

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 516**

21 Número de solicitud: 201031680

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **15.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
11.06.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:
**GIL MUÑOZ, M^a ISABEL;
SELMA GARCÍA, VICTORIA;
LÓPEZ-GÁLVEZ, FRANCISCO;
ALLENDE PRIETO, ANA y
BELTRÁN RIQUELME, DAVID**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **MÉTODO Y SISTEMA ASOCIADO PARA LA DETECCIÓN Y EL ANÁLISIS DE AGENTES
PATÓGENOS Y/O CAPACES DE CAUSAR EL DETERIORO EN ALIMENTOS VEGETALES.**

57 Resumen:

Método y sistema asociado para la detección y el análisis de agentes patógenos y/o capaces de causar el deterioro en alimentos vegetales.

La presente invención se refiere a un método para la detección de agentes potencialmente patógenos y/o capaces de causar el deterioro en una muestra vegetal, representativa de uno o varios lotes de producto vegetal, caracterizado porque comprende la concentración de una muestra vegetal mediante centrifugación y el análisis de la presencia o la cantidad de los agentes potencialmente patógenos y/o capaces de causar el deterioro en la muestra concentrada obtenida. Asimismo, la presente invención se refiere a un sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o capaces de causar el deterioro en una muestra vegetal, para llevar a cabo dicho método.

ES 2 382 516 A1

DESCRIPCIÓN

Método y sistema asociado para la detección y el análisis de agentes patógenos y/o capaces de causar el deterioro en alimentos vegetales

5 La presente invención pertenece al campo de la Biotecnología y se refiere a un método para la detección de agentes patógenos y/o capaces de causar el deterioro en alimentos vegetales y a un sistema que lleva a cabo dicho método, que permiten mejorar la seguridad biológica y preservar la calidad de los alimentos vegetales mediante la detección de patógenos y/o microorganismos capaces de causar el deterioro de los mismos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Los requisitos relativos a las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y Buenas Prácticas de Distribución (BPD) tienen como objetivo minimizar el riesgo de contaminación de los productos preparados de IV Gama, los cuales están listos para su consumo o para ser cocinados. La implantación de programas de higienización resulta necesaria para garantizar la seguridad de las frutas y hortalizas. A pesar de los avances que se están produciendo en el sector para reducir los riesgos de contaminación, estos productos hortofrutícolas se han visto involucrados en algunos problemas relativos a la salud pública.

15 Los alimentos de IV Gama son productos vegetales, frutas y hortalizas frescas, lavadas, cortadas y envasadas, listos para su consumo. Estos productos de IV Gama no presentan en su procesado ninguna etapa que garantice su inocuidad y es mediante el uso de BPA y de BPF, la forma de evitar la contaminación por microorganismos patógenos en el alimento.

20 Las guías sobre calidad y seguridad de frutas y hortalizas en IV gama, especifican la necesidad de una etapa de lavado o higienización que sea capaz de eliminar la suciedad, los residuos de plaguicidas así como los microorganismos causantes de la pérdida de calidad y del deterioro del alimento. No debe olvidarse que, en las etapas de elaboración de los productos vegetales en IV gama, no se emplean procedimientos que puedan garantizar la asepsia completa, como sería el caso de la utilización de los tratamientos térmicos. Por tanto, el control de la microflora sólo podrá conseguirse mediante una higienización apropiada durante las etapas de elaboración y una adecuada conservación en atmósfera modificada en condiciones de refrigeración.

25 De cara a garantizar la seguridad del consumo de estos alimentos, es necesaria la comprobación de la ausencia de microorganismos patógenos antes de su distribución al consumidor. La incidencia de enfermedades en humanos asociadas al consumo de productos frescos se ha incrementado durante las últimas dos décadas. La identificación de organismos patógenos en los alimentos y en el medio ambiente se ha convertido cada vez en una necesidad más importante. A pesar de que hay muchos métodos de detección disponibles, los microbiólogos de los alimentos deben elegir a menudo entre los métodos cuantitativos y los de identificación, sin la posibilidad de compaginar ambos. Los métodos cuantitativos generalmente se basan en la capacidad de las células bacterianas viables de multiplicarse en un medio rico en nutrientes, aunque en ocasiones se añaden agentes selectivos para favorecer el crecimiento de un grupo específico de organismos, tales como coliformes o enterococos. Estos métodos que requieren un cultivo de enriquecimiento son relativamente inespecíficos, pues cuantifican el número total de organismos pertenecientes a una o varias familias, en la muestra analizada. Los métodos no específicos más comúnmente utilizados son tanto cuantitativos como semicuantitativos, como el método de recuento en placa (por ejemplo el recuento de microorganismos aerobios en placa, de coliformes, de levaduras y de hongos), los ensayos de bioluminiscencia, y las mediciones de impedancia o de conductancia.

30 Stevens y Jaykus (Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30 (1): 7–24) describen los métodos más empleados para la separación, concentración e identificación de patógenos en alimentos, así como sus ventajas e inconvenientes. Entre otros métodos, estos autores describen la centrifugación como un método muy usado para la separación de los microorganismos del producto alimenticio y para su concentración de cara a su análisis. Para la detección de microorganismos patógenos en brotes de alfalfa y en el agua de riego, Johnston y colaboradores describen un método donde se concentran los microorganismos mediante centrifugación, se realiza la extracción del ADN y se detectan e identifican dichos microorganismos por PCR (Journal of Food Protection, 2005. Vol. 68, 11, 2256–2263). Kumar y colaboradores describen un método de detección rápida de *Salmonella typhi* basado en la separación inmunomagnética y en la PCR. Este método emplea agua de aclarado de los vegetales, que es centrifugada para la obtención de los microorganismos, cuyo ADN es extraído para la detección de *S. typhi* por PCR (World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2005, 21 (5):625–628).

35 40 45 50 55 En US7691602 se describe un método para la identificación rápida de microorganismos en una muestra agrícola. Este método permite la identificación rápida y eficaz de microorganismos patógenos sin la necesidad de enriquecer la muestra mediante su cultivo. Además, permite determinar la presencia de cantidades estadísticamente significativas de microorganismos en toda una cosecha. El método descrito en esta patente se basa en el análisis de muestras preferentemente líquidas mediante varias filtraciones consecutivas. Este método consiste en hacer pasar grandes cantidades de muestra, como puede ser el agua del tanque de lavado del vegetal, a través de varios filtros. Los microorganismos retenidos en el filtro se recuperan aplicando un gas a presión sobre el filtro en la dirección opuesta al filtrado de la muestra. Tras sucesivos pasos de filtración y recuperación de los microorganismos retenidos

en el filtro, se identifican los patógenos mediante técnicas bien conocidas, como inmunoensayos, PCR, cultivo, espectrometría de masas y otros.

En WO2009111389 se describe un método y un equipo, el OmniFresh™1000 de Hanson Technologies, para llevar a cabo ese método, que permite analizar el agua del tanque de lavado de vegetales y detectar la presencia de microorganismos patógenos.

La optimización de un método rápido, sensible y eficaz de detección de agentes patógenos en estos alimentos vegetales es necesaria para asegurar su inocuidad. En la actualidad, la mayoría de los procedimientos destinados a comprobar la calidad biológica de los alimentos vegetales precisan de un paso de cultivo de enriquecimiento y llevan más de 8 horas, salvo el método descrito por Hanson Technologies, que permite identificar los agentes patógenos en unas dos horas desde la recogida de la muestra.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal, representativa de al menos un lote de producto vegetal, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a. concentración de una muestra vegetal mediante centrifugación,
- b. análisis de la presencia o la cantidad de los agentes potencialmente patógenos en la muestra concentrada obtenida en (a).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal, para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención.

Las siguientes figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativas de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG 1. Ilustra esquemáticamente los distintos pasos de la cadena de procesado del alimento vegetal, así como los distintos puntos en los que se han obtenido muestras para los estudios comparativos de la presente invención.

FIG 2. Ilustra la curva estándar para la cuantificación por RT-PCR de *E. coli* O157:H7 mediante el kit comercial de Applied Biosystems TaqMan® *E. coli* O157:H7.

FIG 3. Ilustra una realización del sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos en una muestra vegetal de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un nuevo método para garantizar la seguridad biológica de los productos vegetales destinados a la alimentación y a un sistema para llevar a cabo dicho método.

Un primer aspecto de la invención es un método para el análisis directo y eficaz de agentes patógenos o de agentes capaces de causar el deterioro del vegetal, mediante la evaluación del agua después del lavado del vegetal destinado tanto para su consumo en fresco, como congelado, en conserva o para prepararse como producto de IV Gama, así como un dispositivo para llevar a cabo dicho procedimiento.

La presente invención propone el análisis indirecto de uno o varios lotes de producto vegetal mediante el empleo del agua remanente en el vegetal tras el lavado y aclarado del mismo, donde dicho agua es recuperada mediante un proceso de escurrido activo o secado, preferiblemente mediante centrifugación o túnel de aire frío forzado. El hecho de tomar las muestras del agua remanente tras el lavado mediante un procedimiento de escurrido activo o secado, hace que este método sea más sensible a la recuperación y detección de patógenos, ya que este proceso facilita el arrastre de aquellos agentes patógenos que siguen adheridos a la superficie del vegetal tras el proceso de higienización.

Los autores de la presente invención han demostrado que el empleo del agua de escurrido activo o secado del vegetal para la detección y/o cuantificación de la presencia de agentes potencialmente patógenos es mucho más eficiente que el empleo del agua del tanque de lavado o del agua de aclarado.

Los autores de la presente invención tienen datos comparativos de la eficiencia del procedimiento según sea la procedencia de la muestra: agua de lavado, agua de aclarado o agua de escurrido activo en centrifuga, también llamada agua de centrifuga. Estos datos experimentales demuestran que el emplear el agua de centrifuga, tal cual o concentrada, es vital para la eficacia del procedimiento y que, por tanto, no es indiferente el punto de la línea de procesado en el que se obtiene la muestra.

El concentrar las muestras de agua mediante centrifugación permite descartar las bacterias parcial o totalmente lisadas, así como el ADN microbiano libre, reduciendo el riesgo de aparición de falsos positivos. El método de la presente invención permite, por tanto, reducir el número de falsos positivos debido a la detección de restos de agentes patógenos, como puede ser su ADN, que no provienen de organismos viables e infecciosos.

- 5 Un segundo aspecto de la presente invención es un sistema para la detección y análisis de agentes potencialmente patógenos o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal, en una muestra vegetal, que permite llevar a cabo el método del primer aspecto de la presente invención.

10 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal, representativa de al menos un lote de producto vegetal, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a. concentración de una muestra vegetal mediante centrifugación,
- b. análisis de la presencia o la cantidad de los agentes potencialmente patógenos en la muestra concentrada obtenida en (a).

15 La expresión “agentes potencialmente patógenos”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier organismo, molécula o sustancia que pueda ser infeccioso o perjudicial para la salud. Los agentes potencialmente patógenos más frecuentemente encontrados en vegetales son bacterias, hongos, virus y protozoos.

La expresión “agentes capaces de causar deterioro en el vegetal”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier organismo, molécula o sustancia que pueda modificar las propiedades organolépticas del alimento vegetal.

20 El término “muestra vegetal”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a una parte o porción extraída de uno o varios lotes de producto vegetal por métodos que permiten considerarla como representativa de él. Dicha muestra puede ser acuosa, sin ser agua procedente del propio tejido vegetal, sino que puede ser agua que haya estado en contacto con la superficie del vegetal.

25 Algunos de los agentes potencialmente patógenos que se pueden detectar y cuantificar en el análisis de la etapa (b) pueden ser, pero sin limitarse: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. o cualquier otro agente potencialmente patógeno o indicador de contaminación así como agentes capaces de causar el deterioro del vegetal como pueden ser *Pseudomona* spp., *Lactobacillus* spp., *Pectobacterium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis* spp.

30 En una realización preferida de la presente invención, la muestra vegetal comprende agua procedente del lavado industrial del vegetal. Preferiblemente, la muestra vegetal se obtiene durante el proceso de escurrido activo o secado del vegetal. El proceso de escurrido activo o secado del vegetal puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida. Preferiblemente, el proceso de escurrido activo o secado del vegetal se realiza mediante centrifugación o túnel de aire de frío forzado. El escurrido activo se define en contraposición al escurrido pasivo que ocurre sencillamente por gravedad a partir del lavado del vegetal en la cadena de procesado, y se refiere al proceso que
35 consiste en retirar de la superficie del vegetal el agua de lavado y/o aclarado mediante medios físicos tales como la centrifugación o la aplicación de un flujo de aire que empuje los restos de agua de la superficie vegetal, como es el túnel de aire frío forzado. En el caso de los productos vegetales congelados, puede emplearse una bandeja vibratoria para recoger el agua de la superficie vegetal.

40 El proceso de centrifugación para el escurrido activo o secado del vegetal suele llevarse a cabo a velocidades en torno a las 225 g durante tiempo en torno a 1 minuto. En el proceso de escurrido activo o secado mediante túnel de aire frío forzado, se aplica un flujo de aire frío sobre el producto vegetal de forma que a temperatura del producto vegetal al entrar en el túnel es de entre 10 y 15 °C, y a la salida es de entre 2 y 3 °C. Durante el proceso de escurrido activo o secado en el túnel de aire frío forzado, para unos 600 kg/hora se consiguen eliminar unos 90 litros de agua.

45 En una realización preferida de la presente invención, se obtienen entre 10 y 200 litros de agua procedente del lavado industrial del vegetal por cada tonelada de producto vegetal. El número de muestreos a realizar dependerá de los kilogramos de producto vegetal procesado en cada jornada. Lo normal es un muestreo equivalente a unos 1.000 kg de vegetal por hora.

50 En una realización preferida de la presente invención, la centrifugación de la etapa (a) se realiza en una o en más de una etapa de centrifugación de forma secuencial. Preferiblemente, la centrifugación de la etapa (a) se realiza en dos etapas secuenciales.

55 Cuando se realizan dos o más etapas de centrifugación secuenciales, el precipitado obtenido en la primera centrifugación es resuspendido, y esta nueva muestra concentrada es centrifugada en la siguiente etapa de centrifugación, y así sucesivamente en las siguientes centrifugaciones. De esta forma, la muestra se concentra de forma inversamente proporcional a su volumen. Por ejemplo, cuando una muestra vegetal de 250 ml de volumen se

centrifuga y el precipitado obtenido se resuspende en un volumen de 1 ml, se dice que la muestra ha sido concentrada 250 veces. Si se realizan centrifugaciones sucesivas, las veces que se concentra la muestra en la primera centrifugación se multiplican por las veces que se concentra la muestra en la segunda y en sucesivas centrifugaciones.

5 En una realización preferida de la presente invención, la centrifugación de la etapa (a) permite concentrar la muestra entre 100 y 15.000 veces. Preferiblemente, en la primera etapa de centrifugación la muestra se concentra entre 100 y 500 veces, y en la segunda etapa de centrifugación, la muestra se concentra, adicionalmente, entre 5 y 25 veces.

10 En una realización preferida de la presente invención, la centrifugación de la etapa (a) se realiza a una velocidad de entre 2.000 g y 20.000 g un tiempo de entre 2 y 25 minutos. Preferiblemente, en la etapa (a) se realiza una primera centrifugación a una velocidad de entre 2.000 g y 5.000 g durante un tiempo de entre 5 y 20 minutos y una segunda centrifugación a una velocidad de entre 12.000 g y 20.000 g durante un tiempo de entre 2 y 5 minutos.

15 En una realización preferida de la presente invención, la centrifugación de la etapa (a) permite concentrar agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal. Dicha centrifugación permite concentrar agentes que comprenden al menos una envuelta y no permite concentrar ADN libre. De esta forma, se evita la obtención de falsos positivos, es decir, de resultados que indiquen la presencia de agentes infecciosos y peligrosos para la seguridad del alimento vegetal, cuando realmente sólo había en la muestra restos del ADN de dichos agentes, y por tanto no verdaderos agentes infecciosos.

20 En una realización preferida de la presente invención, se detectan hasta 3 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de producto vegetal. Una UFC es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semisólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes. Una UFC puede corresponder a un par, una cadena o un racimo, así como a una célula individual.

25 En una realización preferida de la presente invención, el análisis de la etapa (b) comprende la extracción del ADN de los agentes potencialmente patógenos presentes en la muestra. Preferiblemente, el análisis de la etapa (b) se realiza mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real o cualquier otro método para análisis rápido de agentes patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del alimento vegetal.

En una realización preferida de la presente invención, la duración de las dos etapas (a) y (b) es de entre 1,5 horas y 4 horas. Preferiblemente, la duración de las dos etapas (a) y (b) es inferior a 2 horas.

30 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal, para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención, que comprende un analizador (9) para la detección y cuantificación de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal, caracterizado porque comprende adicionalmente:

35 -un primer tanque (3) para recoger el agua impulsada hacia dicho primer tanque desde un contenedor (1) de recogida del agua eliminada de la superficie del vegetal durante el proceso de escurrido activo o secado, a través de un conducto (2), mediante unos primeros medios de impulsión (4),

-un segundo tanque (5) para recoger una muestra de agua, impulsada hacia dicho segundo tanque desde el primer tanque (3) mediante unos segundos medios de impulsión (6),

40 -unos medios de centrifugación (8) para concentrar los agentes potencialmente patógenos presentes en el agua, y

-un sistema de control (7) para regular: el caudal impulsado por los primeros medios de impulsión (4); el caudal impulsado por los segundos medios de impulsión (6); y el proceso de centrifugación,

donde el analizador está adaptado para analizar el agua centrifugada.

45 El agua de escurrido activo o secado del vegetal recogida en el contenedor (1) está libre de restos de vegetales. Dichos restos pueden eliminarse mediante un filtro o cualquier otro mecanismo conocido en el estado de la técnica.

En una realización preferida de la presente invención, el primer tanque (3) y/o el segundo tanque (5) comprenden unos medios de agitación (10) para la homogenización del agua.

50 El primer tanque (3), llamado tanque de homogenización, está destinado a recoger toda el agua procedente del escurrido activo o secado del vegetal, recogida en las distintas centrifugaciones o según pasa el producto vegetal por el túnel de aire frío forzado. Toda el agua recogida en el contenedor (1) es transferida al primer tanque (3) mediante los primeros medios de impulsión (4). De esta forma, se puede elegir si se quiere que el primer tanque (3) almacene el agua de escurrido activo o secado de un solo lote o de más de un lote de producto vegetal.

Gracias a los segundos medios de impulsión (6), parte del agua del primer tanque (3) es transferida al segundo tanque (5), llamado tanque de muestreo.

En una realización preferida de la presente invención, el primer tanque (3) y el segundo tanque (5) comprenden unos sistemas de drenaje (12) para el vaciado de dichos tanques (3) y (5).

5 En el segundo tanque (5) se mezclan muestras de agua procedentes de distintos llenados del primer tanque (3). Una vez se ha transferido la cantidad de agua deseada desde el primer tanque (3) hasta el segundo tanque (5) mediante los segundos medios de impulsión (6), dicho primer tanque (3) es vaciado gracias a un sistema de drenaje (12).

Una vez se ha transferido la cantidad de agua deseada desde el segundo tanque (5) a los medios de centrifugación (8), dicho segundo tanque (5) es vaciado gracias al sistema de drenaje (12).

10 En una realización preferida de la presente invención, el sistema adicionalmente comprende una unidad de desinfección (11) para suministrar una solución desinfectante al conducto (2) mediante unos terceros medios de impulsión (13). La solución desinfectante puede ser un ácido como el ácido láctico o una base como el hipoclorito sódico, o puede ser cualquier otra solución desinfectante conocida, como puede ser una solución obtenida mediante la exposición de un oxidante como el peróxido de hidrógeno a luz ultravioleta, a ozono o a ultrasonidos, o utilizando cualquier otra tecnología de desinfección o agente desinfectante. Una vez la solución desinfectante entra en el
15 conducto (2), discurre por todo el sistema gracias a los primeros y segundos medios de impulsión (4 y 6), hasta el segundo tanque (5).

20 En otra realización preferida de la presente invención, al menos uno de los siguientes elementos: los medios de agitación (10) del primer tanque (3) y del segundo tanque (5); los sistemas de drenaje (12) para el vaciado del primer tanque (3) y el segundo tanque (5); los terceros medios de impulsión (13) para la aplicación de la solución desinfectante de la unidad de desinfección (11) al conducto (2), está regulado por el sistema de control (7).

En una realización preferida de la presente invención, los medios de centrifugación (8) comprenden dos conjuntos diferenciados de tubos colectores para la centrifugación secuencial de las muestras en dos etapas diferentes de forma que en la segunda etapa se centrifuga el precipitado de la primera etapa.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30 EJEMPLOS

A continuación se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia del método de la invención para la detección de agentes potencialmente patógenos en una muestra vegetal, así como del sistema asociado.

35 EJEMPLO 1: La eficiencia del método de detección depende del punto de la cadena de procesado en donde se tome la muestra.

Las muestras de agua de centrifugación se procesan en el laboratorio a temperatura de refrigeración. Normalmente, las bacterias patógenas que pueden contaminar el material vegetal se encuentran en muy baja concentración. Por tanto, la concentración de estas bacterias patógenas que pasan desde el producto al agua de lavado y centrifugado podría ser muy baja, estando por debajo del límite de detección para técnicas extremadamente sensibles, como es la RT-PCR (del inglés "*Real Time Polymerase Chain Reaction*" o Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real, también llamada "cuantitativa").

40 Durante el procesado de los vegetales de IV gama (frutas y hortalizas mínimamente procesadas, troceadas, lavadas, y envasadas) se llevan a cabo operaciones de preenfriamiento de las materias primas, eliminación de hojas externas, pelado y cortado. A continuación, los vegetales son sometidos a una etapa de lavado con la finalidad de eliminar exudados e higienizar el producto. Dicha etapa que tiene una duración de 0,5-2 minutos, se suele realizar en un túnel de lavado en continuo con agua y algún higienizante a temperaturas de 4-6° C. Muchos higienizantes requieren un aclarado posterior con agua, el cual puede realizarse por ducha o inmersión y que no debe durar más de 1 min. Posteriormente, se elimina el exceso de agua acumulada en la superficie durante el lavado, mediante centrifugación o túnel de aire frío forzado (Fig. 1). El sistema utilizado dependerá de las características del producto, como por ejemplo la sensibilidad a los daños mecánicos, la morfología del tejido, etc. Posteriormente, el alimento es
50 envasado utilizando atmósfera activa o pasiva, atendiendo a las particularidades de cada vegetal (tasa respiratoria, pardeamiento, etc.).

Se realizó la detección y el análisis del agente patógeno *Escherichia coli* O157:H7 en vegetales, concretamente en lechugas iceberg, en muestras de agua recogidas en distintos puntos de la línea de procesado industrial del vegetal
55 (Fig. 1):

- el agua del tanque de lavado,
- el agua de aclarado,
- el agua del escurrido activo o secado (por centrifugación en este caso).

5 Se utilizó un cóctel de 5 cepas de *Escherichia coli* O157:H7 de la Colección Española de Cultivos Tipo: CECT 5947, CECT 4783, CECT 4782, CECT 4267, CECT 4076 comprobando:

- (a) su amplificación mediante el kit comercial de Applied Biosystems TaqMan® *E. coli* O157:H7 para RT-PCR, y
- (b) su viabilidad y crecimiento mediante recuento en placa.

Límite de detección en las distintas muestras

10 Se realizó la inoculación artificial en las aguas de lavado, aclarado y centrifugado de la línea de procesado de lechuga en IV gama con un cóctel de cepas de *E. coli* O157 y se determinó la sensibilidad del método de recuento en placa y del kit comercial de RT-PCR para detectar el límite de detección en las distintas aguas de proceso industrial. El agua de lavado, aclarado y centrifugado, se generó en la planta piloto de procesado de vegetales utilizando una proporción de agua de 10 veces el volumen de producto vegetal, y una concentración de higienizante (hipoclorito sódico) en el tanque de lavado de 100 partes por millón (ppm). El proceso de aclarado se llevó a cabo en agua sin higienizantes y, posteriormente, la lechuga se centrifugó en la centrifuga automática de la planta piloto.

15 El análisis mediante recuento en placa y RT-PCR, de las distintas aguas de la línea de procesado inoculadas directamente con *E. coli* O157 para obtener una concentración de 10^7 UFC/ml de agua, puso de manifiesto que el higienizante utilizado (100 ppm de hipoclorito sódico) en el agua de lavado inactivó completamente las bacterias, obteniendo recuentos de <1 UFC/ml (Tabla 1).

20 Tabla 1. Comparación de la detección de *Escherichia coli* O157:H7 en distintas aguas de proceso de una línea de IV Gama inoculadas artificialmente con una concentración alta (10^7 UFC/ml) mediante recuento en placa y por RT-PCR.

Aguas de la línea de procesado de IV Gama	Recuento en placa (UFC/ml)	RT-PCR umbral:C _T (ciclo)
Agua de lavado	<1	25
Agua de aclarado	$1,68 \times 10^7$	23,3
Agua de centrifuga	$1,96 \times 10^7$	24,2
Agua limpia	$1,6 \times 10^7$	23,9

25 Sin embargo, los recuentos obtenidos en el agua de aclarado y de centrifuga se asemejan al del inóculo añadido (Tabla 1). El análisis por RT-PCR de las aguas inoculadas con una concentración de *E. coli* alta (10^7 UFC/ml) dio resultados muy similares en los tres tipos de agua analizadas (lavado, aclarado y centrifugado). En el agua de lavado se detectó el ADN de las bacterias inactivadas por el higienizante.

30 Es importante resaltar que cuando la contaminación del agua se produce con una concentración baja de bacterias (10^2 UFC/ml) la eficacia del método de detección por RT-PCR es distinta en función del tipo de agua, si es de lavado, aclarado o centrifugado (Tabla 2).

35 Tabla 2. Comparación de la detección de *Escherichia coli* O157:H7 en distintas aguas de proceso de una línea de IV Gama inoculadas artificialmente con una concentración baja (10^2 UFC/ml) mediante recuento en placa y por RT-PCR.

Aguas de la línea de procesado de IV Gama	Recuento en placa (ufc/ml)	RT-PCR (ciclo umbral:C _T)
Agua de lavado	<1	Negativo
Agua de aclarado	<1	36,0
Agua de centrifuga	1 x 10 ²	34,6

5 De hecho, el agua de lavado dio resultados negativos por RT-PCR mientras que el agua del aclarado y de la centrifugación dio resultados positivos. Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que la detección de bacterias vivas o muertas es mucho más eficaz en el agua de centrifuga donde los C_T fueron menores.

Los ensayos realizados para hallar el límite de detección en las distintas aguas mostraron que sólo en el agua de centrifuga se pueden detectar por RT-PCR concentraciones de 3 UFC/ml, mientras que en el agua de lavado y de aclarado los resultados fueron negativos (Tabla 3).

10 Tabla 3. Límite de detección de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas de proceso inoculadas artificialmente con una concentración muy baja (3 UFC/ml).

Aguas de procesado de la línea de IV Gama	Recuento en placa (ufc/ml)	RT-PCR (ciclo umbral:C _T)
Agua de lavado	<1	Negativo
Agua de aclarado	<1	Negativo
Agua de centrifuga	3	35,6 (50% negativo y 50% positivo)
Agua de lavado concentrada 100 veces	<1	Negativo
Agua de aclarado concentrada 100 veces	<1	35,4 (50% Negativo y 50% positivo)
Agua de centrifuga concentrada 100 veces	300	32,6

15 Para mejorar la sensibilidad en la detección de bacterias en agua donde la contaminación es muy baja, se podría realizar una concentración de las muestras por centrifugación (3.000 g durante 10 minutos). Este proceso de concentración fue eficaz en muestras de agua de centrifuga que contenían 3 UFC/ml ya que dieron recuentos más altos y C_T más bajos (Tabla 3). Sin embargo, este proceso de concentración de las muestras no fue eficaz para la detección en agua de lavado y de aclarado (Tabla 3).

EJEMPLO 2: Validación del procedimiento mediante el análisis de producto contaminado.

20 Se simuló el procesado industrial de unas muestras de lechuga contaminada. Para ello, se utilizó lechuga iceberg inoculada artificialmente con dos niveles de inóculo de *E. coli* O157:H7 (10² UFC/g y 10⁵ UFC/g). Una vez inoculada la lechuga, se sometió al proceso de cortado, lavado e higienización (solución acuosa de hipoclorito sódico 100 ppm, pH 6,5 y temperatura de 4,5° C), aclarado y posterior centrifugado. Se realizaron los análisis de las distintas aguas de lavado, aclarado y centrifugación así como del material vegetal antes y después de los procesos lavado (Fig. 1). Los análisis se realizaron mediante recuento en placa y RT-PCR. El agua de lavado, aclarado y centrifugado de la lechuga con inóculo bajo (10² ufc/g) se concentró entre 90 y 100 veces mediante un proceso de centrifugación previo al análisis de RT-PCR.

30 Los recuentos en placa de la lechuga inoculada con un inóculo alto (1x10⁵ UFC/g) y otro bajo (5x10² UFC/g) mostraron que en las distintas etapas de proceso (lavado, aclarado, centrifugado) no se consigue eliminar totalmente la contaminación, siendo la concentración de *E. coli* O157:H7 de 4x10⁴ y 83 UFC/g, respectivamente, en el producto final (Tabla 4).

Tabla 4. Detección mediante recuento en placa y por RT-PCR de la contaminación de *E. coli* O157:H7 inoculada artificialmente con una concentración alta (10^5 UFC/g) y baja (10^2 UFC/g) mediante el análisis en lechuga y en las aguas de procesado.

Recuentos en placa (UFC/g o UFC/ml)	Inoculo Alto	Inoculo Bajo
Materia prima (antes del lavado)	$1,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$
Producto final (después del lavado-centrifugado)	$3,8 \times 10^4$	$8,3 \times 10$
Agua de lavado	<1	<1
Agua de aclarado	<1	<1
Agua de centrifuga	$3,8 \times 10^3$	1,9
Recuentos por RT-PCR (C_T)	Inoculo Alto	Inoculo Bajo
Agua de lavado	Negativo	Negativo
Agua de aclarado	Negativo	Negativo
Agua de centrifuga	30,6	35,8
Agua de lavado concentrada 100 veces		Negativo
Agua de aclarado concentrada 100 veces		Negativo
Agua de centrifuga concentrada 100 veces		32,7
Cuantificación de resultados RT-PCR (C_T)	Inoculo Alto	Inoculo Bajo
Agua de centrifuga	$1,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^2$
Agua de centrifuga concentrada 100 veces		$2,5 \times 10$

5

A pesar de que el alimento final sigue contaminado, los recuentos en el agua de lavado y aclarado fueron menores de 1 UFC/ml, ya que el higienizante utilizado inactivó todas las bacterias presentes en el agua (Tabla 4). Por el contrario, en el agua de centrifuga se pudo hacer el recuento de *E. coli* O157:H7 tanto cuando la lechuga centrifugada tenía un inóculo alto como bajo.

10 Los resultados obtenidos mediante RT-PCR mostraron de nuevo la mayor idoneidad del agua de centrifuga respecto a la de lavado y aclarado para la detección de patógenos, dado que a pesar de que la lechuga final seguía contaminada, las detecciones en todas las aguas fueron negativas excepto en el agua de centrifuga (Tabla 4).

15 Cuando la concentración de bacterias en el agua es muy baja (inoculo bajo) resulta necesario llevar a cabo una concentración de la muestra de agua de centrifuga para hacer una cuantificación indirecta de bacterias y no sólo detectar la presencia o ausencia de las mismas.

EJEMPLO 3: Preparación de la muestra para el análisis por RT-PCR.

A partir de agua recogida de los distintos puntos explicados en el Ejemplo 1, se procede a la concentración de la muestra:

- 20
1. Los 250 ml de agua son centrifugados a 3.400 g durante 10 minutos y el precipitado se resuspende en 1 ml de agua destilada estéril.
 2. Se centrifuga a 13.000 g durante 3 minutos el mililitro obtenido en el paso anterior y el precipitado se resuspende en 100 µl de Prepman Ultra simple preparation reagent (Applied Biosystems).
 3. Se agita y se calienta a 95-100° C durante 10 minutos.
 4. Se agita y se centrifuga a 13.000 g durante 3 minutos.

5. Se toman los 100 µl de sobrenadante en un tubo estéril y se conserva a 4° C o a -20 ° C.
6. Se hace una dilución 1/10 mezclando 10 µl del sobrenadante con 90 µl de agua nanopura estéril para obtener la muestra de ADN que se va a emplear en la reacción de RT-PCR (ver Ejemplo 4).

EJEMPLO 4. Análisis de la concentración de *Escherichia coli* O157:H7 por RT-PCR.

5 La detección y el análisis se lleva a cabo mediante RT-PCR, concretamente con el equipo de Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System. Para la detección de *E. coli* O157, utilizamos el kit comercial de Applied Biosystems TaqMan® *E. coli* O157:H7 (que posee un control de amplificación interna que evita la aparición de falsos negativos) siguiendo el protocolo descrito por dicha casa comercial:

10 La reacción de RT-PCR se prepara en placas de 96 pocillos (*ABI Prism 96-well Optical Reaction Plate*) en un volumen final de 30 µl por pocillo, como muestra la Tabla 5.

Tabla 5. Volúmenes de los reactivos para la preparación de la reacción.

Para cada muestra: 30µl	Para N muestras
2X <i>Environmental Master Mix</i> : 15µl	N x 15 µl
10X <i>Target Assay Mix</i> 3µl	N x 3 µl
Muestra de ADN: 12 µl	N x 12 µl

15 Se prepara la mezcla de reacción con los volúmenes indicados en la tabla 5, se agita y se dispensan 30 µl de dicha mezcla en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. La placa se tapa con las cubiertas adhesivas y se protege de la luz hasta que se inicie la reacción.

El programa de RT-PCR que se lleva a cabo consiste en 10 minutos a 95° C para la activación de la polimerasa, seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C.

20 Se llevó a cabo el ajuste de la curva estándar de cuantificación para correlacionar las medidas obtenidas por RT-PCR con la concentración de bacterias en las muestras, obtenida mediante recuento en placa. Las concentraciones fueron desde 2,2 ± 0,2 X10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml hasta 20 UFC/ml.

25 El kit de RT-PCR utilizado permitió hacer un buen ajuste en la curva estándar de cuantificación, aunque perdió la linealidad cuando la concentración fue de 1 UFC/reacción. Por tanto, la cuantificación es posible como máximo hasta 2,6 colonias por reacción aunque el método es capaz de detectar hasta 1 colonia por reacción como se muestra en la Fig. 2.

Extrapolación de los resultados de PCR a la concentración de agentes patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del alimento vegetal

30 En primer lugar, para realizar la correlación de las medidas obtenidas por RT-PCR en las muestras de agua de centrifugación tras la concentración de los agentes patógenos y/o capaces de causar el deterioro del alimento vegetal, se hace el ajuste de la curva estándar de cuantificación utilizando como patrón de ADN un cóctel de bacterias de la misma especie y serotipo que aquellas que queremos detectar en nuestras muestras (Fig. 2). Una vez cuantificados nuestros resultados de RT-PCR de las muestras de agua de centrifuga, correlacionamos estos resultados con la concentración de agentes patógenos y/o capaces de causar el deterioro en la materia prima que ha pasado por la línea de producción y en el alimento elaborado.

35 Atendiendo a nuestros resultados experimentales y a modo de ejemplo, para el procesado de lechuga iceberg, observamos que la concentración de bacterias *E. coli* O157:H7 en el agua de centrifuga es inferior en 1 y 2 logaritmos decimales a la concentración de bacterias existentes en el producto vegetal después y antes de la etapa de lavado, respectivamente (Tabla 4).

EJEMPLO 5: Ejemplo del tiempo empleado para llevar a cabo el método de la invención.

40

Recogida de muestras

- 1- Lavado industrial del producto vegetal: 0,5-2 minutos.
- 2- Eliminación por centrifugación/túnel de aire forzado, del agua de la superficie del vegetal: 0,5-1 minuto.
- 3- Recogida de muestras: como ejemplo, cada hora se toman 2 muestras de 250 ml.

5 Tiempo empleado en el análisis

- 1- Centrifugación de la muestra en el laboratorio: 10 minutos/3400 g.
- 2- Extracción del ADN: 20 minutos.
- 3- Preparación de la reacción de RT-PCR: 5 minutos.
- 4- Procesado en el equipo de RT-PCR: 1 hora.

10 Por tanto, en menos de 2 horas se obtienen los resultados de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos en las muestras de agua de escurrido activo o secado del vegetal.

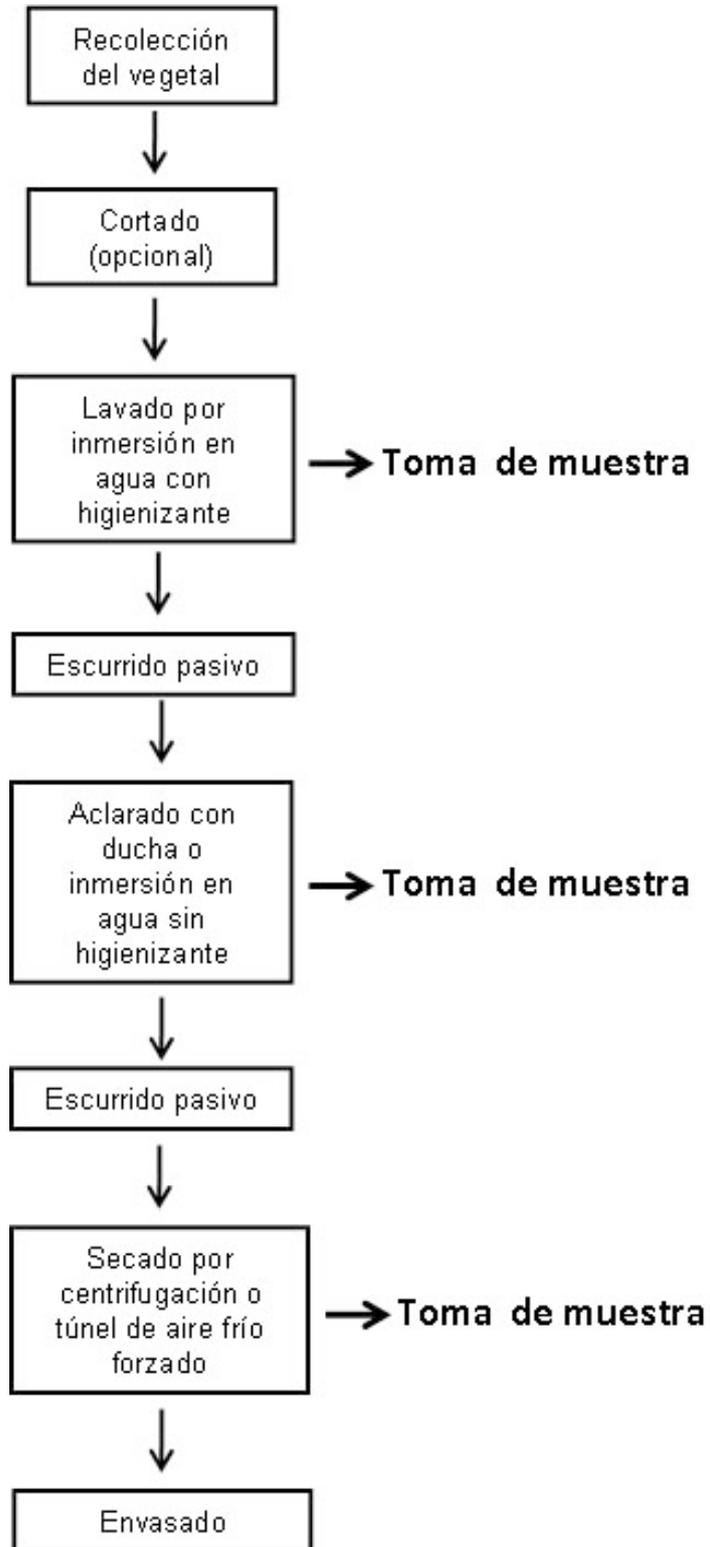
REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal, representativa de al menos un lote de producto vegetal, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. concentración de una muestra vegetal mediante centrifugación,
 - b. análisis de la presencia o la cantidad de los agentes potencialmente patógenos en la muestra concentrada obtenida en (a).
2. El método según la reivindicación anterior, donde la muestra vegetal comprende agua procedente del lavado industrial del vegetal.
- 10 3. El método según la reivindicación anterior, donde la muestra vegetal se obtiene durante el proceso de escurrido activo o secado del vegetal.
4. El método según la reivindicación anterior, donde el proceso de escurrido activo o secado del vegetal se realiza mediante centrifugación o túnel de aire de frío forzado.
- 15 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la centrifugación de la etapa (a) se realiza en una o en más de una etapa de centrifugación de forma secuencial.
6. El método según la reivindicación anterior, donde la centrifugación de la etapa (a) se realiza en dos etapas secuenciales.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la centrifugación de la etapa (a) permite concentrar la muestra entre 100 y 15.000 veces.
- 20 8. El método según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde en la primera etapa de centrifugación la muestra se concentra entre 100 y 500 veces, y en la segunda etapa de centrifugación, la muestra se concentra, adicionalmente, entre 5 y 25 veces.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la centrifugación de la etapa (a) se realiza a una velocidad de entre 2.000 g y 20.000 g durante un tiempo de entre 2 y 25 minutos.
- 25 10. El método según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores, donde en la etapa (a) se realiza una primera centrifugación a una velocidad de entre 2.000 g y 5.000 g durante un tiempo de entre 5 y 20 minutos y una segunda centrifugación a una velocidad de entre 12.000 g y 20.000 g durante un tiempo de entre 2 y 5 minutos.
- 30 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se detectan hasta 3 unidades formadoras de colonia por gramo de producto vegetal.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la duración de las dos etapas (a) y (b) es de entre 1,5 horas y 4 horas.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la duración de las dos etapas (a) y (b) es inferior a 2 horas.
- 35 14. Un sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal, para llevar a cabo el método descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende un analizador (9) para la detección y cuantificación de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal, caracterizado porque comprende adicionalmente:
 - 40 -un primer tanque (3) para recoger el agua impulsada hacia dicho primer tanque desde un contenedor (1) de recogida del agua eliminada de la superficie del vegetal durante el proceso de escurrido activo o secado, a través de un conducto (2), mediante unos primeros medios de impulsión (4),
 - un segundo tanque (5) para recoger una muestra de agua, impulsada hacia dicho segundo tanque desde el primer tanque (3) mediante unos segundos medios de impulsión (6),
 - 45 -unos medios de centrifugación (8) para concentrar los agentes potencialmente patógenos presentes en el agua, y
 - un sistema de control (7) para regular: el caudal impulsado por los primeros medios de impulsión (4); el caudal impulsado por los segundos medios de impulsión (6); y el proceso de centrifugación,

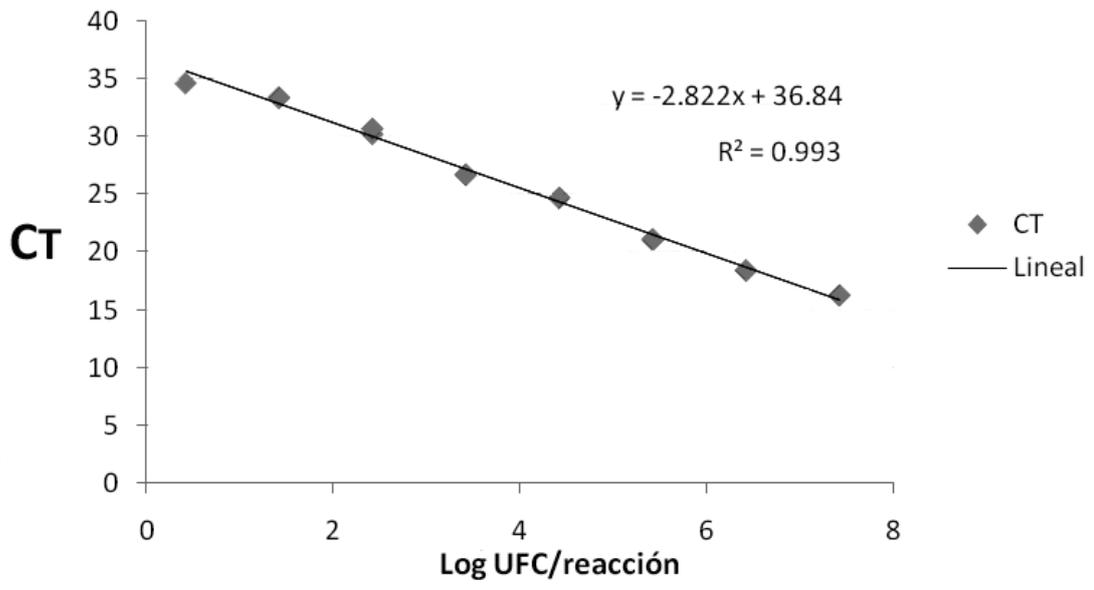
donde el analizador está adaptado para analizar el agua centrifugada.

- 5
15. El sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal según la reivindicación anterior, caracterizado porque el primer tanque (3) y/o el segundo tanque (5) comprenden unos medios de agitación (10) para la homogenización del agua.
16. El sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el primer tanque (3) y el segundo tanque (5) comprenden unos sistemas de drenaje (12) para el vaciado de dichos tanques (3) y (5).
- 10
17. El sistema de detección y análisis agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende una unidad de desinfección (11) para suministrar una solución desinfectante al conducto (2) mediante unos terceros medios de impulsión (13).
- 15
18. El sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores, caracterizado porque al menos uno de los siguientes elementos: los medios de agitación (10) del primer tanque (3) y del segundo tanque (5); los sistemas de drenaje (12) para el vaciado del primer tanque (3) y el segundo tanque (5); los terceros medios de impulsión (13) para la aplicación de la solución desinfectante de la unidad de desinfección (11) al conducto (2), está regulado por el sistema de control (7).
- 20
19. El sistema de detección y análisis de agentes potencialmente patógenos y/o agentes capaces de causar el deterioro del vegetal en una muestra vegetal según cualquiera de las cinco reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los medios de centrifugación (8) comprenden dos conjuntos diferenciados de tubos colectores para la centrifugación secuencial de las muestras en dos etapas diferentes de forma que en la segunda etapa se centrifuga el precipitado de la primera etapa

FIG 1



5 FIG 2



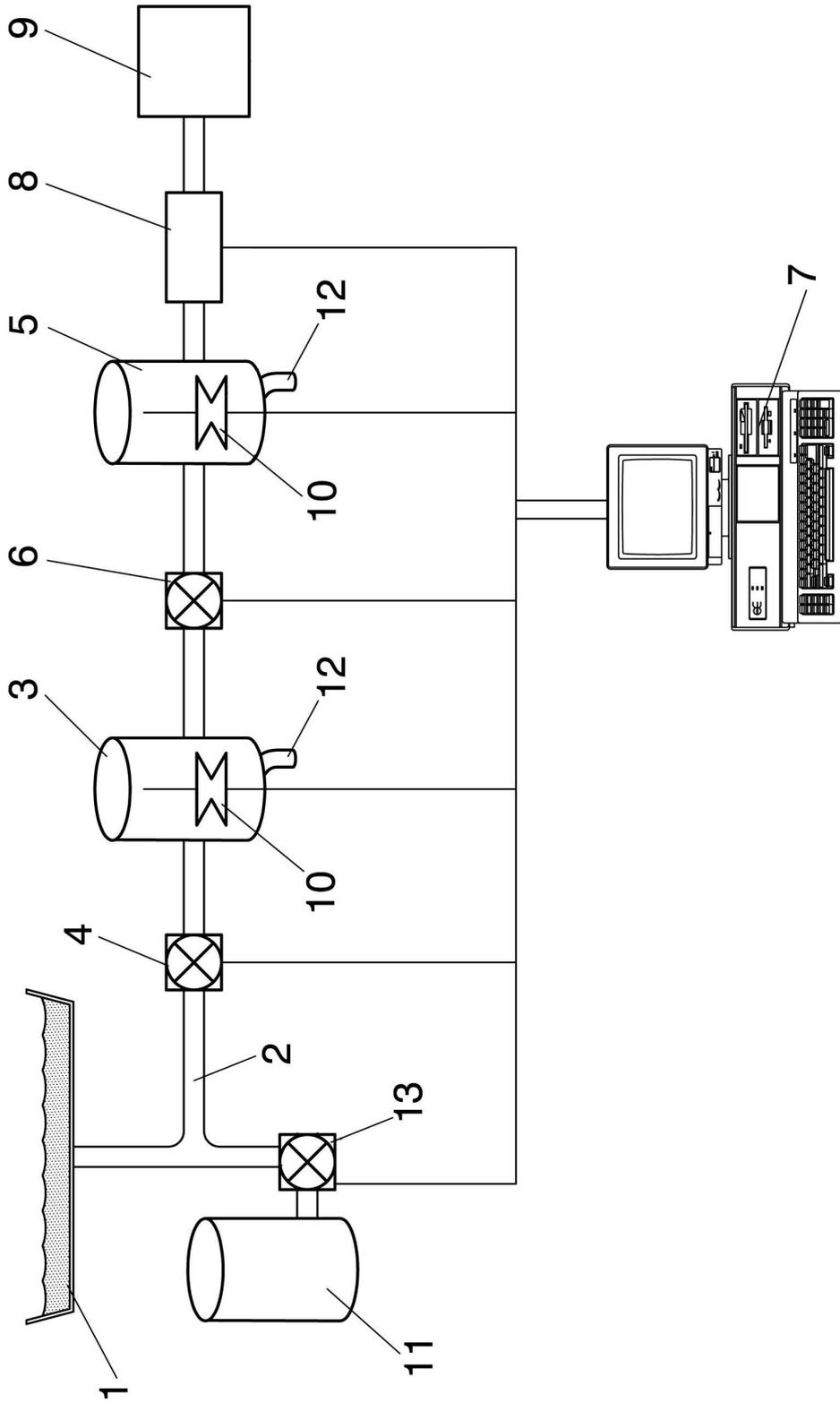


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031680

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 7691602 (HANSON et al.) 06.04.2010, reivindicaciones 1-17.	1-19
X	STEVENS, K.A. et al., 'Direct detection of bacterial pathogens in representative dairy products using a combined bacterial concentration-PCR approach.', JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 2004, Vol. 97, No. 6, páginas 1115-1122, ISSN: 1364-5072, Materiales y Métodos, Figura 1.	1-13
A	WO 2009111389 A1 (HANSON TECHNOLOGIES INC.) 11.09.2009, todo el documento.	1-19
A	ES 2170637 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 01.08.2002, todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.08.2011

Examinador
J. Vizán Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.08.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 14-19	SI
	Reivindicaciones 1-13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 14-19	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 7691602 A	06.04.2010
D02	STEVENSON, K.A. et al., J. Appl. Microbiol., (2004), 97(6): 1115-22	2004
D03	WO 2009111389 A1	11.09.2009
D04	ES 2170637 A1	01.08.2002

En D1-D2 se analizan diferentes métodos de detección de microorganismos infecciosos en productos agrícolas de alimentación.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para la detección de agentes potencialmente patógenos en una muestra vegetal caracterizado básicamente por una etapa de concentración de la muestra mediante centrifugación y en otra de análisis de la presencia de patógenos en la muestra concentrada.

En el estado de la técnica más próximo, representado por los documentos D1 y D2, se han descrito métodos para la detección e identificación rápida y precisa de patógenos en una muestra de un producto agrícola sin que se precise un cultivo previo de dicha muestra. En particular, los procedimientos descritos en D1 y D2 se caracterizan porque comprenden una etapa de concentración de la muestra mediante centrifugación seguida del análisis de la presencia de agentes patógenos (cf. D1: Reivindicaciones. D2: Materiales y Métodos, Figura 1.).

Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-13 se considera que no es nuevo y tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D2.

1.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la misma, definido en las reivindicaciones 1-13, no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. En el documento D1 se describe un sistema para la detección e identificación de patógenos en una muestra agrícola que comprende un tanque de recogida de la muestra, un sistema de concentración de la muestra y un analizador (cf. D1: Figura 3).

2.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 14 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo sistema para la detección de agentes potencialmente patógenos en una muestra vegetal.

2.3. La solución propuesta es el sistema de la reivindicación 14 caracterizado porque comprende dos tanques en serie en donde se recoge la muestra a analizar, un sistema de concentración de la muestra y un analizador. Básicamente, la diferencia técnica entre el sistema de la invención y el de D1 es el número de tanques para la recogida de la muestra utilizados previamente a la etapa de concentración. Puesto que en la solicitud no se especifica el supuesto efecto sorprendente e inesperado derivado de dicha diferencia que se traduciría en una mejora del sistema de la invención frente al descrito en D1, se considera que la solución propuesta por la reivindicación 14 al problema técnico planteado es una alternativa no inventiva a la solución del estado de la técnica que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia.

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, se concluye que el objeto de la reivindicación independiente 14 y el de las dependientes 15-19 no es inventivo.

2.4. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 14-19, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.