

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 342**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2012 PCT/CA2012/050468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13006969**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2012 E 12811195 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2732027**

54 Título: **Medio de cultivo, método para cultivar Salmonella y E. coli y método para detectar Salmonella y E. coli**

30 Prioridad:

12.07.2011 US 201161506937 P

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

27.07.2017

73 Titular/es:

**FOODCHEK SYSTEMS, INC. (100.0%)
Suite 450 1414 8th Street S.W.
Calgary, Alberta T2R 1J6, CA**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ, GABRIELA;
TREMBLAY, RENAUD y
LAROCHELLE, JANI KIM**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 627 342 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

Medio de cultivo, método para cultivar *Salmonella* y *E. coli* y método para detectar *Salmonella* y *E. coli*

5 **Antecedentes****1. Campo**

10 La materia objeto desvelada se refiere de manera general a medios y métodos para cultivar microorganismos y métodos para detectar microorganismos.

2. Publicaciones relacionadas

- 15 1. Roof, D. M. y J. R. Roth. 1988. Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170:3855-3863.
2. Roof, D. M. y J. R. Roth. 1989. Functions required for vitamin B12-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 171:3316-3323.
3. Chang, G. W. y J. T. Chang. 1975. Evidence for the B12-dependent enzyme ethanolamine deaminase in *Salmonella*. *Nature* 254:150-151.
- 20 4. Garsin, D.A. 2010. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: role and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (4): 290-295.
5. Kofoed, E., C. Rappleye, I. Stojjkovic y J. Roth. 1999. The 17-gene ethanolamine (eut) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins. *J. Bacteriol.* 181: 5317-5329.
- 25 6. Brinsmade S.R., Paldon T., Escalante-Semerena J.C. 2005. Minimal functions and physiological conditions required for growth of *salmonella enterica* on ethanolamine in the absence of the metabolosome. *J. Bacteriol.* 187(23): 8039-46.
7. Capítulo 4, titulado Isolation and identification of *Salmonella* from, meat, poultry and eggs products en USDA/FSIS Microbiology Laboratory guidebook, 3ª Edición, Rev. n.º 4, http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_05.pdf
- 30 8. Capítulo 5B, titulado Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products en USDA/FSIS Microbiology Laboratory guidebook, 3ª Edición, Rev. n.º 1, http://www.fsis.usda.gov/PDF/MIg_5B_01.pdf
9. Capítulo 5 titulado *Salmonella* en FDA Bacterial Analytical Manual, 8ª Edición, Versión de noviembre de 2011, <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManual-BAM/ucm070149.htm>
- 35

Brinsmade S.R. et al. (2005) "Minimal Functions and Physiological Conditions Required for Growth of *Salmonella enterica* on Ethanolamine in the Absence of the Metabolosome", *J. Bacteriol.* 187(23):8039-8046 estudiaron el papel fisiológico del metabolismo durante el catabolismo de etanolamina usando un medio de cultivo mínimo suplementado con etanolamina (30 mM) y vitamina B12 (150 nM). El caldo usado en Brinsmade S.R. et al. contiene antibióticos y se usó para cultivar mutantes de *Salmonella* para controlar el crecimiento.

40

El estudio de Roof D.M. et al. (1989) "Functions Required for Vitamin B12-Dependent Ethanolamine Utilization in *Salmonella typhimurium*", *J. Bacteriol.* 171 (6) :3316-3323 es similar al de Brinsmade S.R. et al., sin embargo, el caldo de enriquecimiento en Roof D.M. et al. contenía sal, azúcar y antibióticos.

45

Kofoed E. et al. (1999) "The 17-gene ethanolamine (eut) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins", *J. Bacteriol.* 181 (17):5317-5329 también estudiaron el perfil genético de *Salmonella* con respecto a la utilización de etanolamina. El medio de cultivo usado en Kofoed E. et al. fue caldo LB, un caldo de enriquecimiento comercial típico bien conocido, y también contenía algunos antibióticos. Kofoed E. et al. no enseña o sugiere el uso de sulfato ferroso o piruvato de sodio.

50

Scarlett F.A. et al. (1976) "Microbial Metabolism of Amino Alcohols. Ethanolamine Catabolism Mediated by Coenzyme B12-dependent Ethanolamine Ammonia-Lyase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*", *J. Gen. Microbiol.* 95(1):173-176 también estudiaron la utilización de etanolamina con vitamina B12 con *Salmonella* usando un medio mínimo para el cultivo de bacterias. Sin embargo, Scarlett F.A. et al. no enseña o sugiere el uso de sulfato ferroso o piruvato de sodio.

55

El documento WO 1996/040861 de Bochner divulga un medio de enriquecimiento para la detección de *Salmonella*. Sin embargo, el caldo de enriquecimiento en el documento WO 1996/040861 contiene propionato de sodio en lugar de piruvato de sodio, y no usa sulfato ferroso tal como se requiere mediante la presente invención.

60

Jeter R.M. (1990) "Cobalamin-dependent 1,2-propanediol utilization by *Salmonella typhimurium*", *J. Gen. Microbiol.* 136(5):887-896, Wolf J.B. et al. (1986) "Isolation and genetic characterizations of *Bacillus megaterium* cobalamin-deficient mutants", *J. Bacteriol.* 166 (1):51-58, Koyuncu S. et al. (2009) "A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients", *BMC Veterinary Research* 5:6, and de Boer, E. (1998)

65

"Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods", Int. J. Food Microbiol. 45(1):43-53 no divulga un medio que contiene los ingredientes de vitamina B12, etanolamina, sulfato ferroso y piruvato de sodio en los intervalos de concentración de la presente invención. Por ejemplo, Jeter R.M. y Wolf J.B. et al. no usan sulfato ferroso o piruvato de sodio. Koyuncu S. et al. no usa ninguno de estos cuatro ingredientes, mientras que Boer solo menciona el piruvato de sodio, pero ninguno de los otros tres ingredientes.

Por lo tanto, la invención presenta una combinación de etanolamina, vitamina B12, piruvato de sodio y sulfato ferroso para una detección mejorada de *Salmonella* o *E. coli* en una muestra de alimento o ambiental.

10 Resumen

En una primera realización se divulga un medio de cultivo que comprende concentraciones biológicamente eficaces de: un compuesto de cobalamina y una alcanolamina.

15 En realizaciones, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina.

En realizaciones, la alcanolamina es etanolamina.

20 En realizaciones, se desvela un medio de cultivo bacteriano.

En realizaciones, las bacterias son *Salmonella spp* o *E. coli*.

25 En realizaciones, las bacterias son *Salmonella typhimurium*, *E. coli* 157, *E. coli* productora de toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica.

En realizaciones, el compuesto de cobalamina está presente a una concentración de más de aproximadamente 0,002 M y dicha alcanolamina está presente a una concentración de más de aproximadamente 0,001 mg/litro.

30 En una serie adicional de realizaciones se desvela un método para cultivar una muestra biológica, el método que comprende la etapa de incubar la muestra en presencia de concentraciones biológicamente eficaces de: un compuesto de cobalamina y una alcanolamina.

35 En realizaciones, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina.

En realizaciones, la alcanolamina es etanolamina.

En realizaciones, el método es para cultivar bacterias.

40 En realizaciones, las bacterias son *Salmonella spp* o *E. coli*.

En realizaciones, las bacterias son *Salmonella typhimurium*, *E. coli* 157, *E. coli* productora de toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica.

45 En realizaciones, la alcanolamina está presente a una concentración de más de aproximadamente 0,002 M y dicho compuesto de cobalamina está presente a una concentración de más de aproximadamente 0,001 mg/litro.

El método es para detectar *Salmonella spp* o *E. coli spp* en una muestra.

50 En realizaciones, el método es para detectar *Salmonella spp* o *E. coli spp* en una muestra y la alcanolamina es etanolamina.

55 En realizaciones, el método además comprende una etapa de PCR, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, unión a anticuerpo, flujo lateral o flujo continuo.

En una serie adicional de realizaciones se desvela un método para cultivar preferentemente *Salmonella spp* y *E. coli spp* en un medio, el método que comprende suplementar el medio con una combinación biológicamente eficaz de compuesto de cobalamina y una alcanolamina.

60 En una serie adicional de realizaciones se desvela una composición para suplementar un medio de cultivo, la composición que comprende: un compuesto de cobalamina y una alcanolamina.

65 En realizaciones, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina.

En realizaciones, la alcanolamina es etanolamina.

En realizaciones, la composición es para el crecimiento de bacterias.

5 En realización, las bacterias son *Salmonella spp* o *E. coli*.

10 En una serie adicional de realizaciones se desvela un método para detectar *Salmonella typhimurium*, *E. coli* 157, *E. coli* productora de toxina Shiga y *E. coli* enterohemorrágica en una muestra biológica, el método que comprende cultivar la muestra en presencia de una concentración biológicamente eficaz de: etanolamina; y un compuesto de cobalamina seleccionado del grupo que consiste en metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina.

15 Las características y ventajas de la materia objeto de la misma se harán más evidentes a la luz de la siguiente descripción detallada de realizaciones seleccionadas, tal como se ilustra en las figuras adjuntas. Como se verá, la materia descrita y reivindicada es susceptible de modificaciones en diversos aspectos.

En consecuencia, las figuras y la descripción han de considerarse como ilustrativos por naturaleza y no como restrictivos. El alcance completo de la invención se expone en las reivindicaciones.

20 Descripción detallada de las realizaciones seleccionadas

Términos

25 En esta divulgación, la expresión "que comprende" se usa en un sentido no limitado para referirse a que los elementos que siguen a esta expresión están incluidos, pero los elementos no mencionados de manera específica no están excluidos. Se entenderá que cuando se indica que una realización comprende un aspecto o característica, también se contempla que en variantes alternativas de la realización, la realización puede consistir en o puede consistir esencialmente en la característica en cuestión. Una referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, salvo que el contexto requiera claramente que esté uno y solo uno de los elementos.

30 En esta divulgación, el recitado de intervalos numéricos mediante puntos finales incluye todos los números subsumidos en ese intervalo que incluyen todos los números naturales, todos los números enteros y todos los intermedios fraccionarios (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4 y 5, etc.).

35 En la presente divulgación las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los correspondientes plurales salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos.

40 En la presente divulgación, el término "o" se emplea generalmente en su sentido que incluye "y/o" salvo que el contenido indique claramente lo contrario.

45 En la presente divulgación, salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresen cantidades o ingredientes, mediciones de propiedades, etc., usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como modificadas en todos los casos mediante el término "aproximadamente". En consecuencia, salvo que se indique lo contrario o necesario a la luz del contexto, los parámetros numéricos expuestos en la divulgación son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener por aquellos expertos en la materia que utilicen las enseñanzas de la presente divulgación y a la luz de las inexactitudes de medición y cuantificación.

50 Cada parámetro numérico debe entenderse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de las técnicas de redondeo ordinarias. Independientemente de que los intervalos y parámetros numéricos que determinan el ámbito general de la divulgación sean aproximaciones, sus valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se entienden ampliamente sólo en la medida en que esto es consistente con la validez de la divulgación y la distinción de la materia objeto divulgada y reivindicada de la técnica anterior.

60 En la presente divulgación, las expresiones "medios", "medio", "caldo", "medio de cultivo", "medios de cultivo", "caldo de cultivo" y similares, se refieren todas a una mezcla de nutrientes adecuada para cultivar un microorganismo deseado que puede ser una bacteria o microbio o microorganismo o cepa o especie patógena. En realizaciones, los medios pueden ser o pueden comprender cualquier medio principal tal como se define en el presente documento y se pueden preparar en la forma de un polvo o concentrado.

65 En realizaciones, los medios contienen un tampón de pH. En una serie de realizaciones, el tampón de pH es una mezcla de fosfato de potasio monobásico y dibásico pero pueden ser adecuados tampones biológicamente compatibles alternativos, tales como MOPS (también conocido como ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, ácido 3-

morfolinopropano-1-sulfónico; ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico; ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico; y 4-morfolinopropanosulfónico) y tampones de carbonato de calcio adecuados, y se seleccionarán e implementarán fácilmente por los expertos en la materia, para lograr un pH deseado para el medio.

5 En realizaciones, los medios se pueden proporcionar en la forma de un polvo o concentrado también de forma general denominado como "polvo", "concentrado", "medio en polvo", "polvo del medio", "concentrado del medio", "medio concentrado" o similares, que comprenden una pluralidad de componentes y que es adecuado para combinarse con un volumen de agua predeterminado para proporcionar un medio líquido con concentraciones deseadas de los componentes particulares. Tal medio en polvo o concentrado puede ser completo, lo que significa que solo necesita disolverse en el agua adecuada, normalmente agua estéril, antes de su uso. Como alternativa, en realizaciones, un medio en polvo o concentrado puede ser parcial, lo que significa que se necesita añadir componentes adicionales para proporcionar un medio completo adecuado para su uso. En realizaciones, un medio en polvo o concentrado también incluye medio que está al menos parcialmente hidratado en una forma concentrada adecuada para la dilución para producir el medio para su uso real en el cultivo de bacterias. Se entenderá que el término "medio" o "medios", tal como se usa en el presente documento, salvo que se requiera lo contrario por el contexto, incluye tanto el medio final que tiene componentes en concentraciones adecuadas para el cultivo de bacterias y microorganismos, y medios en polvo o concentrados adecuados para la dilución. Las expresiones medios de enriquecimiento "ActeroSalmonella/STEC" o medios "AEM" y expresiones similares se usan para referirse de manera general a los medios de acuerdo con las realizaciones.

20 En la presente divulgación, las expresiones "vitamina B12" y "cobalamina" tienen su significado normal y ambas se refieren a la vitamina que tiene la fórmula estructural mostrada en la Figura 1A, en donde R representa cualquier grupo que es compatible con la actividad normal sustancialmente de la vitamina B12 o la actividad adecuada para su uso en realizaciones de la materia objeto reivindicada en el presente documento. En realizaciones particulares y sin limitar lo anterior, el ligando R coordinado con el ion de Co²⁺ central puede ser Me, OH, CN, 5'-desoxiadenosil. Para una certidumbre adicional y sin limitación, los nombres alternativos para la vitamina B12 y los derivados biológicamente activos de las mismas incluyen: B-12, B12, complejo vitamina B, bedumil, cobalamin, cobalamina, cobamin, cobamina, complejo vitamínico B, cianocobalamin, cianocobalamina, cianocobalamínio, cibobemin, hidroxocobalamin, hidroxocobalamina, hidroxocobalamínio, hidroxocobemina, hidroxocobémína, idrossocobalamina, metilcobalamin, metilcobalamina, vitadurin, vitadurina, vitamina B12, vitamine B12, riboflavin, vitamin B2; flavin; flavina; lactoflavin; riboflavina; vitamin B-2; y vitamina G.

35 De manera similar, se entenderá que la expresión "compuesto de cobalamina" incluye todos los compuestos sustancialmente y biológicamente equivalentes a la vitamina B12 o cobalamina. Por ejemplo, y sin limitación, aquellos expertos en la materia entenderán fácilmente que en realizaciones, se entenderá que la referencia a los compuestos de vitamina B12 incluye cianocobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxilcobalamina y otros compuestos químicos funcionalmente equivalentes, todos los cuales se identificarán por aquellos expertos en la materia.

40 Se entenderá además que, en realizaciones, una variedad de formas modificadas o conjugadas de cobalamina pueden ser biológicamente eficaces y serán fácilmente reconocidas por aquellos expertos en la materia y se entenderá que se incluyan en la expresión "compuesto de cobalamina". En un aspecto amplio, los compuestos de cobalamina pueden incluir cualquiera de los compuestos de la estructura general ilustrados en la Figura 1B, en donde R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15 pueden ser el mismo o diferentes entre sí, y pueden ser independientemente H o pueden ser un alquilo de cadena lineal o ramificada, cíclica, cicloalquilo y pueden estar ramificados o sustituidos en una variedad de formas, todas fácilmente evidentes para aquellos expertos en la materia y pueden comprender de manera independiente o comprender al menos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más átomos de carbono. En realizaciones particulares y sin limitar lo anterior, el ligando R15 coordinado con el ion de Co²⁺ central puede ser Me, OH, CN, 5'-desoxiadenosil.

50 En la presente divulgación, la expresión "alcanolaminas", también denominadas alternativamente "aminoalcoholes" significa compuestos orgánicos que comprenden un grupo alcohol y un grupo amino en una estructura principal de alcano. Ejemplos no limitantes de alcanolaminas incluyen metanolamina, etanolamina, dimetiletanolamina, N-metiletanolamina, heptaminol, isoetarina, norepinefrina, propanolaminas, pentanolaminas, esfingosina, dialcanolaminas que tienen la fórmula N(H)R1,R2 y trialquilanolaminas que tienen la fórmula NR1,R2,R3. En realizaciones particulares, una alcanolamina puede ser etanolamina o puede comprender una estructura principal que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más átomos de carbono y puede comprender más de un grupo amino o más de un grupo hidroxilo o más de un grupo amino y más de un grupo hidroxilo. En realizaciones, las alcanolaminas pueden ser alcanolaminas sustituidas. En realizaciones particulares, una alcanolamina puede ser etanolamina. Para una mayor certidumbre, los nombres alternativos para etanolamina incluyen monoetanolamina, 2-aminoetanol, colamina, aminoetanol, 2-hidroxi-etilamina, glicinol, olamina, etilolamina, 2-amino-1-etanol. En realizaciones particulares, las alcanolaminas se seleccionan del grupo que consiste en: propilenglicol, monoisopropanol, etilenglicol, 2-1-aminoacetaldehído, aminopropionitrilo, etilendiamina, 2-aminopropanol, 1,2-diaminopropano, N-metilaminoetanol, 2-hidroxi-etilhidrazina, 3-amino-1-propanol, 2-fluoroetanol, glicolamida, 2-aminoetanol, (R)-(-)1,2-Propanodiol.

Se entenderá que en la presente divulgación, salvo que el contexto indique lo contrario, la referencia a un medio o solución que comprende compuestos de alcanolamina o cobalamina o a "un" o "una" alcanolamina o compuesto de cobalamina o similares, puede incluir dos, tres o una pluralidad de alcanolaminas o de compuestos de cobalamina o tanto de alcanolaminas como de compuestos de cobalamina. Por tanto, a modo de ejemplo y sin limitación, la especificación de que un medio comprende 1 gramo por litro de alcanolamina contempla que 1 gramo puede comprender una mezcla de diferentes alcanolaminas cuyos pesos en conjunto totalizan 1 gramo. Igualmente, y de nuevo a modo de ejemplo y sin limitación, una estipulación de que una mezcla comprende 1 gramo de compuesto de cobalamina debe entenderse para contemplar que el 1 gramo comprende porciones de uno o más compuestos de cobalamina, por ejemplo, metilcobalamina, cianocobalamina y/o otros compuestos de cobalamina, cuyas cantidades en conjunto totalizan 1 gramo.

En la presente divulgación, el verbo "tamponar" significa estabilizar el pH de una solución, que puede ser un medio de cultivo, en un intervalo predeterminado, de maneras que serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. El nombre "tampón" significa un compuesto químico adecuado para estabilizar el pH de una solución.

En la presente divulgación, el término medio o caldo "base" o "principal" se refiere a un caldo parcial que comprende ciertos componentes básicos requeridos fácilmente reconocidos por los expertos en la materia, y cuya composición detallada puede variar mientras se permita el crecimiento de los microorganismos a cultivar. Por lo tanto, en realizaciones y sin limitación, el medio principal puede comprender sales, tampón y extracto de proteína, y en realizaciones puede comprender cloruro de sodio, fosfato de sodio monobásico y dibásico, sulfato de magnesio y cloruro de calcio. En realizaciones, un litro de medio principal puede tener la receta general mostrada en la Tabla 1 pero en realizaciones alternativas el medio principal comprenderá o podrá comprender uno o más de agua, agar, proteínas, aminoácidos, hidrolizado de caseína, sales, lípidos, hidratos de carbono, sales, minerales y tampones de pH y puede contener extractos tales como extracto de carne, extracto de levadura, triptona, fitona, peptona y extracto de malta, y en realizaciones, el medio puede ser o puede contener medio luria bertani (LB); medio LB bajo en sal (peptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 % y NaCl al 0,5 %), medio SOB (peptona al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM), medio SOC (peptona al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM), Supercaldo (peptona al 3,2 %, extracto de levadura al 2% y NaCl al 0,5 %), medio 2xTY (peptona al 1,6 %, extracto de levadura al 1% y NaCl al 0,5 %), CaldoExtraordinario (TB, del inglés *TerrificBroth*) (peptona al 1,2 %, extracto de levadura al 2,4 %, K₂HPO₄ 72 mM, KH₂PO₄ 17 mM y glicerol al 0,4 %), caldo LB Miller o caldo LB Lennox (peptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 % y NaCl al 1 %). Se entenderá que en realizaciones particulares, uno o más componentes se pueden omitir del medio principal. En realizaciones, los medios pueden ser simples, complejos o medios definidos y pueden ser medios enriquecidos y pueden estar suplementados en una amplia variedad de formas, todas las cuales se entenderán fácilmente por aquellos expertos en la materia. En un aspecto amplio, los expertos en la materia comprenderán que los medios contemplan cualquier composición generalmente adecuada para soportar el crecimiento de uno o más microorganismos.

Tabla 1: Receta básica para los medios principales según una realización

Producto	Fabricante (n.º de cat.)	Cantidad (g/l)
Agua desionizada		1 l
Dihidrato de cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Compuestos químicos BDH (M061932)	Entre X g e Y g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma (P5655)	Entre X g e Y g
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	BDH Chemicals (BDH0246)	Entre X g e Y g
Cloruro de sodio (NaCl)	Fisher Scientific (S671)	Entre X g e Y g
Extracto de levadura Bacto TM	BD Biosciences (212750)	Entre X g e Y g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	American Chemicals LTD (7558-79-4)	Entre X g e Y g
Piruvato de sodio (CH ₃ COCOONa)	Sigma (Fluka) 15990	Entre X g e Y g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	Sigma-Aldrich	Entre X g e Y g
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma/Aldrich (251275)	Entre X g e Y g

En la Tabla 1, X e Y son valores numéricos expresados en gramos. Cada uno de X e Y puede ser independientemente 0,0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0 o más de 19,0 o cualquier número intermedio y en realizaciones particulares, el intervalo de X a Y puede estar delimitado por cualquier valor de X e Y. Se entenderá que, en realizaciones particulares, el extracto de levadura se puede usar en una variedad de formas y un intervalo de alternativas para

extracto de levadura Bacto TM será fácilmente seleccionado por aquellos expertos en la materia. A modo de ejemplo, en realizaciones particulares, triptona, extractos de carne y extractos de plantas pueden ser alternativas adecuadas, se pueden usar tampones alternativos y, en algunas realizaciones, se pueden usar sales de magnesio, de calcio y de sodio, y en realizaciones particulares, se pueden seleccionar alternativas al magnesio, calcio y sodio.

5 La Tabla 2 muestra la receta para una posible realización de medio principal.

Tabla 2: Medio principal según una realización

Producto	Fabricante (n.º de cat.)	Cantidad (g/l)
Agua desionizada		1 l
Dihidrato de cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	BDH Chemicals (M061932)	0,013
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma (P5655)	3
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	BDH Chemicals (BDH0246)	0,12
Cloruro de sodio (NaCl)	Fisher Scientific (S671)	0,5
Extracto de levadura Bacto TM	BD Biosciences (212750)	3
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	American Chemicals LTD (7558-79-4)	6
Piruvato de sodio (CH ₃ COCOONa)	Sigma (Fluka) 15990	1 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	Sigma-Aldrich	0,019 g
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma/Aldrich (251275)	0,547 g
(Total de los ingredientes anteriores)		(14,2 g)

10 Los expertos en la materia entenderán fácilmente que el crecimiento de un microorganismo deseado se promoverá mejor a unas temperaturas seleccionadas adecuadas para el microorganismo en cuestión. En realizaciones particulares, el cultivo se puede llevar a cabo a aproximadamente 39 °C y el caldo a usar puede precalentarse a esta temperatura preparatoria para la inoculación con una muestra para ensayo. En realizaciones divulgadas en el presente documento, el cultivo se puede llevar a cabo a cualquier temperatura entre 33 °C y 43 °C y se puede llevar a cabo a aproximadamente 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, o 39 °C, o 40 °C, o 41 °C o 42 °C o 43 °C o 15 entre 33 °C y 34 °C, 34 °C y 35 °C, 35 °C y 36 °C, 36 °C y 37 °C, 37 °C y 38 °C, 38 °C y 39 °C, 39 °C y 40 °C, 40 °C y 41 °C, 41 °C y 42 °C, o 42 °C y 43 °C o a una temperatura de entre 34 °C y 43 °C, o entre 35 °C y 42 °C, o entre 36 °C y 42 °C, 38 °C y 42 °C o entre 39 °C y 41 °C o entre 39 °C y 40 °C o entre 38 °C y 39 °C, o entre 39 °C y 40 °C, o entre 40 °C y 41 °C, o entre 41 °C y 42 °C o entre 42 °C y 43 °C.

20 En la presente divulgación, el "enriquecimiento" o la "suplementación" del medio se refiere a la adición de componentes seleccionados (también denominados "suplementos" o de manera colectiva como un "suplemento") para promover el crecimiento, la proliferación u otras características de uno o más microorganismos deseados, un medio "enriquecido" o "suplementado" es un medio que ha sido enriquecido de esta manera. Una "solución de enriquecimiento" o "solución de suplemento" o "suplemento" o "solución aditiva" se refiere a una solución que 25 comprende estos componentes adicionales. En realizaciones, los componentes incluidos en una solución de enriquecimiento pueden comprender una combinación biológicamente eficaz de alcanolamina y un compuesto de cobalamina y, en realizaciones, la alcanolamina puede ser etanolamina y el compuesto de cobalamina puede estar seleccionado del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina. En realizaciones particulares, un suplemento puede promover o seleccionar el crecimiento de 30 *Salmonella spp* o *E. coli spp*. Se entenderá que un suplemento o una solución de enriquecimiento puede comprender concentraciones de sus principios activos sustancialmente por encima de las concentraciones finales deseadas de tales principios, de manera que la adición del suplemento al medio receptor se puede hacer sin un cambio indeseable o excesivo del volumen o concentración de los componentes principales del medio receptor. En realizaciones, las soluciones de enriquecimiento pueden comprender aproximadamente 1 mg/ml de compuesto de 35 cobalamina o aproximadamente 0,125 mg/ml de compuesto de cobalamina o aproximadamente alcanolamina 16,6 M, o puede comprender tanto compuesto de cobalamina como alcanolamina en concentraciones relativas y absolutas tales que su adición a un medio es biológicamente eficaz para promover el crecimiento de *E. coli spp* y *Salmonella spp*. En realizaciones, la alcanolamina puede ser etanolamina y el compuesto de cobalamina puede ser cobalamina.

40 En realizaciones, el enriquecimiento de los medios puede comprender la adición a aproximadamente un litro de los medios aproximadamente 4 ml de solución 0,125 mg/ml del compuesto de cobalamina y aproximadamente 2 ml de solución de alcanolamina 16,6 M y, en realizaciones, la alcanolamina puede ser etanolamina y el compuesto de cobalamina puede ser cobalamina. Sin embargo, los expertos en la materia entenderán fácilmente que estas 45 cantidades pueden variar para adecuarse a los requerimientos particulares y, en realizaciones alternativas, los medios enriquecidos finales pueden contener aproximadamente 1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 3×10^{-6} , 4×10^{-6} , 5×10^{-6} , 6×10^{-6} , 7×10^{-6} , 8×10^{-6} , 9×10^{-6} , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} , 5×10^{-5} , 6×10^{-5} , 7×10^{-5} , 8×10^{-5} , 9×10^{-5} , 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 4×10^{-4} , 5×10^{-4} , 6×10^{-4} , 7×10^{-4} , 8×10^{-4} , 9×10^{-4} , 1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} , 5×10^{-3} , 6×10^{-3} , 7×10^{-3} , 8×10^{-3} , 9×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2×10^{-2}

2, 3x10⁻², 4x10⁻², 5x10⁻², 6x10⁻², 7x10⁻², 8x10⁻², 9x10⁻², 1x10⁻¹, 2x10⁻¹, 3x10⁻¹, 4x10⁻¹, 5x10⁻¹, 6x10⁻¹, 7x10⁻¹, 8x10⁻¹, 9x10⁻¹, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 1x10², 2x10², 3x10², 4x10², 5x10², 6x10², 7x10², 8x10², 9x10², 1x10³, 2x10³, 3x10³, 4x10³, 5x10³, 6x10³, 7x10³, 8x10³, 9x10³ o más de 9x10³ g/litro de compuesto de cobalamina, y en realizaciones particulares, el compuesto de cobalamina puede estar en un intervalo cuyos límites superiores e inferiores se definen mediante cualquiera de los valores anteriores y pueden ser de aproximadamente 1x10³ g/litro, y en realizaciones particulares puede estar entre 1x10⁻⁴ y 1x10⁻¹ g/litro, o entre 1x10⁻⁴ y 1 g/litro o puede ser mayor 1x10⁻⁴ g/litro, 1x10⁻³g/litro, 1x10⁻²g/litro o 1x10⁻¹g/litro. De manera similar, los expertos en la materia entenderán fácilmente que la concentración de alcanolamina en los medios enriquecidos se puede aproximar o exceder de los 0,02 M de alcanolamina, pero en realizaciones particulares, los medios enriquecidos pueden contener al menos o más de aproximadamente 1x10⁻⁶, 2x10⁻⁶, 3x10⁻⁶, 4x10⁻⁶, 5x10⁻⁶, 6x10⁻⁶, 7x10⁻⁶, 8x10⁻⁶, 9x10⁻⁶, 1x10⁻⁵, 2x10⁻⁵, 3x10⁻⁵, 4x10⁻⁵, 5x10⁻⁵, 6x10⁻⁵, 7x10⁻⁵, 8x10⁻⁵, 9x10⁻⁵, 1x10⁻⁴, 2x10⁻⁴, 3x10⁻⁴, 4x10⁻⁴, 5x10⁻⁴, 6x10⁻⁴, 7x10⁻⁴, 8x10⁻⁴, 9x10⁻⁴ 1x10⁻³, 2x10⁻³, 3x10⁻³, 4x10⁻³, 5x10⁻³, 6x10⁻³, 7x10⁻³, 8x10⁻³, 9x10⁻³, 1x10⁻², 2x10⁻², 3x10⁻², 4x10⁻², 5x10⁻², 6x10⁻², 7x10⁻², 8x10⁻², 9x10⁻², 1x10⁻¹, 2x10⁻¹, 3x10⁻¹, 4x10⁻¹, 5x10⁻¹, 6x10⁻¹, 7x10⁻¹, 8x10⁻¹, 9x10⁻¹, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 1x10², 2x10², 3x10², 4x10², 5x10², 6x10², 7x10², 8x10², 9x10², 1x10³, 2x10³, 3x10³, 4x10³, 5x10³, 6x10³, 7x10³, 8x10³, 9x10³ etanolamina en un precursor biológicamente eficaz o forma modificada del mismo y, en realizaciones particulares, puede contener entre 2x10³ y 2x10⁻¹M de alcanolamina, y en realizaciones, puede contener entre 2x10⁻³ y 2 M de alcanolamina y, en realizaciones, la alcanolamina puede ser o puede comprender etanolamina. En realizaciones particulares de un caldo enriquecido de acuerdo con las realizaciones, la alcanolamina puede estar a una concentración de más de aproximadamente 0,001 M, 0,002 M, 0,01 M, 0,02 M, 0,1 M o 0,2 M y el compuesto de cobalamina puede estar a una concentración de más de aproximadamente 0,001 mg/ml, 0,01 mg/ml o 0,1 mg/ml.

En la presente divulgación "condiciones del cultivo" se refiere a los parámetros para el cultivo de un microorganismo, e incluye la composición química y las propiedades físicas del medio de cultivo, así como la temperatura, agitación, contención y duración del cultivo y cualquier otro parámetro que pueda efectuar el crecimiento del microorganismo. Por tanto, en realizaciones particulares, un cultivo puede mantenerse a cualquier temperatura fuera, a cualquier temperatura entre 33 °C y 43 °C y puede llevarse a cabo a aproximadamente 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41°C, 42 °C o 43 °C o entre 33 °C y 34 °C, 34 °C y 35 °C, 35 °C y 36 °C, 36 °C y 37 °C, 37 °C y 38 °C, 38 °C y 39 °C, 39 °C y 40 °C, 40 °C y 41 °C, 41 °C y 42 °C, o 42 °C y 43 °C o a una temperatura de entre 34 °C y 43 °C, o entre 35 °C y 42 °C, o entre 36 °C y 42 °C, 38 °C y 42 °C o entre 39 °C y 41 °C o entre 39 °C y 40 °C o entre 38 °C y 39 °C, o entre 39 °C y 40 °C, o entre 40 °C y 41 °C, o entre 41 °C y 42 °C o entre 42 °C y 43 °C o entre o a cualquier otro intervalo de temperaturas compatible con el crecimiento de las bacterias de interés. En realizaciones particulares, la temperatura del cultivo puede ser de aproximadamente 39 °C. Se entenderá que las temperaturas por encima de 43 °C y por debajo de 33 °C también se pueden usar para cultivar microorganismos usando los medios descritos en el presente documento, sin embargo, se ha descubierto que cuando se desea cultivar *E. coli* spp o *Salmonella* spp, las temperaturas fuera del intervalo entre 43°C y 33°C pueden permitir un crecimiento relativamente más rápido de otros microorganismos no deseados o ser menos eficaz al promover el crecimiento del microorganismo de interés. El pH del medio de cultivo generalmente se establece entre 7 y 8, por ejemplo, en realizaciones particulares es o está aproximadamente a 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 o 9,0 o puede estar en intervalos delimitados mediante dos valores cualquiera de los anteriores. Por lo tanto, en realizaciones particulares, el pH del medio de cultivo está en intervalos con límites inferiores de 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8 o 7,9 y con límites superiores de 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, o 9,0. En una realización, el medio tiene un pH entre 7,8 y 8,4, en otra realización, el medio tiene un pH entre 7,9 y 8,3 y en una realización adicional más, el medio tiene un pH entre 8,0 y 8,2.

Se entenderá que un pH fuera del intervalo de pH 7-9 aún se puede usar en las realizaciones, pero que la eficacia y selectividad del cultivo se puede ver afectada de manera adversa. Un cultivo puede crecer durante cualquier período deseado tras la inoculación con una muestra, pero se ha descubierto que, en realizaciones, un período de cultivo de 7 horas es suficiente para enriquecer el contenido de *Salmonella* spp o *E. coli* spp de manera suficiente como para permitir el ensayo mediante métodos normales. Sin embargo, en realizaciones alternativas con propósitos particulares, el período de cultivo será mayor o menor y será de hasta o menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más horas. Los expertos en la materia seleccionarán fácilmente un período de cultivo adecuado para satisfacer requerimientos particulares.

En la presente divulgación, un "microorganismo" se refiere a una bacteria, que puede ser una bacteria patógena y, en realizaciones, es *Salmonella* spp o *E. coli* spp. En realizaciones particulares, la *Salmonella* es *Salmonella typhimurium*, y la *E. coli* es *E. coli* 157, *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

En la presente divulgación, "detectar" un microorganismo, se refiere a cualquier proceso para observar la presencia o ausencia de un microorganismo, o un cambio en la presencia de un microorganismo, en una muestra biológica, tanto si realmente se detecta o no el microorganismo o el cambio en el microorganismo. En otras palabras, el hecho de ensayar una muestra para un microorganismo o un cambio en el nivel de un microorganismo, es una "detección", incluso si se determina que el microorganismo no está presente o está por debajo del nivel de sensibilidad. La detección puede ser una observación cuantitativa, semicuantitativa o no cuantitativa y puede basarse en una

- comparación con una o más muestras de control. La detección se puede aplicar a cualquier muestra en la que se quiera evaluar la presencia o ausencia del microorganismo, y en realizaciones particulares pero sin limitar la generalidad de lo anterior, una muestra es o comprende cualquier forma de material biológico y puede comprender, molido o sin moler, carne, aves de corral, pescado, marisco, vegetales, fruta, productos lácteos, leche, huevos, alimentos envasados, alimentos enlatados, alimentos embotellados, o alimentos envueltos o almohadillas para fregar o toallitas. Se entenderá que son posibles una variedad de metodologías de detección y que éstas serán fácilmente seleccionadas e implementadas entre los expertos en la materia. En realizaciones particulares, la detección se lleva a cabo usando métodos de PCR, PCR en tiempo real, lectinas, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo y tales métodos incluyen ensayos basados en EIA y ELISA y pueden implicar la incorporación de detección por fluorescencia o colorimetría, pueden incluir la tecnología inmunocromatográfica y pueden incorporar técnicas moleculares tales como la hibridación del ADN y ensayos basados en PCR. En realizaciones, la detección se lleva a cabo usando la metodología de ensayo y aparatos MICT™ de FoodChek™ en donde se calienta una alícuota de cultivo enriquecido para eliminar el analito diana. La muestra calentada se carga en un casete de flujo lateral, que está compuesto de un lecho de muestra/conjugado que contiene partículas magnéticas de tamaño nanométrico conjugadas con un anticuerpo que se unirá al antígeno del patógeno. Los ensayos también contienen un segundo anticuerpo en una tira estrena denominada zona de captura. El flujo capilar toma el líquido cargado a través del lecho de muestra hacia el lecho conjugado, donde las bacterias dianas se unen a las partículas cubiertas de anticuerpo. Este complejo inmunitario fluye en la tira de ensayo hacia la zona de captura. El resultado es una acumulación de partículas magnéticas en la zona de captura. Si el patógeno diana está ausente, los complejos inmunitarios no se forman, las partículas no se acumulan en la línea de captura, y el resultado del ensayo es negativo. Adicionalmente, aguas abajo, una línea de control que se ha despojado de manera similar pero con un reactivo diferente verifica que el ensayo se ha realizado de manera correcta y que los reactivos aún son activos. El casete se lee en un instrumento capaz de detectar bajas concentraciones de partículas magnéticas. Este detector detecta pequeños cambios en un campo magnético a lo largo de la tira de ensayo a medida que pasa por debajo de un grupo de bobinas de detección. Las bobinas se enrollan en direcciones alternas, de manera que se genera un perfil de señal característico por la presencia de partículas magnéticas unidas a las líneas de control o de ensayo. El instrumento compara la señal de detección con un valor umbral positivo codificado en el código de barras pegado en cada casete individual y entonces comunica un resultado positivo o negativo. Los resultados se presentan en la pantalla de cristal líquido del instrumento y se imprimen o se transfieren a un ordenador relacionado. Además de todos los parámetros de análisis, el código de barras también codifica el nombre de ensayo, el número del lote, la fecha de expiración, que se imprimen junto con el resultado del ensayo. Se entenderá que una variedad de procedimientos de ensayo reconocidos para *Salmonella spp*, *E. coli spp* y otros microorganismos son ampliamente conocidos por los expertos en la materia y que tales expertos en la materia combinarán fácilmente de manera adecuada tales métodos de detección con los cultivos y los métodos de cultivo descritos en el presente documento. A modo ilustrativo y no limitante, En realizaciones particulares, los posibles métodos de detección incluyen o usan la materia objeto descrita en cualquiera de los documentos US6483303; US 6597176; US6607922; US6927570; US7323139 y explica adicionalmente la metodología de ensayo MICT™ de FoodChek™ que se puede usar de manera opcional en o con las realizaciones de los mismos.
- 40 En la presente divulgación, la expresión "biológicamente eficaz" se refiere a un compuesto, compuesto químico o mezcla o combinación de compuestos o compuestos químicos que tiene el efecto biológico deseado. Por tanto, la referencia a una mezcla biológicamente eficaz o combinación de una alcanolamina y un compuesto de cobalamina se refiere a que la mezcla tiene el efecto deseado de promover preferentemente el crecimiento del microorganismo deseado y, en realizaciones, el microorganismo puede ser uno o más de una *E. coli spp.* o una *Salmonella spp.*
- 45 En la presente divulgación, el término "concentrado" cuando se usa en referencia con uno o más compuestos químicos o componentes, significa una preparación que contiene un compuesto químico o componentes o mezcla de compuestos químicos o componentes en concentraciones significativamente mayores que sus concentraciones de trabajo deseables. Por tanto, por ejemplo, si es deseable usar un compuesto químico en una concentración de 0,02 M, entonces una solución concentrada adecuada del compuesto químico puede ser una solución 20 M, de manera que la adición de la solución concentrada a, por ejemplo, un medio de cultivo, puede lograr la concentración de trabajo deseada sin alteración material de otra manera de la concentración de otros componentes del medio de cultivo.
- 50 En la presente divulgación, las expresiones "promover de manera preferente el crecimiento de" un organismo específico, y "cultivar de manera preferente" un microorganismo y expresiones similares, se usan en referencia a condiciones de cultivo que promueven o soportan el crecimiento del microorganismo específico en preferencia del crecimiento de otros microorganismos. Por lo tanto, en realizaciones se desvelan métodos y medios que dan como resultado un elevado crecimiento y división de *Salmonella spp.* y *E. coli spp.*, con preferencia a otros microorganismos. Por lo tanto, las expresiones indican condiciones en donde el crecimiento del microorganismo específico se potencia en relación con otros microorganismos en una muestra, de manera que el crecimiento de los otros microorganismos se puede inhibir o se puede aumentar, pero que en cualquier caso, la proporción del microorganismo deseado y promovido se elevará en relación con otros microorganismos en el cultivo. En realizaciones, el crecimiento en un cultivo puede ser exclusivamente o exclusivamente de manera sustancial el crecimiento del microorganismo de interés.
- 60 En la presente divulgación, las expresiones "muestra" y "muestra biológica" tienen el mismo y más amplio significado consistente con su contexto y se refiere de manera general y sin limitación a cualquier cosa que se desee ensayar para la presencia de uno o más microorganismos de interés, e incluye todas las materias objeto tanto si contiene

realmente como si no cualquier microorganismo, o cualquier microorganismo de interés y tanto si contiene como si no *Salmonella spp* o *E. coli spp*. En realizaciones, se puede obtener una mezcla tomando una parte o porción, o mediante el uso de un hisopo, toallitas, filtro, frotis o cualquier otro método adecuado, todas las cuales se entenderán fácilmente y se implementarán y seleccionarán por aquellos expertos en la materia. En realizaciones
 5 particulares, una muestra es o comprende material alimenticio o es o comprende material vegetal o animal o es o comprende carne, marisco, pescado, vegetales, fruta, ensaladas, comidas prefabricadas, huevos, productos lácteos, materiales alimenticios combinados o sin combinar, productos enlatados o cualquier otra forma de productos frescos, crudos, cocidos, sin cocer, congelados, refrigerados, molidos, triturados, enlatados, envasados, tratados térmicamente, secos, conservados, refinados o en conserva cualesquiera. En realizaciones adicionales, se puede
 10 tomar una muestra del ambiente, de una superficie, de un recipiente o de una localización en donde se desea determinar si está presente un microorganismo de interés, por ejemplo, y sin limitación, superficies de cocina, superficies de cocción, recipientes de almacenamiento de alimentos, cubiertos, refrigeradores, congeladores, recipientes de exposición, materiales de embalaje, animales y plantas vivas y cualquier otro ambiente, localización, superficie o material cualesquiera que pueda ser de interés para un usuario. Los expertos en la materia entenderán e
 15 implementarán métodos adecuados para seleccionar, obtener y manejar cualquier muestra para su uso en las realizaciones. En realizaciones seleccionadas, las muestras son muestras de carne, pescado, marisco, vegetales, huevos o productos lácteos.

Medio de cultivo de una realización:

20 En una realización se describe un medio de cultivo que comprende concentraciones biológicamente eficaces de: un compuesto de cobalamina y una alcanolamina. En variantes de la realización y sin limitar otras variantes de la realización, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxilcobalamina y cianocobalamina. En variantes particulares de la realización, la
 25 alcanolamina es etanolamina. En realizaciones, el medio de cultivo es un medio de cultivo bacteriano y, en realizaciones, las bacterias son o incluyen *Salmonella spp* y *E. coli spp*. o cualquiera de las anteriores. En variantes particulares de la realización, las bacterias son o pueden incluir *Salmonella typhimurium*, *E. coli 157*, *E. coli* productora de toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica.

30 En variantes particulares de la realización, el compuesto de cobalamina está presente a una concentración de más de 0,002 M y la alcanolamina está presente a una concentración de más de 0,001 mg/litro.

35 En una serie de variantes, la *E. coli* es *E. coli 157* y la *Salmonella* es *Salmonella typhimurium* y en una realización, la muestra biológica es una muestra de alimento, que puede ser una muestra de carne y puede ser una muestra de carne molida.

Ejemplo de la realización:

40 La composición y el uso de un ejemplo no limitante de la composición y el uso de un ejemplo de un medio de acuerdo con la realización es tal como sigue.

45 Para preparar el medio, suspender 14,2 g de constituyentes del medio principal en polvo en 1 litro de agua destilada. La composición del medio principal de acuerdo con el ejemplo se muestra en la Tabla 3. Dispensar en un recipiente final y esterilizar mediante autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Antes de su uso, añadir 2 ml por litro de solución de etanolamina (suplemento 1) y 0,5 ml por litro de vitamina B12 (suplemento 2). Mezclar bien. Estos suplementos se ilustran adicionalmente en la Tabla 4. El pH del medio está entre 7,9 y 8,5, con un valor objetivo de aproximadamente 8,2.

50 Se entenderá que aunque se proporciona la información del fabricante para los componentes, esto es solo a modo de ejemplo, y no a modo de limitación. Los expertos en la materia entenderán fácilmente que los mismos materiales o equivalentes o las calidades adecuadas se pueden obtener a partir de un intervalo de fuentes alternativas y los expertos en la materia determinarán fácilmente las alternativas adecuadas a los componentes enumerados en la Tabla 3.

55

Tabla 3: Composición de un medio principal según la realización

Producto	Fabricante (n.º de cat.)	Cantidad (g/l)
Agua desionizada		1 l
Dihidrato de cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	BDH Chemicals (M061932)	0,013
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma (P5655)	3
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	BDH Chemicals (BDH0246)	0,12
Cloruro de sodio (NaCl)	Fisher Scientific (S671)	0,5
Extracto de levadura Bacto TM	BD Biosciences (212750)	3
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	American Chemicals LTD (7558-79-4)	6
Piruvato de sodio (CH ₃ COCOONa)	Sigma (Fluka) 15990	1 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	Sigma-Aldrich	0,019g
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma/Aldrich (251275)	0,547 g
(Total de los ingredientes anteriores)		(14,2 g)

Tabla 4: Suplementos añadidos al medio principal para formar medio final para su uso

Producto	Fabricante (n.º de cat.)	Cantidad (ml)
Etanolamina (solución) 16,6 M (suplemento 1)	Sigma (E0135)	2
Solución de vitamina B12 de 1 mg/ml (suplemento 2)	Sigma (V6629)	0,5

5 Para el control de calidad

Realización: Ensayar 10 ml por litro de medio preparado mediante inoculación con *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* O157:H7 ATCC 43895. Ambas deberían crecer en el medio tras un período de incubación adecuado. El control negativo es incubar el mismo medio durante el mismo tiempo o más sin ningún inoculante. No debería haber crecimientos evidentes bacterianos o de microorganismos.

Cuando la anterior mezcla (también denominada caldo "base" o "principal" o "medio") se ha enfriado, se añade una composición para el enriquecimiento o la suplementación del caldo principal, la composición que comprende etanolamina y vitamina B12. En la práctica, la etanolamina y la vitamina B12 se pueden añadir al medio justo antes de su uso. Los expertos en la materia entenderán que la solución de vitamina y la etanolamina se debe esterilizar antes de su uso. En una realización, la solución de vitamina B12 se prepara mezclando 1 mg de vitamina B12 por ml de agua (1 mg/ml) y la etanolamina concentrada y la solución de vitamina B12 se esterilizan con filtro antes de su uso.

Los expertos en la materia también entenderán fácilmente que, por acuerdo, el caldo base o el caldo completo se puede preparar como un concentrado y diluir con agua estéril cuando se desee usar.

En realizaciones, una muestra biológica se añade después a un volumen deseado de medio enriquecido y se mantiene a una temperatura deseada durante un período deseado. Cuando el microorganismo a detectar es *Salmonella spp*, entonces un ejemplo de la temperatura de la realización del medio de cultivo está entre aproximadamente 38 °C y 40 °C y en una variante adicional es aproximadamente 39 °C. En realizaciones, el cultivo se mantiene a la temperatura deseada, con cualquier agitación deseada o necesaria, durante cualquier período de tiempo deseado. Cuando el propósito del cultivo es la detección del microorganismo de interés, entonces la duración del cultivo de aproximadamente siete (7) horas o más puede ser adecuada para la mayoría de los procedimientos de ensayo, pero en variantes de realizaciones particulares, se elegirán períodos de tiempo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más horas. Sin embargo, los expertos en la materia ajustarán fácilmente la duración, agitación y temperatura de las condiciones del cultivo como pueda ser necesario o deseable para propósitos particulares.

Métodos de cultivo de acuerdo con una realización:

En una realización adicional se describe un método para cultivar una muestra biológica, el método que comprende la etapa de incubar la muestra en presencia de concentraciones biológicamente eficaces de: un compuesto de cobalamina y una alcanolamina. En variantes de la realización, el medio es el medio de acuerdo con una realización de medio de cultivo. En realizaciones particulares, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina; y en realizaciones, la alcanolamina es etanolamina. El método de acuerdo con la realización puede ser un método para cultivar bacterias. En variantes de la realización, las bacterias son *Salmonella spp* o *E. coli* o incluyen tanto *Salmonella spp* como *E. coli spp*. En variantes de la realización, las bacterias incluyen *Salmonella typhimurium*, *E. coli 157*, *E. coli* productora

de toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica. En variantes de la realización, la alcanolamina puede estar presente a una concentración de más de 0,002 M, 0,02M, o 0,2 M y el compuesto de cobalamina puede estar presente a una concentración de más de 0,001 g/litro, 0,01 g/litro o 0,1 g/litro. En realizaciones, el método es para detectar *Salmonella spp* o *E. coli spp* o ambas en una muestra biológica.

5 En realizaciones, el método comprende una etapa de PCR, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, unión de anticuerpos, flujo lateral o flujo continuo.

10 En realizaciones adicionales, el método es un método para cultivar preferentemente *Salmonella spp.* y *E. coli spp* en un medio, el método que comprende suplementar el medio con concentraciones biológicamente eficaces de un compuesto de cobalamina y una alcanolamina.

Suplementos de los medios de acuerdo con una realización:

15 En una serie adicional de realizaciones se describen composiciones para suplementar un medio de cultivo. En realizaciones, tal composición comprende un compuesto de cobalamina y una alcanolamina. En variantes de la realización y sin limitación, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en cobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina. En realizaciones, la alcanolamina es etanolamina. En realizaciones, las composiciones son para el crecimiento de bacterias. En realizaciones, las bacterias son o incluyen *Salmonella spp* o *E. coli spp* y en realizaciones son *Salmonella typhimurium*, *E. coli* 157, *E. coli* productora de toxina Shiga o *E. coli* enterohemorrágica.

Métodos para detectar bacterias según una realización:

25 En una realización adicional, se desvelan métodos para detectar bacterias en una muestra biológica. En realizaciones y sin limitar otras realizaciones, las bacterias son o incluyen *E. coli spp* o *Salmonella spp* o ambas. En variantes particulares de la realización, el método comprende el cultivo de la muestra en presencia de una combinación biológicamente eficaz de etanolamina y un compuesto de cobalamina. En realizaciones, el compuesto de cobalamina se selecciona del grupo que consiste en metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y cianocobalamina.

30 En una variante de la realización, se describe un método para detectar microorganismos que pueden ser *Salmonella spp* o *E. coli spp* en una muestra. En variantes de la realización, el método comprende las etapas de, de manera secuencial: cultivar la muestra en un volumen de medio que comprende cantidades biológicamente eficaces de etanolamina y compuesto de cobalamina; y detectar la *E. coli spp* o *Salmonella spp* en el cultivo. En la realización, las concentraciones de etanolamina y vitamina B12 se eligen de acuerdo con otras realizaciones. En realizaciones, el cultivo se incuba durante un tiempo adecuado a temperatura adecuada y otras condiciones para permitir el crecimiento del microorganismo de interés antes de detectar el microorganismo. En realizaciones particulares, la detección comprende detectar las bacterias mediante el uso de métodos de PCR, lectinas, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo o puede usar cualquier otra metodología de detección adecuada.

45 Tras cultivar los microorganismos en los medios de acuerdo con una realización durante un período de tiempo adecuado en las condiciones de cultivo adecuadas, la presencia del microorganismo de interés se detecta mediante uno cualquiera de los métodos fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Tales métodos incluyen pero no se limitan a métodos de detección mediante PCR, detección mediante PCR en tiempo real, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo. Sin limitación, los métodos inmunológicos incluyen la inmunoprecipitación, transferencias, inmunorradioensayo o inmunoprecipitación asociada con ligandos magnéticos o puede comprender cualquier otro método inmunológico adecuado. En realizaciones

50 una alícuota del cultivo se calienta o se trata de otro modo para eliminar el microorganismo antes del ensayo. La muestra calentada se procesa a través de la metodología derivada para identificar la presencia de antígenos o secuencias de ácido nucleicos de diagnóstico del microorganismo de interés.

55 En una realización, el medio se usa en combinación con la metodología de ensayo propiedad de FoodChek. Tal metodología se denomina MICT en el presente documento. De manera general, en una realización del proceso MICT, una alícuota del cultivo enriquecido se puede calentar para eliminar el analito diana. La muestra calentada se carga en un casete de flujo lateral, que está compuesto de un lecho de muestra/conjugado que contiene partículas magnéticas de tamaño nanométrico conjugadas con un anticuerpo que se unirá al antígeno del patógeno. Los ensayos también contienen un segundo anticuerpo en una tira estrena denominada zona de captura. El flujo capilar toma el líquido cargado a través del lecho de muestra hacia el lecho conjugado, donde las bacterias dianas se unen a las partículas cubiertas de anticuerpo. Este complejo inmunitario fluye en la tira de ensayo hacia la zona de captura. El resultado es una acumulación de partículas magnéticas en la zona de captura. Si el patógeno diana está ausente, los complejos inmunitarios no se forman, las partículas no se acumulan en la línea de captura, y el resultado del ensayo es negativo. Adicionalmente, aguas abajo, una línea de control que se ha despojado de manera similar pero con un reactivo diferente verifica que el ensayo se ha realizado de manera correcta y que los reactivos aún son activos. El casete se lee en un instrumento capaz de detectar bajas concentraciones de partículas

magnéticas. Este detector detecta pequeños cambios en un campo magnético a lo largo de la tira de ensayo a medida que pasa por debajo de un grupo de bobinas de detección. Las bobinas se enrollan en direcciones alternas, de manera que se genera un perfil de señal característico por la presencia de partículas magnéticas unidas a las líneas de ensayo o de control. El instrumento compara la señal de detección con un valor umbral positivo codificado en el código de barras pegado en cada casete individual y entonces comunica un resultado positivo o negativo. Los resultados se presentan en la pantalla de cristal líquido del instrumento y se imprimen o se transfieren a un ordenador relacionado. Además de todos los parámetros de análisis, el código de barras también codifica el nombre de ensayo, el número del lote, la fecha de expiración, que se imprimen junto con el resultado del ensayo. Las realizaciones de los métodos MICT y los aparatos se exponen en uno o varios de los documentos US7323139, US6927570, US6607922, US6597176, US6518747, US6483303, US 6046585, US6275031, US6437563.

Los expertos en la materia entenderán fácilmente que se puede usar una amplia variedad de metodologías de ensayo.

Los medios de acuerdo con las realizaciones pueden reemplazar al menos la primera etapa de enriquecimiento en protocolos convencionales para el aislamiento y la identificación de *Salmonella*.

En realizaciones, es posible alcanzar los niveles de microorganismo diana requerido para algunas tecnologías de detección actuales (es decir, aproximadamente de 10^3 a 10^4 ufc/ml) en aproximadamente 7 h de incubación a partir de un inóculo inicial que puede comprender tan poco como aproximadamente 1 ufc. En otras realizaciones, puede ser posible alcanzar tales niveles. En realizaciones, la detección puede usar procesos MICT. En realizaciones, la muestra inicial puede ser carne y la muestra puede ser de aproximadamente 375 g de carne, sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que se pueden seleccionar muestras de cualquier tamaño y naturaleza adecuadas para propósitos particulares.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan como ilustraciones de las realizaciones y no limitan el alcance de la materia objeto de las diversas realizaciones reivindicadas.

La Tabla 5 muestra la fórmula de un medio para cultivar bacterias de *Salmonella*, también denominado medio de enriquecimiento de ActeroSalmonella/STEC.

La composición y el uso de un medio de acuerdo con la realización es como sigue. Suspender 14,2 g de constituyentes del medio en polvo en 1 litro de agua destilada. Dispensar en un recipiente final y esterilizar mediante autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Antes de su uso, añadir 2 ml por litro de solución de etanolamina (suplemento 1) y 0,5 ml por litro de vitamina B12 (suplemento 2). Mezclar bien. El pH del medio está entre 7,9 y 8,5, con un valor objetivo de aproximadamente 8,2.

Tabla 5: Composición de un medio principal según el ejemplo

Producto	Fabricante (n.º de cat.)	Cantidad (g/l)
Agua desionizada		1 l
Dihidrato de cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	BDH Chemicals (M061932)	0,013
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma (P5655)	3
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO ₄)	BDH Chemicals (BDH0246)	0,12
Cloruro de sodio (NaCl)	Fisher Scientific (S671)	0,5
Extracto de levadura Bacto TM	BD Biosciences (212750)	3
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	American Chemicals LTD (7558-79-4)	6
Piruvato de sodio (CH ₃ COCOONa)	Sigma (Fluka) 15990	1 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	Sigma-Aldrich	0,019 g
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma/Aldrich (251275)	0,547 g
(Total de los ingredientes anteriores)		(14,2 g)

Enfriar el medio principal y añadir lo siguiente:

Producto	Fabricante (n.º de cat.)	Cantidad (ml)
Etanolamina (solución) 16,6 M (suplemento 1)	Sigma (E0135)	2
Solución de vitamina B12 de 1 mg/ml (suplemento 2)	Sigma (V6629)	0,5

Para el control de calidad

Realización: Ensayar 10 ml por litro de medio preparado mediante inoculación con *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* O157:H7 ATCC 43895. Ambas deberían crecer en el medio tras un período de incubación adecuado. El control negativo es incubar el mismo medio durante el mismo tiempo o más sin ningún inoculante. No debería haber crecimientos evidentes bacterianos o de microorganismos.

Cuando la mezcla (también denominada medio "base" o "principal" o caldo) se ha enfriado, se añaden la etanolamina y la vitamina B12. Actualmente, la etanolamina y la vitamina B12 se añaden al medio justo antes de su uso. Los expertos en la materia entenderán que la solución de vitamina y la etanolamina se deben esterilizar antes de su uso. En la práctica, la solución de vitamina B12 se prepara mezclando 1 mg por ml de agua (1 mg/ml) o 1 mg por ml (1 mg/ml) y la etanolamina y la solución de vitamina B12 se esterilizan con filtro.

Los expertos en la materia también entenderán fácilmente que, cuando sea conveniente, el caldo base o el caldo completo se puede preparar como un concentrado y diluir con agua estéril cuando se desee usar.

Metodología de ensayo

Se prepara una muestra para muestras compuestas de 325 g de carne de ternera molida.

1. Precalentar los medios base a 39 °C manteniendo los medios durante toda la noche (10-20 horas) en una incubadora o durante unas pocas horas en un baño de agua.
2. Añadir inmediatamente antes del enriquecimiento 2 ml de etanolamina y 500 µl de una solución de 1 mg/ml de vitamina B12 a 1 l de medios base precalentados. Mezclar a conciencia mediante vórtice e inversión.
3. Añadir dos partes de medios precalentados (que contienen tanto etanolamina como vitamina B12) a una parte de la muestra (por ejemplo, 650 ml de medio suplementado a 325 g de ternera molida) en una bolsa stomacher equipada con filtro.
4. Someter a la muestra durante 30 segundos a 150 rpm en un Stomacher® 3500.
5. Cerrar la bolsa sin apretar e incubar las muestras para enriquecimiento durante 7 horas a 39 °C en un baño de agua. Si se va a analizar un gran número de muestras, verificar que la temperatura del agua entre las bolsas de muestra alcanza 39 °C antes de comenzar a registrar el tiempo de incubación. Es importante controlar con precisión el período de enriquecimiento para obtener resultados valiosos y precisos.
6. Tras 7 horas, retirar las muestras del baño de agua y resuspender los contenidos.

Una vez que la muestra se ha preparado, se puede detectar *Salmonella spp.* o *E.coli spp* usando el procedimiento analítico de FoodChek tal como se describe anteriormente, o usando cualquiera de los métodos de ensayo convencionales. En un ejemplo, se puede detectar *Salmonella spp* usando anticuerpos selectivos adecuados. En realizaciones que usan métodos de detección adecuadamente sensibles, la sensibilidad puede ser de 1 ufc/325 g de ternera molida. Tales métodos de detección adecuadamente sensibles pueden comprender el uso de anticuerpos selectivos.

Ejemplos adicionales

Suministros y reactivos: Agua estéril destilada/desionizada. Cualquier fuente; caldo de tetrionato (TT) - Laboratorios Quelab, Quebec, Canadá; caldo de peptona de soja Rappaport-Vassiliadis (RVS) - Oxoid, Hampshire, Inglaterra; caldo Rappaport-Vassiliadis (RV); agar xilosa lisina tergitol-4 (XLT4) - Difco Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; agar BG Sulfa (BGS) - Difco Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) - Laboratorios Quelab, Quebec, Canadá; agar Hektoen Enteric (HE) - Laboratorios Quelab, Quebec, Canadá; hierro-triple azúcar (TSI) - Difco Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; agar lisina hierro (LIA) - BBL Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; antisuero de *Salmonella* - Difco Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; kits API 20 E para la identificación de enterobacterias - Biomerieux, Marcy-L'etoile, Francia; agujas de inoculación de plástico y 10 µl de bucles calibrados. Cualquier fuente.; Pipetas estériles, 10 ml - cualquier fuente

Aparatos: Incubador estacionario Symphony™ (VWR, EEUU) o equivalente - capaz de proporcionar 39 °C ± 0,5; incubador estacionario, modelo 1555 (VWR, EEUU) o equivalente. - capaz de proporcionar 35 °C ± 2,0; Baño de agua (Polyscience, EEUU) o equivalente. - capaz de proporcionar 39 °C ± 0,5; Baño de agua, con circulación, controlado de manera termostática (Lindberg/Blue, EEUU) o equivalente - capaz de proporcionar 42 °C ± 0,2; Baño de agua, con circulación, controlado de manera termostática (Lindberg/Blue, EEUU) o equivalente - capaz de proporcionar 43°C ± 0,2; Micropipeta - capaz de dispensar con precisión 500 µl - cualquier fuente; Balanza de carga superior para pesar muestras de 25, 100 y 325 g - cualquier fuente; Stomacher-Seward modelo 3500 (Seward, Londres, Inglaterra) o equivalente - para mezclar a conciencia muestras de alimentos en caldo de enriquecimiento; Stomacher-Seward modelo 400 (Seward, Londres, Inglaterra) o equivalente - para mezclar a conciencia muestras de alimentos en caldo de enriquecimiento; Mezclador de vórtice (VWR, EE.UU.).

Preparación general del medio: Para preparar Actero Salmonella/STEC, suspender 14,2 g del medio en polvo en un litro de agua destilada y mezclar bien. Dispensar en un recipiente final y esterilizar mediante autoclave a 121 °C

durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. En algunos casos, se ha descubierto que no es necesario tratar con autoclave el medio si se usa inmediatamente después de su preparación, pero en este caso, es preferible usar agua destilada al preparar el medio. Antes de su uso, añadir 2 ml de suplemento 1 (etanolamina 16,6 M) y 0,5 ml de suplemento 2 (1 mg/ml de vitamina B12) a un litro del medio principal en condiciones asépticas.

5

Preparar otros medios de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Materiales y reactivos adicionales: Placas de agar de tripticasa de soja con sangre de oveja al 5 % (agar sangre) - BBL Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; caldo TT (TT Hajna) - Laboratorios Quelab, Quebec, Canadá; agar tripton de soja (TSA) - Laboratorios Quelab, Quebec, Canadá; Caldo de tripton de soja (TSB) - Oxoid, Hampshire, Inglaterra; Agar placa de contar (PCA); Solución salina tamponada con fosfato (OBS) - Oxoid, Hampshire, Inglaterra; Agar Rainbow modificado (mRBA) - Biolog, California, EEUU; Agar sulfito de bismuto (BS) - Difco Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU; Caldo de lactosa - Laboratorios Quelab, Quebec, Canadá; Agua de pepton tamponada (BPW) - Fluka Analytical, St-Louis, EEUU; Baño de agua Isotemp (Fisher Scientific, EEUU) o equivalente. - Capaz de proporcionar 55 °C ± 0,2. Los materiales, métodos y reactivos necesarios para realizar los métodos de referencia se detallan adicionalmente en: Capítulo 4, titulado Isolation and identification of Salmonella from, meat, poultry and eggs products en USDA/FSIS Microbiology Laboratory guidebook, 3ª Edición, Rev. n.º 4, http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_05.pdf; Capítulo 5B, titulado Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products en USDA/FSIS Microbiology Laboratory guidebook, 3ª Edición, Rev. n.º 1, http://www.fsis.usda.gov/PDF/Mlg_5B_01.pdf; Capítulo 5 titulado Salmonella en FDA Bacterial Analytical Manual, 8ª Edición, Versión de noviembre de 2011, <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>

25 Preparación de la muestra: La preparación de la muestra depende del tipo y del tamaño de la muestra. Por lo tanto, el protocolo para preparar la muestra se elige para reflejar esas condiciones. Los métodos de preparación para los tipos de muestra seleccionada se explican adicionalmente a continuación.

30 Análisis: El análisis de las muestras depende de los tipos de las muestras. Por lo tanto, el protocolo para preparar la muestra se debe elegir para reflejar el tipo de muestra. Interpretación y comunicación del resultado del ensayo: Los resultados se confirman de acuerdo con el capítulo 5 de US FDA Bacteriological Analytical Manual y los capítulos 4.05 y 5B.01 de USDA FSIS Microbiology Laboratory Guidebook. Los expertos en la materia entenderán bien ambos.

Estudios de validación interna:

35 Se realizaron los siguientes estudios de validación:

1. Estudios de robustez:

Los estudios de robustez se llevaron a cabo para evaluar el efecto de modificar dos parámetros: la temperatura y el tiempo de incubación. Las variables de robustez y sus respectivos intervalos se muestran en la Tabla 6.

40 Metodología: Cada condición del intervalo del ensayo se evaluó mediante el análisis del crecimiento de tres cultivos puros en placas de agar selectivas. Se eligió *S. typhimurium* ATCC 14028 como representativa de *Salmonella* spp. y los resultados se analizaron en placas de agar XLT4 y BGS. Se eligió *E. coli* 0157:H7 ATCC 43895 como STEC y se analizó en agar Rainbow modificado y se eligió *E. faecalis* ATCC 19433 como la cepa no diana y se analizó en XLT4, BGS y agar Rainbow modificado.

45 Para los tres parámetros, las cepas se cultivaron en estrías en agar de tripticasa de soja con sangre de oveja al 5 % (también denominado agar sangre) y se incubaron durante toda la noche a 35 °C ± 1 °C. Se transfirieron unas pocas colonias de las cepas diana a 9 ml de TSB durante 6-7 horas a 35 °C ± 1 °C. Se diluyó cada cultivo a 1:10 en TSB fresco y se incubaron durante toda la noche a la misma temperatura. Después se diluyeron estos cultivos para obtener un nivel de inoculación fraccional (0,5 UFC por muestra) en el caldo de Actero Salmonella/STEC. Los cultivos crecieron usando el protocolo convencional excepto para el parámetro evaluado.

50 Para la cepa no diana, se usó la misma metodología de cultivo excepto que el nivel de inoculación fue 10 veces mayor. Se probaron diez réplicas de cada diana y 5 réplicas de la no diana para cada parámetro.

55 Resultados: Según el análisis de PDD (probabilidad de detección) realizado en los resultados, no se observaron diferencias significativas (Tabla 6). El intervalo de confianza entre la dPDD (diferencia en la probabilidad de detección) de condiciones extremas contiene un cero, de manera que no hay diferencia estadística entre cada parámetro. Por lo tanto, los cambios mínimos de temperatura y los tiempos ensayados no afectaron de manera significativa a la capacidad de Actero Salmonella/STEC para recuperar *S. typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* 0157:H7 ATCC 43895. La presencia de la cepa no diana *E. faecalis* ATCC 19433 en las muestras de Actero Salmonella/STEC no se detectó en ningún caso (datos no mostrados).

Tabla 6. Resultados del método de robustez de Actero Salmonella/STEC

Parámetro	Condición		Cepa	N ^a	Condición A			Condición B			dPDD _{AB} ^e	IC del 95 % ^f
	A	B			X ^b	PDD _A ^c	IC del 95 %	X	PDD _B ^d	IC del 95 %		
baño de agua a 39 °C	6 h	7,5 h	<i>S. typhimurium</i>	10	4	0,4	(0,168, 0,687)	2	0,2	(0,057, 0,51)	0,2	(-0,092, 0,521)
				10	5	0,5	(0,237, 0,763)	4	0,4	(0,168, 0,687)	0,1	(-0,285, 0,451)
incubadora a 39 °C	16 h	20 h	<i>S. typhimurium</i>	10	3	0,3	(0,108, 0,603)	4	0,4	(0,168, 0,687)	-0,1	(-0,446, 0,282)
				10	5	0,5	(0,237, 0,763)	3	0,3	(0,108, 0,603)	0,2	(-0,202, 0,526)
baño de agua de 7 h	38 °C	40 °C	<i>S. typhimurium</i>	10	5	0,5	(0,237, 0,763)	6	0,6	(0,312, 0,831)	-0,1	(-0,391, 0,290)
				10	4	0,4	(0,168, 0,687)	2	0,2	(0,057, 0,510)	0,2	(-0,134, 0,521)
18 h en incubadora	38 °C	40 °C	<i>S. typhimurium</i>	10	2	0,2	(0,057, 0,510)	6	0,6	(0,313, 0,832)	-0,4	(-0,672, 0,023)
				10	5	0,5	(0,237, 0,763)	5	0,5	(0,237, 0,763)	0	(-0,372, 0,372)

^aN = Número de partes del ensayo

^bx = Número de partes del ensayo positivas

^cPDD_A = Resultados positivos de la condición A divididos entre el número total de ensayos

^dPDD_B = Resultados positivos de la condición B divididos entre el número total de ensayos

^edPDD_{AB} = Diferencia entre los valores de PDD de la condición A y los de la condición B

IC del 95 % = Si el intervalo de confianza de una dPDD no contiene cero, entonces la diferencia es estadísticamente significativa al nivel del 5 %

2. Estudios de inclusión:

Se analizaron ciento nueve (109) cepas de *Salmonella* (Tabla 7) que representan casi todas las especies de *Salmonella* (incluyendo las cepas positivas en lactosa) y 50 cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) (Tabla 8), que representan especies STEC (cepas que pertenecen a los "seis grandes" y a la familia *E. coli* 0157) se analizaron para ensayar la capacidad del caldo para enriquecer *Salmonella* spp. y cepas de STEC.

Metodología: Todas las cepas de *Salmonella* spp. y STEC se cultivaron en estrías en agar sangre y se incubaron durante toda la noche a 35 °C. Se transfirieron unas pocas colonias a 10 ml de TSB durante 6-7 horas a 35 °C. Cada cultivo se diluyó a 1:10 en TSB fresco y se cultivó durante toda la noche a la misma temperatura. El cultivo se diluyó después para inocular una baja concentración (entre 1,0 y 20 UFC/ml) de la cepa en el caldo de Actero Salmonella/STEC. Cada cepa se cultivó por triplicado. Los cultivos crecieron a $39 \pm 0,5$ °C durante 7 h en un baño de agua. El crecimiento de las cepas de *Salmonella* se analizó mediante el cultivo en estrías de 10 µl de cada muestra en placas de agar selectivas de *Salmonella* (XLT4, BGS, XLD y HE). Para cepas de STEC, se confirmó el crecimiento mediante el cultivo en estrías en placas de agar Rainbow modificado.

Resultados: Los resultados del estudio de inclusión se resumen en las tablas 7 y 8 respectivamente para cepas de *Salmonella* spp y de STEC. Entre las 110 cepas de *Salmonella* ensayadas en el caldo de Actero Salmonella/STEC, 6 mostraron un crecimiento lento y 3 no crecieron. En total, 106 de 109 (el 97,2 %) cepas de *Salmonella* crecieron en el caldo Actero Salmonella/STEC y se pudieron identificar en placas específicas de agar selectivo. En lo referente a las especies de STEC, las 50 (el 100 %) cepas ensayadas crecieron en el caldo de Actero Salmonella/STEC y se pudieron identificar en placas de agar selectivo, pero 2 mostraron un crecimiento más lento en comparación con las otras. Por lo tanto, en general, el 98,1 % de las cepas diana se identificaron en las condiciones usadas para el enriquecimiento.

Tabla 7: Lista de *Salmonella* spp. - Resultados del estudio de inclusión

n.º	Número de cepa	Género	Subespecie	Serotipo	Serogrupo	Origen	Fuente ³	Resultado
1	MSR0042	<i>Salmonella</i>	enterica	Paratyphi A	A	N/A	LFZ (PHAC)	+
2	MSR0001	<i>Salmonella</i>	enterica	Kiambu	B	Pechuga de pollo	CIPARS (PHAC)	+
3	MSR0002	<i>Salmonella</i>	enterica	Schwarzengrund	B	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
4	MSR0003	<i>Salmonella</i>	enterica	Heidelberg	B	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
5	12-047	<i>Salmonella</i>	enterica	Heidelberg	B	Pollo crudo molido	Maxivet inc.	+
6	MSR0010	<i>Salmonella</i>	enterica	Typhimurium var. Copenhagen	B	Alas de pollo	CIPARS (PHAC)	+
7	MSR0013	<i>Salmonella</i>	enterica	Agona	B	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
8	MSR0017	<i>Salmonella</i>	enterica	Indiana	B	Alas de pollo	CIPARS (PHAC)	+
9	MSR0026	<i>Salmonella</i>	enterica	Saintpaul	B	agua - pez	MAPAQ	+
10	MSR0031	<i>Salmonella</i>	enterica	Stanley	B	LLZ CO 2008	MAPAQ	+
11	MSR0032	<i>Salmonella</i>	enterica	Bredeney	B	Hígado de pavo	MAPAQ	+
12	MSR0034	<i>Salmonella</i>	enterica	Paratyphi B var. Java	B	agua-tortuga	MAPAQ	+
13	MSR0044	<i>Salmonella</i>	enterica	Chester	B	Porcino	LFZ (PHAC)	+
14	MSR0065	<i>Salmonella</i>	enterica	Haifa	B	N/A	SGSC	+
15	MSR0084	<i>Salmonella</i>	enterica	Brandenburg	B	Heces de cerdo	Maxivet inc.	+
16	MSR0088	<i>Salmonella</i>	enterica	Derby	B	Heces de cerdo	Maxivet inc.	+
17	MSR0079	<i>Salmonella</i>	enterica	California 4:gmt:-	B	Heces de cerdo	Maxivet inc.	+
18	MSR0111	<i>Salmonella</i>	enterica	Typhimurium	B	ATCC 14028	ND	+
19	MSR0023	<i>Salmonella</i>	enterica	14,[5],12i-	B	Yeyuno de cerdo	MAPAQ	+
20	MSR0008	<i>Salmonella</i>	enterica	Braenderup	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
21	MSR0012	<i>Salmonella</i>	enterica	Ohio	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
22	MSR0014	<i>Salmonella</i>	enterica	Thompson	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
23	MSR0015	<i>Salmonella</i>	enterica	Mbandaka	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
24	MSR0114	<i>Salmonella</i>	enterica	1:6,7,14;z:10:-	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
25	MSR0082	<i>Salmonella</i>	enterica	1:6,7,-:1,5	C1	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
26	MSR0018	<i>Salmonella</i>	enterica	Montevideo	C1	Ambiental-Aves	Maxivet inc.	+
27	MSR0019	<i>Salmonella</i>	enterica	Infantis	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
28	MSR0030	<i>Salmonella</i>	enterica	Oranienburg	C1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
29	MSR0048	<i>Salmonella</i>	enterica	Virchow	C1	Ambiental-Aves	MAPAQ	+
30	MSR0057	<i>Salmonella</i>	enterica	Lille	C1	Camarón	LFZ (PHAC)	+
						N/A	MAPAQ	+

n.º	Número de cepa	Género	Subespecie	Serotipo	Serogrupo	Origen	Fuente ³	Resultado
31	MSR0076	<i>Salmonella</i>	enterica	Tennessee	C1	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
32	MSR0110	<i>Salmonella</i>	enterica	Rissen	C1	Harina	Maxivet inc.	+
33	MSR0205	<i>Salmonella</i>	enterica	Paratyphi C	C1	N/A	SGSC	+*
34	MSR0168	<i>Salmonella</i>	indica	V1:6,7;z41:1,7	C1	N/A	SGSC	+
35	MSR0009	<i>Salmonella</i>	enterica	Hadar	C2	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
36	MSR0016	<i>Salmonella</i>	enterica	Litchfield	C2	Alas de pollo	CIPARS (PHAC)	+
37	MSR0021	<i>Salmonella</i>	enterica	Newport	C2	Gato	MAPAC	+
38	MSR0025	<i>Salmonella</i>	enterica	Muenchen	C2	Cerdos	MAPAC	+
39	MSR0104	<i>Salmonella</i>	enterica	Molade	C2	Heces de cerdo	Maxivet inc.	+
40	MSR0045	<i>Salmonella</i>	enterica	Blockley	C2	Pollo	LFZ (PHAC)	+
41	MSR0047	<i>Salmonella</i>	enterica	Bovismordificans	C2	Porcino	LFZ (PHAC)	+
42	MSR0006	<i>Salmonella</i>	enterica	Albany	C3	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
43	MSR0007	<i>Salmonella</i>	enterica	Kentucky	C3	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
44	MSR0063	<i>Salmonella</i>	enterica	Emek	C3	N/A	SGSC	+
45	MSR0004	<i>Salmonella</i>	enterica	Enteritidis	D1	Alas de pollo	CIPARS (PHAC)	+
46	MSR0022	<i>Salmonella</i>	enterica	Javiana	D1	LLZ CC 2010	MAPAC	+
47	MSR0028	<i>Salmonella</i>	enterica	Dublin	D1	LLZ	MAPAC	+
48	MSR0064	<i>Salmonella</i>	enterica	Gallinarum	D1	Humano	SGSC	-
49	MSR0204	<i>Salmonella</i>	enterica	Typhi	D1	N/A	SGSC	-
50	MSR0011	<i>Salmonella</i>	enterica	Anatum	E1	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
51	MSR0029	<i>Salmonella</i>	enterica	Muenster	E1	Heces bovinas	MAPAC	+
52	MSR0046	<i>Salmonella</i>	enterica	Meleagridis	E1	N/A	ASPC	+
53	MSR0091	<i>Salmonella</i>	enterica	Give	E1	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
54	MSR0099	<i>Salmonella</i>	enterica	Orion	E1	Harina de carne	Maxivet inc.	+
55	MSR0103	<i>Salmonella</i>	enterica	Lexington	E1	Heces de cerdo	Maxivet inc.	+
56	MSR0020	<i>Salmonella</i>	enterica	Liverpool	E4	Pechuga de pollo	CIPARS (PHAC)	+*
57	MSR0089	<i>Salmonella</i>	enterica	Krefeld	E4	N/A	N/A	+
58	MSR0106	<i>Salmonella</i>	enterica	Dessau	E4	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
59	MSR0112	<i>Salmonella</i>	enterica	Senftenberg	E4	ATCC 8400	ND	+
60	MSR0038	<i>Salmonella</i>	enterica	Rubislaw	F	Agua - Terrario	MAPAC	+
61	MRS0173	<i>Salmonella</i>	diarizonae	Illb:11.k:z53	F	Desconocido	LFZ (PHAC)	+

n.º	Número de cepa	Género	Subespecie	Serotipo	Serogrupo	Origen	Fuente ³	Resultado
62	MSR0170	<i>Salmonella</i>	<i>indica</i>	VI:11:a:1,5	F	N/A	SGSC	+
63	MSR0037	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Poona	G1	Heces de camaleón	MAPAC	+
64	MSR0005	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Worthington	G2	Muslos de pollo	CIPARS (PHAC)	+
65	MSR0043	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Mishmarthaemek	G2	Porcino	LFZ (PHAC)	+
66	MSR0074	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Cubana	G2	Harina	Maxivet inc.	+
67	MSR0102	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Havana	G2	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
68	MSR0050	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Beauesert	H	Dragón barbudo	LFZ (PHAC)	+
69	MSR0186	<i>Salmonella</i>	<i>indica</i>	VI:1,6,14,25:a:e,n,x	H	Coco	SGSC	+
70	MSR0067	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Saphra	I	N/A	LFZ (PHAC)	+
71	MSR0049	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Camel	J	N/A	LFZ (PHAC)	+
72	MSR0071	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Cerro	K	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
73	MSR0078	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Ruiru 21:y;x	L	Harina de pescado	Maxivet inc.	+
74	MSR0040	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Pomona	M	agua - pez	MAPAQ	+
75	MSR0092	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Urbana	N	N/A	N/A	+
76	MSR0041	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Ealing	O	Soja	Maxivet inc.	+
77	MSR0066	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Monschau	O	N/A	LFZ (PHAC)	+
78	MSR0068	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Lansing	P	N/A	LFZ (PHAC)	+
79	MSR0185	<i>Salmonella</i>	<i>dianizonae</i>	III6:38:(k):z35:-	P	Humano	SGSC	+
80	MSR0039	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Wandsworth	Q	Musgo acuático	MAPAQ	+
81	MSR0060	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Tilene	R	N/A	SGSC	+
82	MSR0077	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Johannesburg	R	Harina	Maxivet inc.	+
83	MSR0167	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	V:1,40:z35:--	R	Alimento	SGSC	+
84	MSR0187	<i>Salmonella</i>	<i>indica</i>	VI:4:1:b:1,7	S	Opossum	SGSC	+
85	MSR0055	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Waycross	S	N/A	LFZ (PHAC)	+
86	MSR0056	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Kingabwa	U	Lagarto	LFZ (PHAC)	+
87	MSR0069	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Niareme	V	N/A	LFZ (PHAC)	+
88	MSR0166	<i>Salmonella</i>	<i>houtenae</i>	V:44:z39:-	V	Alimento	SGSC	+
89	MSR0054	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	IV:45:g.z51:-	W	Pérdidas de achicoria	LFZ (PHAC)	+
90	MSR0053	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Bootle	X	Camaron	LFZ (PHAC)	+
91	MSR0052	<i>Salmonella</i>	<i>anzonae</i>	IIIa:48:z4,z24:-	Y	Felino	LFZ (PHAC)	+
92	MSR0181	<i>Salmonella</i>	<i>anzonae</i>	IIIa:48:z4,z24:-	Y	Humano	SGSC	+

n.º	Número de cepa	Género	Subespecie	Serotipo	Serogrupo	Origen	Fuente ³	Resultado
93	MSR0182	<i>Salmonella</i>	<i>diarizonae</i>	IIb:48:i:z	Y	Humano	SGSC	+
94	MSR0051	<i>Salmonella</i>	<i>houtenae</i>	IV:50:z4,z23:-	Z	N/A	LFZ (PHAC)	+
95	MSR0062	<i>Salmonella</i>	<i>houtenae</i>	IV:50:g,z51 (Wassenaar)	Z	N/A	LFZ (PHAC)	+
96	MSR0184	<i>Salmonella</i>	<i>diarizonae</i>	IIb:50:k:z	Z	Humano	SGSC	+
97	MSR0059	<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i>	IIa:51:z4,z23:-	51	N/A	SGSC	+
98	MSR0163	<i>Salmonella</i>	<i>salamae</i>	II:58:d:z6	58	Humano	SGSC	+
99	MSR0171	<i>Salmonella</i>	<i>salamae</i>	II:57:z29:-	57	Desconocido	LFZ (PHAC)	-
100	MRS0174	<i>Salmonella</i>	<i>diarizonae</i>	IIb:60:z52:z53	60	Desconocido	LFZ (PHAC)	+
101	MSR0061	<i>Salmonella</i>	<i>salamae</i>	II:60:g,m,t:z6 (Setubal)	60	N/A	SGSC	+
102	MSR0183	<i>Salmonella</i>	<i>diarizonae</i>	IIb:61:k:1,5,(7)	61	Humano	SGSC	+
103	MSR0164	<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i>	IIa:62:z36:--	62	Humano	SGSC	+
104	MSR0058	<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i>	V66:z35:- (Maregrosso)	66	N/A	SGSC	+
105	MSR0165	<i>Salmonella</i>	<i>diarizonae</i>	IIb:65:(k)z	65	Humano	SGSC	+
106	MSR0100	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	I:40:b:-	-	Harina	Maxivet inc.	+
107	MSR0101	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	I:rough-0:r:1,2	-	Ambiental-Aves	Maxivet inc.	+
108	MSR0113	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	I:6,7:-:e,n,z15	-	Aves de corral	Maxivet inc.	+
109	12-055	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	I:Rough-o,y,e,n,x	-	Harina de pescado	Maxivet inc.	+

³LFZ (PHAC): Laboratory for Foodborne Zoonose (Public Health Agency of Canada), Guelph, Canadá, SGSC: *Salmonella* Genetic Stock Center, Department of Biological Sciences, University of Calgary, Canadá, MAPAQ: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec, Quebec (QC), Canadá, CIPARS (PHAC): Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance, (Public Health Agency of Canada) Saint-Hyacinthe, Canadá, Maxivet inc.: Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá

+ Presencia de colonias típicas de *Salmonella* spp. en placas de agar selectivas de *Salmonella*

+ Presencia de colonias típicas de *Salmonella* spp. en placas de agar selectivas de *Salmonella* pero con el crecimiento observado más lento.

- No se observó crecimiento en ninguna de las placas de agar selectivas para la cepa particular de *Salmonella*.

Tabla 8: Lista de STEC spp. - Resultados del estudio de inclusión

n.º	Número de cepa	Géneros y especies	Cepa	Fuente ^a	Resultado
1	MSR0144	<i>Escherichia coli</i> O26	Ovino (13918)	EcL	+
2	MSR0136	<i>Escherichia coli</i> O26:K60	Campo aislado	EcL	+
3	MSR0207	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	Bovino (EC19960464)	PHAC	+
4	MSR0208	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	Humano (EC19970119)	PHAC	+
5	MSR0209	<i>Escherichia coli</i> O45:H2	Bovino (EC19940040)	PHAC	+
6	MSR0210	<i>Escherichia coli</i> O45:H2	Humano (EC19970074)	PHAC	+
7	MSR0211	<i>Escherichia coli</i> O45:H2	Humano (EC19970086)	PHAC	+
8	MSR0212	<i>Escherichia coli</i> O45:H2	Humano (EC19970358)	PHAC	+
9	MSR0138	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13857)	EcL	+
10	MSR0139	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13858)	EcL	+
11	MSR0140	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13862)	EcL	+
12	MSR0141	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13863)	EcL	+
13	MSR0142	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13864)	EcL	+
14	MSR0143	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13897)	EcL	+
15	MSR0145	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13926)	EcL	+
16	MSR0146	<i>Escherichia coli</i> O103	Ovino (13928)	EcL	+
17	MSR0137	<i>Escherichia coli</i> O103	Bovino (10368)	EcL	+
18	MSR0135	<i>Escherichia coli</i> O103:H2	Campo aislado	Centro de ref. de <i>E. coli</i>	+
19	MSR0134	<i>Escherichia coli</i> O111:H8	Campo aislado	Centro de ref. de <i>E. coli</i>	+
20	MSR0213	<i>Escherichia coli</i> O111:H8	Bovino (EC19930467)	PHAC	+
21	MSR0214	<i>Escherichia coli</i> O111:H8	Bovino (EC20000612)	PHAC	+
22	MSR0215	<i>Escherichia coli</i> O111:NM	Humano (EC20000927)	PHAC	+
23	MSR0216	<i>Escherichia coli</i> O121:H19	Humano (EC19960807)	PHAC	+
24	MSR0217	<i>Escherichia coli</i> O12 1:H19	Humano (EC19990161)	PHAC	+
25	MSR0218	<i>Escherichia coli</i> O12 1:H19	Humano (EC20020234)	PHAC	+
26	MSR0219	<i>Escherichia coli</i> O12 1:H19	Bovino (EC20040083)	PHAC	+
27	MSR0220	<i>Escherichia coli</i> O145:NM	Humano (EC20020231)	PHAC	+
28	MSR0221	<i>Escherichia coli</i> O145:NM	Humano (EC19970355)	PHAC	+
29	MSR0222	<i>Escherichia coli</i> O145:H25	Humano (EC19990166)	PHAC	+
30	MSR0223	<i>Escherichia coli</i> O145:NM	Humano (EC19990324)	PHAC	+
31	MSR0293	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	EcL	+

n.º	Número de cepa	Géneros y especies	Cepa	Fuente ^a	Resultado
32	MSR0294	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43895 (aislado a partir de ternera molida)	EcL	+
33	MSR0295	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Aislado a partir de ternera molida (H3-FC-2)	Desconocido	+
34	MSR0296	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	campo aislado (CRDA 506)	CRDA	+
35	MSR0297	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Aislado a partir de salchicha (California EE.UU.) (CRDA 507)	CRDA	+
36	MSR0133	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Aislado a partir de salami (CRDA 508)	CRDA	+
37	MSR0298	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (EE.UU., 1993) (CRDA 509)	CRDA	+
38	MSR0299	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (MEC-1)	LSPQ	+
39	MSR0300	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (MEC-2)	LSPQ	+
40	MSR0301	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (MEC-3)	LSPQ	+
41	MSR0302	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (MEC-4)	LSPQ	+
42	MSR0303	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (MEC-5)	LSPQ	+
43	MSR0304	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	A partir de una infección tóxica alimentaria (MEC-6)	LSPQ	+
44	MSR0305	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	93111 (MEC27)	PHAC	+
45	MSR0306	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	OK1 (MEC28)	PHAC	+
46	MSR0307	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	278F1 (MEC21)	PHAC	+
47	MSR0308	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	279F1 (MEC29)	PHAC	+
48	MSR0309	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	237F1 (MEC18)	PHAC	+
49	MSR0310	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	235F1 (MEC19)	PHAC	+
50	MSR0311	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	D103F5 (MEC23)	PHAC	+

* Estas bacterias crecen más despacio en comparación con las otras

^a **PHAC:** Public Health Agency of Canada, Guelph, Canadá. **EcL:** *E. coli* Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, Quebec (QC), Canadá. **Centro de ref. de *E. coli*:** Centro de referencia de *E. coli*, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, EE.UU. **LSPQ:** Laboratoire de Sante publique du Quebec, Saint-Anne-de-Bellevue, Quebec (QC), Canadá. **CRDA:** Centre de Recherche et Developpement sur les Aliments, Saint-Hyacinthe, Quebec (QC), Canadá +Presencia de colonias típicas de STEC en agar Rainbow.

+ Presencia de colonias típicas de STEC en agar Rainbow modificado, pero el crecimiento observado fue más lento.

- No hubo crecimiento en ninguna de las placas de agar selectivo para la cepa específica de *Salmonella*.

3. Estudios de exclusividad:

Treintaiún (31) cepas no diana, elegidas como parientes genéticos cercanos de *Salmonella* y *E. coli* y especies que se encuentran en el mismo ambiente, se ensayaron en los medios de enriquecimiento de Actero Salmonella/STEC.

5 Representaron 25 géneros diferentes de bacterias y levaduras.

Metodología: Cada cepa no diana se cultivó en estrías en agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35 °C. Después, cada cepa no diana se cultivó en sus condiciones óptimas. Cada suspensión bacteriana se diluyó para inocular el caldo de Actero Salmonella/STEC con una concentración promedio 10 veces mayor de la que usó para las cepas diana. Esta etapa se realizó por triplicado. Se ensayó su crecimiento en el caldo de Actero Salmonella/STEC a 39 ± 0,5 °C durante 7 h en un baño de agua y 18 h en una incubadora. Se analizaron después en placas específicas de agar selectivas para *Salmonella* y STEC para verificar si estaban creciendo y si el caldo de Actero Salmonella/STEC, por alguna razón, provoca un cambio en el fenotipo que puede llevar a una mala interpretación de los resultados.

10 **Resultados:** Los resultados de exclusividad se resumen en la Tabla 9. La mayoría de las cepas no diana no

crecieron en las placas de agar selectivo. Para aquellas en las que se pudo observar el crecimiento, ninguna de ellas presentó un fenotipo que pudiera asemejarse a cepas de *Salmonella* o de STEC, o pudiese llevar a una mala interpretación de los resultados en placas de agar selectivo.

5 **Tabla 9: Bacterias que no son de *Salmonella* ni de STEC incluidas en ensayo de exclusividad**

N.º	Género	Especies	Cepa	Fuente ^a	Resultado
1	<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	ATCC 8750	FMV	Crecimiento atípico
2	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	ATCC 19606	SGSC	Sin crecimiento
3	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	ATCC 13812	FMV	Sin crecimiento
4	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Campo aislado	Maxivet inc.	Sin crecimiento
5	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	ATCC 14579	FMV	Sin crecimiento
6	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	ATCC 24433	FMV	Sin crecimiento
7	<i>Carnobacterium</i>	<i>divergens</i>	ATCC 35677	ARS	Sin crecimiento
8	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	ATCC 8090	FMV	Crecimiento atípico
9	<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	Campo aislado	SGSC	Crecimiento atípico
10	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	ATCC 23355	FMV	Crecimiento atípico
11	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	ATCC 19433	FMV	Crecimiento atípico
12	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	ATCC 8459	ARS	Sin crecimiento
13	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	ATCC 13337	FMV	Sin crecimiento
14	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC 13883	FMV	Crecimiento atípico
15	<i>Kluyvera</i>	<i>spp.</i>	Campo aislado	SGSC	Crecimiento atípico
16	<i>Kocuria</i>	<i>rhizophila</i>	ATCC 9341	FMV	Sin crecimiento
17	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	ATCC 314	FMV	Sin crecimiento
18	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	ATCC 43236	FMV	Sin crecimiento
19	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	ATCC 25830	FMV	Crecimiento atípico
20	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	ATCC 29906	FMV	Crecimiento atípico
21	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	Campo aislado	FMV	Sin crecimiento
22	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	Campo aislado	FMV	Crecimiento atípico
23	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Campo aislado	Maxivet inc.	Sin crecimiento
24	<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	ATCC 6939	FMV	Sin crecimiento
25	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	ATCC 8086	ARS	Sin crecimiento
26	<i>Serratia</i>	<i>spp.</i>	Campo aislado	Maxivet inc.	Sin crecimiento
27	<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i>	Campo aislado	SGSC	Crecimiento atípico
28	<i>Shigella</i>	<i>sonnei</i>	ATCC 29930	FMV	Crecimiento atípico
29	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC 25923	FMV	Sin crecimiento
30	<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	Campo aislado	FMV	Sin crecimiento
31	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	ATCC 7966	SGSC	Crecimiento atípico

^a **FMV:** Laboratory of Bacteriology, Diagnostic Service, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Canadá. **SGSC:** *Salmonella* Genetic Stock Center, Department of Biological Sciences, University of Calgary, Canadá. **ARS:** Agricultural Research Service, Washington DC, 20250, EE.UU.

4. Preparación de la muestra: Todos los diferentes alimentos se pidieron en puntos de venta cercanos a las localizaciones donde se llevaron a cabo los experimentos.

10 5. Ensayo de alimento: Se realizó el estudio matricial (usando 5 tipos de alimento) para evaluar la capacidad de recuperación de las cepas de *Salmonella* y de STEC del caldo de Actero *Salmonella*/STEC en comparación con el enriquecimiento convencional. Se usaron diferentes condiciones de enriquecimiento de acuerdo con el tipo de alimento ensayado. Los alimentos se eligieron por dos razones: 1) por la frecuente implicación en brotes de formas relevantes de intoxicación alimentaria o contaminación, y 2) en función del tipo de estrés soportado por la cepa diana (estrés frío y calor).

15

Metodología:**Huevos líquidos completos:**

5 Preparación de la muestra: *S. enteritidis* (aislada a partir de alas de pollo) se cultivó en estrías en TSBA y se incubó durante toda la noche a 35 °C. Se transfirieron unas pocas colonias a 9 ml de TSB durante 6-7 horas a 35 °C. El cultivo se diluyó a 1:10 en TSB fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura.

10 Antes de la inoculación, se trataron con calor 1,5 ml de cultivo durante 2 minutos a 55 °C en un baño de agua para lograr un daño del 50-80 % del inóculo. El grado de daño se determinó mediante la comparación del crecimiento en placas de agar selectivo y no selectivo. El grado de daño obtenido para el inóculo fue del 63 %.

15 Cinco mil quinientos ml de huevo líquido completo se inocularon a un nivel para obtener resultados parcialmente positivos (1 UFC/100 g) y se homogeneizaron agitando a mano. Mil quinientos ml de huevo líquido completo se dejaron sin inocular. Las dos partes se almacenaron a 4 °C durante 48 h para permitir que las bacterias se estabilicen en el alimento. Se preparó un análisis de NMP (número más probable) para estimar el nivel de contaminación tras el período de estabilización. La parte inoculada se dividió en dos conjuntos de muestras de 100 g y la parte sin inocular se dividió en diez muestras de 100 g en bolsas stomacher equipadas con filtro.

20 Enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: Un conjunto (20 muestras inoculadas y 5 sin inocular) se sometió durante 30 segundos con 300 ml de caldo Actero Salmonella/STEC precalentado y se incubó a $39 \pm 0,5$ °C durante 7 h en un baño de agua. Las muestras se cultivaron después en estrías directamente en agar verde brillante con sulfa (BGS) y en agar xilosa lisina Tergitol 4 (XLT4) y todas las presuntas colonias se confirmaron mediante procedimientos bioquímicos y serológicos de acuerdo con el protocolo de referencia USDA/FSIS para *Salmonella*.

25 Confirmación del enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: De la muestra enriquecida con Actero Salmonella/STEC, se transfirieron 0,5 ml en 10 ml de caldo de tetrionato (Hajna) y 0,1 ml en 10 ml de caldo de soja Rappaport-Vassiliadis (RVS) y se incubaron a $42 \pm 0,5$ °C durante 22-24 h.

Después se cultivaron en estrías en BGS y XLT4 y se incubaron a 35 °C durante 18-24 h. Si las colonias eran pequeñas o no visibles, se incubaban de nuevo durante 18-24 h adicionales. Se recogieron hasta 3 colonias típicas por placa y se transfirieron a tubos inclinados de TSI y LIA. Se realizaron procedimientos bioquímicos y serológicos como los de MLG 4.05 para confirmar las muestras positivas.

30 Enriquecimiento del método de referencia: El segundo conjunto (20 muestras inoculadas y 5 sin inocular) se enriqueció en 900 ml de agua de peptona tamponada durante 18-24 horas a $35 \pm 2,0$ °C y después se procesó de acuerdo con el protocolo de referencia USDA/FSIS para *Salmonella*. Las muestras de NMP se trataron del mismo modo. Todas las muestras presuntamente positivas se sometieron a una identificación bioquímica y serológica recomendada por el USDA/FSIS.

35 Vieiras crudas congeladas:

Preparación de la muestra: *S. saintpaul* se cultivó en estrías en agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35 °C. Unas pocas colonias se transfirieron a 9 ml de TSB durante 6-7 horas a 35 °C. El cultivo se diluyó a 1:10 en TSB fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. Mil setecientos gramos (1700 g) de vieiras crudas congeladas se inocularon a un nivel para obtener resultados parcialmente positivos (1,25 UFC/25 g) y se homogeneizaron agitando a mano. Trescientos gramos (300 g) de vieiras crudas congeladas se dejaron sin inocular. Las dos partes se almacenaron durante dos semanas a menos 20 °C para permitir que las bacterias se estabilicen en el alimento. Se preparó un análisis de NMP (número más probable) para estimar el nivel de contaminación tras el período de estabilización. La parte inoculada se dividió en dos conjuntos de veinte muestras de 25 g y la parte sin inocular se dividió en dos conjuntos de 5 muestras de 25 g.

50 Enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: Un conjunto (20 muestras inoculadas y 5 sin inocular) se sometió durante 30 segundos con 50 ml de caldo Actero Salmonella/STEC precalentado y se incubó a $39 \pm 0,5$ °C durante 7 h en un baño de agua. Las muestras se cultivaron después en estrías directamente en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y en agar Hektoen Enteric (HE) y todas las presuntas colonias se confirmaron mediante procedimientos bioquímicos y serológicos de acuerdo con el protocolo de referencia BAM 5 para *Salmonella*. Confirmación del enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: De la muestra enriquecida con Actero Salmonella/STEC, se transfirió 1,0 ml a 10 ml de caldo de tetrionato y 0,1 ml a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y se incubaron respectivamente a 35 ± 2 °C y $42 \pm 0,5$ °C durante 22-24 h. Después se cultivaron en estrías en placas de agar selectivo como en Bam 5 y los presuntos positivos se confirmaron mediante procedimientos bioquímicos de acuerdo con el protocolo de referencia BAM 5 para *Salmonella*.

55 Enriquecimiento del método de referencia: El segundo conjunto de muestras (20 inoculadas y 5 sin inocular) se enriquecieron en 225 ml de caldo de lactosa, que se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h y se procesó como en el método de referencia de BAM 5 para *Salmonella*. Todas las muestras presuntamente positivas se sometieron a una identificación bioquímica y serológica tal como se recomienda por el FDA.

Pollo crudo molido:

65 Preparación de la muestra: Se usó pollo crudo molido contaminado de manera natural. Para lograr resultados parcialmente positivos (bajo nivel), el pollo molido contaminado de manera natural se mezcló cuidadosamente con producto sin contaminar para asegurar la homogeneidad (se prepararon mil trescientos gramos (1300 g)). Para la

porción de alto nivel, doscientos cincuenta gramos (250 g) del pollo molido contaminado de manera natural se dejaron sin diluir. Se estableció un análisis de NMP para determinar el nivel de *Salmonella* en el pollo molido. Una parte de bajo nivel de contaminación se dividió en dos conjuntos de veinte muestras de 25 g y la parte de alto nivel de contaminación en diez muestras de 25 g. Todas las muestras se colocaron en bolsas stomacher equipadas con filtro. Enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: Un conjunto (20 muestras de bajo nivel y 5 de alto nivel) se sometió durante 30 segundos con 50 ml de caldo Actero Salmonella/STEC precalentado y se incubó a $39 \pm 0,5$ °C durante 20 h en una incubadora. Después se cultivaron en estrías en BGS y XLT4 y se incubaron a 35 °C durante 18-24 h y todas las colonias presuntamente positivas se confirmaron mediante procedimiento bioquímico y serológico de acuerdo con el protocolo de referencia USDA/FDIS para *Salmonella*.

Confirmación del enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: De la muestra enriquecida con Actero Salmonella/STEC, se transfirieron 0,5 ml en 10 ml de caldo de tetrionato (Hajna) y 0,1 ml en 10 ml de caldo de soja Rappaport-Vassiliadis (RVS) y se incubaron a $42 \pm 0,5$ °C durante 22-24 h. Después se cultivaron en estrías en BGS y XLT4 y se incubaron a 35 °C durante 18-24 h. Si las colonias eran pequeñas o no visibles, se incubaban de nuevo durante 18-24 h adicionales. Se recogieron hasta 3 colonias típicas por placa y se transfirieron a tubos inclinados de TSI y LIA. Se realizaron procedimientos bioquímicos y serológicos como los de MLG 4.05 para confirmar las muestras positivas.

Enriquecimiento del método de referencia: El segundo conjunto de muestras (20 muestras inoculadas y 5 sin inocular) se enriqueció en 900 ml de agua de peptona tamponada durante 18-24 horas a $35 \pm 2,0$ °C y después se procesaron de acuerdo con el protocolo de referencia USDA/FSIS para *Salmonella*. Las muestras de NMP se trataron del mismo modo. Todas las muestras presuntamente positivas se sometieron a una identificación bioquímica y serológica tal como se recomienda por el USDA/FSIS.

25 Coles:

Preparación de la muestra: *S. montevideo* se cultivó en estrías en agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35 °C. Unas pocas colonias se transfirieron a 9 ml de TSB durante 6-7 horas a 35 °C. El cultivo se diluyó a 1:10 en TSB fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. Mil quinientos gramos (1500 g) de coles se inocularon a un nivel para obtener resultados parcialmente positivos (1,0 UFC/25 g) y se homogeneizaron cuidadosamente agitando a mano. Cuatrocientos gramos (400 g) de coles se dejaron sin inocular. Las dos partes se almacenaron a 4 °C durante 48 h para permitir que las bacterias se estabilicen en el alimento. Se preparó un análisis de NMP para estimar el nivel de contaminación tras el periodo de estabilización. La parte inoculada se dividió en dos conjuntos de veinte muestras de 25 g y la parte sin inocular se dividió en dos conjuntos de cinco muestras de 25 g.

Enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: Un conjunto (20 muestras inoculadas y 5 sin inocular) se sometió durante 30 segundos con 150 ml de caldo Actero Salmonella/STEC precalentado y se incubó a $39 \pm 0,5$ °C durante 7 h en un baño de agua. De la muestra enriquecida con Actero Salmonella/STEC, se transfirió 1,0 ml en 10 ml de caldo de tetrionato y 0,1 ml en 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis y se incubaron respectivamente a $43 \pm 0,2$ °C and $42 \pm 0,2$ °C durante 18 h (porque se considera que las coles tienen una alta carga microbiana). Después se cultivaron en estrías en placa de agar selectivo tal como en Bam 5 y los presuntos positivos se confirmaron mediante procedimientos bioquímicos y serológicos de acuerdo con el protocolo de referencia de BAM 5 para *Salmonella*.

Confirmación del enriquecimiento con ActeroSalmonella/STEC: Para la confirmación, las muestras de doble enriquecimiento de Actero Salmonella/STEC se volvieron a poner en incubación durante 6 horas más para un total de 24 h (tal como se recomienda por el FDA). Después se cultivaron en estrías en placa de agar selectivo tal como en Bam 5 y los presuntos positivos se confirmaron mediante procedimientos bioquímicos y serológicos de acuerdo con el protocolo de referencia de BAM 5 para *Salmonella*. Enriquecimiento del método de referencia: El segundo conjunto de muestras (20 inoculadas y 5 sin inocular) se enriquecieron en 225 ml de caldo de lactosa, que se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h y se procesó como en el método de referencia de BAM 5 para *Salmonella*. Todas las muestras presuntamente positivas se sometieron a una identificación bioquímica y serológica recomendada por el FDA.

Resultados: Todos los resultados del estudio del método de comparación se resumen en las Tablas 10 y 11. En los huevos líquidos completos, usando caldo de Actero Salmonella/STEC para un enriquecimiento de 7 h en un baño de agua a 39 °C, se detectaron 10 muestras de 20 como positivas. Un doble enriquecimiento de las muestras enriquecidas con Salmonella/STEC de acuerdo con el protocolo de referencia USDA/FSIS confirmó los resultados para una especificidad del 100 % (Tabla 10). De las 20 muestras ensayadas mediante el método de referencia, 10 se confirmaron positivas. Todas las muestras no inoculadas resultaron negativas tanto para el método de enriquecimiento con Actero Salmonella/STEC de FoodChek como para el método de referencia USDA/FSIS (Tabla 11).

A) En las vieiras crudas congeladas, de nuevo, la realización del método de enriquecimiento de FoodChek usando el caldo Actero Salmonella/STEC fue similar al método de referencia. Efectivamente, usando el caldo Actero Salmonella/STEC para un enriquecimiento de 7 horas en un baño de agua, se confirmaron 5 muestras como positivas de las 20 inoculadas al nivel fraccional para una especificidad del 100 % (Tabla 10). El método de

referencia de FDA (BAM 5) detectó 4 muestras positivas. Todas las muestras no inoculadas se confirmaron como negativas mediante ambos métodos. El análisis estadístico (estudio no pareado) de los resultados obtenidos muestra que no existe una diferencia significativa entre los métodos de enriquecimiento con Actero Salmonella/STEC de FoodChek y el método de referencia USDA/FSIS (Tabla 11).

5 B) En el pollo crudo molido, se ensayaron muestras contaminadas de manera natural. El método con ActeroSalmonella/STEC de FoodChek, que consiste en un enriquecimiento de 20 h a 39 °C en una incubadora usando el caldo Actero Salmonella/STEC, detectó 7 positivos de los 20 analizados. La confirmación mediante el doble enriquecimiento de las muestras enriquecidas en Actero Salmonella/STEC también proporciona los mismos 7 positivos para una especificidad del 100 % (Tabla 10). El método de referencia detectó 10 muestras
10 positivas de las 20 ensayadas. Ambos métodos detectaron las 5 muestras de alto nivel contaminadas de manera natural. Como es un estudio no pareado, el análisis estadístico de los resultados obtenidos muestra que no existe diferencia significativa entre los métodos de enriquecimiento con Actero Salmonella/STEC de FoodChek y el método de referencia USDA/FSIS (Tabla 11).

15 C) En coles, el método de enriquecimiento de FoodChek que consiste en un primer enriquecimiento en un baño con agua durante 7 h a 39 °C en el caldo Actero Salmonella/STEC y un segundo enriquecimiento en caldo TT y RV durante 18 h en baños de agua a 43 °C y 42 °C respectivamente descubrió 11 muestras positivas confirmadas de las 20 preparadas (Tabla 10). Para el método de referencia, desafortunadamente, se aislaron muy pocas colonias típicas y todas resultaron negativas mediante ensayo bioquímico. Hubo hasta tres intentos de volver a aislar las colonias típicas no aisladas, pero ninguna de ellas resultaron positivas para *Salmonella*
20 mediante ensayo bioquímico. El único resultado positivo descubierto es una muestra de 50 g del análisis de NMP. El análisis estadístico de los resultados obtenido en este caso muestra que existe una diferencia significativa entre ambos métodos (Tabla 11).

Tabla 10: Método FoodChek Actero Salmonella/STEC presunto vs. confirmado

Matriz	Cepa	NMP ^a /porción de ensayo	N ^c	Método presunto con Actero Salmonella/STEC de FoodChek		Método confirmado con Actero Salmonella/STEC de FoodChek		dPDD _{cp} ^g	IC del 95 % ^h
				X ^d	PDD _{cp} ^e	IC del 95 %	X		
Huevos líquidos completos	<i>S. enteritidis</i>	0	5	0	0	(0,00, 0,43)	0	0	(-0,43, 0,43)
		0,67	20	10	0,5	(0,30, 0,70)	10	0,5	(0,30, 0,70)
Veiras crudas congeladas	<i>S. saintpaul</i>	0	5	0	0	(0,00, 0,43)	0	0	(-0,43, 0,43)
		0,17	20	5	0,25	(0,11, 0,47)	5	0,25	(0,11, 0,47)
Pollo crudo molido	contaminado de manera natural	1150	5	5	1	(0,57, 1,00)	5	1	(0,57, 1,00)
		0,67	20	7	0,35	(0,18, 0,57)	7	0,35	(0,18, 0,57)
Coles	<i>S. montevideo</i>	0	5	0	0	(0,00, 0,43)	0	0	(-0,43, 0,43)
		N/A	20	11	0,55	(0,34, 0,74)	11	0,55	(0,34, 0,74)

^aNMP = Número Más Probable basado en el PDD de las porciones de ensayo del método de referencia entre los laboratorios que usan la calculadora de NMP de AOAC, con intervalo de confianza del 95 %
^bN/A = No aplicable
^cN = Número de partes del ensayo
^dx = Número de partes del ensayo positivas
^ePDD_{cp} = Resultados positivos del método del candidato **presunto** divididos entre el número total de ensayos
^fPDD_{cc} = Resultados positivos del método del candidato confirmado divididos entre el número total de ensayos
^gdPDD_{cp} = Diferencia entre el resultado del método del candidato presunto y los valores de PDD del resultado del método del candidato confirmado
^hIC del 95 %^h = Si el intervalo de confianza de una dPDD no contiene cero, entonces la diferencia es estadísticamente significativa al nivel del 5 %

Tabla 11: Resultados del método de comparación

Matriz	Cepa	NMP ^a /porción de ensayo	N ^c	Método con Actero Salmonella/STEC de FoodChek		Método de referencia			dPDD _{c,9}	IC del 95 % ^h
				X ^d	PDD ^e	IC del 95 %	X	PDD _R ^f		
Huevos líquidos completos	<i>S. enteritidis</i>	0	5	0	0	(0,00, 0,43)	0	0	(0,00, 0,43)	(-0,43, 0,43)
		0,67	20	10	0,5	(0,30, 0,70)	10	0,5	(0,30, 0,70)	(-0,28, 0,28)
Vieiras crudas congeladas	<i>S. saintpaul</i>	0	5	0	0	(0,00, 0,43)	0	0	(0,00, 0,43)	(-0,43, 0,43)
		0,17	20	5	0,25	(0,11, 0,47)	4	0,2	(0,08, 0,42)	(-0,21, 0,30)
Pollo crudo molido	contaminado de manera natural	1150	5	5	1	(0,57, 1,00)	5	1	(0,57, 1,00)	(-0,43, 0,43)
		0,67	20	7	0,35	(0,18, 0,57)	10	0,5	(0,30, 0,70)	(-0,41, 0,15)
Coles	<i>S. montevideo</i>	0	5	0	0	(0,00, 0,43)	0	0	(0,00, 0,43)	(-0,43, 0,43)
		N/A	20	11	0,55	(0,34, 0,74)	0	0	(0,00, 0,16)	(0,29, 0,74)

^aNMP = Número Más Probable basado en el PDD de las porciones de ensayo del método de referencia entre los laboratorios que usan la calculadora de NMP de AOAC, con intervalo de confianza del 95 %
^bN/A = No aplicable
^cN = Número de partes del ensayo
^dX_c = Número de partes del ensayo positivas
^ePDD_c = Resultados positivos del método del candidato confirmado divididos entre el número total de ensayos
^fPDD_R = Resultados positivos del método de referencia confirmada divididos entre el número total de ensayos
^gSdPDD_{cr} = Diferencia entre los valores de PDD del método del candidato y del método de referencia
^hIC del 95 %^h = Si el intervalo de confianza de una dPDD no contiene cero, entonces la diferencia es estadísticamente significativa al nivel del 5 %

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo adecuado para su uso en la detección de *Salmonella spp* o *Escherichia coli* (*E. coli*) en una muestra de alimento o ambiental, comprendiendo dicho medio de cultivo una concentración biológicamente eficaz de una mezcla de nutrientes que comprende:
- 5
- cloruro de calcio en una concentración de 0,001 g/l a 0,05 g/l;
 fosfato de potasio monobásico en una concentración de 1 g/l a 6 g/l;
 sulfato de magnesio en una concentración de 0,01 g/l a 0,5 g/l;
 10 cloruro de sodio en una concentración de 0,1 g/l a 1 g/l;
 fosfato de sodio dibásico en una concentración de 0,5 g/l a 10 g/l;
 ácido cítrico en una concentración de 0,1 g/l a 1 g/l; extracto de levadura en una concentración de 1 g/l a 4 g/l;
 vitamina B12 en una concentración de 0,1 mg/l a 1,0 mg/l;
 etanolamina en una concentración de 1,0 g/l a 3,0 g/l; sulfato ferroso en una concentración de 0,01 g/l a 0,05 g/l;
 15 y
 piruvato de sodio en una concentración de 0,5 g/l a 2,0 g/l.
2. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la mezcla de nutrientes comprende extracto de levadura en una concentración de 3 g/l.
- 20
3. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el cloruro de calcio está presente en una concentración de 0,013 g/l.
4. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el fosfato de potasio monobásico está presente en una concentración de 3 g/l.
- 25
5. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el sulfato de magnesio está presente en una concentración de 0,12 g/l.
- 30
6. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el cloruro de sodio está presente en una concentración de 0,5 g/l.
7. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el ácido cítrico está presente en una concentración de 0,547 g/l.
- 35
8. El medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde:
- la vitamina B12 está presente en una concentración de 0,5 mg/l;
 la etanolamina está presente en una concentración de 2,0 g/l;
 40 el sulfato ferroso está presente en una concentración de 0,019 g/l; y
 el piruvato de sodio está presente en una concentración de 1,0 g/l.
9. Un método para cultivar *Salmonella spp* o *Escherichia coli* en una muestra de alimento o ambiental, comprendiendo el método la etapa de incubar la muestra en el medio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el medio comprende extracto de levadura en una concentración de 3 g/l.
- 50
11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en donde el medio comprende
- vitamina B12 en una concentración de 0,5 mg/l;
 etanolamina en una concentración de 2,0 g/l;
 sulfato ferroso en una concentración de 0,019 g/l; y
 55 piruvato de sodio en una concentración de 1,0 g/l.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde las *Escherichia coli* (*E. coli*) son *E. coli* O157, *E. coli* productoras de toxina shiga (STEC) y *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC).
- 60
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde las *Salmonella spp* son *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enterica*.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende adicionalmente una etapa de detección de *Salmonella spp* o *E. coli* después de la etapa de incubación, y en donde dicha detección es mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, unión de anticuerpos, flujo lateral, detección inmunológica, ELISA o flujo continuo.
- 65

FIG. 1A

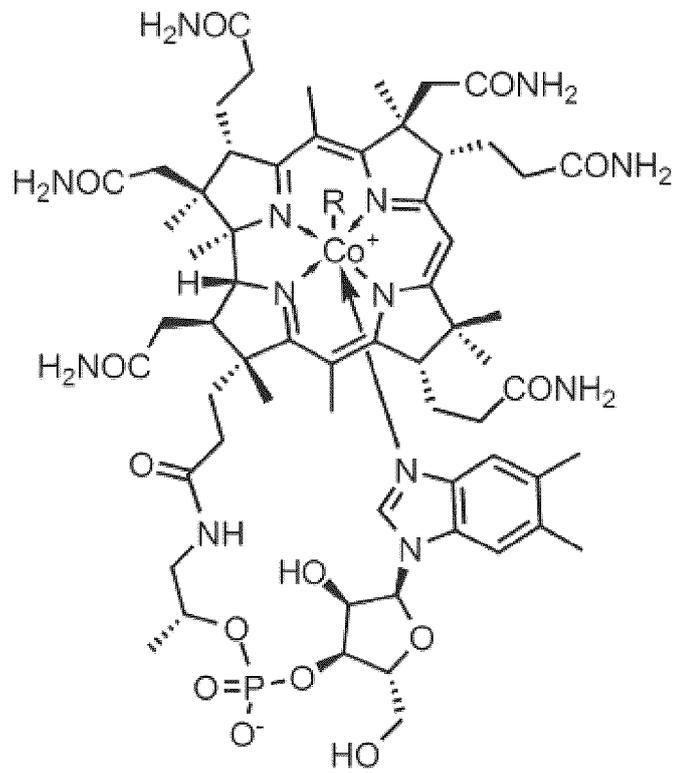
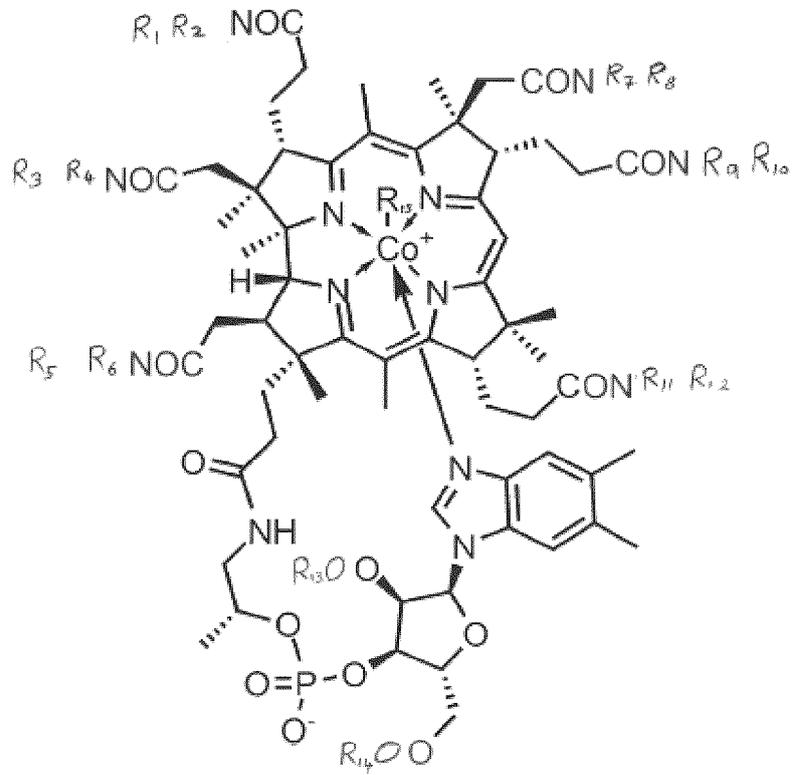


FIG. 1B



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 1996040861 A, Bochner [0007]
- US 6483303 B [0059] [0078]
- US 6597176 B [0059] [0078]
- US 6607922 B [0059] [0078]
- US 6927570 B [0059] [0078]
- US 7323139 B [0059] [0078]
- US 6518747 B [0078]
- US 6046585 A [0078]
- US 6275031 B [0078]
- US 6437563 B [0078]

10 **Literatura no patente citada en la descripción**

- ROOF, D. M. ; J. R. ROTH. Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, 3855-3863 [0002]
- ROOF, D. M. ; J. R. ROTH. Functions required for vitamin B12-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, 3316-3323 [0002]
- CHANG, G. W. ; J. T. CHANG. Evidence for the B12-dependent enzyme ethanolamine deaminase in *Salmonella*. *Nature*, 1975, vol. 254, 150-151 [0002]
- GARSIN, D.A. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: role and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8 (4), 290-295 [0002]
- KOFOID, E. ; C. RAPPLEYE ; I. STOJIKOVIC ; J. ROTH. The 17-gene ethanolamine (eut) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, 5317-5329 [0002]
- BRINSMADE S.R. ; PALDON T. ; ESCALANTE-SEMERENA J.C. Minimal functions and physiological conditions required for growth of *salmonella enterica* on ethanolamine in the absence of the metabolosome. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187 (23), 8039-46 [0002]
- Isolation and identification of *Salmonella* from, meat, poultry and eggs products. USDA/FSIS Microbiology Laboratory guidebook [0002] [0092]
- Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products. USDA/FSIS Microbiology Laboratory guidebook [0002] [0092]
- *Salmonella* in FDA Bacteriological Analytical Manual. November 2011 [0002]
- BRINSMADE S.R. et al. Minimal Functions and Physiological Conditions Required for Growth of *Salmonella enterica* on Ethanolamine in the Absence of the Metabolosome. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187 (23), 8039-8046 [0003]
- ROOF D.M. et al. Functions Required for Vitamin B12-Dependent Ethanolamine Utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, vol. 171 (6), 3316-3323 [0004]
- KOFOID E. et al. The 17-gene ethanolamine (eut) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181 (17), 5317-5329 [0005]
- SCARLETT F.A. et al. Microbial Metabolism of Amino Alcohols. Ethanolamine Catabolism Mediated by Coenzyme B12-dependent Ethanolamine Ammonia-Lyase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 1976, vol. 95 (1), 173-176 [0006]
- JETER R.M. Cobalamin-dependent 1,2-propanediol utilization by *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.*, 1990, vol. 136 (5), 887-896 [0008]
- WOLF J.B. et al. Isolation and genetic characterizations of *Bacillus megaterium* cobalamin-deficient mutants. *J. Bacteriol.*, 1986, vol. 166 (1), 51-58 [0008]
- KOYUNCU S. et al. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. *BMC Veterinary Research*, 2009, vol. 5, 6 [0008]
- DE BOER, E. Update on media for isolation of *Enterobacteriaceae* from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, vol. 45 (1), 43-53 [0008]
- *Salmonella* in FDA Bacteriological Analytical Manual,. November 2011 [0092]
- USDA FSIS Microbiology Laboratory Guidebook. US FDA Bacteriological Analytical Manual [0092]