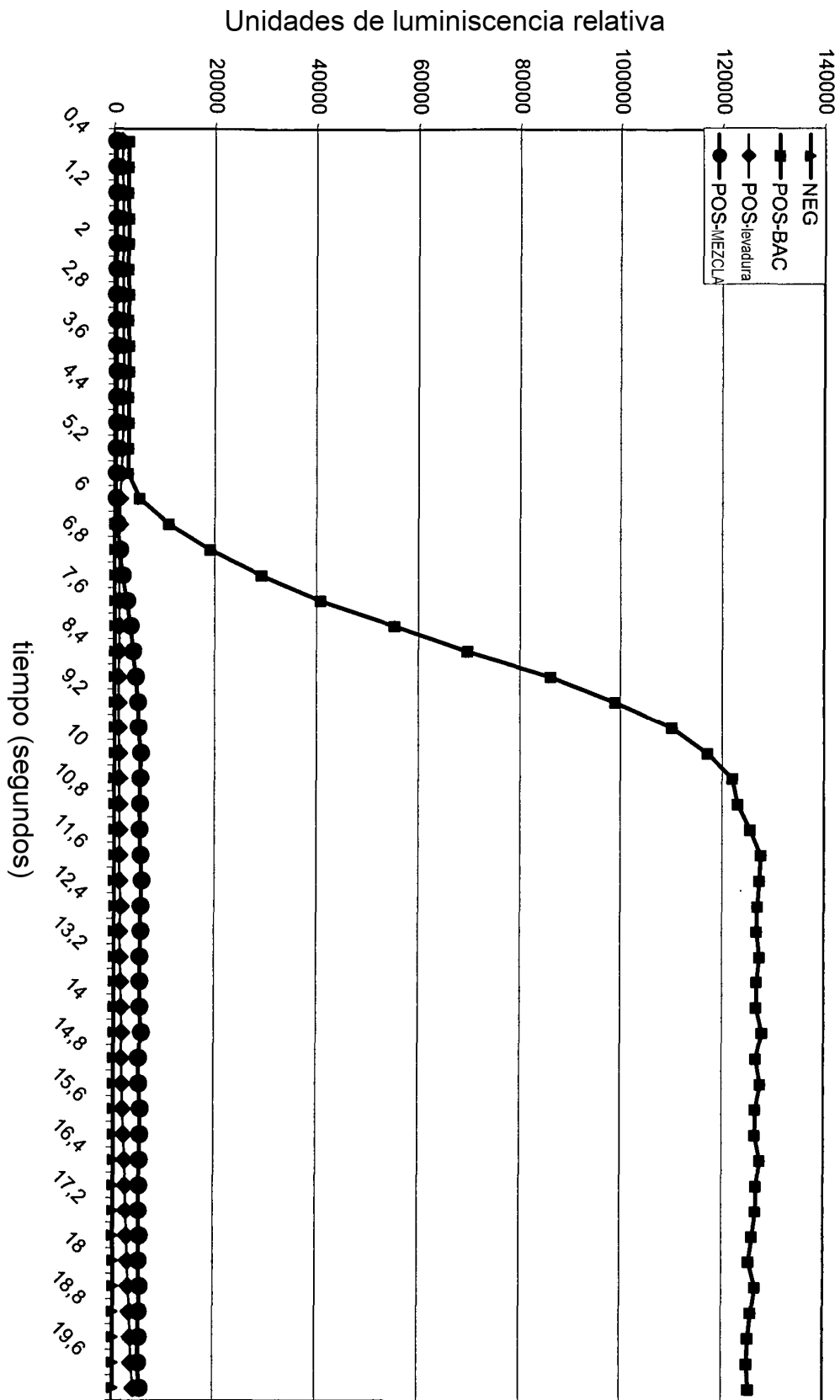


Figura 4A

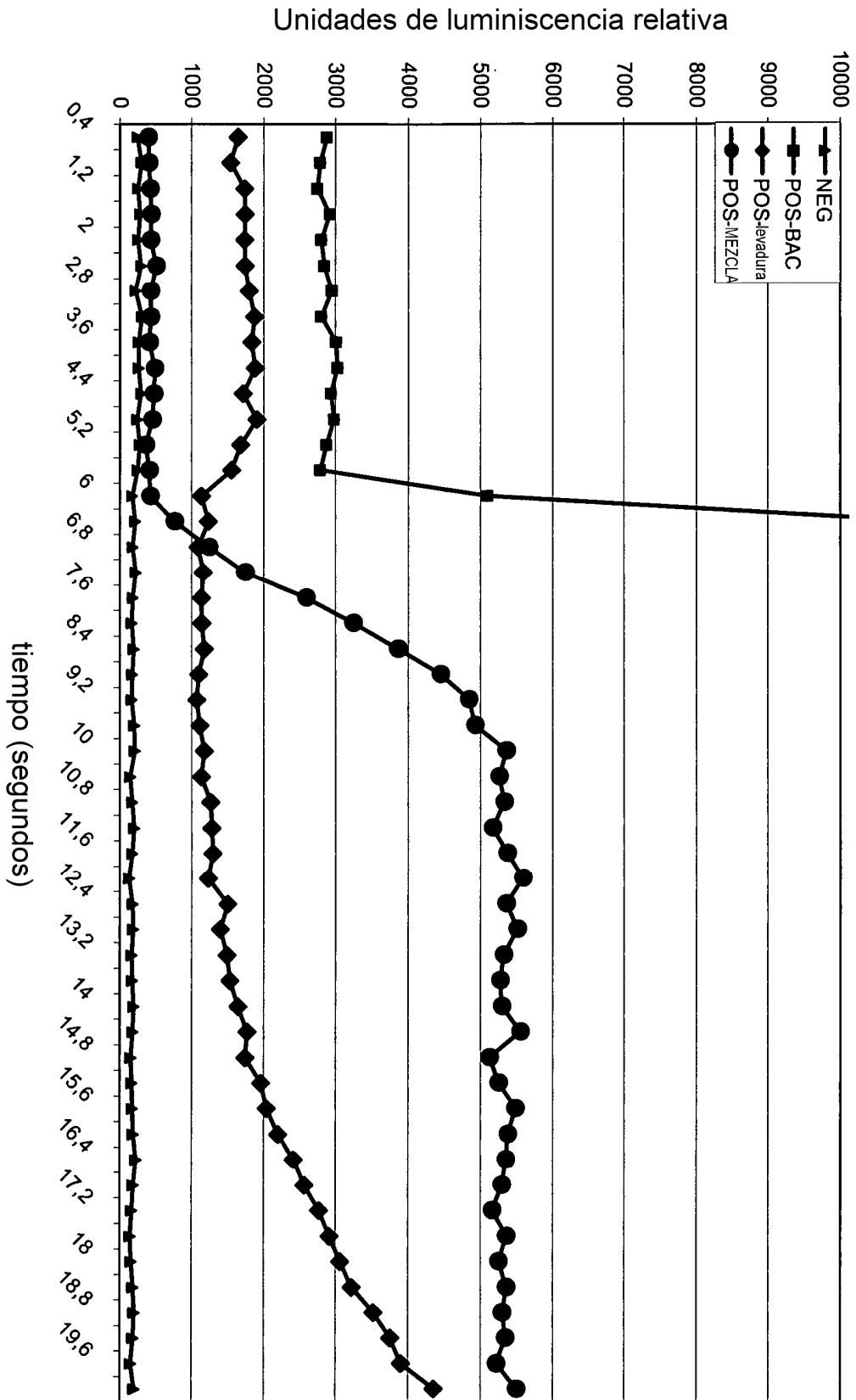


Figura 4B

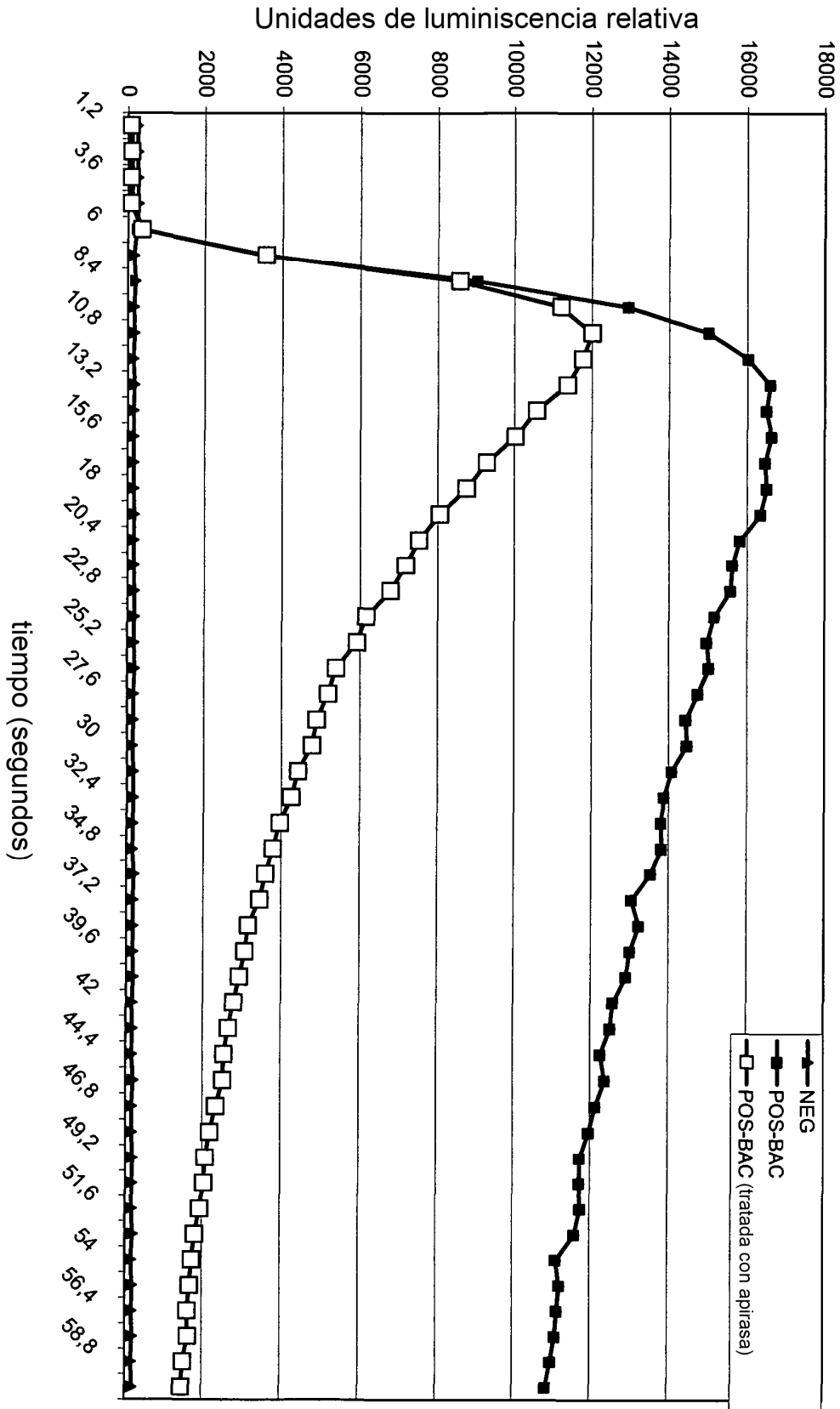


Figura 5

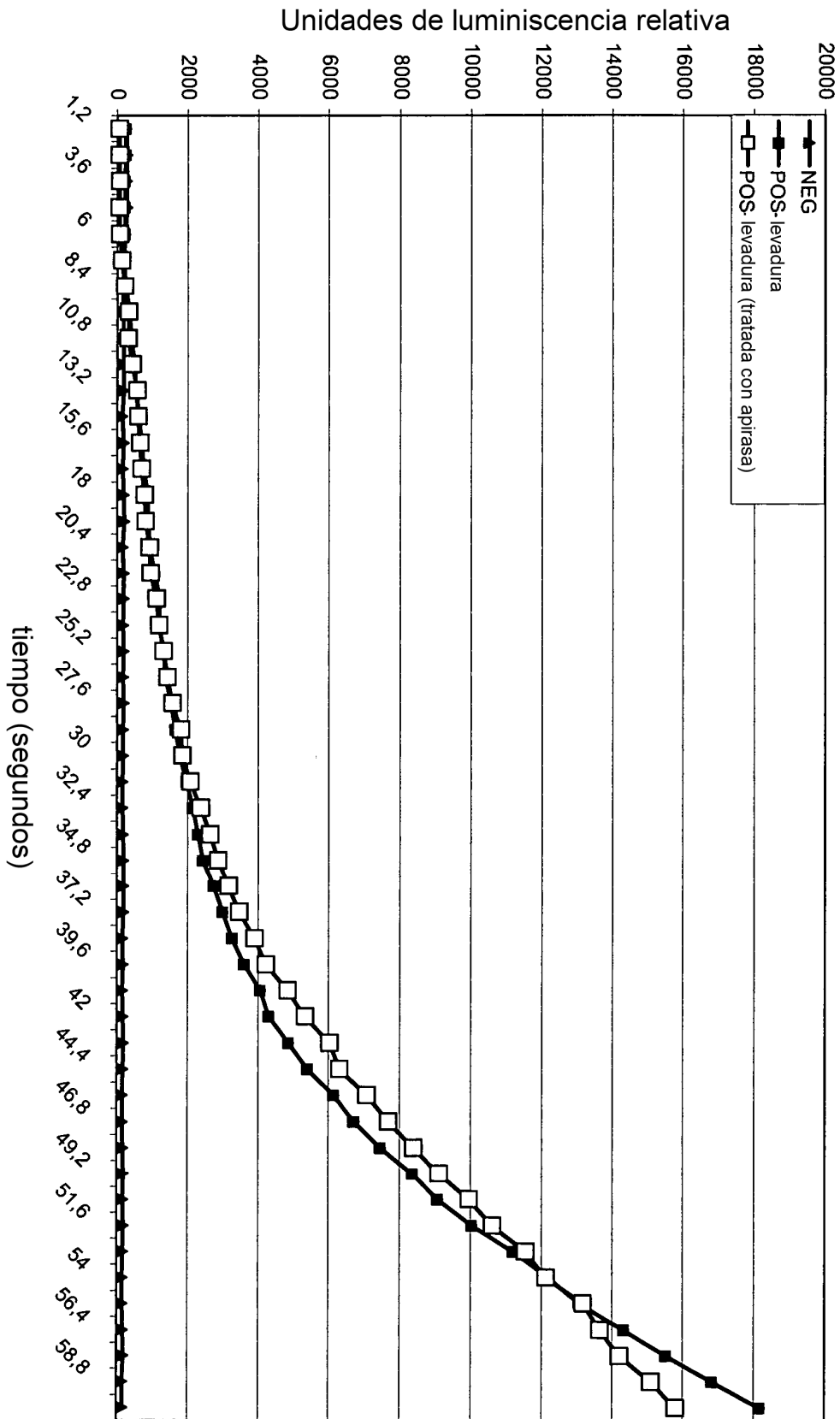


Figura 6

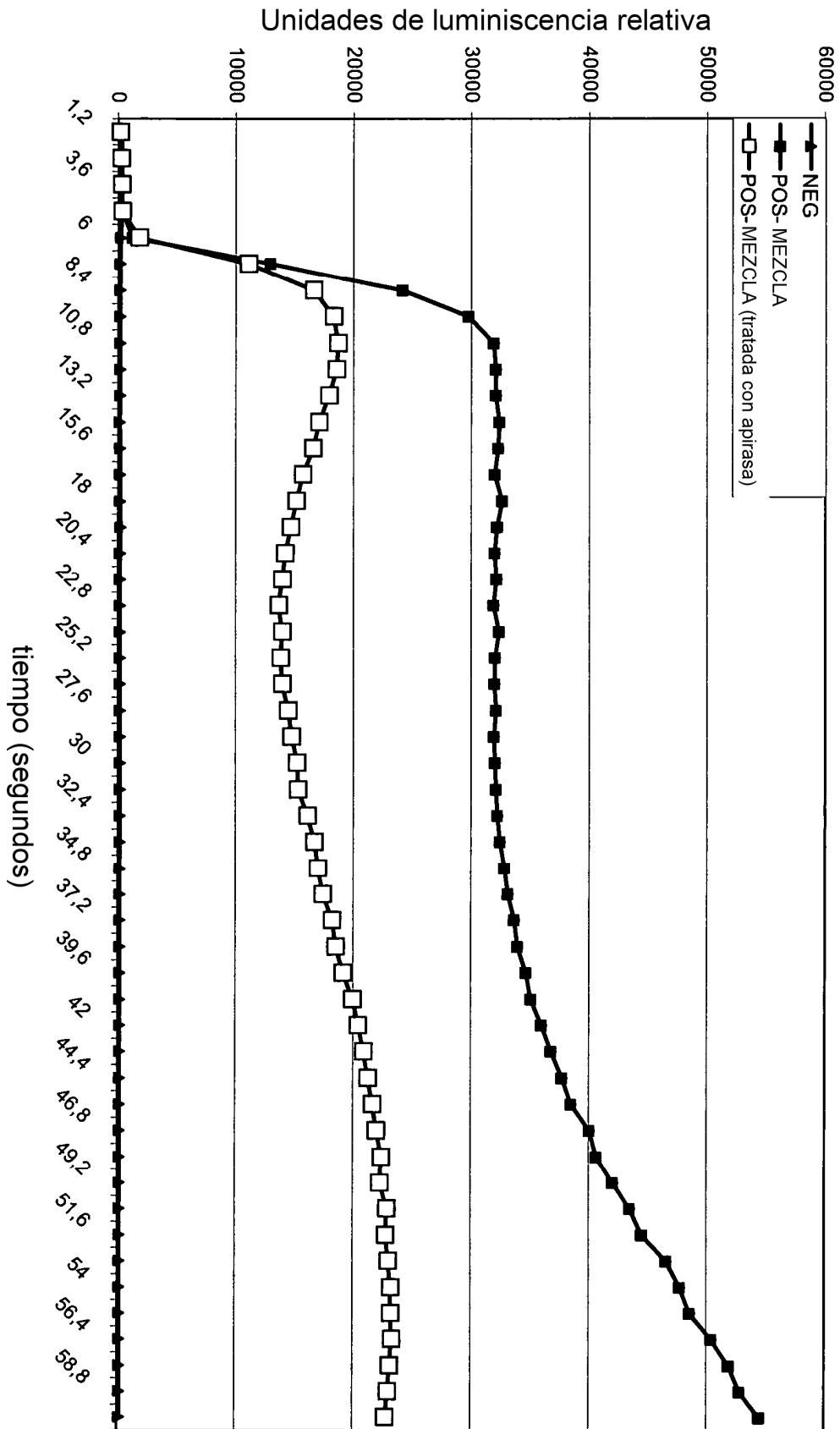


Figura 7

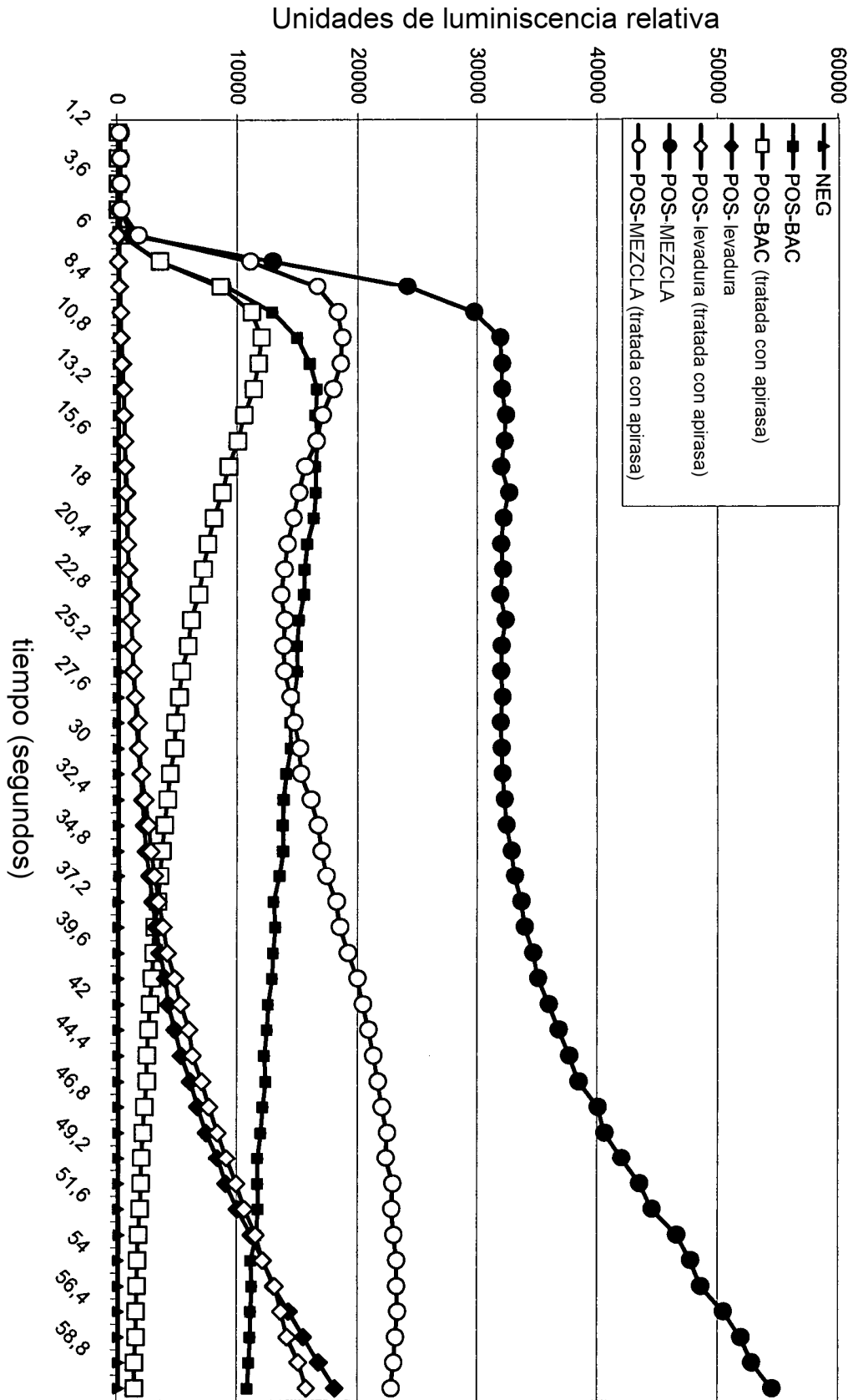


Figura 8A

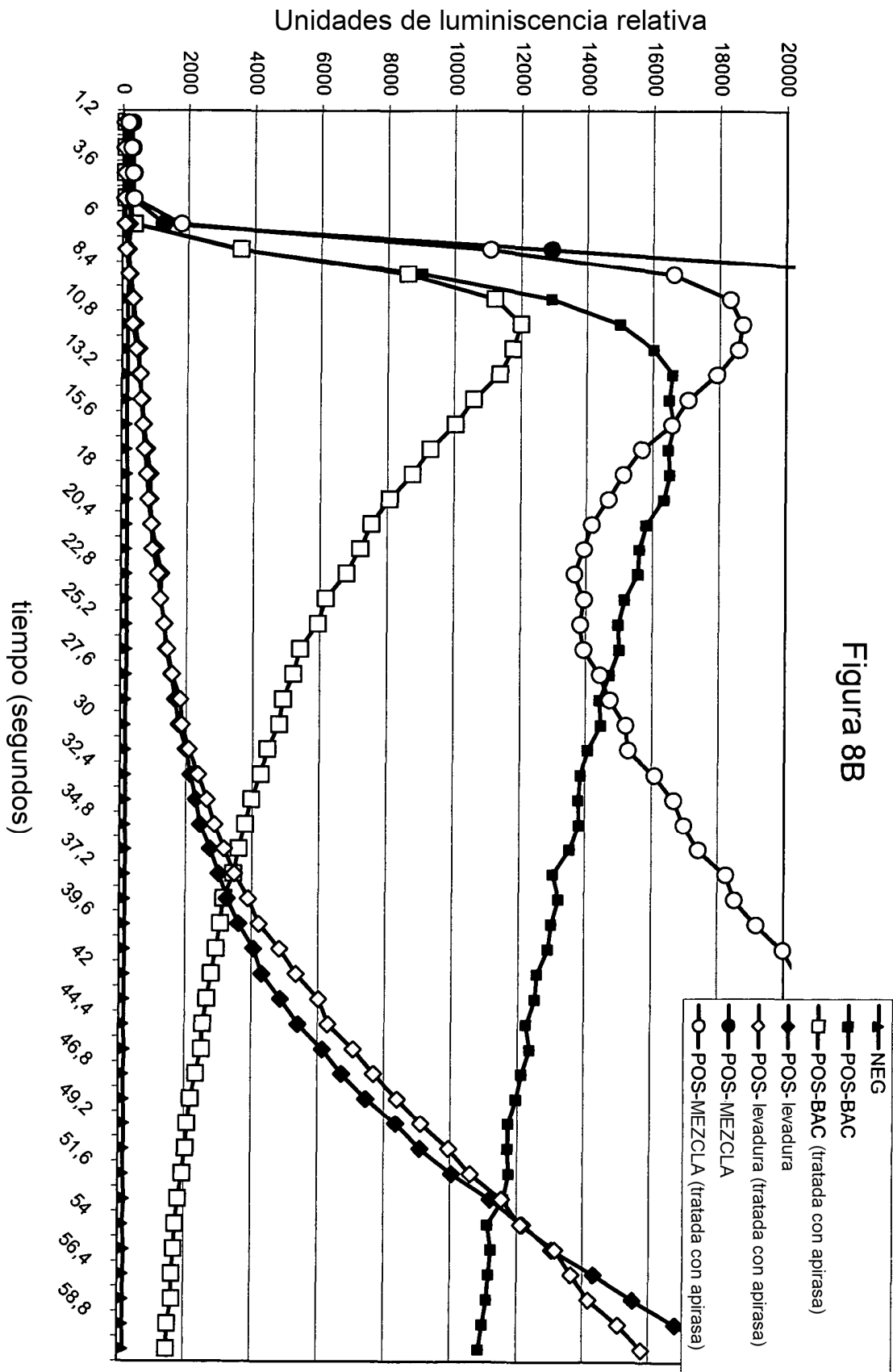


Figura 8B

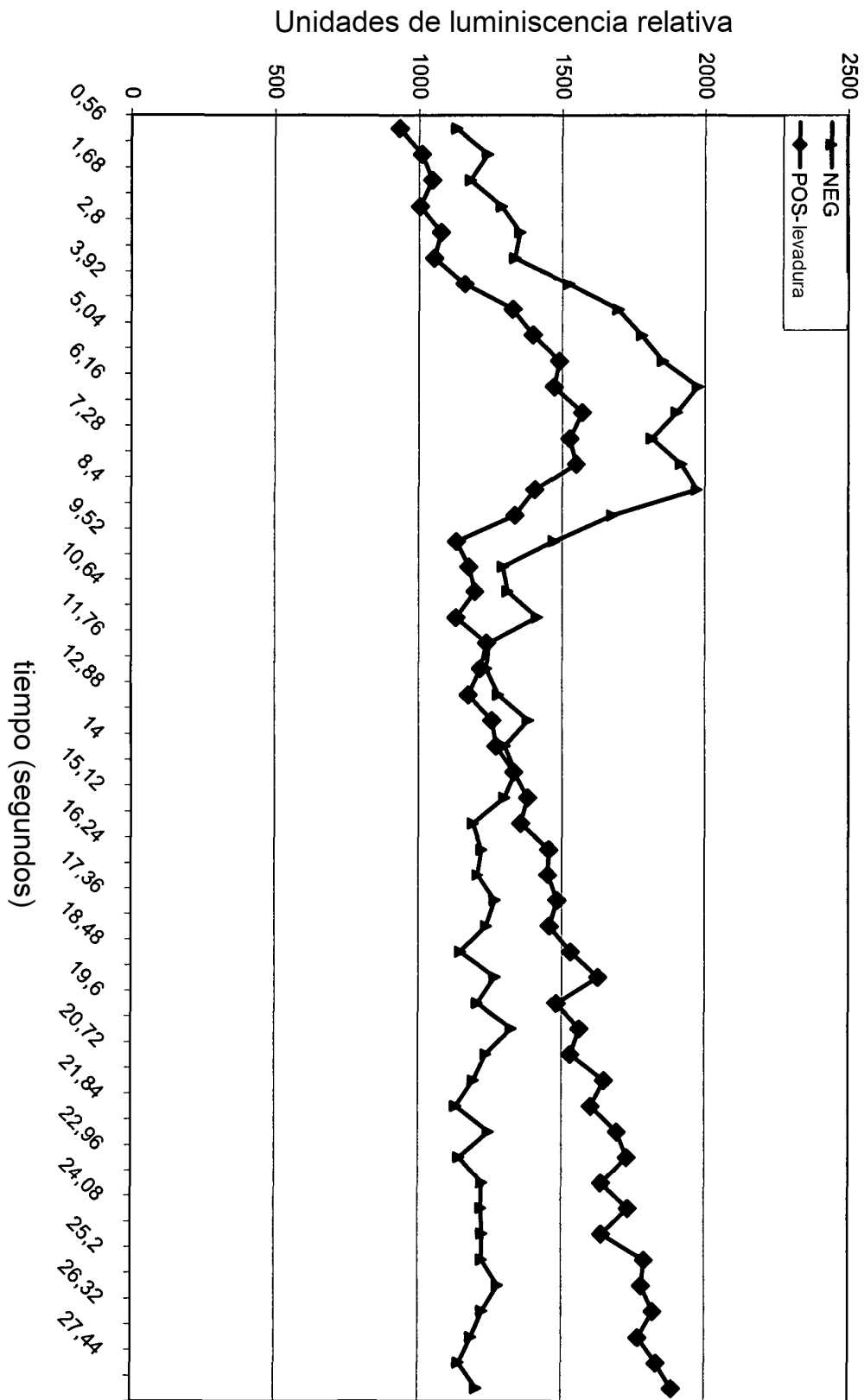


Figura 9

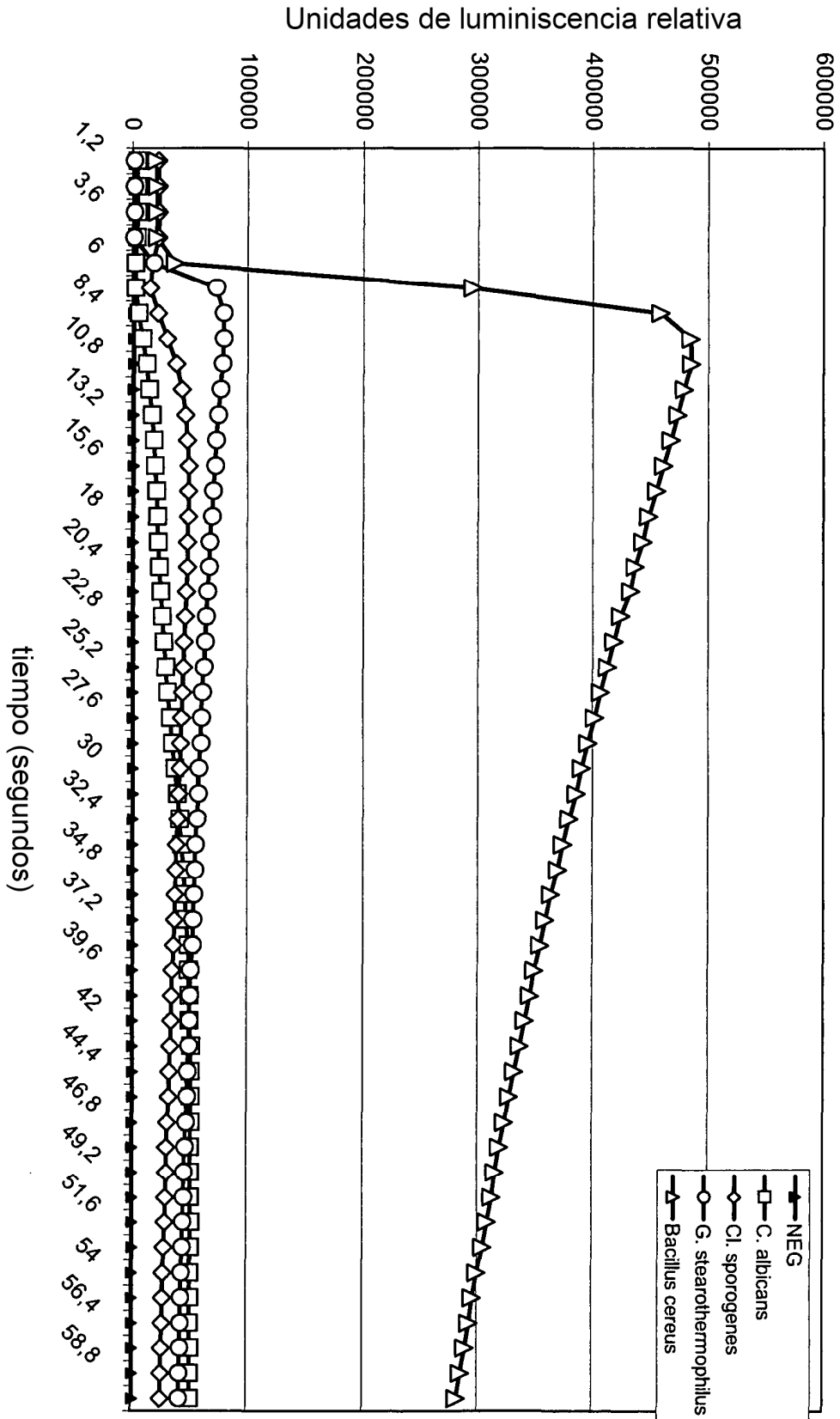


Figura 10 A

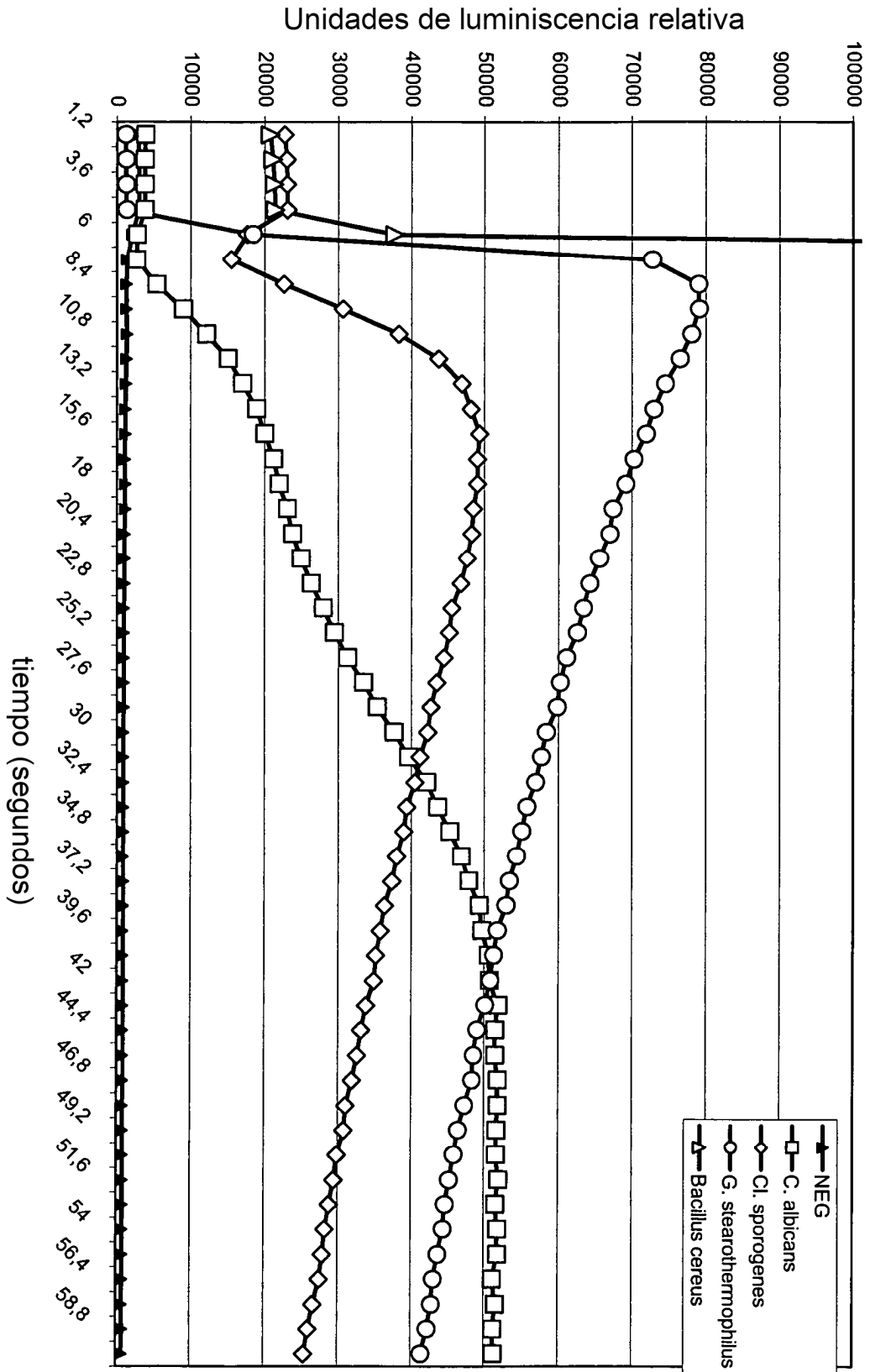


Figura 10 B