

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 993**

51 Int. Cl.:  
**C12M 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/06** (2006.01)  
**C12Q 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06749134 .0**  
96 Fecha de presentación: **04.04.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1869157**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **Bolsa flexible para medio de cultivo que contiene un concentrado de nutrientes**

30 Prioridad:  
**04.04.2005 US 668020 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.10.2012**

73 Titular/es:  
**E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
1007 MARKET STREET  
WILMINGTON, DE 19898, US**

72 Inventor/es:  
**STEICHEN, John Carl;  
ANDALORO, Bridget W.;  
KANE, James P., Jr.;  
VISIOLI, Donna Lynn y  
WANG, Siqun**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 387 993 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

Bolsa flexible para medio de cultivo que contiene un concentrado de nutrientes

Esta invención se refiere a una bolsa para medio de cultivo que comprende un compartimento principal y un lugar de contención que contiene un concentrado de nutrientes hasta que se libera en el momento de uso.

5 **Antecedentes de la invención**

Los microorganismos pueden existir en los alimentos y en el medio ambiente en concentraciones tan bajas que son difíciles de medir, pero siguen representando un riesgo significativo para la salud. Los microbiólogos incuban muestras en medios de cultivo líquidos para detectar y realizar pruebas para microorganismos patógenos, tales como los incluidos en el género *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Campylobacter* y *Escherichia coli*.

10 Pruebas de tipos similares se llevan a cabo para detectar la presencia de microorganismos en muestras que normalmente se espera que sean estériles, tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, dispositivos médicos y una amplia variedad de materiales industriales.

Con el fin de aumentar la concentración de los microorganismos a niveles medibles, una muestra para análisis se mezcla con un medio nutriente que permite el crecimiento de la población del organismo. Este crecimiento se puede realizar en dos etapas: (1) la homogeneización del nutriente y la muestra de modo que se mezclen a fondo, y (2) un período más largo cuando la muestra y el nutriente se exponen a temperaturas que favorecen el crecimiento del organismo diana. Durante esta segunda etapa, se pueden introducir aditivos adicionales en el medio nutriente para crear un entorno de crecimiento desfavorable para los organismos no diana. Estas dos etapas se denominan "enriquecimiento de la muestra" en la industria alimentaria.

20 El documento de Patente de EE.UU. 6.312.930 describe un método para la detección de bacterias diana específicas en una mezcla de muestras compleja, tal como una muestra de alimentos, mediante el cultivo de la muestra seguido del aislamiento y la detección del ADN de las bacterias diana. El ADN diana se amplifica a través de protocolos de amplificación por PCR y la detección se realiza mediante electroforesis en gel o por medios fluorescentes.

25 Tradicionalmente, el enriquecimiento de la muestra se había llevado a cabo en recipientes cerrados rígidos, tales como botellas, pero un enfoque que se prefiere ahora es realizar el enriquecimiento en bolsas de plástico flexibles, a las cuales se hace referencia frecuentemente como "bolsas para homogeneizador" o "bolsas Stomacher®". Estas bolsas ofrecen ventajas sobre los recipientes de paredes sólidas porque una máquina puede manipular mecánicamente la bolsa y su contenido, realizando de este modo la homogeneización de la muestra. Un homogeneizador típico tiene paletas de movimiento alternativo que pulverizan y mezclan la muestra con el medio del cultivo.

30 En la práctica, un microbiólogo o un técnico en un laboratorio de ensayos, prepara una serie de medios de enriquecimiento diferentes, tales como soluciones de cultivo líquidas y estériles, y soluciones de diluyentes tamponadas con composiciones diferentes para distintos microorganismos diana. Los medios de preparación y de esterilización son bien conocidos para un experto en la técnica. Lotes grandes de los medios y de los aditivos se pueden preparar, y porciones más pequeñas se transfieren a las bolsas para homogeneizador, para análisis individuales. La preparación de los medios de cultivo en cada laboratorio de ensayos es una labor costosa e intensa, y sujeta a error, especialmente durante las operaciones de medición y de transferencia. Este procedimiento de preparación de medios, esterilización, almacenamiento e introducción en las bolsas para homogeneizador, se considera gravoso para la industria de ensayos alimentarios y ambientales.

40 Por lo tanto, se han producido unos recipientes rígidos cargados previamente y esterilizados. Esto permite que el laboratorio se limite a la tarea de introducir las muestras de la prueba en los recipientes después de su llegada. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. 6.379.949.

45 Sin embargo, el envío de soluciones de cultivo líquidas, incluso en bolsas flexibles, puede no ser recomendable debido al peso y al volumen de las soluciones. Además, una amplia variedad de análisis necesarios en la industria de ensayos alimentarios y ambientales, pueden requerir muchos medios de cultivo diferentes en términos de dilución, volumen, perfil de nutrientes y/u otros factores. La amplia variedad de medios de cultivo puede resultar en un inventario excesivamente complejo de bolsas llenadas previamente para la fabricación y distribución. Por lo tanto, puede ser deseable proporcionar bolsas para homogeneizador con concentrados de nutrientes medidos, a los que se puede añadir agua purificada en el momento de uso en el laboratorio de ensayo. Alternativamente, puede ser deseable proporcionar bolsas para homogeneizador llenadas previamente, en donde el concentrado de nutrientes y el agua están contenidos en compartimentos separados hasta el momento del uso de la bolsa. Además, el proporcionar bolsas en las que los nutrientes están contenidos en un envase estéril y no en un "caldo" hasta el momento del uso, minimiza las posibilidades de crecimiento de microorganismos que entren en la bolsa casualmente, antes de su uso previsto. Además, en algunos casos puede no ser deseable almacenar juntos diversos componentes nutrientes en solución, requiriendo que se mezclen en el momento del uso. Para aquellos casos en los que los componentes del medio nutriente no son compatibles entre sí durante largos períodos de tiempo, son deseables compartimentos múltiples, conteniendo cada uno un componente del medio nutriente final.

Las bolsas flexibles con juntas frágiles se han descrito, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE.UU. 4.602.910, Patente de EE.UU. 5.728.542, la solicitud de Patente de EE.UU. 2004/118710 y la solicitud de Patente PCT WO91/07503.

### Resumen de la invención

5 La invención incluye una bolsa que comprende

(a) una primera lámina de película polímera;

(b) una segunda lámina de película polímera; en donde al menos dicha segunda lámina se superpone sobre dicha primera lámina; y en donde dicha primera lámina y dicha segunda lámina están selladas entre sí directamente, o indirectamente a través de una película polímera intercalada, definiendo de este modo un  
10 perímetro sellado que forma una bolsa;

(c) un lugar de contención dentro de la bolsa, comprendiendo dicho lugar un concentrado de nutrientes; y

(d) opcionalmente uno o varios lugares de contención adicionales dentro de la bolsa, comprendiendo cada uno de los lugares adicionales un aditivo seleccionado entre el grupo consistente en compuesto indicador, colorante, atenuador, fijador, reactivo para la extracción o la detección de microorganismos y combinaciones de dos o  
15 varios de los mismos; en donde el reactivo para la extracción o la detección de microorganismos es puro o comprende uno o varios aditivos adicionales, diluyentes, fagos, componentes derivados de fagos, anticuerpos, polihistaminas, dominios de unión a maltosa, péptidos de afinidad, aptómeros, biotinas, estreptavidinas, u otras moléculas de afinidad;

en donde dicho lugar de contención o, si está presente, al menos uno de dichos lugares de contención adicionales, comprende (1) al menos una junta frágil en el interior del perímetro, que divide dicha bolsa en compartimentos separados, o (2) una bolsita; en donde dicha junta frágil o dicha bolsita está formada ella misma al menos parcialmente por un material polímero que reacciona con el agua; y en donde dicho material polímero que reacciona con el agua se disuelve, se rompe, se dispersa y/o se descompone después de entrar en contacto con agua.

Esta invención también incluye un procedimiento que se puede utilizar para determinar la presencia de una bacteria diana específica, sospechosa de estar en una muestra, utilizando un recipiente tal y como se ha descrito anteriormente. El procedimiento comprende

insertar una muestra que contiene el microorganismo en una bolsa tal y como se ha caracterizado anteriormente;

liberar un concentrado de nutrientes desde el lugar de contención para producir un medio de cultivo;

incubar la muestra en el medio de cultivo para formar una mezcla de la muestra compleja y enriquecida; y

30 detectar el microorganismo en la mezcla de la muestra.

### Descripción detallada de la invención

En una realización, el lugar de contención dentro de la bolsa comprende una bolsita de película flexible en la que está contenida el concentrado de nutrientes, en donde al menos una porción de la bolsita comprende un material polímero que reacciona con el agua.

35 En realizaciones alternativas, el lugar de contención dentro de la bolsa comprende un polvo, gránulo, sedimento, lámina, placa o similar que comprende una matriz de material polímero que reacciona con el agua, en la que se mezcla el concentrado de nutrientes. El lugar de contención puede comprender un revestimiento de material polímero que reacciona con el agua, aplicado sobre el concentrado de nutrientes. El concentrado de nutrientes puede estar en forma de polvo o granulado antes del revestimiento con el material polímero reactivo con el agua.  
40 Alternativamente, el medio nutriente se transforma en bolitas, lámina, placa o similar antes de la aplicación del revestimiento de material polímero que reacciona con agua. Como otra alternativa, el lugar de contención es un compartimento separado en la bolsa, definido por una junta formada por un material reactivo al agua.

En estas realizaciones, se añade agua purificada y/o esterilizada, al compartimento principal de la bolsa para homogeneizador en el momento del uso, haciendo que el material polímero reactivo al agua se disuelva, se rompa, se disperse y/o se desintegre, liberando el concentrado de nutrientes y permitiendo que se mezcle con el agua  
45 añadida.

En aún otra realización, el lugar de contención comprende un comprimido o cápsula que se puede pulverizar y/o disolver durante el proceso de homogeneización. Los lugares pueden comprender uno o varios comprimidos o cápsulas que se pueden pulverizar y/o disolver de una manera secuencial para las liberaciones programadas.

50 Preferiblemente, la bolsa para medio de cultivo también incluye un cierre que se puede volver a cerrar. Opcionalmente, la bolsa del medio de cultivo comprende una base reforzada que permite que la bolsa esté en

posición vertical cuando se llena.

Un recipiente descrito en esta memoria puede ser una "bolsa para medio de cultivo" o una "bolsa para homogeneizador", utilizadas indistintamente en esta memoria para referirse a un recipiente o una bolsa flexible, que se puede utilizar para la incubación de una muestra en medios de cultivo líquidos para favorecer el crecimiento de microorganismos.

Un homogeneizador es un dispositivo para mezclar muestras con medios nutrientes en bolsas flexibles para mantener el cultivo de microorganismos. Un homogeneizador comprende un conjunto de paletas que proporcionan una acción de amasado desde fuera de la bolsa para mezclar la muestra. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. 6.439.759. Los homogeneizadores pueden estar disponibles comercialmente en Seward Ltd., bajo el nombre comercial Stomacher®.

Esta invención proporciona bolsas para homogeneizador con lugares de contención que se pueden romper intencionalmente, de modo que el contenido (por ejemplo, un concentrado de nutrientes) se libere en el momento del uso. Es posible colocar el lugar de contención dentro de una bolsa para homogeneizador de modo que su contenido se libere cuando la bolsa se coloque dentro de un homogeneizador. Ya que se puede proporcionar una bolsa para homogeneizador estéril, el técnico de laboratorio sólo tiene que añadir la muestra y el agua estéril, colocar la bolsa con su contenido en el homogeneizador, y después recuperar la muestra homogeneizada.

Las bolsas para homogeneizador se pueden preparar en varios tamaños para diferentes tipos de muestras y procedimientos de muestreo, pero todas ellas están manipuladas de la misma manera para conseguir la homogeneización, es decir, la bolsa se comprime mecánicamente primero en una zona y luego en otra. Cuando una zona se comprime, la otra se libera. Este procedimiento hace que la muestra y el medio nutriente fluyan hacia atrás y hacia adelante en la bolsa. Existen diversos diseños mecánicos que forman regímenes de flujo en la bolsa, pero todos ellos utilizan el proceso de compresión alterna. Debido a la posible liberación de gases por los microorganismos aeróbicos en la bolsa, frecuentemente la bolsa no está sellada durante al menos parte del proceso de homogeneización, y su contenido se expone al aire.

El lugar de contención (por ejemplo, un compartimento separado o una bolsita) que contiene el concentrado de nutrientes, se puede colocar de manera que la primera compresión de las paletas del homogeneizador rompa el lugar de contención y libere el nutriente en el agua. Para aquellos casos en los que los componentes del medio nutriente no son compatibles entre sí durante largos períodos de tiempo, múltiples lugares de contención, conteniendo cada uno un componente del medio nutriente final, se localizan deseablemente en las zonas de compresión del homogeneizador. El(los) concentrado(s) de nutrientes liberado se puede disolver y/o dispersar en agua para constituir el medio nutriente.

El enriquecimiento de las muestras de ciertos microorganismos incluye una fase inicial de crecimiento para todos los microorganismos, seguido por una fase de crecimiento inhibido generalmente para todos, excepto para el organismo diana. Por ejemplo, esta segunda fase podría implicar la introducción de un aditivo, tal como un antibiótico, que inhibe el crecimiento de los organismos que no son diana, el aditivo se libera desde su lugar de contención en una etapa posterior a la liberación del concentrado de nutrientes.

Otros aditivos que se pueden liberar en una etapa posterior a la liberación del concentrado de nutrientes, pueden incluir, por ejemplo, compuestos indicadores, colorantes, atenuadores, fijadores y similares. Otros aditivos de la segunda etapa pueden ser reactivos para la extracción y/o la detección de microorganismos. Tales reactivos pueden ser puros, estar formulados con aditivos, diluyentes o en combinación con fagos (organismos submicroscópicos, generalmente víricos que destruyen bacterias), componentes derivados de fagos, anticuerpos, polihistaminas o dominios de unión a maltosa, o cualquier otro péptido de afinidad, aptómeros, biotinas o estreptavidinas o cualquier otra molécula de afinidad. Estos reactivos formulados pueden estar en forma de líquido, gel, pasta, polvo seco, gránulos u otras formas que pueden fluir libremente. Alternativamente, estos reactivos pueden estar inmovilizados sobre soportes sólidos, tales como partículas, en particular partículas magnéticas o paramagnéticas con un tamaño desde nanómetro hasta micra.

La invención también contempla una bolsa para homogeneizador con al menos un lugar de contención adicional, que se encuentra por encima de las zonas de compresión, para que el(los) aditivo(s) tal y como se ha descrito anteriormente se libere en al menos una etapa posterior a la liberación del concentrado de nutrientes. De este modo, el aditivo para la segunda etapa se puede liberar mediante la apertura de su lugar de contención en un momento posterior al de la liberación del concentrado de nutrientes. Por ejemplo, el aditivo para la segunda etapa se puede liberar, gracias a la ruptura de una junta frágil, en un compartimento o una bolsita, ya sea por compresión manual o por compresión automática. Otros lugares de contención para los aditivos de la segunda etapa, tales como compartimentos con cubiertas despegables, bolsitas solubles en agua, o comprimidos o cápsulas, también se contemplan en esta invención.

La invención puede funcionar bien en situaciones en las que la muestra no se disuelve fácilmente en el medio de cultivo. En algunos casos, con el fin de obtener una buena distribución de la muestra, puede ser necesario agitar físicamente o batir la mezcla. Cuando se utiliza el procedimiento descrito, la solución del medio y de la muestra se

- 5 puede pulverizar rápidamente o amasar a través de las paredes flexibles de la bolsa, según sea necesario, sin transferir los contenidos de la bolsa de un recipiente a otro. Esto reduce el riesgo de introducir contaminantes no deseados. La transferencia de recipiente a recipiente puede ser un inconveniente en esta situación, si se utilizan recipientes rígidos. Adicionalmente, el uso de una bolsa transparente permite la inspección visual del medio de cultivo y de la muestra en cualquier momento durante el cultivo o el proceso de la prueba. Además, el uso del recipiente de la invención puede reducir los costes de laboratorio, utilizando medios de cultivo cargados y esterilizados previamente sin tener la necesidad de reciclarlos devolviéndolos al proveedor para reutilización, reduciendo de este modo el coste adicional del recipiente rígido y reduciendo la masa total y el volumen del material de desecho.
- 10 El concentrado de nutrientes comprende diversos nutrientes adecuados para mantener el crecimiento de los microorganismos (por ejemplo, proteínas, aminoácidos, vitaminas, azúcares, oxígeno y similares). También puede comprender componentes tales como sales inorgánicas, tampones, indicadores y similares para facilitar el cultivo y el análisis de las muestras. Las preparaciones de nutrientes están disponibles en forma concentrada obtenida a partir de, por ejemplo, caseína de soja, tioglicolato e infusiones de cerebro y/o corazón. El concentrado de nutrientes es típicamente sólido, y puede estar en formas fluibles, tales como polvos, partículas, gránulos y similares.
- 15 Alternativamente, el concentrado se puede comprimir en gránulos, láminas, placas o similares, con o sin ligantes adicionales. Las formas semisólidas, pasta, gel o líquido concentrado también pueden ser adecuadas para uso en algunas realizaciones de esta invención.
- 20 La bolsa está hecha preferiblemente de un material que es resistente a la perforación, es convenientemente transparente para permitir la inspección visual de los contenidos y tiene una vida útil larga. Por ejemplo, la bolsa puede comprender dos láminas de una película fina, de modo que la bolsa es una bolsa de "doble cara" y se puede poner completamente plana, una lámina encima de la otra, cuando la bolsa no está llena.
- 25 Las láminas de película polímera empleadas para hacer las paredes laterales de la bolsa de medio de cultivo flexible o la bolsita, que se va a utilizar como un lugar de contención dentro de la bolsa, pueden ser una película polímera monocapa o multicapa. Las láminas de la película que participan en la construcción de la bolsa, pueden tener estructura diferente (por ejemplo, una capa puede ser clara y la otra puede ser opaca). Se puede emplear cualquier resina o material polímero de tipo película, tal y como se conoce en general en la técnica del envasado. Una lámina polimérica multicapa puede incluir al menos tres capas categóricas, incluyendo pero no limitadas a, una capa más externa estructural o de uso excesivo, una capa de barrera interior, y una capa más interna y, opcionalmente, una o varias capas adhesivas o de unión. La capa más interna que está en contacto y es compatible con el contenido deseado de la bolsa o la bolsita, es capaz preferiblemente de formar las juntas perimétricas de bloqueo (es decir, fuerzas de sellado superiores a 60 g/mm) y, para algunas realizaciones de esta invención, cualquier junta frágil. La capa más interna puede ser termosellable.
- 30 La capa estructural más externa o de uso excesivo puede ser de polietileno, poliéster orientado o polipropileno orientado, pero también puede incluir nilón orientado. Esta capa preferentemente se puede imprimir a la inversa y ventajosamente no se ve afectada por las temperaturas de sellado utilizadas para fabricar la bolsa y los compartimentos, ya que la bolsa se sella a través de todo el espesor de la estructura multicapa. El espesor de esta capa se puede seleccionar para controlar la rigidez de la bolsa, y puede variar desde aproximadamente 10 a aproximadamente 60 µm, preferiblemente aproximadamente 50 µm.
- 35 La capa interna puede incluir una o varias capas de barrera, en función de qué condiciones atmosféricas (oxígeno, humedad, luz y similares) pueden afectar potencialmente al producto dentro de la bolsa. Las capas de barrera pueden ser de polipropileno metalizado orientado (PP), lámina de aluminio, tereftalato de polietileno orientado (PET), alcohol etileno-vinílico (EVOH), nilón o nilón orientado biaxial, mezclas o materiales compuestos de los mismos, así como copolímeros relacionados de los mismos. El espesor de la capa de barrera dependerá de la sensibilidad del producto y de la vida útil deseada.
- 40 La capa más interna del envase es el sellador. El sellador se selecciona para que tenga un efecto mínimo sobre la eficacia de los contenidos, para que no esté afectado por el producto y para soportar las condiciones del sellado (tales como gotas de líquido, grasa, polvo o similares). El sellador puede ser una resina que puede estar unida a sí misma (sellada) a temperaturas sustancialmente inferiores a la temperatura de fusión de la capa más externa, de modo que la apariencia de la capa más externa pueda no estar afectada por el proceso de sellado y no pueda adherirse a las pinzas de la barra de sellado. Los selladores utilizados en las bolsas o las bolsitas pueden incluir copolímeros de etileno, tales como polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), polietileno de metaloceno, o copolímeros de etileno con acetato de vinilo o acrilato de metilo, o copolímeros de etileno y ácido acrílico (EAA) o ácido metacrílico (EMAA), opcionalmente ionomerizados (es decir, parcialmente neutralizados con iones metálicos, tales como Na, Zn, Mg o Li). Los selladores también pueden incluir copolímeros de polipropileno. Las capas de sellador pueden tener un espesor de 25 a 100 µm. Para algunas realizaciones de la invención, el sellador forma preferentemente una junta frágil que se rompe y revienta por compresión de la bolsa.
- 50 Durante la fabricación de la lámina de película polimérica que se va a utilizar en la fabricación de la bolsa, se emplean opcionalmente adhesivos coextruibles entre las capas funcionales, para adherir las capas entre sí y proporcionar una integridad estructural. Estos incluyen, pero no están limitados a, polímeros y copolímeros de
- 60

etileno o propileno modificados con grupos de ácido carboxílico insaturados o injertados con los anteriores, tales como anhídrido maleico o ácido maleico y similares. Además, para proporcionar un espesor adicional (si lo desea el consumidor para una aplicación particular), capas en bruto de poliolefina o residuos triturados de la película multicapa, recortados durante la fabricación de la bolsa, se pueden incorporar dentro de la estructura multicapa.

- 5 En algunos casos, las funciones de las capas estructurales, de barrera y/o selladora se pueden combinar en una sola capa de polímero. Son de destacar las bolsas para medio de cultivo de la presente invención en las que las películas utilizadas en las bolsas comprenden una sola capa de polietileno. También son importantes las bolsas en las que las películas utilizadas en las bolsas comprenden una capa exterior de nilón y una capa interior de copolímero de etileno/acetato de vinilo (EVA). Otros materiales multicapas adecuados para la fabricación de bolsas incluyen (desde la capa más externa a la capa más interna): PET/Adhesivo/LLDPE; Nilón/Adhesivo/LLDPE, Nilón/PVDC/Adhesivo/LLDPE.

#### Materiales que reaccionan con el agua

- 15 El lugar de contención comprende un material que reacciona con el agua. El material que reacciona con el agua es un material que se disuelve, se rompe, se dispersa y/o se desintegra al entrar en contacto con el agua, para permitir que el concentrado de nutrientes contenido en el mismo se libere en el agua y forme un medio de cultivo líquido. Preferiblemente, el material es hidrosoluble, tal como un material polímero hidrosoluble.

- 20 Las bolsitas están formadas preferiblemente por una película soluble en agua. La bolsita puede estar formada por dos láminas superpuestas de película soluble en agua que se sellan entre sí. Alternativamente, la bolsita puede comprender una lámina de película soluble en agua, sellada a una lámina de película que no es reactiva al agua. Esta alternativa puede ser útil en la preparación de una bolsita con una pestaña extendida para el sellado entre las láminas que forman la bolsa para homogeneizador, en donde la pestaña extendida no reacciona con el agua. La bolsita puede tener una junta soluble que se disuelve para liberar el contenido de la bolsa.

- 25 La película soluble en agua útil para estas realizaciones tiene una solubilidad en agua de al menos 50%, al menos 75%, o incluso al menos 95%. La solubilidad se puede determinar del modo siguiente. Cincuenta gramos  $\pm$  0,1 g de material se añaden a un vaso de precipitados de 400 ml de peso conocido, y se añaden 245 ml  $\pm$  1 ml de agua destilada. Se agita vigorosamente en un agitador magnético ajustado en 600 rpm durante 30 minutos. A continuación, la mezcla se filtra a través de un filtro de vidrio sinterizado cualitativo doblado, con los tamaños de poro conocidos (típicamente menos de 50  $\mu$ m) para eliminar el material insoluble. El agua se separa por secado desde el filtrado recogido, mediante cualquier método convencional, y el peso del residuo de polímero se determina (que es la fracción disuelta o dispersa). A continuación, se puede calcular el % de solubilidad o dispersabilidad.

- 30 Los materiales preferidos son películas de materiales polímeros, por ejemplo, polímeros que se moldean en una película o lámina. La película se puede obtener, por ejemplo, mediante fundición, moldeo por soplado, extrusión o soplado del material polímero, tal y como se conoce en la técnica. Los polímeros, copolímeros o sus derivados preferidos son seleccionados a partir de poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidona, poli(óxidos de alquileo), poli(acrilamida), poli(ácido acrílico), celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa, poli(acetatos de vinilo), poli(ácidos carboxílicos) y sales, poliaminoácidos o péptidos, poliamidas, poli(acrilamida), copolímeros de ácidos maleico/acrílico, polisacáridos incluyendo el almidón y la gelatina, gomas naturales, tales como xantano y carragenano. El polímero puede ser poli(acrilatos) y copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, dextrina, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos, incluso más preferiblemente poli(alcoholes vinílicos), copolímeros de poli(alcohol vinílico) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). El polímero puede tener cualquier peso molecular medio ponderado, preferiblemente desde aproximadamente 1000 a 1.000.000, o incluso desde 10.000 a 300.000 o incluso desde 15.000 a 200.000 o incluso desde 20.000 a 150.000.

- 45 Las mezclas de polímeros también se pueden utilizar. Estas pueden ser beneficiosas para controlar las propiedades mecánicas y/o de disolución del lugar de contención, dependiendo de la aplicación del mismo y de las necesidades requeridas. Por ejemplo, un material polímero tiene una mayor solubilidad en agua que otro material polímero, y/o un material polímero tiene una resistencia mecánica mayor que otro material polímero. Puede ser preferible utilizar una mezcla de polímeros, que tengan diferentes pesos moleculares medios ponderados, por ejemplo, una mezcla de poli(alcohol vinílico) (PVA) o un copolímero del mismo con un peso molecular medio ponderado de 10.000-40.000, preferiblemente de aproximadamente 20.000, y de PVA o un copolímero del mismo, con un peso molecular medio ponderado de aproximadamente 100.000 a 300.000, preferiblemente de aproximadamente 150.000.

- 55 También son útiles las composiciones de mezclas de polímeros, por ejemplo, las que comprenden una mezcla de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua, tales como polilactida y poli(alcohol vinílico), obtenidas por la mezcla de polilactida y poli(alcohol vinílico), que comprenden típicamente 1-35% en peso de polilactida y aproximadamente de 65% a 99% en peso de poli(alcohol vinílico), si el material va a ser soluble en agua.

El polímero se puede presentar en la película de 60% a 98%, o de 80% a 90%, hidrolizado, para mejorar la disolución del material, y/o que los niveles de plastificante, incluyendo el agua, en la película varíen de tal manera que la disolución se ajuste según sea necesario.

También se prefiere una película de PVA en donde el nivel de polímero en la película puede ser de al menos 60%. Estas películas pueden comprender un polímero de PVA con propiedades similares a la película conocida, con la referencia comercial M8630 o CXP4087, tal y como es vendida por Chris-Craft Industrial Products de Gary, Indiana, EE.UU. Los ejemplos incluyen también los materiales M8630 y/o CXP4087. Otro ejemplo de películas de PVA también está disponible como "Solublón PT30" y "Solublón KA40" de Aicello Chemical Co., Ltd., Aichi, Japón.

Los plastificantes pueden incluir glicerol agua, etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Otros aditivos pueden ser agentes estabilizadores, coadyuvantes de la disgregación, etc.

La bolsita puede estar formada por un material que es estirable, tal y como se describe en esta memoria. Esto facilita el cierre de la bolsita abierta, cuando se llena más del 90% o incluso 95% en volumen o incluso 100% o incluso sobrellenada. El material es preferentemente elástico, para asegurar un envasado hermético y la fijación del concentrado de nutrientes dentro de ella durante la manipulación, por ejemplo, para asegurar que no se pueda formar ningún espacio de aire (adicional) después del cierre de la bolsita. Los materiales estirables preferidos tienen un grado de estiramiento máximo de al menos 150%, por lo menos 200% o por lo menos 400%, según se determinó por comparación de la longitud original de un pedazo de material justo antes de la ruptura debido al estiramiento, cuando se aplica una fuerza de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 20 Newton sobre un pedazo de película con una anchura de 1 cm. Preferiblemente, el material es tal, que tiene el mismo grado de estiramiento que antes, cuando se utiliza una fuerza de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 Newton, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 Newton. Por ejemplo, un pedazo de película con una longitud de 10 cm y una anchura de 1 cm y un espesor de 40  $\mu\text{m}$ , se estira longitudinalmente con una tensión en aumento, hasta el punto en que se rompe. El grado de elongación justo antes de la rotura se puede determinar mediante medición continua de la longitud y el grado de estiramiento se puede calcular. Por ejemplo, un pedazo de película con una longitud original de 10 cm que se estira con una fuerza de 9,2 Newton hasta 52 cm justo antes de la rotura, tiene un grado de estiramiento máximo de 520%.

La fuerza para estirar tal pedazo de película (10 cm x 1 cm x 40 micras) hasta un grado del 200%, puede estar dentro de los intervalos descritos anteriormente. Esto puede asegurar que la fuerza elástica que permanece en la película después de formar la bolsita o de cerrar la bolsita, es suficientemente alta para envasar herméticamente el concentrado de nutrientes dentro de la bolsita (pero no tan alta que la película no se pueda empujar dentro de un molde de vacío, con profundidad razonable, cuando la bolsita se prepara mediante un procedimiento que implica el uso de vacío, tal como mediante conformado a vacío o termoconformado). El material estirable se define por un grado de estiramiento medido cuando no está presente como una bolsita cerrada. Sin embargo, el material se puede estirar cuando se forma o se cierra la bolsita. Esto se puede observar, por ejemplo, mediante la impresión de una rejilla sobre el material, por ejemplo, una película, antes del estiramiento, a continuación, conformando una bolsita; se puede observar que los cuadrados de la rejilla son alargados y por ello están estirados.

La elasticidad del material estirable se puede definir como la "recuperación elástica". Esta se puede determinar por el estiramiento del material, por ejemplo, hasta una elongación del 200%, tal y como se ha establecido más arriba, y midiendo la longitud del material después de liberar la fuerza de estiramiento. Por ejemplo, un pedazo de película de una longitud de 10 cm y un ancho de 1 cm y un espesor de 40  $\mu\text{m}$ , se estira longitudinalmente hasta 20 cm (200% de elongación) con una fuerza de 2,8 Newton (como más arriba), y luego se retira la fuerza. La película se recupera rápidamente a una longitud de 12 cm, lo que indica una recuperación elástica del 80%. El material de la bolsita puede tener una recuperación elástica desde aproximadamente 20% a aproximadamente 100%, desde aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, desde aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, desde aproximadamente 75% a aproximadamente 100%, o desde aproximadamente 80% a aproximadamente 100%.

El grado de estiramiento puede no ser uniforme sobre la bolsita, debido al procedimiento de formación y de cierre. Por ejemplo, cuando una película se coloca en un molde y se forma una bolsita abierta conformada a vacío, la parte de la película en el fondo del molde, que se retira del modo más distante desde los puntos de cierre, se puede estirar más que en la parte superior. Una acción de estiramiento, cuando se utiliza un material estirable, elástico, o ambos, estira el material de manera no uniforme, dando como resultado una bolsita que tiene un espesor no uniforme. Esto puede permitir el control de la disolución/desintegración o dispersión de las bolsitas en el agua añadida a la bolsa para el medio de cultivo. El material se puede estirar de tal manera que la variación del espesor en la bolsita formada de material estirado es desde 10 a 1000%, 20% a 600%, 40% a 500% o 60% a 400%. Esto se puede medir mediante cualquier método, por ejemplo, utilizando un micrómetro apropiado.

Realizaciones alternativas que comprenden polímeros que reaccionan con el agua, incluyen matrices o recubrimientos de material reactivo al agua, que delimitan o envuelven los sólidos del concentrado de nutrientes para que no se expongan al aire y a microorganismos accidentales, antes del momento de uso. Otra realización alternativa comprende un compartimento separado de la bolsa, definido por una junta formada a partir de un material reactivo al agua. Los materiales reactivos al agua de estas realizaciones pueden comprender los materiales ya descritos para las películas solubles en agua.

Preferiblemente, la bolsita que reacciona con el agua, la matriz, el recubrimiento o el sellado comienza a liberar el concentrado de nutrientes casi inmediatamente después de ponerse en contacto con agua, durante la preparación del cultivo de la muestra. Por ejemplo, la bolsita comienza a liberar el concentrado desde aproximadamente 1

segundo hasta aproximadamente 120 segundos, o desde aproximadamente 5 segundos hasta aproximadamente 60 segundos, después de ponerse en contacto con el agua.

Conjunto de la bolsa

5 La(s) lámina(s) de película polímera (es decir, el llamado "material laminar") utilizadas para preparar la bolsa de esta invención o las bolsitas, se pueden producir utilizando cualquier combinación de los procedimientos conocidos en general en la técnica, tales como colada monocapa o multicapa, película soplada, laminación por extrusión y laminación adhesiva y combinaciones de los mismos. Los coadyuvantes de la elaboración, tal y como se conocen en general en la técnica, que incluye a modo de ejemplo, pero sin estar limitados a los mismos; agentes de deslizamiento (tales como ceras de amidas), agentes antibloqueo (tal como sílice) y antioxidantes (tales como fenoles impedidos), se pueden incorporar en el material laminar, si es necesario, para facilitar la fabricación de la película o la formación de la bolsa. Las bolsas se forman a partir del material laminar, ya sea por corte y termosellado de pedazos separados de material laminar o por una combinación de plegado y termosellado con corte. Aunque la invención se define por comprender una primera lámina y una segunda lámina de película polimérica, una banda única de película se puede plegar sobre sí misma para proporcionar dos láminas superpuestas, o un tubo de película se puede formar de tal manera que dos porciones superpuestas del tubo proporcionen el equivalente de dos láminas de película. El perímetro termosellado de la bolsa se puede lograr mediante la superposición de la primera y la segunda láminas de película polimérica y a continuación termosellando cada una directamente con la otra, o termosellándolas indirectamente empleando una tercera película polimérica intercalada, como se conoce en general y se practica en la técnica.

20 Se puede utilizar la bolsa o el material para fabricar una bolsa, tal como el fabricado por Totani Corporation, Kioto, Japón o Klockner Barlett Co., Gordonsville, VA, EE.UU.

25 Las bolsas se preparan preferentemente de forma que se proporcione un sellado hermético completo por todo el perímetro para que incluya totalmente el interior de la bolsa y su contenido, antes del momento de uso. Un sellado perimétrico completo puede mantener el interior de la bolsa en un estado estéril. La bolsa se puede cortar o abrir por rasgado por debajo de la junta superior perimétrica, en el momento de uso para introducir la muestra del ensayo y el agua necesaria para constituir el medio de cultivo (si no se proporciona ya en la bolsa). Opcionalmente, la bolsa comprende unos medios guía para facilitar la apertura de la bolsa para la adición de una muestra de cultivo. Tales medios guía comprenden al menos una muesca, perforación o una combinación de las mismas, incorporada en la bolsa cerca de la junta superior.

30 Una bolsa puede tener un cierre de tipo reutilizable cerca de la junta superior, tal como la abertura que se puede volver a cerrar en forma de un cierre de tipo "cremallera" o "Ziplock", y otras formas de sellar la bolsa. Un cierre "Ziplock" para la bolsa permite abrir y cerrar de nuevo convenientemente la bolsa cuando se añade una muestra a la bolsa para cultivos.

35 Un método alternativo para cerrar de nuevo la bolsa es utilizar un hilo de alambre para el cierre en lugar de un cierre "Ziplock". El hilo de alambre para el cierre está conectado a la porción superior de una de las láminas, y el hilo de alambre para el cierre tiene una longitud que excede la anchura de la bolsa. Para cerrar de nuevo la bolsa después de haber añadido la muestra, los bordes superiores de la bolsa, incluyendo la abertura para la inserción de la muestra, se acoplan entre sí y luego se enrollan sobre el hilo de alambre para cierre. Los extremos del hilo de alambre para el cierre se sujetan a continuación sobre la porción enrollada para evitar que la porción se desenrolle.

40 Alternativamente, la bolsa puede cerrarse de nuevo enrollando sus bordes superiores y sujetando la parte enrollada con una abrazadera de resorte. Un método alternativo de sellado de la bolsa después de que la muestra ha sido añadida, implica simplemente la unión de los bordes superiores entre sí mediante termosellado o, de forma similar, formar un sellado hermético.

45 Las bolsas se pueden ensamblar parcialmente antes de la introducción del concentrado de nutrientes (es decir, como muchas operaciones en el conjunto de la bolsa, el ensamblaje se lleva a cabo si es posible, antes de la introducción del concentrado de nutrientes). Por ejemplo, puede ser deseable ensamblar bolsas "vacías" en las que el sellado perimétrico superior y el cierre reutilizable opcional, están en su lugar antes de que el lugar de contención para el concentrado de nutrientes se introduzca en la bolsa a través de una abertura en las porciones inferiores o la parte inferior del sellado perimétrico. El ensamblaje parcial puede producir bolsas vacías no específicas que se pueden adaptar con diferentes concentrados de nutrientes, específicos de las pruebas y paquetes opcionales de aditivos.

55 Las bolsas se pueden preparar en una variedad de tamaños dependiendo de la prueba a realizar. Una bolsa para homogeneizador ejemplar puede tener aproximadamente 18 cm (7 pulgadas) de ancho y 29 cm (11,5 pulgadas) de altura. Cuando una bolsa se coloca en un homogeneizador adecuado, se sujeta con la puerta de la cámara o con abrazaderas en un punto de presión de aproximadamente 24 cm (9,5 pulgadas) por encima del fondo de la bolsa. El área de la bolsa afectada por las paletas (la zona de compresión) se extiende hasta aproximadamente 19 cm (7,5 pulgadas) por encima del fondo de la bolsa. El área de la bolsa entre el punto de presión y la zona de compresión no está sujeta generalmente a compresión en caso de uso normal.

En algunas realizaciones, el concentrado de nutrientes se introduce en un compartimento separado a través de una abertura en la junta perimétrica, tal y como se describe más abajo, y a continuación se sella la bolsa. En realizaciones alternativas, el lugar de contención, tal como una bolsita, se puede preparar en una operación aparte de la formación de la bolsa. En esos casos, el lugar de contención se introduce en la bolsa a través de una abertura en la junta perimétrica antes de sellar la bolsa.

Uno o más compartimentos frágiles se pueden instalar ya sea durante o después de la formación de la bolsa. Como se ha descrito anteriormente, el compartimento frágil puede estar formado por termosellado de las láminas superpuestas, a temperaturas más bajas que la requerida para proporcionar el sellado perimétrico de bloqueo. Un sellado frágil puede cubrir dos puntos en la junta perimétrica, de tal manera que el sellado frágil y la porción de la junta perimétrica entre los puntos defina un compartimento separado. Una porción de la junta perimétrica se deja sin sellar para proporcionar una abertura para introducir el concentrado de nutrientes. Después de que se ha introducido el concentrado de nutrientes en el compartimento separado, la abertura en la junta perimétrica se sella para proporcionar un compartimento cerrado. De manera similar, un compartimento separado se puede definir por impresión por zonas de un material que reacciona con el agua en la superficie interior de una lámina que forma la bolsa y sellarla con la superficie interior de la otra lámina que forma la bolsa. El compartimento frágil se puede incorporar en la bolsa en una región de la bolsa, de manera que se pueda comprimir fácilmente por las paletas de los homogeneizadores (en la bolsa del ejemplo descrito anteriormente, en la zona entre la parte inferior de la bolsa, aproximadamente 19 cm (7,5 pulgadas) por encima del fondo, preferiblemente entre el fondo de la bolsa y aproximadamente 8 cm (3 pulgadas) por encima del fondo).

Las bolsitas que contienen concentrado de nutrientes se pueden insertar en la bolsa a través de una abertura en la junta perimétrica. Las bolsitas pueden estar ligeramente sujetas dentro de la bolsa, por ejemplo, incorporadas en la bolsa fijadas en una región de la bolsa, de manera que se puedan comprimir fácilmente por las paletas de los homogeneizadores. Las bolsitas se pueden preparar con al menos una pestaña extendida, que se puede insertar entre la primera lámina de la película polimérica y la segunda lámina de película polimérica, en el perímetro de la bolsa, antes del termosellado para fijar su posición. Por ejemplo, una pestaña extendida se puede sellar entre las láminas del material laminar en la junta inferior o en una junta lateral. Alternativamente, las pestañas extendidas en cada extremo de la bolsita se pueden sellar en una porción de cada junta lateral, de manera que la bolsita abarca la anchura de la bolsa. Otras formas de fijar la bolsita a la bolsa pueden incluir el uso de adhesivos.

En otras realizaciones, como por ejemplo, láminas, bolitas, gránulos y cápsulas, el lugar de contención se puede insertar simplemente en la bolsa antes de termosellar la abertura en el perímetro de la bolsa. Las láminas, bolitas y similares, se pueden adherir opcionalmente a un lugar específico en el interior de la bolsa, por ejemplo, a través de un adhesivo de aplicación en estado fundido.

Las bolsitas o compartimentos múltiples que comprenden tanto las juntas frágiles como los materiales reactivos con el agua, que tienen cada uno un componente del concentrado de nutrientes, también se pueden incorporar en una tira de material polímero. La tira de bolsitas o compartimentos, se pueden sellar en una porción de cada junta lateral, de modo que la tira abarca la anchura de la bolsa en una región de la bolsa que permite que las paletas de los homogeneizadores las compriman.

Tal y como se ha descrito anteriormente, una bolsa puede comprender uno o varios lugares de contención adicionales para los aditivos. Estos lugares pueden estar localizados en una región de la bolsa por encima de las zonas de compresión (en la bolsa del ejemplo descrito anteriormente, en la zona comprendida entre aproximadamente 19 cm por encima del fondo hasta aproximadamente 24 cm desde el fondo), de manera que se pueden añadir en una segunda etapa, posterior a la etapa de constitución del medio nutriente. Estos lugares se pueden incorporar en una tira de material polímero que se puede sellar en una porción de cada junta lateral, cerca del extremo superior de la bolsa, por encima de las zonas de compresión.

La invención también incluye una bolsa reforzada, que es una que tiene una base reforzada (con pliegues) que permite que la bolsa pueda permanecer erguida sin ningún apoyo externo. La bolsa reforzada puede comprender al menos dos láminas de película de envasado, situadas una encima de la otra cuando la bolsa no está llena. La porción o la región inferior de las láminas, la misma o una diferente, están conectadas entre sí y se cierran para formar la base reforzada. Por ejemplo, una lámina puede ser opaca, opcionalmente con elementos gráficos, y otra lámina puede ser transparente para permitir la visualización del contenido de la bolsa. Una forma particular de bolsa erguida comprende tres láminas de película de envasado, una de las cuales forma el fondo de la bolsa y está reforzada, y dos que forman los lados de la bolsa. Las láminas se unen entre sí por dos costuras en el fondo de la bolsa y unas costuras perimétricas a los lados. Las costuras proporcionan suficiente rigidez a la bolsa para que pueda permanecer en posición vertical. Después del llenado, el medio de cultivo líquido constituido aplica una presión hacia fuera sobre los lados opuestos de la bolsa, obligando a que los lados se distancien entre sí. En la base de la bolsa, el fondo o el refuerzo se despliegan. El refuerzo define el fondo de un recipiente que contiene líquido y limita el movimiento hacia afuera de los lados de la bolsa. Los bordes laterales inferiores se fortalecen por la abertura del refuerzo y definen una base estable que permite que la bolsa repose sobre cualquier superficie plana en una posición vertical. Cuando la bolsa se cierra, es fácil de mover de un lugar a otro y se puede colocar en estantes o en cajas junto con otras bolsas de la misma construcción.

Una bolsa de malla, opcional, se puede colocar dentro de la bolsa del medio de cultivo. La bolsa de malla puede estar formada por una tela de tipo malla o un material similar que pueda permitir que el medio y los microorganismos en el medio pasen a través de sus paredes, pero al mismo tiempo, sirve como un filtro para partículas. La bolsa de malla puede filtrar partículas de modo que si se utiliza una pipeta serológica para retirar el contenido de la bolsa, la pipeta no se obstruye. Opcionalmente, una punta de pipeta puede estar unida a una de las paredes internas de la bolsa. Un extremo superior de la punta está abierto para recibir una pipeta y el extremo inferior está cerrado. Por ejemplo, durante el uso, una pipeta se puede insertar en la punta y el medio puede extraerse desde el interior del cono de la pipeta, tal como el medio de filtración. Cualquier material adecuado para uso como medio de filtración en el contexto descrito, se puede utilizar como una punta de pipeta.

#### 10 Esterilización de la bolsa

La esterilización de la bolsa y del concentrado de nutrientes se produce en una habitación limpia y en condiciones rigurosas. El concentrado esterilizado se puede colocar en la bolsa, ya sea en un compartimento separado o dentro de una bolsita, tal y como se ha descrito anteriormente. Una bolsa se puede esterilizar por medios conocidos por un experto en la técnica, tal como en un autoclave a una temperatura de 121°C, una presión de 15 psi, y vapor al 100%. La bolsa y/o las bolsitas también se pueden esterilizar también por irradiación, un procedimiento convencional que es conocido por una persona experta.

Un concentrado de nutrientes no estéril se puede introducir en una bolsa no estéril y luego someter ambos elementos a tratamiento por irradiación como una sola unidad. Los rayos gamma o la radiación con electrones también pueden esterilizar la unidad. Se prefiere que no se deje crecer a ningún contaminante hasta niveles significativos, antes del tratamiento por radiación, a menos que la dosificación de la radiación se incremente para matar por completo estos contaminantes y puede hacer que uno o varios nutrientes en el medio sean incapaces de favorecer el crecimiento de los microorganismos deseados cuando se utilizan posteriormente para el cultivo. Un crecimiento excesivo de estos contaminantes antes de la esterilización puede dar como resultado la creación y acumulación de productos de desecho tóxicos, que no se pueden eliminar por esterilización, pero no obstante puede restringir o impedir el crecimiento de los microorganismos durante el cultivo. El control del crecimiento de contaminantes, previo a la esterilización puede incluir la esterilización en un corto período de tiempo, después del llenado (por ejemplo, 48 horas) o por refrigeración, para restringir el crecimiento de los contaminantes.

La dosificación de la radiación necesaria para la esterilización es bien conocida por un experto en la técnica y puede depender del material de la bolsa y del tipo de medio de cultivo. Por ejemplo, una dosis de radiación gamma de 2,5 Mrad puede ser suficiente para matar los contaminantes. Se puede utilizar una radiación gamma en el intervalo de 15 a 30 kGy.

#### Muestras de pruebas para los organismos diana

Esta invención también incluye un procedimiento para determinar una bacteria diana específica, sospechosa de estar en una muestra, utilizando la bolsa para medio de cultivo descrita anteriormente. El procedimiento puede comprender (1) la inserción de una muestra en la bolsa; (2) la liberación de un concentrado de nutrientes desde su lugar de contención y la constitución de un medio de cultivo; (3) la incubación de la muestra en el medio de cultivo para formar una mezcla de la muestra enriquecida y compleja; y (4) la detección de la presencia de la bacteria diana en la mezcla de la muestra. La mezcla compleja puede comprender una matriz alimenticia enriquecida de forma no selectiva.

Después de la preparación, la bolsa del medio de cultivo se envía a un laboratorio o a instalaciones de análisis, para someter a ensayo una muestra (a veces llamada una "muestra del cultivo"). La bolsa del medio de cultivo se abre y la muestra del cultivo se introduce dentro de ella, junto con el agua necesaria para constituir el medio de cultivo líquido, a partir del concentrado de nutrientes. La bolsa se sella y el concentrado de nutrientes es liberado desde su lugar de contención por reacción con el agua, en el caso de realizaciones reactivas con el agua y/o por la acción de una compresión manual o compresión por homogeneizador, para proporcionar el medio de cultivo líquido. A continuación, se incuba de acuerdo con procedimientos conocidos y el tipo de muestra. Después de la incubación, la muestra cultivada se inspecciona y se somete a ensayo para determinar la muestra de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la detección de bacterias diana en la mezcla compleja de la muestra puede comprender (i) obtener el ADN diana bacteriano total a partir de las bacterias diana; (ii) poner en contacto el ADN diana bacteriano total con una composición de replicación del ensayo para formar una primera mezcla de reacción, y con una composición de replicación testigo positivo para formar una segunda mezcla de reacción, (iii) termociclar las mezclas de reacción primera y segunda, produciendo de este modo productos de la amplificación del ADN que consisten en uno o ambos ADN (ADN bacteriano total amplificado para producir múltiples copias del ADN diana o un fragmento amplificado del ácido nucleico testigo) y (iv) detectar los productos de la amplificación en los que la presencia del fragmento amplificado de ácido nucleico testigo solo, indica una reacción con éxito y en donde la presencia de múltiples copias de ADN diana, indica la presencia de las bacterias diana en la muestra. Por ejemplo, la presencia de productos de la amplificación se puede detectar por medios fluorescentes, electroforesis en gel o ambos.

La composición de replicación del ensayo puede comprender (a) una polimerasa y (b) una pareja de cebadores que

consisten en un primer cebador y un segundo cebador, siendo capaz cada cebador de hibridarse con una porción del ADN bacteriano diana total; (c) reactivos y tampones necesarios para llevar a cabo la amplificación del ADN. La composición de replicación testigo positivo puede comprender (a) una polimerasa, (b) al menos un fragmento de ácido nucleico testigo, (c) un único cebador capaz de hibridarse con una porción del fragmento de ácido nucleico testigo y (d) reactivos y tampones necesarios para efectuar la amplificación del ADN. La composición de replicación del ensayo, la composición de replicación testigo positivo, o ambas se pueden proporcionar en un comprimido. El único cebador puede ser el mismo que el primero cebador o el segundo cebador. El número de fragmentos de ácido nucleico testigo puede ser de 1 a 10.

La composición de replicación del ensayo, la composición de replicación testigo positivo, o ambas, pueden comprender un agente intercalante tal como un colorante de cianina asimétrico. El colorante de cianina puede ser quinolinio, tetrayoduro de 1,1'-[1,3-propanoediilbis[(dimetiliminio)-3,1-propanodiil]]bis[4-[(3-metil-2(3H)-benzotiazoliliden)metilo]], disponible bajo el nombre comercial de TO-TO-1<sup>®</sup>; quinolinio, diyoduro de 4-[(3-metil-2(3H)-benzoxazoliliden)metil]-1-[3-(trimetilamonio)propilo], disponible bajo el nombre comercial YO-PRO-1<sup>®</sup>; o combinaciones de dos o varios de los mismos.

Las bacterias diana pueden ser bacterias patógenas, tales como las incluidas en los géneros *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, o combinaciones de dos o varias de las mismas.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos, y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención.

#### 20 Ejemplo 1

El análisis de coliformes en muestras de agua y aguas residuales se lleva a cabo añadiendo 100 ml de la muestra de agua a una bolsa para homogeneizador que contiene un concentrado de nutrientes, suplementado con el reactivo de o-nitrofenil *beta*-D-galactopiranosido (ONPG) en una bolsita que reacciona con el agua. El concentrado se prepara como un polvo de tal manera que la adición del agua lleva los constituyentes hasta las concentraciones finales correctas. Después de que la bolsita se haya roto, liberando el concentrado de nutrientes, la muestra en la bolsa se incubaba a 35°C durante 24 horas. Si las bacterias coliformes están presentes, el compuesto incoloro ONPG se transforma en color amarillo.

#### Ejemplo 2

El análisis de *E. coli* en muestras de agua y aguas residuales se lleva a cabo mediante la adición de 100 ml de la muestra de agua en una bolsa que contiene una lámina que comprende un concentrado de nutrientes en una matriz que reacciona con el agua. El concentrado de nutrientes (por ejemplo, sulfato de laurilo), suplementado con el reactivo de 4-metilumbeliferil-*beta*-D-glucuronido (MUG), se prepara de tal manera que la adición del agua lleva los constituyentes hasta las concentraciones finales correctas. Después de que se disuelva la matriz que reacciona con el agua, liberando el concentrado, la muestra en la bolsa se incubaba a 35°C durante 24 horas. Si están presentes bacterias *E. coli*, el compuesto MUG incoloro se transforma en un compuesto fluorescente azulado que se observa bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm).

#### Ejemplo 3

En muestras de superficies ambientales tales como suelos, desagües y una planta de una compañía alimentaria, se analizó la presencia de microorganismos tales como *E. coli*, especies de *Listeria* y *Salmonella typhimurium*. Estas muestras se recogen con bastoncillos o esponjas estériles. Los bastoncillos o las esponjas se pueden añadir a una bolsa para homogeneización que contiene gránulos de concentrado de nutrientes recubiertos con un revestimiento que reacciona con el agua, junto con 100 ml de agua estéril. El concentrado de nutrientes comprende sulfato de laurilo concentrado con MUG (para *E. coli*), concentrado de UJVM (para *Listeria*), o concentrado de peptona tamponada (para *Salmonella*). El caldo de cultivo resultante después de la disolución del revestimiento que reacciona con el agua y la dispersión del concentrado y el bastoncillo o la esponja, se incubaba durante 18 a 24 horas a 35°C. Después de la incubación, en el medio de cultivo líquido se observa la presencia de material fluorescente azulado bajo luz ultravioleta de onda larga (354 nm) para el ensayo de *E. coli*, o se retiran partes alícuotas del medio de crecimiento y se analizan utilizando un procedimiento de métodos rápidos, tal como un inmunoensayo enzimático, un método de detección de sonda génica o mediante un método de cultivo puro tradicional, tal como se describe en los manuales, tal como el BAM para el análisis de *Listeria* y *Salmonella*.

#### Ejemplo 4

Cincuenta gramos de muestra de alimentos tales como carne, se añaden a una bolsa de plástico flexible que incorpora una bolsa de malla de plástico y contiene una cápsula rellena de concentrado estéril, suficiente para preparar 450 ml de tampón fosfato de Butterfield y se añaden 450 ml de agua. Con una distribución uniforme de la muestra, ésta va a diluir la carne 1:10. La bolsa se coloca en una máquina con paletas de movimiento alternativo y se mezcla durante 1 minuto, pulverizando la cápsula y liberando el concentrado. Una parte alícuota de 1 ml se retira

de la bolsa usando una pipeta serológica a través del acceso al diluyente por el lado opuesto de la bolsa de malla de la carne. Esto minimiza la posibilidad de partículas que obstruyan la pipeta serológica. Se realiza un análisis cuantitativo empleando un procedimiento de vertido o de placa de difusión o usando un procedimiento de número más probable (NMP). Tales procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica de análisis alimentarios.

5

## REIVINDICACIONES

1. Una bolsa que comprende
  - (a) una primera lámina de película polímera;
  - 5 (b) una segunda lámina de película polímera; en donde dicha segunda lámina se superpone sobre dicha primera lámina; y en donde dicha primera lámina y dicha segunda lámina se sellan entre sí directamente, o indirectamente a través de una película polímera intercalada, definiendo de este modo un perímetro sellado que forma una bolsa;
  - (c) un lugar de contención dentro de la bolsa, comprendiendo dicho lugar un concentrado de nutrientes; y
  - 10 (d) opcionalmente uno o varios lugares de contención adicionales dentro de la bolsa, comprendiendo cada uno de los lugares adicionales un aditivo seleccionado entre el grupo consistente en compuesto indicador, colorante, atenuador, fijador, reactivo para la extracción o la detección de microorganismos, y combinaciones de dos o varios de los mismos; en donde el reactivo para la extracción o la detección de microorganismos es puro o comprende uno o varios aditivos adicionales, diluyentes, fagos, componentes derivados de fagos, anticuerpos, polihistaminas, dominios de unión a maltosa, péptidos de afinidad, aptómeros, biotinas, estreptavidinas, u otras moléculas de afinidad;

en donde dicho lugar de contención, si está presente, o al menos uno de dichos lugares de contención adicionales, comprende (1) al menos una junta frágil interna al perímetro, que divide dicha bolsa en compartimentos separados, o (2) una bolsita; en donde dicha junta frágil o dicha bolsita está formada ella misma al menos parcialmente por un material polímero que reacciona con el agua; y en donde dicho material polímero que reacciona con el agua se disuelve, se rompe, se dispersa y/o se descompone después de entrar en contacto con agua.
- 20 2. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la bolsa incluye un cierre reutilizable.
3. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el lugar comprende un polvo, gránulo, bolita, lámina o placa que comprende una matriz de material polímero que reacciona con el agua en donde se mezcla el concentrado de nutrientes.
- 25 4. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 3, en donde al medio nutriente se da forma de bolita, lámina o placa antes de la aplicación del recubrimiento de material polímero que reacciona con el agua.
5. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde el lugar o uno de los lugares adicionales comprenden un comprimido o una cápsula capaz de ser pulverizado y/o disuelto durante un proceso de homogeneización.
- 30 6. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, que comprende el lugar o varios lugares de contención adicionales en donde el lugar o los lugares adicionales comprenden un antibiótico y el reactivo está en forma de líquido, gel, pasta, polvo seco, granulado u otra forma que es capaz de fluir libremente.
7. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el reactivo se inmoviliza sobre un soporte sólido que comprende partículas magnéticas o partículas paramagnéticas.
- 35 8. La bolsa de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, que comprende (1) unos medios de guía para facilitar la apertura de la bolsa para añadir una muestra de cultivo en donde los medios de guía comprenden al menos una muesca, una perforación o una combinación de las mismas incorporada en la bolsa, próxima al sellado superior o (2) una base reforzada que permite que la bolsa se mantenga en posición vertical cuando se llena.
9. Un procedimiento que comprende
  - 40 insertar una muestra que contiene un microorganismo en una bolsa según se ha caracterizado en las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;
  - liberar un concentrado de nutrientes desde el lugar para producir un medio de cultivo;
  - incubar la muestra en el medio de cultivo para formar una mezcla de la muestra enriquecida y compleja; y
  - detectar el microorganismo en la mezcla de la muestra.
- 45 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la detección comprende obtener el ADN total a partir del microorganismo; poner en contacto el ADN total con una composición de replicación de ensayo para formar una primera mezcla de reacción y con una composición de replicación de testigo positivo para formar una segunda mezcla de reacción; termociclar la primera mezcla de reacción y la segunda mezcla de reacción produciendo de este modo un producto de amplificación del ADN; y detectar el producto de la amplificación en
  - 50 donde la composición de replicación de ensayo puede comprender una polimerasa, una pareja de cebadores y un

reactivo; la composición de replicación de testigo positivo comprende una polimerasa, al menos un fragmento de ácido nucleico testigo, un cebador único capaz de hibridarse con una porción del fragmento de ácido nucleico testigo, y el reactivo; el reactivo es necesario para efectuar la amplificación del ADN; y el microorganismo incluye el género *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia*, *Staphylococcus* o *Clostridium*.

- 5 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde la mezcla de la muestra compleja comprende una matriz alimentaria enriquecida no selectivamente; la composición de replicación de ensayo o la composición de replicación de testigo positivo se encuentra preferiblemente en forma de comprimido o comprende un agente intercalante; la presencia de los productos de la amplificación se detecta por medios fluorescentes; y el agente intercalante es preferiblemente un colorante de cianina asimétrica que incluye quinolinio, tetrayoduro de 1,1'-[1,3-propanoediilbis(dimetiliminio)-3,1-propanodiil]bis[4-[(3-metil-2(3H)-benzotiazoliliden)metilo]], o quinolinio, diyoduro de 4-[(3-metil-2(3H)-benzoxazoliliden)metil]-1-[3-(trimetilamonio)propilo].

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el cebador único es el mismo que el primer cebador o el segundo cebador; y el número de fragmentos de ácido nucleico testigo es de 1 a 10.