

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **1 217 044**

21 Número de solicitud: 201831031

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD

U

22 Fecha de presentación:

03.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.09.2018

71 Solicitantes:

SANCHIS SOLERA, Jorge (100.0%)
Puerto de Navacerrada, 32
28210 Valdemorillo (Madrid) ES

72 Inventor/es:

SANCHIS SOLERA, Jorge

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Ignacio

54 Título: **CALDO MINIMIZADOR DEL EFECTO MATRIZ Y DEL ANTAGONISMO DE LA FLORA
ACOMPañANTE EN ALIMENTOS**

ES 1 217 044 U

DESCRIPCIÓN

CALDO MINIMIZADOR DEL EFECTO MATRIZ Y DEL ANTAGONISMO DE LA FLORA ACOMPAÑANTE EN ALIMENTOS

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a una composición o caldo especialmente concebida para minimizar el efecto matriz en alimentos, así como para compensar los metabolitos de la flora antagónica para activar la cepa diana.

15 El objeto de la invención es proporcionar un caldo diluyente para el análisis de muestras alimentarias que tenga un efecto neutralizante sobre conservantes así como sobre los metabolitos de la flora antagónica acompañante en orden a permitir llevar a cabo análisis microbiológicos de alimentos con garantías de que no se produzcan falsos negativos en dichos análisis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 El efecto matriz se define como el efecto de todos los componentes de la muestra distintos al analito en la medida de una cantidad (de analito). A la hora de aplicar un método analítico, el efecto matriz se traduce en una diferencia de sensibilidad del mismo cuando se prepara un calibrado en un disolvente frente a uno preparado en el mismo entorno de la muestra.

25

Este efecto es sumamente perjudicial a la hora de llevar a cabo análisis microbiológicos en alimentos, ya que provoca falsos negativos.

30 En tal sentido, un ejemplo típico del efecto matriz es la *Listeria monocytogenes* en pimentón: por más concentración de cepa que se añada al pimentón, ni por los métodos ISO ni por métodos ISO mejorados, se es capaz de detectarla.

35 Esto es debido al alto poder inhibitorio intrínseco de la muestra, de manera que muchos de los conservantes utilizados en los alimentos inhiben el desarrollo microbiano, pero no lo eliminan, es decir, sólo los convierten en células letárgicas, que no se activan hasta que cambia la concentración, por ejemplo al mezclarlos y comerlos. Esto no afecta sólo a los

esporulados, afecta a todo tipo de microorganismos. Y no es un ejemplo aislado, ya que el ajo, las aromáticas, las especias, los picantes, el vinagre, la sal, el azúcar... se añaden más como conservantes que como saborizantes, aunque nos hemos acostumbrado tanto a sus sabores que creemos que es al revés.

5

En el caso de la flora antagónica, y de acuerdo con determinados estudios, se ha comprobado como el *Penicillium candidum* impide el desarrollo de mohos verdes en el fuet.

10 El *Penicillium camembertii* impide el crecimiento de mohos desagradables alergénicos o toxigénicos en el queso, ciertas acidolácticas impiden el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en jamones y otros alimentos.

15 El hecho de que todo esto no se tenga en cuenta en los protocolos oficiales de análisis microbiológico de alimentos, está provocando numerosos casos de falsos negativos de diversos patógenos en los laboratorios de todo el mundo como se demuestra ronda tras ronda en los ensayos intercomparativos de muestras ciegas para el aseguramiento de la calidad de los análisis microbiológicos de los laboratorios participantes.

20 Hasta la fecha no se conocen caldos inactivadores de los conservantes cuyo efecto secundario sea también neutralizar los metabolitos de la flora antagónica acompañante en alimentos.

25 Existe un tercer problema y que consiste en que a veces los recuentos (de aerobios, enterobacterias, hongos, coliformes o de lo que sea) son más altos cuando se hacen en la dilución (-2) que en la solución madre (-1), dejando perplejos a los analistas, que creen haberse confundido, ya que en teoría debería ser al revés: menos recuento a mayor dilución (menor concentración de alimento).

30 Esto es otra consecuencia del efecto matriz extremo, del poder inhibitorio intrínseco exagerado de una muestra, que a pesar del caldo neutralizante, cuanto más alimento haya presente en el caldo, más sigue inhibiendo y menos microorganismos son capaces de crecer en los medios de cultivo posteriores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 El caldo minimizador del efecto matriz y del antagonismo de la flora acompañante en alimentos que se preconiza resuelve de forma plenamente satisfactoria la problemática anteriormente expuesta, en base a una solución sencilla pero eficaz, constituyendo un caldo diluyente capaz de inactivar todo el conjunto de conservantes naturales, artificiales y metabolitos, que inhiben el desarrollo microbiano sin eliminar dichos microbios.

10 Para ello, el caldo de la invención presenta la siguiente composición para un litro de agua destilada:

- Peptonas y extractos proteicos..... 0,001-20 g/L
- Extracto de Levadura0,001-10 g/L
- Cloruro sódico.....0,001-15 g/L
- 15 • Dextrosa0,001-15 g/L
- Fosfato disódico.....0,001-9 g/L
- Fosfato monopotásico.....0,001-1,5 g/L
- Polisorbato Tween 80.....0,001-10 g/L
- Mezcla de inactivadores de amplio espectro..... 0,001-15 g/L

20 Estando la mezcla de inactivadores de amplio espectro compuesta por una mezcla sinérgica de Lecitina, Tioglicolato sódico, L-Cystina, Tiosulfato sódico, Bi-sulfito sódico, Histidina, Tritón X100-Octoxynol 9 y otros conocidos neutralizantes de los conservantes, indicados en las Normas ISO de microbiología cosmetica.

25 Ajustar a pH: $7,3 \pm 0,6$

Este medio, según sea el agua destilada empleada, puede requerir hasta 7 ml de NaOH 1 N o de ClH 1 N por cada litro de medio final.

30 Solo resta señalar por último que, aunque un caldo inactivador como el que propone la invención anula la acción de los conservantes (permitiendo detectar los patógenos vivos), a veces hace falta que la solución madre sea 1:100 en lugar de 1:10 para que llegue a ser efectivo.

35

EJEMPLO DE REALIZACIÓN PRÁCTICA DE LA INVENCION

A modo de ejemplo, para obtener un caldo minimizador de efecto matriz en alimentos se añadieron los siguientes componentes en un litro de agua destilada:

5

- Polipeptona bacteriológica 15,0 g
- Extracto de Levadura5,0 g
- Cloruro sódico..... 7,5 g
- 10 • Dextrosa.....0,01 g
- Fosfato disódico..... 4,5 g
- Fosfato monopotásico.....0,75 g
- Polisorbato Tween 80..... 5,0 g
- Mix de inactivadores de amplio espectro..... 6,3 g

15

A la mezcla obtenida hubo que añadirle 3 ml de NaOH 1 N hasta alcanzar un pH de 7,3.

20

De esta forma se obtuvo un caldo mediante el que se pudo detectar la presencia de varias cepas de Salmonella que con agua Peptonada Tamponada convencional dieron falso negativo.

25

En un servicio intercomparativo, varios participantes indican que, al no obtener presencia de ningún patógeno en sus primeros análisis, pero observar como crecían 10 veces más colonias de aerobios a dilución (-2) que en la dilución madre, repitieron los experimentos con los más variados trucos para ver si conseguían ver crecer algo. Los que creyeron esos resultados falsamente negativos sin levantar acciones correctoras en su análisis (4 participantes), han obtenido calificaciones deficientes. Si no se hubiera tratado de un intercomparativo, donde casi todos los participantes trabajan con “sospechas de falsos negativos”, sino que se hubiera tratado de muestras normales, muchos más laboratorios hubieran dado falsos negativos, al no repetir la analítica por creerla normal.

30

REIVINDICACIONES

1^a.- Caldo minimizador del efecto matriz y del antagonismo de la flora acompañante en alimentos, caracterizado porque el mismo presenta la siguiente composición para cada litro de agua destinada:

5

- Peptonas y extractos proteicos..... 0,001-20 g/L
- Extracto de Levadura0,001-10 g/L
- Cloruro sódico.....0,001-15 g/L
- 10 • Dextrosa0,001-15 g/L
- Fosfato disódico.....0,001-9 g/L
- Fosfato monopotásico.....0,001-1,5 g/L
- Polisorbato Tween 80.....0,001-10 g/L
- Mezcla de inactivadores de amplio espectro..... 0,001-15 g/L

15

2^a.- Caldo minimizador del efecto matriz y del antagonismo de la flora acompañante en alimentos, según reivindicación 1^a, caracterizado porque la mezcla de inactivadores de amplio espectro consiste en una mezcla sinérgica de Lecitina, Tioglicolato sódico, L-Cystina, Tiosulfato sódico, Bi-sulfito sódico, Histidina, Tritón X100-Octoxynol 9 y similares.

20

3^a.- Caldo minimizador del efecto matriz y del antagonismo de la flora acompañante en alimentos, según reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque es susceptible de ser diluido en una proporción 1:10 y también en una proporción 1:100 para minimizar aún más el efecto matriz y de la flora antagónica en muestras de alimentos con elevado poder inhibitorio intrínseco.

25