

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 354**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07734972 .8**
96 Fecha de presentación: **10.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2041297**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Procedimiento colorimétrico para detección de carga bacteriana**

30 Prioridad:
11.07.2006 IT BO20060531

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.03.2012

73 Titular/es:
M.B.S. S.r.l.
Via Giacomo Peroni 386
Rome , IT

72 Inventor/es:
ANTONINI, Giovanni;
MARI, Alberto y
MASSUCCI, Maria Teresa

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

ES 2 377 354 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

Procedimiento colorimétrico para detección de carga bacteriana

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento colorimétrico para detección de carga bacteriana.

10 Técnica anterior

En el sector de la alimentación cada vez es más necesario garantizar la seguridad en términos de higiene y salud de los alimentos y el agua.

15 Tanto los países tecnológicamente avanzados como los países en desarrollo, por diversos motivos, requieren un control microbiológico rápido y barato de los alimentos y el agua. Hasta ahora, no se dispone en el mercado de procedimientos de análisis microbiológico con características que combinen simplicidad de uso, rapidez del análisis y bajos costes.

20 Con mayor frecuencia, el análisis de alimentos y agua implica la identificación de los denominados "indicadores", es decir microorganismos que, cuando están ausentes, proporcionan una indicación fiable de la ausencia de microorganismos patogénicos. Entre los "indicadores", el más importante es la búsqueda cuantitativa para microorganismos totales, coniformes/E.coli y estafilococos positivos a la coagulasa (St. aureus). La detección de dichos microorganismos cubre aproximadamente el 40-50 % de los análisis microbiológicos en el sector del agua y los alimentos.

El procedimiento tradicional para la detección de microorganismos presentes en un líquido (p. ej., agua) o en un sólido (alimentos) se basa en la detección de la multiplicación microbiana. De hecho, los microorganismos, normalmente invisibles a simple vista, se pueden detectar cuando, como resultado de la multiplicación por sucesivas divisiones a partir de una única célula (clones) se forman agregados de billones de células (colonias), visibles a simple vista. Los procedimientos tradicionales basados en la multiplicación bacteriana se denominan, por tanto, recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). La detección específica de un tipo concreto de microorganismo se garantiza por el uso de medios nutritivos selectivos. La multiplicación de los microorganismos se puede observar fácilmente a simple vista en medio selectivo, tanto sólidos (procedimiento de recuento en placas para análisis microbiológico de líquidos) como líquidos (procedimiento del "número más probable" para el análisis microbiológico de sólidos). En el procedimiento de recuento en placa, en general, los medios sólidos selectivos están dentro de cápsulas transparentes. Se deposita una gota de la muestra de líquido que se va a analizar (concentrado en filtros en caso necesario) sobre el medio nutritivo selectivo y la multiplicación de los microorganismos se hace visible en forma de "colonias", cada una formada por billones de células, todas derivadas de al menos 20-22 divisiones sucesivas de una única célula (clones). Estos clones aparecen como pequeñas protuberancias con dimensiones de 0,5 a 1 mm o más. A partir del número de colonias presente en una única cápsula, por lo que se puede seguir el número de microorganismos presente inicialmente en la gota de la muestra de líquido depositada sobre el medio nutritivo.

45 En el procedimiento del "número más probable", los medios líquidos selectivos están dentro de tubos transparentes. Una cantidad homogeneizada pequeña de la muestra de sólido que se va a analizar se añade a estos tubos de ensayo. La multiplicación de los microorganismos viene indicada por la aparición de una turbidez extendida del medio nutritivo contenido en el tubo de ensayo. Por medio tablas realizadas con una base estadística, el "número más probable" de microorganismos inicialmente presentes en la muestra de sólido se puede seguir según la presencia o ausencia de la turbidez en los diferentes tubos de ensayo a diluciones diferentes de la muestra que se va a analizar.

50 A partir de lo anterior es evidente que estos procedimientos son exigentes en términos del proceso de trabajo y requieren la presencia de un laboratorio equipado con el fin de esterilizar previamente el material que se va a usar y mantenerlo en condiciones estériles. La ausencia de esterilidad conduciría a contaminación microbiana desde fuera de la muestra, lo que hace que el análisis realizado no tenga ningún significado.

60 Actualmente se usan procedimientos alternativos, como el basado en el uso de medios cromogénicos. Aunque este también es un procedimiento de cultivo, el uso de medios cromogénicos para el análisis microbiológico a menudo puede considerarse un procedimiento "rápido", ya que permite la optimización de la búsqueda por microorganismos específicos sin la necesidad de realizar subcultivos y, en ocasiones, incluso sin la necesidad de pruebas de

confirmación.

De los procedimientos rápidos, el uso de anticuerpos es el que tiene mayor impacto en el sector de la alimentación. La especificidad de los anticuerpos monoclonales, la simplicidad y versatilidad de la reacción antígeno-anticuerpo ha permitido el desarrollo de numerosos procedimientos de análisis inmunológicos. No obstante, estos procedimientos sufren los inconvenientes respecto a la necesidad del personal y equipos especialistas y del alto nivel de sensibilidad de al menos 10^4 células/ml.

La solicitud de patente de EE.UU. US3936356 se refiere a la identificación de bacterias desconocidas por medio de reacciones bioquímicas realizadas de forma simultánea. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para transformar los resultados de las reacciones bioquímicas en un perfil numérico representativo de la bacteria que se está analizando y, después, consultar un Registro de Perfiles para obtener la identificación.

Por último, más recientemente se han usado procedimientos de análisis molecular genéticos. Estos procedimientos comprenden hibridación de ADN/ADN, análisis de las secuencias de ARNr (ARN ribosómico), uso de sondas oligonucleotídicas complementarias al ARNr o a otros genes diana, ribotipificación y reacción en cadena de la polimerasa-PGR. Estos procedimientos, aunque tienen la ventaja de un límite de sensibilidad bajo (10^2 células/ml), no resuelven el problema de la necesidad de personal altamente especializado para el uso de entornos controlados de equipos complejos para evitar la contaminación de la muestra y, además, a menudo no son capaces de distinguir entre microorganismos vivos o muertos.

El objetivo de la presente invención es idear un procedimiento para la detección de carga bacteriana, cuyas características técnicas sean tales que lo conviertan en eficiente, económico y, al mismo tiempo, fácil de usar sin requerir la intervención de personal especialista.

El sujeto de la presente invención es un procedimiento para la detección de carga bacteriana, cuyas características básicas se especifican en la reivindicación 1 y cuyas características preferidas y/o complementarias se especifican en las reivindicaciones 2 y 3.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para fines no limitantes ilustrativos, para una mejor comprensión de la invención con la ayuda de las figuras del dibujo adjunto, en las que:

la figura 1 ilustra de forma esquemática el dispositivo sujeto de la presente invención;

la figura 2 es una vista esquemática lateral de la unidad de análisis del dispositivo de acuerdo con una realización preferida;

la figura 3 es una vista en planta esquemática de la unidad de análisis de la figura 1;

la figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra las operaciones realizadas por la unidad de comandos/control central del dispositivo de la presente invención; y

la figura 5 es una sección de un vial de acuerdo con la presente invención.

En la figura 1, 1 indica en general el dispositivo de análisis de acuerdo con la presente invención. El dispositivo (1) comprende una pluralidad de unidades de análisis (2), una unidad central (3) de comandos/control y medios de visualización (4) de los resultados obtenidos.

Como se ilustra esquemáticamente en las figuras 2 y 3, cada una de las unidades de análisis (2) comprende una pared cilíndrica (5) revestida con una capa de material reflectante (6) y que define una cavidad de análisis (7) que aloja un vial en el que la muestra para el análisis reacciona con el reactivo de la presente invención. La unidad de análisis (2) comprende, además, un termostato ilustrado esquemáticamente por 8, adecuado para mantener la cavidad de análisis (7) a una temperatura entre 25 y 45 °C, cuatro LED de emisión (9), dos de los cuales emiten a 560 nm y dos emiten a 660 nm, un fotodiodo receptor (10) de luz visible de alto rendimiento y un circuito eléctrico para proporcionar potencia y amplificar la señal indicada esquemáticamente por 11. El uso de al menos dos longitudes de onda permite la evaluación del cambio de color, incluso cuando la solución de reactivo más la muestra está turbia. De este modo, es posible realizar una lectura alternativa en al menos dos longitudes de onda y restar la absorción específica por la turbidez de la muestra para determinar el cambio de color. La posición relativa del fotodiodo receptor (10) y los LED emisores (9) permiten la detección de la radiación tanto de acuerdo con el fenómeno de la reflectancia como de acuerdo con el fenómeno de transmitancia, garantizando de este modo mayor eficiencia de detección.

La figura 4 muestra el diagrama de bloque respecto a los parámetros que se van a comunicar a la unidad central (3) y las operaciones que va a realizar la misma.

5 En particular, la unidad central (3) de comandos/control constituye la interfaz del dispositivo con el operador y está conectada al termostato (8), a los LED emisores (9) y al fotodiodo receptor (10).

10 Con referencia al diagrama de bloque de la figura 4, el alojamiento de los viales indicados por I1, la elección del tipo de análisis indicado por I2 y el inicio del análisis indicado por I3 debe fijarse en la unidad central (3). Después, las operaciones realizadas por la unidad central (3) son: la orden a la unidad de análisis (2) para iluminar la muestra por medio de los LED emisores (9) indicados por O1, lectura de la intensidad luminosa por medio del fotodiodo receptor (10) indicado por O2, cálculo de la absorción específica indicada por O3 y comparación con la absorción a tiempo cero indicada por O4. Si la operación O4 tiene como resultado ausencia de cambio de color, la unidad central (3) comunica la ausencia de carga bacteriana (operación indicada por O5) mediante los medios de visualización (4), mientras que si la operación O4 tiene como resultado un cambio de color, la unidad central (3) calcula la concentración de la carga bacteriana (operación indicada por O6) y comunica el resultado (operación indicada por O7) mediante los medios de visualización (4).

20 La operación O6 se basa en la correlación demostrada entre el número de bacterias presentes en la muestra y el tiempo necesario para el cambio de color del reactivo. Sobre la base de esta correlación, se han realizado líneas de calibración específicas para las diferentes cepas bacterianas, relacionando el logaritmo de la concentración de las bacterias presentes en la muestra con el tiempo necesario para el cambio de color del reactivo. Los datos de dichas líneas se fijan en la unidad central (3) y se usan por comparación en la operación O6 con los hallazgos de la operación O4.

25 En la figura 5, se indica con el número 12 un vial usado en el procedimiento de la presente invención. El vial (12) comprende una porción contenedor (13) hecha de material transparente y un émbolo (14) adecuado para cerrar o abrir la porción contenedor (13). Tanto la porción contenedor (13) como el émbolo (14) se proporcionan con rosca, indicada por 15 y 16 respectivamente, para acoplar o liberar por medio de una acción de roscado o desenroscado, respectivamente.

30 El émbolo (14) comprende una pared lateral (18) de forma cilíndrica en la que se obtiene la rosca (16), un émbolo de depósito (19) fijado a la pared lateral (18) y un émbolo de cizalladura (20) que contiene la sustancia de esterilización y adecuado para entrar dentro de la pared lateral (18) para permitir la cizalladura de una membrana (21) en el fondo del émbolo del depósito (19) y la consiguiente descarga de la sustancia de esterilización dentro de la porción contenedor (13).

35 El émbolo del depósito (19) comprende un cuerpo de forma de taza (19a) fijado a la pared lateral (18) mediante la acción de un diente de cierre periférico (22) que se extiende desde la propia pared lateral (18).

40 El émbolo de cizalladura (20) comprende un cabezal activador (23) que presiona el operador y una pared cilíndrica (24) que tiene un extremo de cizalladura (25) adecuado para cizallar la membrana (21) en el fondo del cuerpo (19a) con forma de taza.

45 En otras palabras, para depositar la sustancia de esterilización en la porción contenedor (13), el operador debe ejercer una presión sobre el cabezal activador (23) y causar la cizalladura de la membrana (21) en la parte inferior mediante el extremo de cizalladura (25) y la consiguiente salida de flujo de la sustancia de esterilización. A este respecto, deberá especificarse que la sustancia de esterilización preferida es dicloroisocianuro.

50 La presencia de las roscas (15 y 16) garantiza una acción práctica de abertura y cierre de la porción contenedor (13) por el émbolo (14) y, al mismo tiempo, evita la abertura accidental cuando el émbolo (14) está apretado.

55 El vial tiene un volumen de trabajo de aproximadamente 13 ml y contiene el reactivo en una cantidad variable entre 1 y 2 g, que, cuando se realiza el análisis, se añadirá a 10 ml de la muestra de líquido o a 0,1-1 g de la muestra de sólido con la adición de 9-10 ml de agua desionizada estéril.

Los viales, como se han descrito anteriormente, se pueden vender listos para usar y, por tanto, ya esterilizados y con el reactivo para análisis.

60 Más adelante se dan cuatro ejemplos de reactivo de la presente invención. En particular, el reactivo 1 es específico y se puede usar para detectar todas las bacterias con la excepción de las bacterias anaerobias obligatorias, el reactivo 2 es específico para la especie *Staphylococcus*, el reactivo 3 es específico para las enterobacterias y el reactivo 4 es específico de las coliformes.

ES 2 377 354 T3

REACTIVO 1 CBT (1,24 g por vial de 13 ml)

Tipo de componente	Componente	g/l
Fuente de aminoácidos	Infusión de cerebro-corazón	10
Fuente de aminoácidos	Extracto de levaduras	1
Sistema tampón	HEPES*	10
Sistema tampón	TRIS**	2,5
Indicador	TMPD***	0,25
Líquido orgánico	Aceite mineral blanco	100 ml

REACTIVO 2 Staphylococcus aureus (1,85 g por vial de 13 ml)

Tipo de componente	Componente	g/l
Fuente de aminoácidos	Infusión de cerebro-corazón	20
Fuente de aminoácidos	Manitol	10
Agente selectivo	Polimixina B	0,3
Agente selectivo	NaCl	50
Sistema tampón	K ₂ HPO ₄	5
Indicador	Rojo fenol	0,3
Indicador	TMPD***	0,25
Líquido orgánico	Aceite mineral blanco	100 ml

5

REACTIVO 3 Enterobacterias (1,53 g por vial de 13 ml)

Tipo de componente	Componente	g/l
Fuente de aminoácidos	Infusión de cerebro-corazón	20
Fuente de glúcidos	Glucosa	10
Agente selectivo	Colato sódico	10
Sistema tampón	HEPES*	10
Sistema tampón	TRIS**	2,5
Indicador	TMPD***	0,25
Líquido orgánico	Aceite mineral blanco	100 ml

REACTIVO 4 Coli (1,53 g por vial de 13 ml)

Tipo de componente	Componente	g/l
Fuente de aminoácidos	Infusión de cerebro-corazón	20
Fuente de glúcidos	Lactosa	10
Agente selectivo	Colato sódico	10
Agente selectivo	Triptófano	0,07
Sistema tampón	HEPES*	10
Sistema tampón	TRIS**	2,5
Indicador	Rojo fenol	0,3
Indicador	TMPD***	0,25
Líquido orgánico	Aceite mineral blanco	100 ml

*HEPES: Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

** TRIS: tris (hidroximetil)aminometano

*** TMPD: N, N, N' N'-tetrametil-p-fenilendiamina clorhidrato (N,N,N',N'-tetrametil benceno-1,4-diamina clorhidrato)

- 10 Como será obvio para un experto en la técnica, las composiciones de los reactivos 1-4 constituyen las mejores realizaciones en relación con los tipos de bacterias mencionados. No obstante, la presente invención se refiere a las composiciones de los reactivos tal como se reivindican.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de carga bacteriana que comprende las fases de añadir una muestra que se va a analizar a un reactivo de análisis en un contenedor de reacción adecuado esterilizado adecuadamente, termofijar dicho contenedor de reacción a una temperatura entre 25 y 45 °C, y verificar el cambio de color de dicho reactivo de análisis, estando dicho procedimiento **caracterizado porque** dicho reactivo de análisis es una solución acuosa que comprende de 1 a 100 g/l de una fuente de aminoácidos escogida del grupo que consiste en peptonas de carne, peptonas de vegetal, hidrolizados de vegetal, hidrolizados de caseína, triptosa, triptonas y extracto de levaduras; de 0 a 200 g/l de un sistema tampón adecuado para mantener el pH global entre 5,5 y 8,5; de 0,03 a 3 g/l de un indicador rédox con potencial entre -250 y +250 mV; de 0 a 200 g/l de un agente selectivo para la detección de una clase específica de bacterias; y un compuesto líquido orgánico no miscible con agua y con una densidad menor que la del agua y adecuada para separar la fase acuosa de una fase gaseosa existente antes del análisis o formada durante la reacción; en el que dicho procedimiento comprende una fase de esterilización en la que, una vez que se ha completado el análisis, se añade una sustancia de esterilización en el contenedor de reacción, siendo dicho contenedor de reacción un vial (12) desechable que contiene dicho reactivo de análisis y que comprende una porción contenedor (13) hecha de un material transparente y un émbolo (14) que se pueden acoplar entre sí por medio de respectivas roscas (15, 16); dicho émbolo (14) comprende un depósito que aloja dicha sustancia de esterilización adecuada para vaciarse en la porción contenedor (13) por medio de una acción de cizalladura adecuada; comprendiendo dicha fase de verificar el cambio de color el cálculo del tiempo necesario para que se produzca el cambio de color de dicho reactivo de análisis.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque dicho reactivo de análisis comprende una fuente de glúcidos escogidos de glúcidos monoméricos u oligoméricos metabolizables por los microorganismos; y un indicador de pH con intervalo de cambio de color entre pH 4,0 y pH 9,0.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dicho émbolo (14) comprende una pared lateral (18) de forma cilíndrica en la que se obtiene la rosca (16), un émbolo de depósito (19) fijado a la pared lateral (18) y un émbolo de cizalladura (20) que contiene la sustancia de esterilización y adecuado para entrar dentro de la pared lateral (18) para permitir la cizalladura de una membrana (21) en el fondo del émbolo del depósito (19) y la consiguiente descarga de la sustancia de esterilización dentro de la porción contenedor (13).

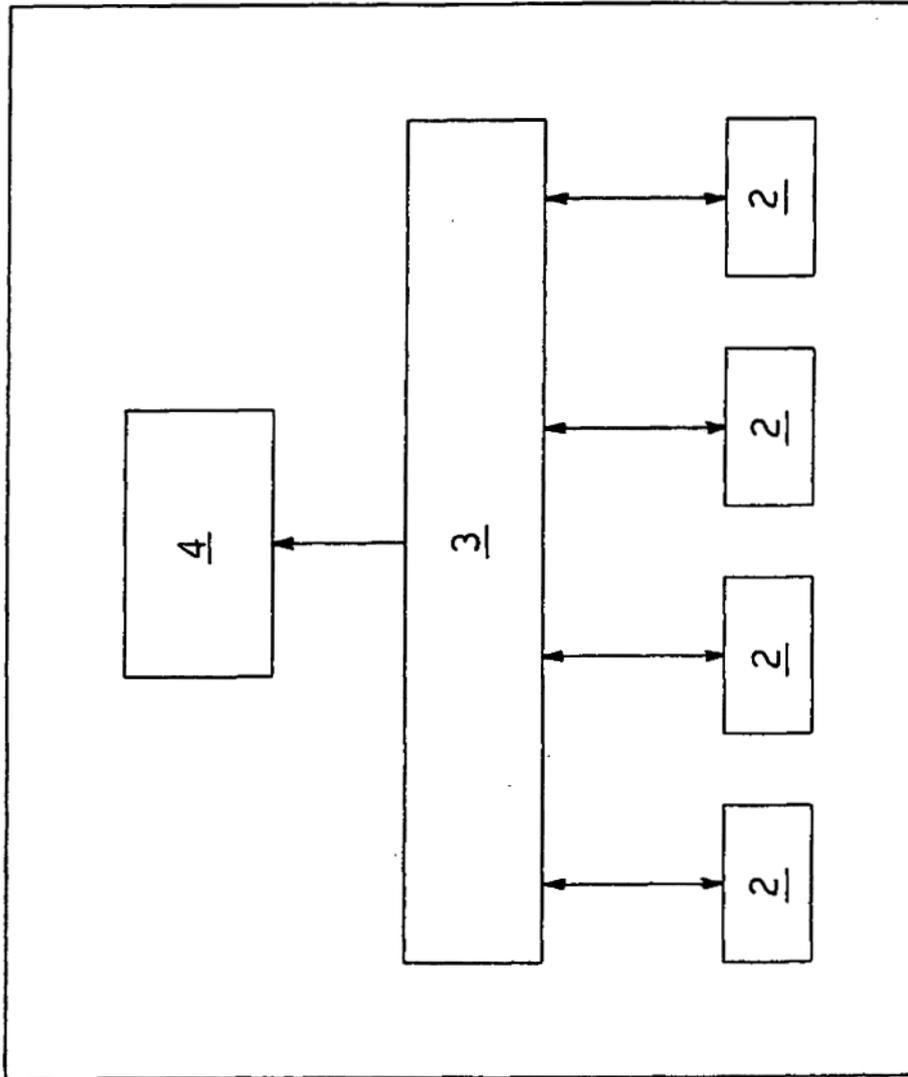


Fig.1

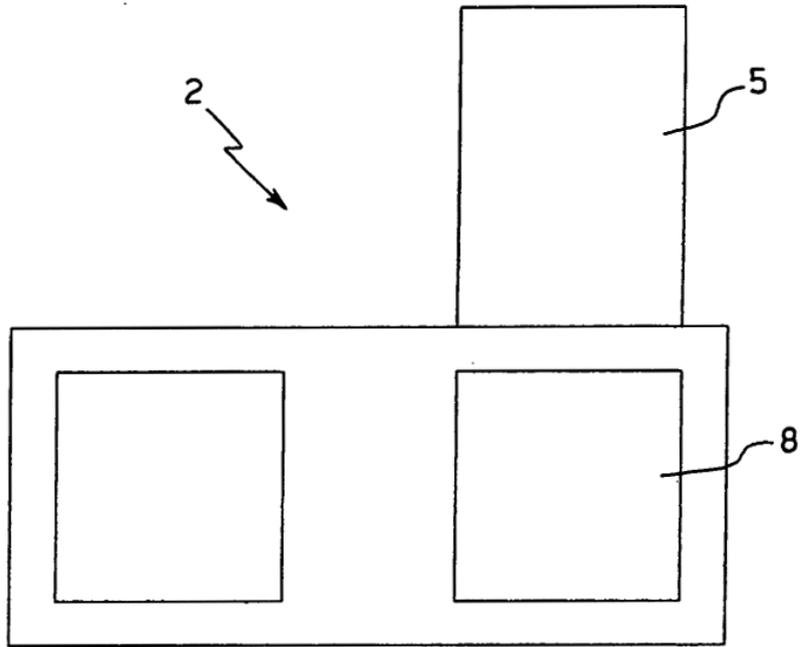


Fig.2

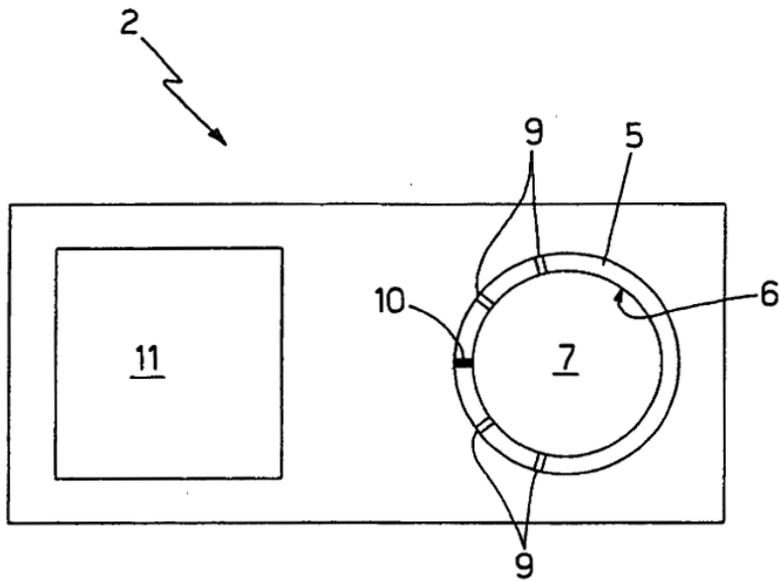


Fig.3

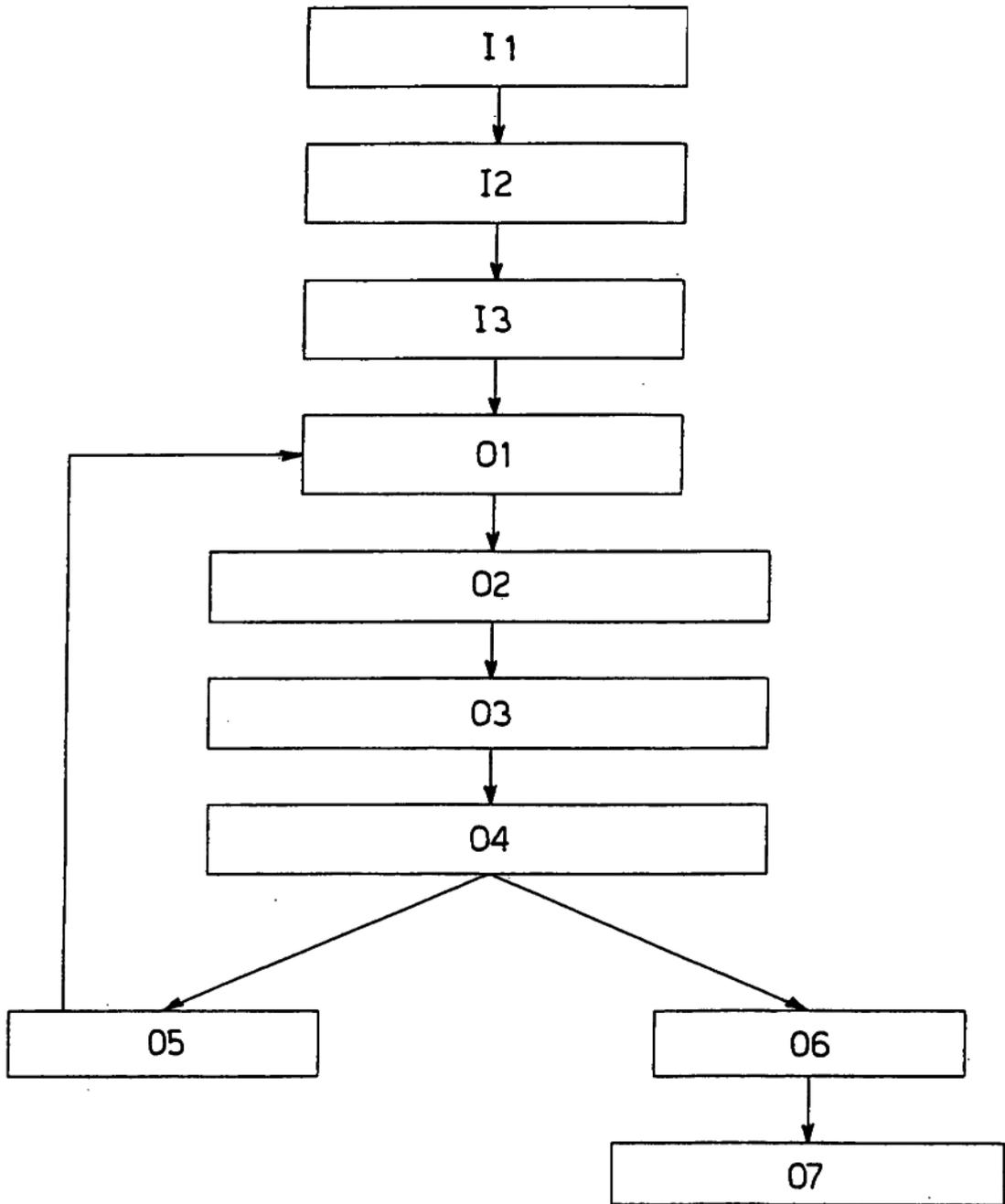


Fig.4

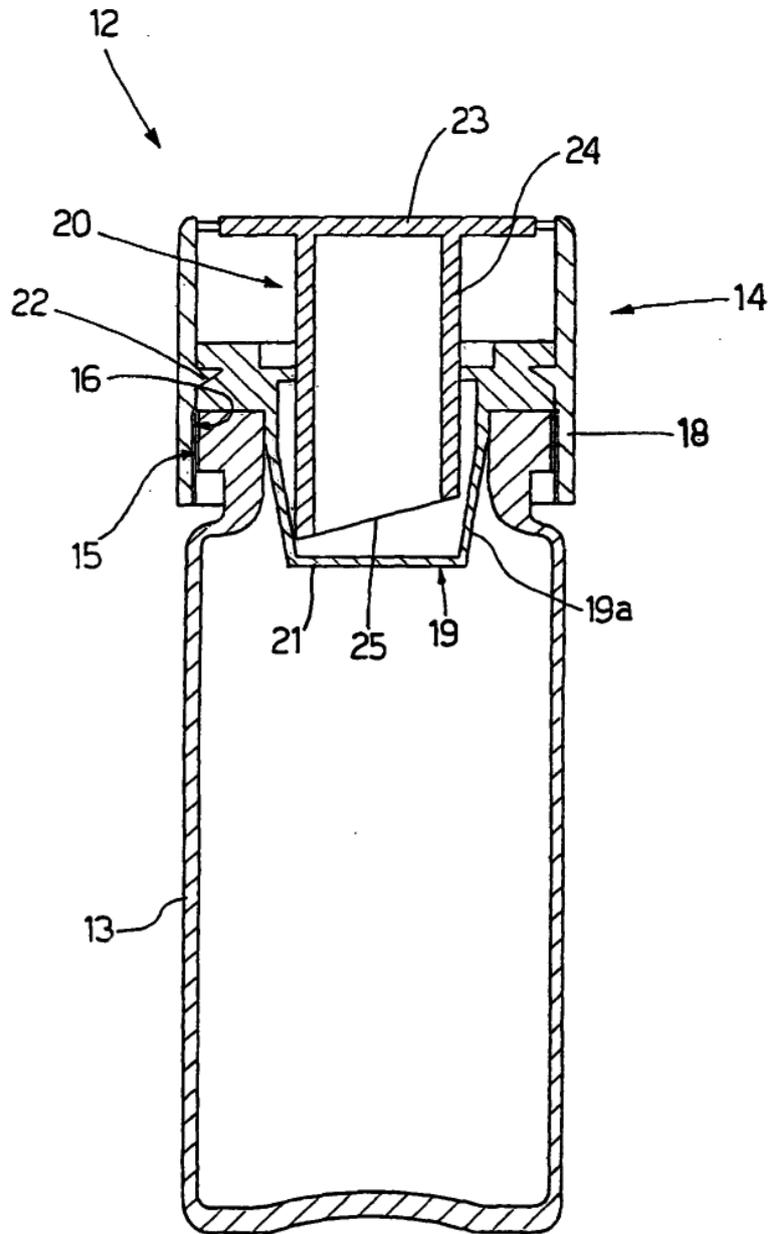


Fig.5