

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 929**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/84** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

**G01N 33/02** (2006.01)

**G01N 33/04** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2015 PCT/US2015/032445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15183816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2015 E 15799085 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3149471**

54 Título: **Uso de plataformas de hemocultivo para las pruebas de esterilidad de la leche**

30 Prioridad:

**27.05.2014 CN 201410227620**

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

**23.09.2024**

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON HOLDINGS PTE. LTD.**

**(100.0%)**

**30 Tuas Avenue 2  
Singapore 639461, SG**

72 Inventor/es:

**LI, XIAO;  
ZHANG, YAN y  
LIU, JIANWEI**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 978 929 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

Uso de plataformas de hemocultivo para las pruebas de esterilidad de la leche

**Referencia cruzada a solicitud relacionada**

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente china n.º. CN201410227620.9, presentada el 27 de mayo de 2014.

**Antecedentes de la invención**

10 Las enfermedades transmitidas por los alimentos son motivo de preocupación pública. La mayoría de las naciones desarrolladas cuentan con políticas y procedimientos establecidos para garantizar un suministro de alimentos seguro y confiable, libre de contaminación por patógenos que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos.

Muchos países han desarrollado pruebas y protocolos para inspeccionar los alimentos en busca de contaminación a fin de garantizar que los alimentos contaminados no entren en el suministro de alimentos. Un ejemplo de un protocolo de este tipo es la Norma Nacional de Seguridad Alimentaria de la República Popular China. En los Estados Unidos, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos promulga y hace cumplir las pruebas y normas para controlar el suministro de alimentos en busca de patógenos.

15 El objetivo de estas pruebas es evitar que lleguen a los consumidores alimentos no seguros o potencialmente no seguros. Sin embargo, como con cualquier prueba de este tipo, la integridad de la prueba es crucial para identificar los alimentos que sean potencialmente no seguros para el consumo, y mantenerlos alejados de los consumidores sin que las muestras den falsos positivos en las pruebas de patógenos o de contaminación. Los falsos positivos son una carga económica para la sociedad, tanto para los proveedores como para los consumidores. Por lo tanto, cualquier método, sistema o dispositivo que inspeccione los alimentos, debe identificar con precisión los alimentos que presenten un riesgo real para la salud pública.

20 El protocolo para la norma de inspección china se ilustra en la Figura 1. Básicamente, la muestra 100 (como, por ejemplo, leche), mientras aún está en el recipiente en el que se envasa, se examina (120) para detectar signos de daños en el recipiente o de una brecha en la integridad del recipiente. Si se determina que el recipiente está en buen estado, el recipiente se coloca en una incubadora en la etapa 140. El recipiente se almacena en la incubadora a una temperatura de aproximadamente 35 °C durante 10 días. Transcurrido ese tiempo, el recipiente se inspecciona visualmente para detectar cualquier signo de hinchazón o expansión, que es indicativo de la presencia de patógenos. Si el recipiente muestra signos de crecimiento microbiano en el recipiente durante la incubación, el recipiente se enfría en un refrigerador antes de abrir e inspeccionar la muestra. Esto asegura que la muestra contaminada no escape del recipiente cuando se abra. Las muestras de control también se colocan en el refrigerador como control para las muestras incubadas. Cuando se mide el pH del contenido de las muestras incubadas, se compara con el pH del contenido de las muestras refrigeradas. Una diferencia de pH de 0,5 o más, es una indicación del crecimiento microbiano en la muestra incubada.

30 Tras la incubación (y el enfriamiento cuando sea apropiado) se abren los recipientes que muestran signos físicos de crecimiento microbiano (150). Se retira una alícuota del contenido (160), y se coloca en un recipiente estéril. La muestra reservada se inocula en medios de cultivo y la muestra se cultiva para identificar los microbios que sean la fuente de la contaminación microbiana.

Cuando se abre el recipiente, se mide el pH del contenido y se inspeccionan las propiedades organolépticas de la muestra (p. ej., las propiedades experimentadas por los sentidos, como el olfato, el color, etc.) (170). A continuación, la muestra se prepara para un examen microscópico (180). El examen microscópico tiene por objeto identificar la fuente de la contaminación microbiana y determinar si los microbios son patógenos. Tras la inspección, se emite un informe. El informe indica si la muestra es aceptable (es decir, esterilización comercial) o no aceptable (esterilización no comercial).

35 Los métodos descritos en la Figura 1 toman mucho tiempo debido a las largas esperas para la incubación de la muestra. Se han realizado intentos para acelerar la inspección de dichas muestras utilizando un sistema automatizado para detectar el crecimiento microbiano en las muestras. Zheng, J., y col., «Study on rapid detection commercial sterilization of fungus (i.e. mushroom) with BacT/ALERT 3D system», Food Science and Technology, n.º. 9, págs. 196-199 (2007), informa de tres días para la detección mediante el sistema BacT/ALERT 3D. En BacT/Alert, la muestra se coloca en un frasco con medio de cultivo. El frasco también tiene un sensor de CO<sub>2</sub>. El sensor detecta la presencia de dióxido de carbono en la muestra. Si el sistema detecta durante la incubación un aumento en el contenido de dióxido de carbono del frasco de muestra más allá de un cierto nivel, el sistema señala la muestra como positiva para el crecimiento microbiano. Para este estudio, se utilizaron dos tipos de frascos que contenían los medios. Uno (el frasco i AST) contenía un medio para la detección de bacterias aeróbicas, y el otro (el frasco i NST) contenía un medio para la detección de bacterias anaeróbicas. Los frascos (que contenían los medios) fueron enriquecidos con niveles bajos de diferentes tipos de bacterias y 10 ml del producto (solución en latas de champiñones). El tiempo hasta obtener resultados utilizando BacT/Alert se indicó en la Tabla 1 y se informó que estaba en el rango de 16 horas a aproximadamente 30 horas. También se informa de un experimento con muestras sin enriquecer en el que se utilizaron 45 latas que contenían champiñones. Los resultados del BacT/Alert se compararon con los resultados de la inspección

utilizando el protocolo chino denominado en la presente memoria, protocolo de prueba estándar. BacT/Alert identificó una muestra positiva entre las 45 muestras, y la contaminación se verificó mediante el protocolo de prueba estándar.

Zheng, J., y col., «Application of BacT/Alert 3D System in detection of Commercial Sterilization of Konjac Cans», Food Science, vol. 29, n.º. 10, págs. 463-467 (2008), describe las pruebas de las latas de Konjac con BacT/Alert 3D. Se probaron muestras de cincuenta y nueve latas (sin enriquecer). Los resultados se compararon con los resultados de las latas probadas utilizando la prueba estándar. Se utilizaron tres recipientes de muestra para esta prueba. De un recipiente, se añadieron 10 ml de muestra a cada frasco de BacT/Alert. Específicamente, se añadieron 10 ml de muestra a cada uno de los frascos i. AST e i. NST. El segundo recipiente se analizó mediante el protocolo de prueba estándar, y el tercer recipiente se mantuvo a temperatura ambiente para las pruebas de seguimiento. Para las latas probadas utilizando el protocolo de prueba estándar, ninguna de las latas falló en el control de calidad. Sin embargo, diecinueve de las muestras analizadas con BacT/Alert dieron positivo para el crecimiento microbiano en uno o ambos frascos. Estos resultados positivos se consideraron falsos positivos en comparación con el control (pruebas mediante la prueba estándar). Entre las diecinueve muestras positivas de BacT/Alert, se confirmó que tres de ellas no contenían microorganismos. Para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos, la muestra de los frascos positivos se inoculó en cinco medios estándar diferentes para detectar la presencia o ausencia de crecimiento microbiano. Mientras tanto, la muestra de los frascos positivos también se examinó bajo un microscopio en busca de evidencia de crecimiento microbiano. De estas, se determinó que las tres muestras positivas eran muestras falsas positivas, ya que, para todas las tres muestras, no hubo signos de crecimiento microbiano ni en los cultivos inoculados ni en las muestras sometidas a examen mediante microscopio. Se aislaron varias bacterias de los otros dieciséis frascos identificados como positivos mediante pruebas utilizando BacT/Alert. Según este artículo, es probable que las latas de Konjac contengan algunos microorganismos vivos, pero esos microorganismos no pueden crecer en las latas de Konjac debido al alto pH del entorno (10 a 12,5). Por lo tanto, en estas latas, los microorganismos que puedan estar presentes no son patógenos, no hacen que el contenido sea no seguro para el consumo, y habría pasado el protocolo de prueba estándar establecido por el gobierno chino. Sin embargo, una vez que las muestras se diluyeron en frascos que contenían medios de cultivo para probarlas en BacT/Alert, los microorganismos pudieron crecer e provocaron que el instrumento BacT/Alert informara de resultados positivos.

Dong, R. y col. Heilongjiang Province CDC, Chinese Primary Health Care, vol. 23, n.º. 12 (diciembre de 2009), describe el uso del BacT/Alert para evaluar la esterilidad de la leche. En este estudio, un tipo de leche de temperatura ultra alta (UHT) se enriqueció con 2 cepas de bacterias (E. coli y B. cereus). Como ambas cepas de bacterias crecen en un entorno aeróbico, solo se evaluó el frasco de AST. La prueba demostró que un mayor volumen de muestra fue más sensible, pero no abordó el tema de los falsos positivos, ya que no comparó los resultados obtenidos con BacT/Alert con el protocolo de prueba estándar.

Grossi, Marco, y col., «A portable biosensor system for bacterial concentration measurements in cow's raw milk», ADVANCES IN SENSORS AND INTERFACES (IWASI), 4TH IEEE INTERNATIONAL WORKSHOP ON, IEEE, páginas 132-137, (28-06-2011), describe el uso de la impedancia para detectar el crecimiento microbiano en la leche cruda de vaca. La solicitud de patente británica GB 2293241A de Blundell (publicada el 20 de marzo de 1996) describe el uso de electrodos para detectar la contaminación microbiana en sustancias líquidas o semilíquidas.

En consecuencia, se siguen buscando métodos y sistemas alternativos para analizar los alimentos en busca de patógenos que tengan un tiempo de detección reducido, pero que se comparen favorablemente con los protocolos de prueba estándar en términos del número de falsos positivos o falsos negativos.

### Breve resumen de la invención

Un sistema para probar la contaminación microbiana de la leche según las reivindicaciones 1 a 4. El sistema utiliza un recipiente de muestra estéril que está adaptado para utilizarse en una incubadora que monitoriza una muestra líquida dispuesta en el recipiente, en busca de evidencia de crecimiento microbiano. A este respecto, hay un sensor dispuesto en el recipiente. El sensor monitoriza al menos un parámetro de la muestra líquida a medida que la muestra líquida se calienta en la incubadora. El al menos un parámetro es una condición de la muestra que cambiará si se produce durante la incubación un crecimiento microbiano en la muestra líquida. En este sentido, el sensor proporcionará una respuesta a los cambios en un parámetro de la muestra que cambia en respuesta a la actividad metabólica de los microorganismos. Dichos parámetros incluyen la concentración de oxígeno en la muestra, la concentración de dióxido de carbono en la muestra, o el pH de la muestra.

Al monitorizar el sensor, el sistema señalará un frasco como positivo por la presencia de microorganismos, si el valor medido del parámetro supera un valor predeterminado. El sensor se coloca en el recipiente de manera que, cuando la muestra líquida se introduzca en el recipiente, el sensor esté en contacto con la muestra. El sistema se ha programado con el valor umbral predeterminado del parámetro monitorizado asociado al crecimiento microbiano. En este sentido, el parámetro medido aumentará si el parámetro medido se produce por la actividad metabólica de los microorganismos (p. ej., CO<sub>2</sub>). De ello se deduce que el parámetro disminuirá si el parámetro de medición del valor es consumido por la actividad metabólica de los microorganismos (p. ej., O<sub>2</sub>).

El sistema tiene un receptáculo en la incubadora para recibir los recipientes de las muestras. Los recipientes de las muestras se colocan de manera que el detector del sistema pueda monitorizar el sensor durante la incubación de

la muestra en la incubadora. Los recipientes de las muestras se presentan para la introducción de la muestra en los mismos, sin contener aditivos que incluyan nutrientes para el crecimiento microbiano.

También se describe un método para probar una muestra de leche para detectar la contaminación microbiana según las reivindicaciones 5 a 9, utilizando el sistema descrito en la presente memoria. En este método, se extrae una muestra de prueba de una muestra envasada bajo inspección. La muestra de prueba se introduce en forma líquida en el recipiente estéril con el sensor que monitoriza el parámetro asociado al crecimiento microbiano. La muestra se introduce en forma líquida en el recipiente. Sin embargo, la muestra puede ser una muestra líquida (por ejemplo, leche) o salmuera, o un líquido envasado con una muestra que de otro modo sería sólida, o una muestra sólida que se haya licuado para la prueba. En la presente memoria, la muestra se denomina muestra líquida, siendo la muestra bajo prueba líquida a temperaturas ambiente y de prueba. El sensor se coloca en el recipiente para que entre en contacto con la muestra de prueba. El recipiente no contiene nutrientes que apoyen el crecimiento microbiano en su interior. A continuación, la muestra se incuba a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 38 °C, mientras se monitoriza el sensor para detectar cambios en el parámetro monitorizado por el sensor. Si la lectura del sensor es un valor predeterminado asociado al crecimiento microbiano, la muestra se señala como muestra positiva para el crecimiento microbiano.

### Breve descripción de los dibujos

Estos y otros objetos, ventajas y características novedosas de la invención, se apreciarán más fácilmente a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la Figura 1 es un diagrama de flujo del protocolo de prueba estándar;

la Figura 2 es un diagrama de bloques de un sistema que emplea múltiples instrumentos de incubación y medición según una realización de la presente invención, cada uno de los cuales utiliza espectroscopía fototérmica para monitorizar la concentración de un gas, tal como oxígeno o dióxido de carbono, en los frascos de muestra, para así detectar el crecimiento de microorganismos en los frascos de muestra;

la Figura 3 es una vista detallada de un instrumento empleado en el sistema mostrado en la Figura 1;

la Figura 4 es una vista superior en sección del instrumento de la Figura 3; y

la Figura 5 es un frasco BACTEC configurado para su uso en el sistema y el método descritos en la presente memoria.

### Descripción detallada

En la Figura 2 se muestra un sistema 100 para detectar el crecimiento de microorganismos en muestras de cultivos según una realización de la presente invención. Como se ilustra, el sistema 100 incluye una pluralidad de módulos 102 de incubación y medición que están conectados a un ordenador central 104. El ordenador central 104 puede controlar las temperaturas y tiempos de incubación, así como la sincronización de las mediciones realizadas por los módulos 102, y puede recopilar y clasificar las lecturas de datos obtenidos por los módulos 102. El sistema 100 también puede incluir un dispositivo de emisión de datos, tal como una impresora 106, que puede controlarse mediante el ordenador central 104 para imprimir las lecturas de datos obtenidos por los módulos 102 de incubación y medición.

Dichos mecanismos son bien conocidos por los expertos en la técnica, y no se describen en detalle en la presente memoria. Un ejemplo de un sistema de este tipo es el BD BACTEC™ FX40, que se obtiene comercialmente de Becton Dickinson. El funcionamiento del BD BACTEC™ FX40 se describe en el manual del usuario del instrumento BD BACTEC™ FX40, que es el documento número 8090414 y el número de catálogo 441980. El funcionamiento del BD BACTEC™ FX40 y otros instrumentos similares (por ejemplo, Soleris® de Neogen Corporation, de Lansing, Michigan, es bien conocido por los expertos en la técnica, y no se describe en detalle en la presente memoria).

En las Figuras 3 y 4 se muestran detalles adicionales de los módulos 102 de incubación y medición. Como se ilustra, cada módulo 102 de incubación y medición en este ejemplo incluye una carcasa 108 y dos estantes 110 que pueden deslizarse dentro y fuera de la carcasa 108 en una dirección a lo largo de la flecha A. Cada estante 110 incluye una pluralidad de aberturas 112, cada una de las cuales está adaptada para recibir un frasco 114 de muestra. Las aberturas 112 están dispuestas en una pluralidad de filas y columnas, como se muestra, y cada estante 110 puede tener cualquier número práctico de aberturas. Por ejemplo, las aberturas 112 pueden disponerse en nueve filas, con nueve columnas en cada fila, totalizando así 81 aberturas 112 por estante 110.

Cuando el módulo 102 de incubación y medición va a analizar una muestra, la muestra se coloca en un frasco 114 de muestra, y el frasco 114 de muestra se carga en una abertura 112 respectiva en el módulo 102 de incubación y medición. En este ejemplo, el frasco 114 de muestra es un frasco de muestra cerrado. El módulo 102 de incubación y medición puede incluir, además, un teclado, un lector de códigos de barras, o cualquier otra interfaz adecuada que permita a un técnico introducir información relativa a la muestra en una base de datos almacenada en una memoria en el módulo 102 de incubación y medición, en el ordenador central 104, o en ambos. La información puede incluir, por ejemplo, la información del paciente, el tipo de muestra, la fila y la columna de la abertura 112 en la que se carga el frasco 114 de muestra, etc.

Cada módulo 102 de incubación y medición incluye, además, un conjunto 116 de monitorización móvil que es capaz de monitorizar el contenido de un medio en los frascos 114 de muestra, monitorizando las señales de un sensor 210 dispuesto dentro del frasco 114 de muestra. Véase la Figura 5. Dichos sensores monitorizan un parámetro en el frasco 114 de muestra durante la incubación. Dichas muestras incluyen niveles de oxígeno, niveles de dióxido de carbono, pH, etc. Los sensores detectarán un cambio en tales condiciones a lo largo del tiempo. Dichos sensores son bien conocidos por un experto en la técnica, y no se describen en detalle en la presente memoria. La incubadora se configura de modo que, cuando el valor del parámetro que se monitoriza supere un cierto umbral, el sistema señale el frasco (y su contenido) como positivo para el crecimiento de microorganismos.

Como se indicó anteriormente, es importante asegurarse de que el suministro de alimentos no esté contaminado por patógenos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS/FAO), el objetivo del suministro de alimentos es la esterilidad comercial. Esto se define como «la ausencia de microorganismos capaces de crecer en los alimentos en condiciones normales no refrigeradas en las que sea probable que los alimentos se conserven durante su fabricación, distribución y almacenamiento».

El protocolo estándar de prueba de esterilidad comercial recomendado por la Norma Nacional de Seguridad Alimentaria de la República Popular China (GB 4789.26-2013), consiste en que los alimentos envasados se incuben a 36 °C +/- 1 °C durante 10 días, buscar paquetes hinchados y, a continuación, abrir todos los paquetes para realizar pruebas de pH e inspecciones visuales y microscópicas.

Aunque el coste por prueba manual es relativamente bajo, el protocolo manual es un proceso lento y laborioso. La necesidad de incubadoras de gran capacidad (para acomodar todo tipo de alimentos en envases voluminosos) añade un costo significativo a los fabricantes de alimentos y a las organizaciones que hacen las pruebas a los alimentos. En las realizaciones descritas en la presente memoria, los instrumentos convencionales para detectar el crecimiento microbiano en hemocultivos se han adaptado y modificado para monitorizar la presencia o ausencia de microorganismos en los alimentos. El uso de tales instrumentos, tales como el BD BACTEC™ FX40, en los métodos descritos en la presente memoria, proporciona un método y sistema que ofrecen un tiempo de obtención de resultados mucho más rápido, al tiempo que se controla el número de falsos positivos y falsos negativos. Por lo tanto, el sistema y los métodos descritos en la presente memoria proporcionan un tiempo de obtención de resultados mucho más rápido sin un aumento significativo en el número de falsos positivos o falsos negativos logrados mediante los métodos anteriores.

En el método descrito en la presente memoria, la muestra de leche se introduce en un frasco de muestra configurado para su uso en un sistema que monitoriza los hemocultivos para detectar el crecimiento microbiano. El frasco 114 de muestra tiene un sensor 210 dispuesto en el interior, preferiblemente en una ubicación donde el sensor estará en contacto con la muestra cuando la muestra se introduzca en el frasco. El frasco 114 es estéril, y el aire se evacua del mismo sustancialmente por completo.

El volumen del frasco es de unos 50 ml. El tamaño del frasco variará, al igual que el volumen del frasco. Sin embargo, los frascos deben tener un volumen adecuado para recibir un volumen de muestra que garantice la sensibilidad adecuada de la muestra. En este sentido, si los frascos solo pueden recibir una muestra muy pequeña, entonces la muestra podría no ser representativa del contenido de la muestra, en términos de los contaminantes (si los hay) en la porción de muestra. Por ejemplo, si el tamaño del recipiente es de un galón (3,8 litros), y el volumen de la muestra para la prueba es de solo 10 ml, existe una posibilidad real de que la porción de la muestra no contenga un microorganismo, incluso si estuviera presente en el recipiente. Para el método y aparato descritos en la presente memoria, el tamaño mínimo de la muestra no sería inferior a aproximadamente 10 ml, y preferiblemente no inferior a 50 ml.

El frasco está preferiblemente bajo cierto vacío para que la muestra pueda introducirse fácilmente en el recipiente de muestras. Los aparatos para introducir muestras líquidas en recipientes son bien conocidos y no se describen en detalle en la presente memoria.

El sensor es normalmente un sensor de CO<sub>2</sub>. Los ejemplos de sensores adecuados se describen en la patente de EE. UU. n.º. US-5.998.517, concedida a Gentle y col. El sensor, p. ej., un sensor de silicona, está dispuesto en una matriz de gel. El sensor se interroga durante la incubación, a fin de monitorizar los cambios en los niveles de dióxido de carbono en la muestra. Cuando los niveles de dióxido de carbono en el frasco superen un umbral predeterminado, se señala que el frasco contiene una muestra que ha dado positivo para la presencia de microorganismos en su interior.

El frasco 114 de muestra en el que se dispensa la muestra no contiene ningún medio nutritivo que facilite el crecimiento microbiano. Para esta aplicación, es importante preservar la integridad de la muestra, y garantizar que los nutrientes para el crecimiento microbiano provengan de la propia muestra y no de los aditivos de la muestra. Como se ilustra en el siguiente ejemplo, el número de falsos positivos aumenta sorprendentemente cuando el medio de cultivo está presente en el recipiente en el que la muestra se desecha, se incuba y se monitoriza para detectar la presencia o ausencia de crecimiento microbiano.

Utilizando leche UHT, se prepararon los frascos de muestra que no contenían medios de cultivo. En una realización, los frascos son aquellos que están configurados para su uso en el dispositivo de hemocultivo BACTEC. Las muestras (50 ml) de leche UHT se obtuvieron de tres tipos diferentes de envases. Las muestras se enriquecieron con microorganismos (*B.*

*cereus*, *B. licheniform*, *C. perfringens*, *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *L. fermentus*). A modo de comparación, también se añadieron 10 ml de las mismas muestras de leche UHT enriquecidas, a los frascos BACTEC que contenían medios líticos/anaeróbicos. Todos los frascos BACTEC se cargaron en un FX200 o un BACTEC 9240 para su detección.

5 Las muestras de leche UHT enriquecidas con las mismas concentraciones de microorganismos se probaron mediante el protocolo de prueba estándar descrito anteriormente. Se demostró que los resultados obtenidos con frascos BACTEC vacíos con 50 ml de muestras de leche se correlacionaban mejor con los resultados obtenidos cuando se utilizó el protocolo de prueba estándar. Si bien los solicitantes no desean basarse en ninguna teoría en particular, los solicitantes creen que las tasas más bajas de falsos negativos para las muestras probadas en frascos sin medios, en comparación con las muestras en frascos con medios, se deben al mayor tamaño de la muestra (50 ml frente a 10 ml) y/o a la selección de un medio que arroja un resultado falso. Un tamaño de muestra más grande es más sensible a las muestras que tengan una concentración baja de organismos.

10 También se observó que ciertas bacterias (p. ej., *C. perfringens*) no crecieron en dos tipos de envases de leche, cuando esos envases se probaron utilizando el protocolo de ensayo estándar descrito anteriormente. Cuando se probaron muestras de 50 ml en frascos sin medios utilizando BACTEC, se realizó la misma observación. Por lo tanto, el método descrito en la presente memoria, produce resultados compatibles con el protocolo de prueba establecido. Por el contrario, cuando se introdujeron muestras de 10 ml en frascos que contenían medios líticos/anaeróbicos, esas muestras dieron positivo en cuanto al crecimiento de microorganismos. Esto se interpreta como un falso positivo. Por lo tanto, la tasa de falsos positivos cuando se utilizaron frascos BACTEC sin medios fue menor que con medios (utilizando el protocolo de prueba estándar).

15 La leche pasteurizada a temperaturas ultra altas (leche UHT) se obtuvo en 3 tipos diferentes de envases: i) Prepack (plástico blando); ii) Tetra Pack (plástico duro); y Tetra Brik (caja de cartón duro). Los productos se compraron en supermercados locales de China.

20 Las soluciones madre de bacterias se diluyeron a una concentración muy baja, y se la misma cantidad se enriqueció en 2 envases idénticos de leche UHT (se enriquecieron de 0,01 cfu/ml a 0,5 cfu/ml en cada envase). Uno de los envases enriquecidos se cerró herméticamente y se puso en una incubadora a 36 °C (el método de referencia de la técnica anterior, también denominado protocolo estándar), y el otro se utilizó para estudios sobre frascos BACTEC con y sin medios.

25 En el método de referencia, los envases se examinaron diariamente para detectar fugas o hinchamientos, y se abrieron de inmediato para un examen más detallado si se observaban anomalías en los envases. Otros envases que parecían estar normal se dejaron en la incubadora durante aproximadamente 10 días, antes de abrirlos para realizar más pruebas. Las pruebas fueron: i) pH; ii) oler; iii) inspección de precipitados o material agregado; y iv) colocar el material en agar TSA y RCM, y buscar que haya crecimiento de colonias después de la incubación a 36 °C. Las muestras se identificaron como muestras contaminadas si alguno de los parámetros anteriores parecía anormal.

Una parte de las muestras se desechó en frascos que contenían el medio lítico/anaeróbico estándar para BACTEC. Este medio se obtiene comercialmente de Becton Dickinson, y no se describe en detalle en la presente memoria.

Para otro conjunto de frascos, se aspiró el medio de los frascos, al igual que cualquier resto de aire residual. En esos frascos, se inyectaron 50 ml de leche UHT enriquecida.

30 Para un tercer conjunto de frascos, se añadieron 5 ml de solución salina a frascos BACTEC vacíos que después se esterilizaron en autoclave. El aire de esos frascos se aspiró con una jeringa, para generar suficiente vacío en el frasco para extraer la muestra. A continuación, se inyectaron 50 ml de leche enriquecida en los frascos, y se utilizaron 2 frascos duplicados para cada experimento. Los frascos se cargaron en un BACTEC FX 200 o un BACTEC 9240 para su detección. Las muestras se consideraron estériles desde el punto de vista comercial si las muestras seguían siendo negativas después de cinco días de incubación.

35 El mismo envase de muestra enriquecida fue la fuente de muestra para los estudios en frascos sin medios y para los estudios en frascos con medios. Cada envase contenía más de 200 ml de leche y, por lo tanto, había una cantidad adecuada de muestra para ambos estudios. La cantidad de muestra enriquecida inyectada en cada frasco que contenía medio lítico/anaeróbico fue de 10 ml. Se utilizaron dos frascos duplicados para cada experimento. Para la muestra enriquecida con *P. aeruginosa*, se utilizó un frasco que contenía medio aeróbico, además de dos frascos con medio anaeróbico en su interior. Las muestras se consideraron estériles desde el punto de vista comercial si las muestras seguían siendo negativas después de 5 días de incubación.

40

Tabla 1

Efecto de los medios en el resultado de muestras enriquecidas con <i>P. aeruginosa</i>				
35 cfu de <i>P. aeruginosa</i> /caja	Frasco lítico/anaeróbico (n°. de cat. 442265) sin medio 50 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Frasco lítico/anaeróbico n°. de cat. 442265 con medio 10 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Frasco aeróbico estándar n°. de cat. 442260 con medio 10 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Incubación a 36 °C (método estándar)
5 <b>Tetra Brik 250 ml/caja</b>	13:15 (Frasco 1)	Negativo (Frasco 1)	16:13	8 días, sin hinchazón, leche estropeada
	13:15 (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)		
10 <b>Tetra Pack 231 ml/caja</b>	14:54 (Frasco 1)	Negativo (Frasco 1)	16:53	8 días, sin hinchazón, leche estropeada
	15:14 (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)		
<b>Prepack 200 ml/caja</b>	13:14 (Frasco 1)	Negativo (Frasco 1)	16:03	8 días, sin hinchazón, leche estropeada
	13:24 (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)		

15 Los resultados demostraron que no todos los organismos crecerán en todos los medios. Como se demostró anteriormente, *P. aeruginosa* creció en un medio aeróbico, pero no creció en un medio anaeróbico. Obviamente, si se utilizan frascos sin medios, no es necesario seleccionar un medio específico en el que crecerá el organismo. Si se utilizan frascos sin medios, no hay problema con la selección del medio. Los resultados de las pruebas de muestras en frascos sin medios fueron completamente coherentes con los resultados de las muestras en medios en los que creció el organismo objetivo (el medio aeróbico). Los resultados de las muestras desechadas en frascos sin medios tenían una completa correspondencia con el resultado de las muestras incubadas utilizando el protocolo estándar.

Tabla 2

Efecto del tamaño de la muestra en los resultados con muestras enriquecidas con <i>L. fermentum</i>			
	Frasco de solución salina sin medio 50 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Frasco lítico/anaeróbico n°. de cat. 442265 con medio 10 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Incubación a 36 °C
25 <b>Tetra Brik 250 ml/caja 45 cfu/caja</b>	23:35 (Frasco 1)	23:04 (Frasco 1)	8 días, hinchazón leve, sin cambios en el aspecto de la leche, disminución del pH > 0,5
	23:05 (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)	
30 <b>Tetra Pack 231 ml/caja 20 cfu/caja</b>	1 día, 05:03 (Frasco 1)	21:03 (Frasco 1)	8 días, sin hinchazón, sin cambios en la apariencia de la leche, el pH disminuyó a aproximadamente 0,5
	19:03 (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)	
35 <b>Prepack 200 ml/caja 44 cfu/caja</b>	22:04 (Frasco 1)	21:03 (Frasco 1)	8 días, sin hinchazón, algunos precipitados en la leche, disminución del pH > 0,5
	24:04 (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)	

40 Este experimento demostró que se obtuvieron falsos negativos en los frascos con medios y solo diez mililitros (ml) de muestra. Los falsos negativos no se obtuvieron de manera sistemática, por lo que se necesitarían al menos dos frascos para los frascos que contengan solo diez ml de muestra combinada con medios. Los dos frascos son necesarios para señalar falsos positivos o falsos negativos. Estos falsos positivos o falsos negativos se señalarían con resultados no coherentes para muestras que de otro modo serían idénticas. No se obtuvieron falsos negativos cuando el tamaño de la muestra fue de 50 ml. Los resultados de la prueba sin medio coincidieron con los del método de referencia (ambos mostraron contaminación), mientras que la mitad de los frascos que utilizaron medios (con un tamaño de muestra de 10 ml) generaron resultados falsos negativos.

Tabla 3

Efecto de los medios sobre el crecimiento de organismos que no podrían crecer en la muestra sin los medios para las muestras enriquecidas con <i>C. perfringens</i>			
	Frasco de solución salina sin medio 50 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Frasco lítico/anaeróbico n°. de cat. 442265 con medio 10 ml/muestra Tiempo hasta el resultado (h/min)	Incubación a 36 °C
5			
	Negativo (Frasco 1)	10:37 (Frasco 1)	10 días, sin hinchazón, sin cambios en la apariencia de la leche, sin cambios en el pH, sin colonias en las placas
	Negativo (Frasco 2)	Negativo (Frasco 2)	
10			
	Negativo (Frasco 1)	9:48 (Frasco 1)	9 días, sin hinchazón, sin cambios en la apariencia de la leche, sin cambios en el pH, sin colonias en las placas
	Negativo (Frasco 2)	9:58 (Frasco 2)	

15 *C. perfringens* no crece en esos dos tipos de leche UHT envasada, como lo demuestran los resultados obtenidos con el protocolo de referencia. Sin embargo, el uso de frascos con medios anaeróbicos dispuestos en ellos, arrojó resultados positivos para esas muestras. Este experimento demuestra que el análisis de la muestra en frascos sin medios produce resultados que se correlacionan mejor con el protocolo de prueba. Esto se debe a que no hay ningún medio presente que facilite el crecimiento de los microorganismos. Por lo tanto, el presente método y sistema no producirá falsos positivos, mientras que los frascos con medios pueden facilitar el crecimiento de microorganismos, que de otro modo no crecerían en la muestra.

20 Aunque la invención en la presente memoria se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y las aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que pueden realizarse numerosas modificaciones en las realizaciones ilustrativas y que pueden diseñarse otras disposiciones sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para probar la contaminación microbiana de la leche según el método de la reivindicación 5, comprendiendo el sistema:
  - 5 un recipiente (114) de muestra estéril configurado para su uso en una incubadora (102) que monitoriza una muestra de leche dispuesta en el recipiente;
  - un sensor (210) dispuesto en el recipiente (114), el sensor (210) configurado para monitorizar al menos un parámetro de la muestra de leche a medida que la muestra de leche se calienta en la incubadora (102), siendo al menos un parámetro una condición que cambia en respuesta al crecimiento microbiano en la muestra de leche, en donde el sensor (210) se coloca en el recipiente (114) de manera que, cuando la muestra de leche se introduce en el recipiente, el sensor (210) está en contacto con la muestra de leche;
  - 10 el sistema programado con un valor predeterminado del parámetro monitorizado, siendo ese valor predeterminado indicativo del crecimiento microbiano en la muestra de leche;
  - un receptáculo (112) en la incubadora adaptado para recibir el recipiente (114) de muestra con la muestra de leche en su interior;
  - un detector para monitorizar los cambios en el sensor (210) durante la incubación de la muestra de leche en la incubadora (102); **caracterizado porque**
  - 15 el sensor (210) está configurado para monitorizar un parámetro del grupo que consiste en la concentración de dióxido de carbono, la concentración de oxígeno y el pH;
  - y QUE el recipiente (114) de muestra no contiene aditivos que contengan nutrientes para el crecimiento microbiano.
  
2. El sistema de la reivindicación 1 en donde la temperatura de incubación es de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 38 °C.
  
3. El sistema de la reivindicación 1 en donde el volumen del recipiente es de al menos aproximadamente 10 ml.
  
- 20 4. El sistema de la reivindicación 1 en donde el volumen de la muestra es de al menos aproximadamente 10 ml.
  
5. Un método para analizar una muestra de leche para detectar la contaminación microbiana, utilizando el sistema de la reivindicación 1 comprendiendo el método:
  - 25 extraer una muestra de leche de una muestra envasada sometida a inspección;
  - introducir la muestra de leche en forma líquida en el recipiente estéril (114) dispuesto en su interior con el sensor (210) que monitoriza el parámetro asociado al crecimiento microbiano, el sensor (210) colocado en el recipiente (114) para que entre en contacto con la muestra de leche;
  - incubar la muestra de leche a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 38 °C mientras se monitoriza el sensor (210);
  - monitorizar una señal del sensor (210) y, si el valor del parámetro monitorizado del sensor (210) supera un valor predeterminado asociado al crecimiento microbiano, señalar la muestra de leche como positiva para el crecimiento microbiano; **caracterizado porque**
  - 30 el sensor (210) está configurado para monitorizar un parámetro del grupo que consiste en la concentración de dióxido de carbono, la concentración de oxígeno y el pH;
  - y que el recipiente (114) de muestra en el que se introduce la muestra de prueba no contiene nutrientes que apoyen el crecimiento microbiano.
  
6. El método de la reivindicación 5 en donde la muestra de leche es una muestra de prueba líquida para un alimento líquido, o una muestra de alimento sólido que se ha licuado.
  
- 35 7. El método de la reivindicación 5 en donde la temperatura de incubación es de aproximadamente 35 °C.
  
8. El método de la reivindicación 5 en donde el volumen del recipiente es de al menos aproximadamente 10 ml.
  
9. El método de la reivindicación 5 en donde el volumen de la muestra de leche es de al menos aproximadamente 10 ml.

40

Figura 1

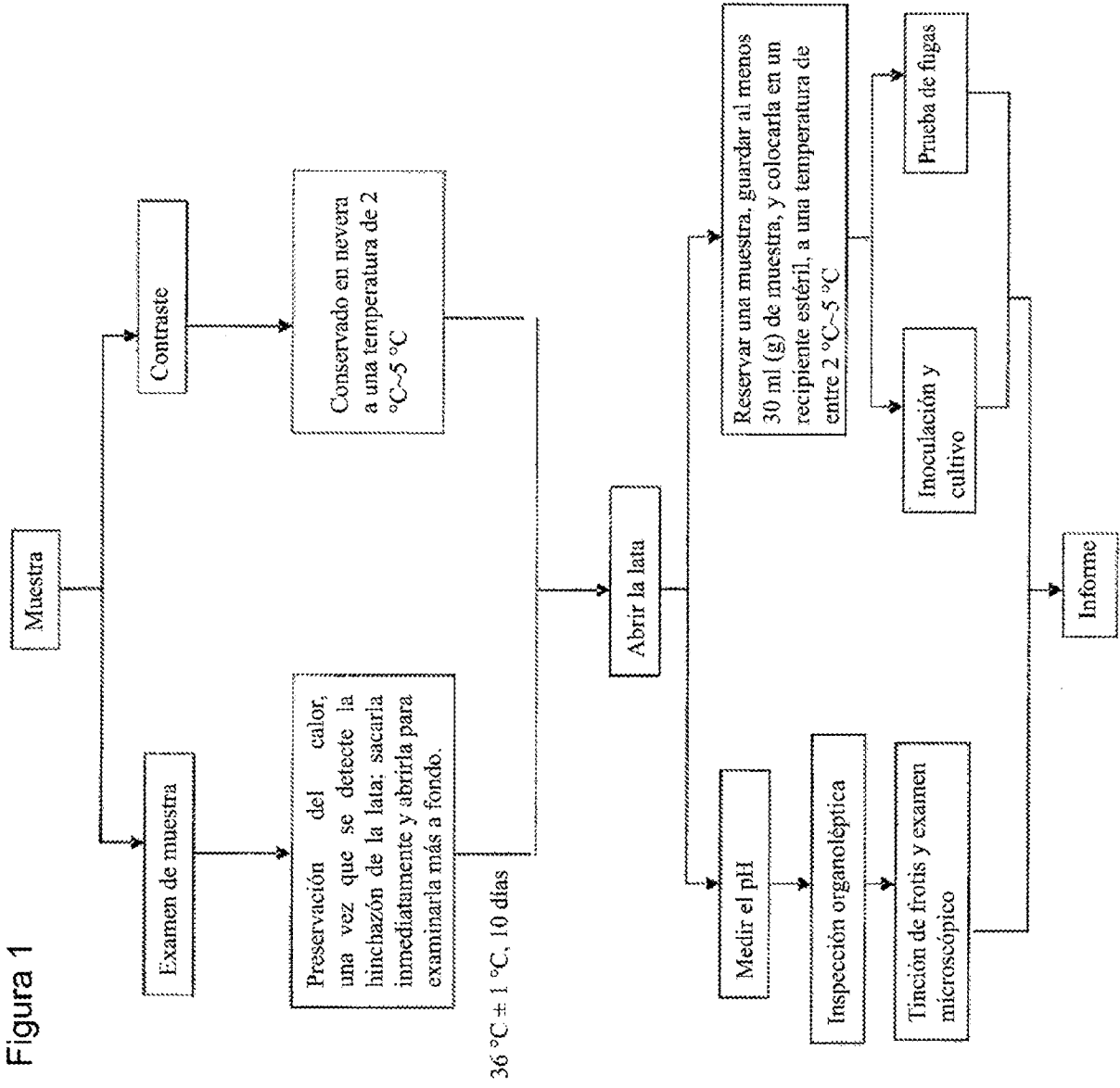
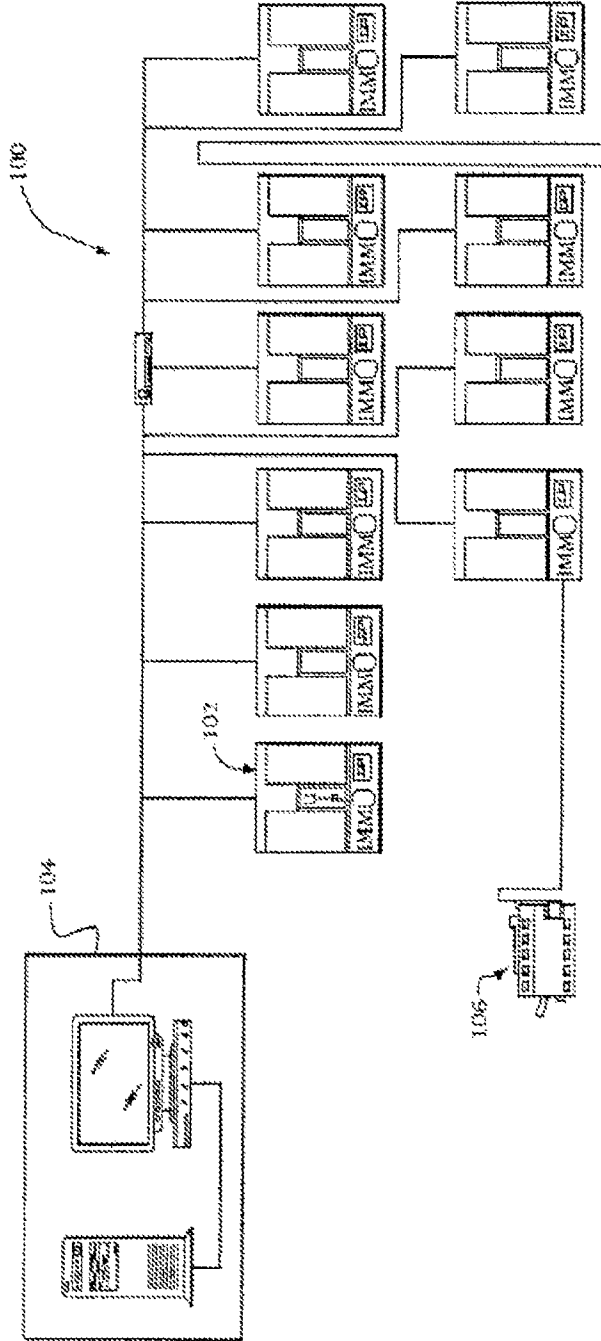
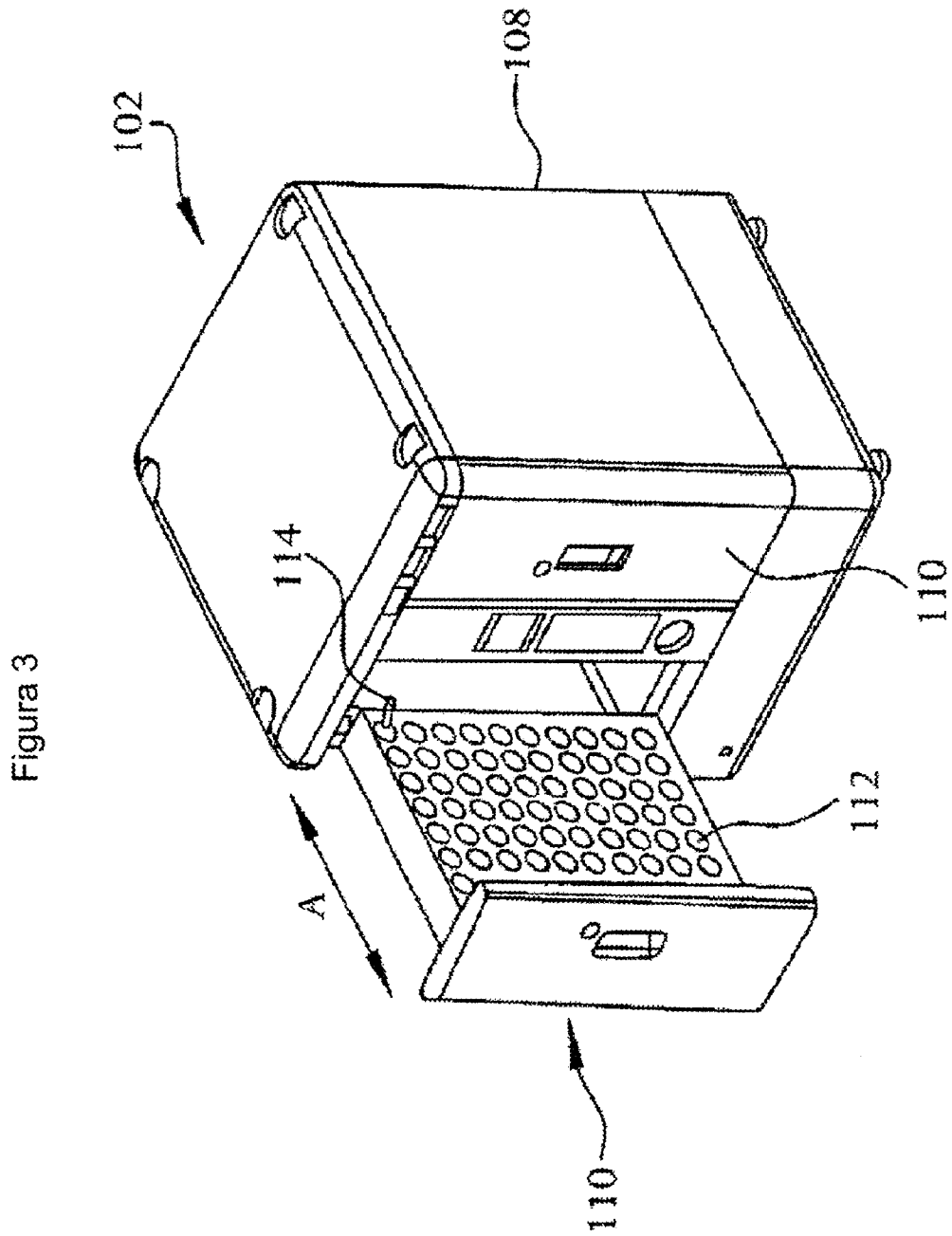


Figura 2





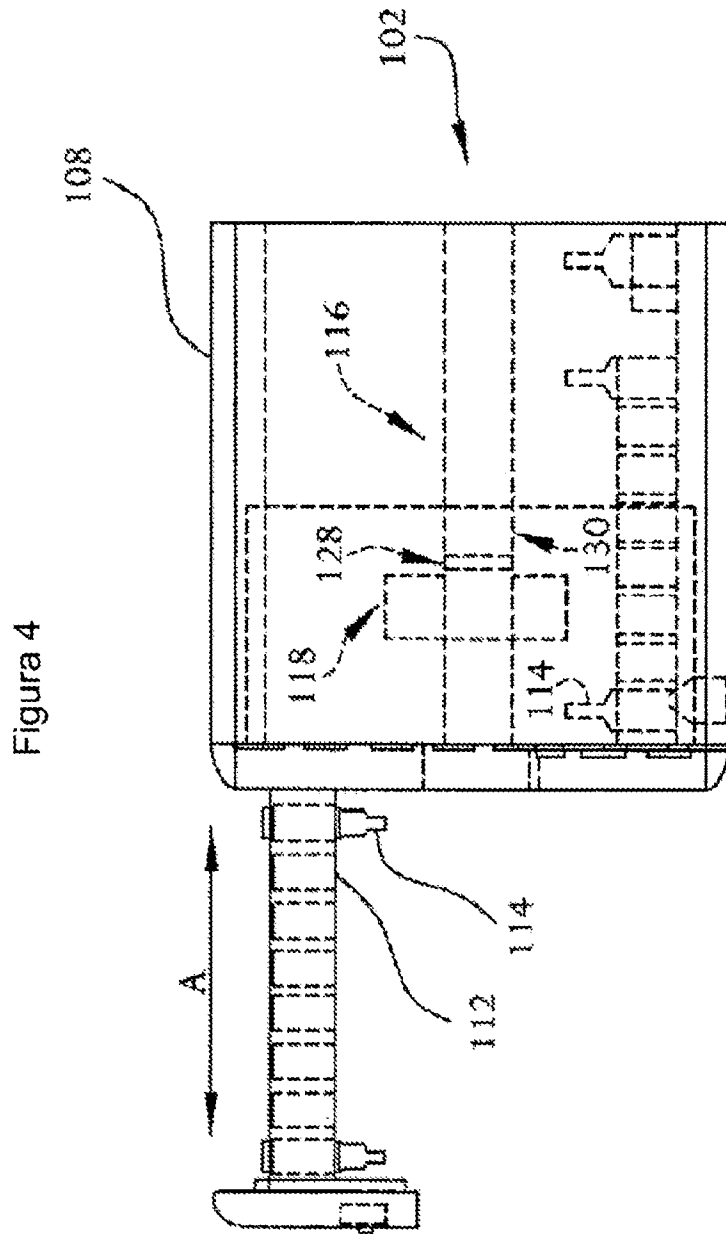


Figura 5

