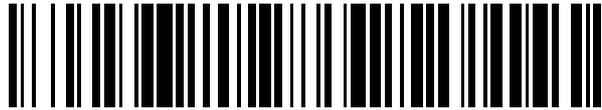


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 344**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2012 PCT/CA2012/000669**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13006960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2012 E 12812126 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2732024**

54 Título: **Medio de cultivo, método para cultivar listeria y método para detectar listeria**

30 Prioridad:

**13.07.2011 US 201161507193 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;  
CLAVEAU, DAVID y  
MADURO, LILA**

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 2 627 344 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 listeria y método para detectar listeria

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

10 La materia objeto descrita generalmente se refiere a medios y métodos para cultivar microorganismos y para detectar microorganismos.

**2. Publicaciones relacionadas**

15 La solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10\597909, MEDIO DE CRECIMIENTO SELECTIVO PARA LISTERIA SPP, presentada el 12 de febrero de 2005, describe composiciones que comprenden cloruro de litio y agentes selectivos.

Mendonca, A., F. y Knabel, S., J. 1994. A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4001-4008.

20 Beumer R. R., te Giffel M. C., Anthonie S. V. R., Cox L. J. 1996. The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. *F. Microbiol.* 13(2); 137-148.

Teo, A., Y-L., Knabel, S., J. 2000. Development of a Simple Recovery-Enrichment System for Enhanced Detection of Heat-Injured *Listeria monocytogenes* in Pasteurized Milk. *J. Food Prot.* 63 (4): 462-472.

25 Busch SV, Donnelly CW. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(1):14-20.

Buchrieser C, Rocourt J. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3ª edición. / Ed. por Ryser ET, Marth EH. CRC Press. 896 p. Lang Halter E, Neuhaus K, Scherer S. 2012. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. *Int J Syst Evol Microbiol.* 27 de Abril. [Artículo publicado electrónicamente, pendiente de impresión].

30 Bertsch D, Rau J, Eugter MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, Meile L. 2012. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.* 20 de Abril. [Artículo publicado electrónicamente, pendiente de impresión].

35 Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3ª edición. / Ed. por Ryser ET, Marth EH. CRC Press. 896 p.

Wesley IV. Listeriosis in animals. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3ª edición. / Ed. por Ryser ET, Marth EH. CRC Press. 896 p.

40 Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. 2007. *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 40 (1): 4-13.

Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany--epidemiological patterns 2001-2005. (2006). *Euro Surveill.* 11 (6): 85-8.

Anónimo. Incidence of Foodborne Illness, 2010. (<http://www.cdc.gov/Features/dsFoodbornellness/>).

45 EU summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks 2009. (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>). Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. 2011. *Emerg Infect Dis.* 17 (1): 126-8.

50 Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol.* 113 (1): 1-15.

USDA-FSIS. 2011. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. En: *Microbiology Laboratory Guidebook*, Capítulo 8.07. ([http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG\\_8\\_07.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_07.pdf)).

55 Donnelly C. W. 2002, Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *Journal of AOAC International* 85(2):495-500.

Knabel S. J. 2002, Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. *Journal of AOAC International* 85(2):501-504.

**Resumen**

60 Los aspectos de la invención se describen en referencia a las reivindicaciones adjuntas.

Se describe un medio de cultivo que comprende concentraciones biológicamente eficaces de: iones de magnesio no quelados; y un secuestrante de oxígeno.

65 Se describe una alternativa en donde el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de

## ES 2 627 344 T3

piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS.

5 Se describe una alternativa en donde el medio además comprende una concentración biológicamente eficaz de: sal de litio; o una sal de hierro (III); o una sal de litio y una sal de hierro (III), en realizaciones alternativas, el medio además comprende un agente selectivo.

Se describe una alternativa en donde el medio además comprende un tampón quelante sustancialmente sin magnesio.

10 Se describe una alternativa en donde dicha sal de hierro (III) es para el cultivo de *Listeria spp.*

Se describe una alternativa en donde dicha sal de hierro (III) está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,05 g/l;

15 dicha sal de litio está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,1 g/l; y dicha sal de magnesio está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,1 g/l; y dicho secuestrante de oxígeno está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,1 g/l.

En alternativas descritas, el medio además comprende un agente selectivo.

20 También se describe un método para cultivar una muestra biológica, el método comprende: cultivar la muestra en un medio que comprende concentraciones de iones de magnesio no quelados y un secuestrante de oxígeno.

En alternativas descritas del método, el medio comprende una sal de litio; o una sal de hierro (III); o una sal de litio y una sal de hierro (III).

25 Se describe una alternativa en donde el medio además comprende un agente selectivo. Se describe un método alternativo en donde

dicha sal de hierro (III) está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,05 g/l;

30 dicha sal de litio está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,1 g/l; y

dicha sal de magnesio está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,1 g/l; y dicho secuestrante de oxígeno está presente en una concentración mayor de aproximadamente 0,1 g/l. En realizaciones alternativas, el método es para cultivar *Listeria spp.*

35 Se describe un método para detectar bacterias en una muestra, el método que comprende la etapa de cultivar la muestra en presencia de concentraciones biológicamente eficaces de: a) iones de magnesio no quelados, y b) un secuestrante de oxígeno.

Se describe un método en donde el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS.

40 También se describe un método para cultivar que tiene lugar en presencia de:

a) una sal de litio; o

b) una sal de hierro (III); o

45 c) una sal de litio y una sal de hierro (III).

Se describe un método para cultivar que tiene lugar en presencia de un agente selectivo.

Se describe un método en donde las bacterias son *Listeria spp.*

50 Se describe una composición para suplementar un medio de cultivo, la composición que comprende un tampón quelante que no es de magnesio y un secuestrante de oxígeno.

Se describe una alternativa en donde la composición además comprende una concentración biológicamente eficaz de:

55 de:

a) una sal de litio; o

b) una sal de hierro (III); o

c) una sal de litio y una sal de hierro (III).

60 Se describe el uso de la composición para cultivar *Listeria spp.*

Se describe un medio de cultivo en polvos adecuado para dilución para dar como resultado un medio de cultivo líquido que comprende cantidades biológicamente eficaces de iones de magnesio no quelados y un secuestrante de oxígeno.

65

Se describe una alternativa del medio de cultivo en polvos, en donde el medio diluido además comprende cantidades biológicamente eficaces de:

- a) una sal de litio; o
- 5 b) una sal de hierro (III); o c) una sal de litio y una sal de hierro (III).

Se describe un kit para cultivar *Listeria spp.*, comprendiendo el kit un secuestrante de oxígeno y un tampón quelante que no es de magnesio.

## 10 Descripción detallada seleccionada

Alternativas descritas

Términos

15 En la presente divulgación, la expresión "que comprende" se usa en un sentido no limitado para referirse a que los elementos que siguen a la expresión están incluidos, pero los elementos no mencionados de manera específica no están excluidos. Se entenderá que en alternativas descritas que comprenden o pueden comprender una característica específica o variable o parámetro, las alternativas descritas pueden consistir o consisten  
20 esencialmente en tales características o variables o parámetros. 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 claramente requiera que haya uno y solo uno de los elementos.

25 En esta divulgación, los intervalos numéricos indicados mediante puntos finales incluyen todos los números englobados 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.). En la presente divulgación, las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte 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. En la presente divulgación, el término "o" generalmente se emplea en su sentido  
30 incluyendo "y/o" salvo que el contenido claramente dicte lo contrario.

En la presente divulgación, el término "PDD" significa probabilidad de diferencia y el término "dPDD" significa diferencia en la probabilidad de diferencia.

35 En la presente divulgación, el término "*sensibilidad*" o "tasa de sensibilidad" se define como: Tasa de sensibilidad = (número de muestras ambientales positivas con el método de Actero Listeria / número de muestras positivas confirmadas mediante segundo enriquecimiento) x 100 %.

40 En la presente divulgación, el término "*especificidad*" o "tasa de especificidad" se define como: Tasa de especificidad = (número de muestras ambientales negativas con el método de Actero Listeria / número de muestras negativas confirmadas mediante segundo enriquecimiento) x 100 %,

45 En la presente divulgación, la expresión *Método de concordancia* se define como: método de concordancia =  $[1 - |(\text{Número de muestras de ensayo que son verdaderos positivos y verdaderos negativos} - \text{número de referencia de muestras de ensayo que son verdaderos positivos y verdaderos negativos en el método de referencia}) / \text{Número total de muestras del método}|] \times 100 \%$ .

50 En la presente divulgación, la expresión "*precisión*" se define como: *Precisión* =  $[\text{Número de muestras de ensayo positivas con el método de Actero Listeria} / \text{Número de muestras de ensayo positivas en el método de referencia}] \times 100 \%$ ,

55 En la presente divulgación, los términos "medios", "medio", "caldo", "caldo de cultivo" y similares se refieren todos a una mezcla de nutrientes adecuada para cultivar un microorganismo deseado, que puede ser una cepa de bacterias o una cepa de microbios o especies. En alternativas particulares descritas, los medios pueden comprender uno o más de agua, agar, proteínas, aminoácidos, hidrolizado de caseína, sales, lípidos, carbohidratos, sales, minerales y tampones de pH, y pueden contener extractos tales como extracto de carne, extracto de levadura, triptona, fitona, peptona y extracto de malta y pueden comprender medio luria bertani (LB). En las alternativas descritas, 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 los expertos en la materia. En alternativas descritas, los medios pueden comprender tampón MOPS, una sal de hierro (III) tal como citrato férrico, una sal de magnesio tal como sulfato de magnesio, una sal de litio tal como cloruro de litio y pueden contener piruvato. En alternativas descritas, los medios pueden comprender o consistir en cualquier medio principal tal como se define en el presente documento. En las alternativas descritas, los medios pueden ser simples, complejos o medios definidos y pueden ser medios enriquecidos y pueden estar suplementados en una amplia  
65 variedad de formas, todas las cuales se entenderán fácilmente por los expertos en la materia. Los términos "Actero/Listeria" y caldo "ALEM", medio, medio de enriquecimiento y similares se usan como descriptores generales

para medios de acuerdo con las alternativas del mismo descritas.

En las alternativas descritas, los medios contienen un tampón de pH que puede ser un tampón quelante no de magnesio. En una serie de alternativas descritas, el tampón de pH es una mezcla de sal de sodio MOPS y ácido sin MOPS, pero un rango de otros tampones tales como tampones de carbonato y fosfato pueden ser usados como alternativa y se seleccionarán fácilmente y se implementarán por los expertos en la materia, para lograr un pH deseado para el medio.

En alternativas descritas, los medios pueden proporcionarse en la forma de un polvo o concentrado, también denominado de manera general "medio en polvo", "polvo de medio", "concentrado de medio", "medio concentrado", o similares, que comprenden una pluralidad de componentes y son adecuados para combinarse con un volumen predeterminado de agua para proporcionar un medio líquido con las concentraciones deseadas de los componentes particulares. Dicho medio en polvo o medio concentrado puede estar completo, lo que significa que solo necesita disolverse en agua adecuada, normalmente, agua estéril, antes de su uso. Como alternativa, en las alternativas descritas, un medio en polvo o concentrado puede ser parcial, lo que significa que se necesitan añadir componentes adicionales para proporcionar un medio completo adecuado para su uso. En alternativas descritas, un medio en polvo o concentrado también incluye un medio que está al menos parcialmente hidratado en la forma concentrada adecuada para la dilución, para producir el medio para 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 los medios finales que tienen componentes a concentraciones adecuadas para cultivar bacterias y microorganismos y medios en polvo o concentrados adecuados para su dilución. En la presente divulgación, el término "secuestrante de oxígeno" significa un compuesto químico que eliminará o inactivará el oxígeno libre o los radicales de oxígeno. En alternativas particulares descritas, un secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal o compuesto de tioglicolato, cisteína, hidrocloreuro de L-(+)-cisteína, L-cisteína, oxyrase™ (Patel, 1995) Na<sub>2</sub>S y FeS. En alternativas descritas, los secuestrantes de oxígeno particulares son formas levorrotatorias o dextrorrotatorias (L o D) y pueden ser formas o mezclas racémicas. Los expertos en la materia seleccionarán fácilmente tales alternativas y reconocerán que tales secuestrantes de oxígeno se seleccionarán basándose en su compatibilidad biológica para la alternativa descrita en cuestión. En alternativas descritas en las que un secuestrante de oxígeno, o cualquier otro reactivo al que se refiere la presente divulgación es una sal, entonces cualquier sal biológicamente eficaz y compatible es útil y las sales no adecuadas se identificarán y evitarán fácilmente por los expertos en la materia. En alternativas descritas, las sales son sales de sodio o de potasio.

En la presente divulgación, la expresión "sal de piruvato" se refiere e incluye todas las sales de ácido pirúvico (también conocido como ácido 2-oxopropanoico) y cualquier compuesto que comprenda un anión piruvato, y cualquier isómero biológicamente eficaz o formas sustituidas del mismo. En alternativas descritas, la sal de piruvato es piruvato de sodio o de potasio. Los expertos en la materia identificarán y evitarán fácilmente las sales que no son biológicamente eficaces o deseables, por ejemplo, debido a la toxicidad.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que las sales y otros compuestos que son letales o deletéreos para las bacterias de interés, se evitarán y tales sales y compuestos se identificarán fácilmente por los expertos en la materia.

En la presente divulgación, un metal alcalino significa cualquiera de entre litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y francio, y una sal de metal alcalino significa cualquier sal biológicamente eficaz de cualquiera de los anteriores. En alternativas descritas, una sal es soluble y puede ser orgánica o inorgánica y, a modo de ejemplo, puede ser cloruro, fosfato, nitrato, carbonato de hidrógeno, piruvato, etanoato.

En la presente divulgación, el verbo "tamponar" se refiere estabilizar el pH de una solución, que puede ser un medio de cultivo, en un intervalo predeterminado, de manera que será fácilmente evidente para los expertos en la materia. El nombre "tampón" se refiere a un compuesto químico adecuado para estabilizar el pH de una solución.

En la presente divulgación, el término "sal" se refiere a sales que son solubles o son sustancialmente o parcialmente solubles en las condiciones relevantes.

En la presente divulgación, la referencia al "crecimiento" o "cultivo" de una muestra o microorganismos se refiere a un proceso mediante el cual la muestra o microorganismo se mantiene en condiciones adecuadas o sustancialmente adecuadas para soportar o promover el crecimiento o la división de uno o más microorganismos de interés. Se entenderá que estos términos incluyen una situación en la que una muestra se expone a condiciones relevantes, tanto si un microorganismo de interés está presente como si no, o si está presente en cantidades detectables.

En la presente divulgación, el término "sal" se refiere a cualquier sal biológicamente compatible que es soluble o sustancialmente soluble o es soluble en el grado necesario para tener la eficacia biológica deseada en condiciones de cultivo aplicables.

En la presente divulgación, un "tampón quelante no de magnesio" o "tampón quelante sustancialmente no de

magnesio" significa un tampón que no quela o secuestra sustancialmente los iones de magnesio disueltos de la solución o no lo hace en un grado biológicamente significativo. En alternativas particulares descritas, un tampón quelante no de magnesio es o comprende ácido 3-(n-Morfolino)Propanosulfónico, también denominado ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico; ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico; ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico; ácido 4-mofolinopropanosulfónico y "MOPS" o es o comprende una mezcla de sales de sodio de MOPS y ácido sin MOPS. En alternativas descritas, un intervalo de tampones quelantes no de magnesio biológicamente aceptables se puede usar y se identificarán y seleccionarán fácilmente entre los expertos en la materia. En algunas alternativas descritas, tales tampones son formas de MOPS sustituidas o modificadas químicamente de otro modo. De manera similar, "sin quelar" o "no quelado" se refiere a un ion o compuesto químico que es sustancialmente libre en solución.

En la presente divulgación, el término medio "base" o medio "principal" o caldo, se refiera a un caldo parcial que comprende ciertos componentes básicos requeridos, fácilmente reconocidos por los expertos en la materia y cuya composición detallada puede variar sustancialmente mientras siga siendo adecuada para soportar el crecimiento de cualquier microorganismo de interés. Por tanto, en alternativas descritas, el medio principal comprende sales, tampón y extracto de proteína, y en alternativas descritas comprende carbonato o fosfato o tampones de MOPS o puede comprender, sales de sodio, sales de magnesio y sales de calcio. En alternativas descritas, un litro de medio principal tiene la receta que se muestra en la Tabla 1. Sin embargo, en alternativas descritas, el medio principal comprende uno o más de agua, agar, proteínas, aminoácidos, hidrolizado de caseína, sales, lípidos, carbohidratos, sales, minerales y tampones de pH y en alternativas descritas, contiene extractos tales como extracto de carne, extracto de levadura, triptona, fitona, peptona y extracto de malta y en alternativas descritas, el medio es o comprende 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, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM), medio SOC (peptona al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4,4</sub> 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 %), caldo extraordinario (TB, del inglés *TerrificBroth*) (peptona al 1,2 %, extracto de levadura al 2,4%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 72 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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%).

Tabla 1: Contenido genérico del medio base

Ingredientes	Fabricantes	Cantidad (g/l)
Fitona	BD BBL (211906)	X a Y
Triptona	Oxoid (LP0042)	X a Y
Extracto de ternera	BD BBL (212303)	X a Y
Extracto de levadura	BD Bacto (212750)	X a Y

En la Tabla 1, X e Y son valores numéricos expresados en gramos. Cada uno de X e Y pueden 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, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,0, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12,0, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13,0, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9, 14,0, 14,1, 14,2, 14,3, 14,4, 14,5, 14,6, 14,7, 14,8, 14,9, 15,0, 15,1, 15,2, 15,3, 15,4, 15,5, 15,6, 15,7, 15,8, 15,9, 16,0, 16,1, 16,2, 16,3, 16,4, 16,5, 16,6, 16,7, 16,8, 16,9, 17,0, 17,1, 17,2, 17,3, 17,4, 17,5, 17,6, 17,7, 17,8, 17,9, 18,0, 18,1, 18,2, 18,3, 18,4, 18,5, 18,6, 18,7, 18,8, 18,9, 19,0, 19,1, 19,2, 19,3, 19,4, 19,5, 19,6, 19,7, 19, 8, 19,9, 20 o más gramos y en alternativas descritas particulares, el intervalo de X a Y puede estar delimitado mediante cualquier valor de X e Y. Se entenderá que, en alternativas particulares descritas, las formas modificadas de fitona, triptona, extracto de ternera y extracto de levadura se seleccionarán fácilmente por aquellos expertos en la materia, y serán sustitutos adecuados de los anteriores. En algunas alternativas descritas, se pueden usar sales alternativas de magnesio, calcio y sodio y en alternativas particulares descritas, las alternativas a las sales de magnesio, calcio y sodio se pueden seleccionar. En algunas alternativas descritas, los tampones se incluirán en el medio principal y en realizaciones, el tampón es un tampón de MOPS.

Tabla 2: Muestra la receta para medios base de acuerdo con una alternativa particular descrita.

Ingredientes	Cantidad (g/l)
Fitona	5
Triptona	5
Extracto de ternera	5
Extracto de levadura	5

Los expertos en la materia entenderán fácilmente que el crecimiento de un microorganismo deseado será el más promovido a temperaturas seleccionadas adecuadas para el microorganismo en cuestión. En alternativas particulares descritas, el microorganismo deseado es *Listeria* spp y el cultivo se puede llevar a cabo aproximadamente a 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C o más y el caldo a usar está o puede estar precalentada a esta temperatura preparatoria para la inoculación con una muestra para el ensayo. En alternativas particulares descritas, el cultivo se puede llevar a cabo aproximadamente a 35°C y el caldo a usar se puede precalentar a esta temperatura preparatoria para la inoculación con una muestra para el ensayo. En alternativas descritas en el presente documento, el cultivo se puede llevar a cabo a cualquier temperatura entre 29°C y 43°C y se puede llevar a cabo aproximadamente a 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 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 entre 29°C y 30°C, 30°C y 31°C, 31°C y 32°C, 32°C y 33°C, 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 t 42°C o entre 36°C y 42°C, 38°C t 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. En alternativas descritas, la temperatura está entre 32°C y 38°C, o entre 33°C. y 37°C. En la presente divulgación, "enriquecimiento" de un medio se refiere a la adición de componentes seleccionados para promover el crecimiento u otras características de uno o más microorganismos deseados. Una "solución de enriquecimiento" se refiere a una solución que comprende estos componentes adicionales. En alternativas descritas, los componentes incluidos en una solución de enriquecimiento incluyen uno o más de MOPS, sal de Fe(III), sal de litio, piruvato, y en alternativas descritas, un suplemento de enriquecimiento selectivo comprende uno o más agentes selectivos tales como ácido nalidíxico, cicloheximida e hidrocioruro de acriflavina. En alternativas particulares descritas, el caldo de enriquecimiento contiene uno o más de sulfato de magnesio, cloruro de litio, citrato férrico, piruvato de sodio y suplemento de enriquecimiento.

Tabla 3: Muestra la composición general de un medio enriquecido descrito.

Ingredientes	Fabricantes	Cantidad (g/l)
Sal de sodio-Mops	Sigma (M9381)	X-Y
Ácido libre de Mops	Sigma (M1254)	X-Y
Citrato férrico III	Sigma (F6129)	X-Y
Cloruro de litio	Sigma (L4408)	X-Y
MgSO <sub>4</sub>	BDH (BDH0246)	X-Y
Piruvato de sodio	Sigma (15990)	X-Y
<b>Suplemento de enriquecimiento selectivo</b> Composición de suplemento de enriquecimiento selectivo (componentes que también se denominan en el presente documento de manera colectiva o individual un "agente selectivo" o un "agente de selección" o un "agente que selecciona") Cicloheximida Ácido nalidíxico Hidrocioruro de acriflavina	<b>Oxoid (SR0141E)</b>  Número CAS 66-81-9 3374-05-8 8048-52-0	<b>2,7 ml</b>  Cantidad (g/l) en caldo enriquecido final A-B A-B A-B

Cada uno de X e Y pueden 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, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 gramos o cualquier valor entre los mismos y en variantes de alternativas particulares descritas, el intervalo X a Y se puede delimitar por cualquiera de los valores de X e Y. Se entenderá que las cantidades relativas de sales de MOPS y de ácido sin MOPS se ajustarán como sea necesario para lograr el pH deseado.

Cada uno de A y B 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, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000 o 100.000 mg/litro.

Tabla 4: Muestra la composición de un medio de enriquecimiento particular descrito.

Ingredientes	Fabricantes	Cantidad (g/l)
Sal de sodio-Mops	Sigma (M9381)	13,7
Ácido libre de Mops	Sigma (M1254)	8,5
Citrato férrico III	Sigma (F6129)	0,50
Cloruro de litio	Sigma (L4408)	8
MgSO <sub>4</sub>	BDH (BDH0246)	2
Piruvato de sodio	Sigma (15990)	1
Suplemento de enriquecimiento selectivo (también denominado en el presente documento un "agente selectivo") que comprende los siguientes componentes: Cicloheximida Ácido nalidíxico Hidrocloruro de acriflavina	Oxoid (SR0141E)  66-81-9 3374-05-8 8048-52-0	2,7 ml  33,75 mg 27 mg 10,125 mg
*Reconstituir un frasco como se indica, y añadir 2,7 ml del contenido a 1 l de medio. Sin embargo, se entenderá fácilmente por los expertos en la materia que estas cantidades pueden variar para adecuarse a requerimientos particulares y en alternativas descritas, el medio enriquecido final contiene aproximadamente 1x10 <sup>-6</sup> , 2x10 <sup>-6</sup> , 3x10 <sup>-6</sup> , 4x10 <sup>-6</sup> , 5x10 <sup>-6</sup> , 6x10 <sup>-6</sup> , 7x10 <sup>-6</sup> , 8x10 <sup>-6</sup> , 9x10 <sup>-6</sup> , 1x10 <sup>-5</sup> , 2x10 <sup>-5</sup> , 3x10 <sup>-5</sup> , 4x10 <sup>-5</sup> , 5x10 <sup>-5</sup> , 6x10 <sup>-5</sup> , 7x10 <sup>-5</sup> , 8x10 <sup>-5</sup> , 9x10 <sup>-5</sup> , 1x10 <sup>-4</sup> , 2x10 <sup>-4</sup> , 3x10 <sup>-4</sup> , 4x10 <sup>-4</sup> , 5x10 <sup>-4</sup> , 6x10 <sup>-4</sup> , 7x10 <sup>-4</sup> , 8x10 <sup>-4</sup> , 9x10 <sup>-4</sup> , 1x10 <sup>-3</sup> , 2x10 <sup>-3</sup> , 3x10 <sup>-3</sup> , 4x10 <sup>-3</sup> , 5x10 <sup>-3</sup> , 6x10 <sup>-3</sup> , 7x10 <sup>-3</sup> , 8x10 <sup>-3</sup> , 9x10 <sup>-3</sup> , 1x10 <sup>-2</sup> , 2x10 <sup>-2</sup> , 3x10 <sup>-2</sup> , 4x10 <sup>-2</sup> , 5x10 <sup>-2</sup> , 6x10 <sup>-2</sup> , 7x10 <sup>-2</sup> , 8x10 <sup>-2</sup> , 9x10 <sup>-2</sup> , 1x10 <sup>-1</sup> , 2x10 <sup>-1</sup> , 3x10 <sup>-1</sup> , 4x10 <sup>-1</sup> , 5x10 <sup>-1</sup> , 6x10 <sup>-1</sup> , 7x10 <sup>-1</sup> , 8x10 <sup>-1</sup> , 9x10 <sup>-1</sup> , 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 1x10 <sup>2</sup> , 2x10 <sup>2</sup> , 3x10 <sup>2</sup> , 4x10 <sup>2</sup> , 5x10 <sup>2</sup> , 6x10 <sup>2</sup> , 7x10 <sup>2</sup> , 8x10 <sup>2</sup> , 9x10 <sup>2</sup> , 1x10 <sup>3</sup> , 2x10 <sup>3</sup> , 3x10 <sup>3</sup> , 4x10 <sup>3</sup> , 5x10 <sup>3</sup> , 6x10 <sup>3</sup> , 7x10 <sup>3</sup> , 8x10 <sup>3</sup> , 9x10 <sup>3</sup> , o más o menos g/litro o mg/litro de componentes individuales en el caldo.		

En la presente divulgación, un "suplemento" para un medio de cultivo significa una solución, líquido, sólido u otro material para añadir a un medio de cultivo. Un suplemento tiene el efecto o el propósito de promover el crecimiento de uno o más microorganismos y en alternativas específicas descritas promueve de manera selectiva el crecimiento de uno o más microorganismos en relación con otros microorganismos no deseados. En alternativas particulares descritas, un suplemento comprende uno o más de: sal de magnesio, sal de litio, una sal de hierro (III), un piruvato y un agente selectivo o comprende precursores o formas modificadas que se pueden convertir o metabolizar fácilmente para formar cualquiera de los anteriores. En alternativas descritas, un suplemento es un suplemento para promover el crecimiento de *Listeria spp.* En la presente divulgación, la expresión "agente selectivo" se refiere a un compuesto químico o condición del cultivo que sirve para favorecer el crecimiento de un microorganismo deseado o para inhibir el crecimiento de un microorganismo no deseado. En alternativas particulares descritas, los agentes selectivos incluyen antibióticos, sulfanamidas o antisépticos. En alternativas particulares descritas, un agente selectivo es o comprende uno, dos o todos los tres de ácido nalidíxico, cicloheximida e hidrocloruro de acriflavina. o incluye equivalentes adecuados o alternativas a los mismos. La expresión "suplemento de enriquecimiento selectivo" es equivalente a la expresión "agente selectivo". En alternativas particulares descritas, la concentración de trabajo de cicloheximida es aproximadamente 33.75 mg por litro de medio de cultivo, y en alternativas descritas está entre 15 y 50 mg/litro de medio de cultivo o puede ser mayor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más mg/litro de medio de cultivo. En alternativas particulares descritas, la concentración de trabajo

de ácido nalidíxico es aproximadamente 27 mg por litro de medio de cultivo o está entre 10 y 50 mg/litro de medio de cultivo o es mayor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más mg/litro de medio de cultivo. En alternativas descritas, la concentración de trabajo de hidrocloreuro de acriflavina es aproximadamente 10,125 mg/litro o está entre 6.000 y 15.000 mg/litro o es mayor de 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000, 20.000 o más mg/litro de medio de cultivo. Los expertos en la materia, sin embargo, reconocerán que se puede emplear una amplia variedad de concentraciones de agentes selectivos y harán ajustes adecuados para propósitos particulares.

10 En la presente divulgación, los términos "Actero/Listeria", "Actero Listeria" y "ALEM", caldo, medio, caldo de enriquecimiento y similares, se refieren todos al caldo o los medios de acuerdo con las alternativas descritas del mismo.

15 En la presente divulgación, "condiciones de cultivo" significa los parámetros para el cultivo de un microorganismo, e incluye la composición química y las propiedades físicas del medio de cultivo, como la temperatura, agitación, contención y duración del cultivo. Por tanto, en alternativas particulares descritas, un cultivo se mantiene a cualquier temperatura entre 29°C y 43°C y en alternativas particulares descritas, se mantiene a una temperatura de aproximadamente 39°C. Se entenderá que en ciertas alternativas descritas, las temperaturas por encima de los 30°C y por debajo de los 25 °C, y en alternativas descritas se mantiene a temperaturas entre 29°C y 43°C y se puede llevar a cabo aproximadamente a 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 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 entre 29°C y 30°C, 30°C y 31°C, 31°C y 32°C, 32°C y 33°C, 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 t 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. En alternativas descritas, la temperatura está entre 32°C y 38°C, o entre 33°C y 36°C. También se pueden usar para cultivar microorganismos que usan los medios descritos en el presente documento, sin embargo, se ha descubierto que temperaturas fuera del intervalo entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 30 °C, pueden permitir un crecimiento más rápido de otros microorganismos no deseados y pueden inhibir el crecimiento de Listeria. El pH del medio de cultivo se establece generalmente a entre 7 y 8 y, por ejemplo, en alternativas particulares descritas, puede ser aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0 o está en un intervalo delimitado por dos valores cualquiera de los anteriores. Se entenderá que un pH fuera del intervalo de pH 7-8 aún puede ser útil en alternativas descritas, pero que la eficacia y selectividad del cultivo puede verse afectada de manera adversa. Un cultivo puede crecer durante cualquier periodo deseado tras la inoculación con una muestra pero se ha descubierto que en las alternativas descritas no limitantes, un período de cultivo de 24 horas es suficiente para enriquecer el contenido de *Listeria spp* suficientemente como para permitir el ensayo mediante métodos normales. Sin embargo, en alternativas descritas para propósitos particulares, el período de cultivo puede ser más largo o más corto y puede ser de hasta o menos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 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" significa una bacteria, que puede ser una bacteria patogénica y en alternativas descritas puede ser *Listeria spp*.

45 En la presente divulgación, "detectar" un microorganismo, significa cualquier proceso de observar la presencia de un microorganismo o un cambio en la presencia de un microorganismo en una muestra biológica, tanto si se detecta realmente como si no el microorganismo o el cambio en el microorganismo. En otras palabras, el hecho de ensayar una muestra de 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 se puede basar en una comparación con una o más muestras de control. La detección se puede aplicar a cualquier muestra en donde se va a evaluar la presencia o ausencia del microorganismo, y en alternativas particulares descritas, pero sin limitar la generalidad de los anteriores, una muestra es o comprende cualquier forma de material biológico y puede comprender carne molida o sin moler, aves de corral, pescado, marisco, verduras, fruta, producción diaria, leche, huevos, alimentos envasados, alimentos enlatados, alimentos embotellados o alimentos envueltos.

60 En alternativas descritas y sin limitación, la etapa de detectar un microorganismo comprende el uso de métodos de PCR, PCR en tiempo real, lectinas, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo para detectar la presencia del microorganismo en un cultivo. A modo de ilustración y sin limitación, en alternativas particulares descritas, los métodos de detección posibles incluyen o usan la materia objeto descrita en cualquiera de los documentos US6483303; US 6597176; US6607922; US6927570; y US7323139.

65 En la presente divulgación, las expresiones "muestra" y "muestra biológica" tienen el mismo y el más amplio significado posible consistente con su contexto y se refiere generalmente y sin limitación a cualquier cosa que se desee ensayar para la presencia de uno o más microorganismos de interés, e incluye todos tales materias objeto tanto si contienen 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 alternativas descritas, se puede obtener una muestra tomando una parte o porción, o mediante el uso de un hisopo, toallita, filtro, frotis o cualquier otro método adecuado, todos las cuales se entenderán fácilmente y se implementarán entre los expertos en la materia. En alternativas descritas particulares, una muestra es o comprende material alimenticio o es o comprende material de plantas o animales o es o comprende carne, marisco, pescado, verduras, fruta, ensaladas, alimentos precocinados, huevos, producción diaria, materiales alimenticios combinados y sin combinar, productos enlatados o cualquier otra forma de productos frescos, crudos, cocidos, sin cocer, congelados, refrigerados, molidos, triturados, enlatados, tratados térmicamente, secos, conservados, refinados o en conserva cualesquiera. En alternativas descritas, se puede tomar una muestra del ambiente, superficie, recipiente o localización en donde se desee determinar si un microorganismo de interés está presente, por ejemplo, y sin limitación, superficies de cocina, superficies de cocción, recipientes de almacenamiento de alimento, cubiertos, refrigeradores, congeladores, recipientes de exposición, materiales de embalaje, plantas y animales vivos y cualquier otro ambiente, localización, superficie o cualquier material que pueda ser de interés para un usuario. Los expertos en la materia entenderán e implementarán métodos adecuados para seleccionar, obtener y manejar cualquier muestra para su uso en alternativas descritas. En alternativas descritas seleccionadas, las muestras son muestras de carne, pescado, marisco, verduras, huevos o producción diaria.

Medio de cultivo de acuerdo con una alternativa descrita

En una alternativa descrita, se describe un medio de cultivo que comprende concentraciones biológicamente eficaces de: iones de magnesio no quelados; y de un secuestrante de oxígeno. Se entenderá que la expresión "concentración biológicamente eficaz" describe las concentraciones tanto de iones de magnesio no quelados como del secuestrante de oxígeno, y que tales ambas concentraciones se pueden ajustar de manera opcional en formas fácilmente reconocidas por los expertos en la materia, pero que tales ajustes se harán de manera que preserve la eficacia de la combinación para los propósitos de realizaciones particulares. En alternativas develadas, el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS.

En alternativas descritas, el medio de cultivo comprende una concentración biológicamente eficaz de iones de magnesio no quelados y una concentración biológicamente eficaz de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en: una sal de litio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato. En variantes de alternativas descritas, el medio comprende una combinación biológicamente eficaz de al menos dos, tres o cuatro componentes seleccionados del grupo que consiste en una sal de litio, una sal de magnesio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato. En variantes de alternativas descritas, el medio además comprende uno o más agentes selectivos. En variantes de alternativas descritas, el medio es un medio tamponado y en variantes de realizaciones, el tampón es sustancialmente un quelante no de magnesio. En alternativas descritas, la sal de hierro (III) está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,05 g/l; la sal de litio está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,1 g/l; la sal de magnesio está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,1 g/l; y la sal de piruvato está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,1 g/l. En alternativas descritas, el medio es para cultivar *Listeria* spp.

En alternativas adicionales descritas, el medio comprende al menos tres, cuatro, cinco o todos los seis componentes seleccionados del grupo que consiste en un tampón quelante no de magnesio, una sal de litio, una sal de magnesio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato. En alternativas descritas, uno de los componentes seleccionados es una sal de litio. En una alternativa adicional descrita, uno de los componentes seleccionados es un tampón quelante no de magnesio. En una alternativa adicional descrita, uno de los componentes seleccionados es una sal de magnesio. En una alternativa adicional descrita, uno de los componentes seleccionados es una sal de hierro (III). En una alternativa adicional descrita, uno de los componentes seleccionados es una sal de piruvato.

En una serie adicional de alternativas descritas, los componentes seleccionados comprenden un tampón quelante que no es de magnesio, una sal de litio y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en una sal de magnesio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato.

En una serie adicional de alternativas descritas, los componentes seleccionados comprenden un tampón quelante no de magnesio, una sal de magnesio y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en una sal de litio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato.

En una serie adicional de alternativas descritas, los componentes seleccionados comprenden un tampón quelante no de magnesio, una sal de óxido de hierro (III) y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en una sal de magnesio, una sal de litio y una sal de piruvato.

En una serie adicional de alternativas descritas, los componentes seleccionados comprenden un tampón quelante no de magnesio, una sal de piruvato y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en una sal de magnesio, una sal de litio y una sal de óxido de hierro (III).

En una serie adicional de alternativas descritas, los componentes seleccionados comprenden una sal de litio y un tampón quelante no de magnesio o una sal de luto y una sal de magnesio o una sal de litio y una sal de hierro (III) o

una sal de litio y una sal de piruvato. En una serie adicional de alternativas descritas los componentes seleccionados comprenden una sal de piruvato y un tampón quelante no de magnesio o una sal de piruvato y una sal de magnesio, o una sal de piruvato y una sal de litio o una sal de piruvato y una sal de óxido de hierro (III).

- 5 En una serie adicional de alternativas descritas, los componentes seleccionados comprenden una sal de óxido de hierro (III) y una sal de litio, y o una sal de óxido de hierro (III) y una sal de piruvato, o una sal de óxido de hierro (III) y un tampón quelante no de magnesio, o una sal de óxido de hierro (III) y una sal de magnesio.

- 10 En series adicionales de alternativas descritas, el medio comprende adicionalmente un agente selectivo. En alternativas descritas, el agente selectivo comprende al menos uno de ácido nalidíxico, hidrocloreuro de acriflavina y cicloheximida. En alternativas descritas, la sal de hierro (III) está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,05 g/l; La sal de litio está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,1 g/l; la sal de magnesio está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,1 g/l; y la sal de piruvato está presente en una concentración de más de aproximadamente 0,1 g/l. En alternativas descritas, la sal de hierro (III) está presente en una concentración de entre 0,05 g/l y 50g/l; dicha sal de litio está presente en una concentración de entre 0,1 g/l y 100 g/l; dicha sal de magnesio está presente en una concentración de entre 0,1 g/l y 100 g/l; dicha sal de piruvato está presente en una concentración de entre 0,1 g/l y 100 g/l.

- 20 La composición de un medio de acuerdo con la invención se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: La composición de un medio de cultivo de acuerdo con la invención.

Ingredientes	Fabricantes	Cantidad (g/l)
Fitona	BD BBL (211906)	5
Triptona	Oxoid (LP0042)	5
Extracto de ternera	BD BBL (212303)	5
Extracto de levadura	BD Bacto (212750)	5
Sal de sodio-Mops	Sigma (M9381)	13,7
Ácido libre de Mops	Sigma (M1254)	8,5
Citrato férrico III	Sigma (F6129)	0,5
Cloruro de litio	Sigma (L4408)	8
MgSO <sub>4</sub>	BDH (BDH0246)	2
Piruvato de sodio	Sigma (15990)	1
Suplemento selectivo (uno o más componentes, los cuales también se denominan en el presente documento "agente selectivo"). El suplemento selectivo comprende cada uno de	Oxoid (SR0141 E)	2,7 ml
cicloheximida, ácido nalidíxico e hidrocloreuro de acriflavina		
*Reconstituir un frasco como se indica, y añadir 2,7 ml del contenido a 1 l de medio. Los 2,7 ml de suplemento selectivo comprenden 33,75 mg de cicloheximida, 27 mg de ácido nalidíxico y 10,125 mg de hidrocloreuro de acriflavina. Esterilizar los medios con el suplemento añadido mediante tratamiento con autoclave a 110°C durante 15 minutos.		

Métodos para cultivar de acuerdo con las alternativas descritas

- 25 En alternativas descritas se describe un método para cultivar una muestra biológica, el método comprende cultivar la muestra en la presencia de concentraciones biológicamente eficaces de: iones de magnesio no quelados; y un secuestrante de oxígeno. En alternativas develadas, el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS. En variantes de
- 30 alternativas descritas se describe un método para cultivar una muestra biológica, comprendiendo el método: cultivar la muestra en un medio que comprende una concentración biológicamente eficaz de iones de magnesio no quelados y una concentración biológicamente eficaz de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en: una sal de litio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato. En alternativas descritas, el cultivo tiene lugar en presencia de al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis componentes seleccionados del grupo que consiste en un tampón quelante que sustancialmente no es de magnesio, una sal de magnesio, una sal de litio, una sal de hierro (III), una sal de
- 35 piruvato y un agente selectivo. En alternativas descritas, el método comprende cultivar las bacterias en un medio de

acuerdo con la divulgación.

5 En realizaciones, la detección además comprende una etapa de PCR, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo. En alternativas descritas, el cultivo tiene lugar en presencia de un agente selectivo. De acuerdo con la invención las bacterias son o incluyen *Listeria* spp y en alternativas descritas, la detección comprende preferentemente cultivar una especie bacteriana que, de acuerdo con la invención, es una *Listeria* spp. En variantes de alternativas descritas, el método comprende cultivar la muestra biológica usando medios de acuerdo con las alternativas descritas. En alternativas descritas, la muestra biológica comprende bacterias, en realizaciones, las bacterias son *Listeria* spp y en alternativas descritas, el método  
10 preferentemente comprende cultivar *Listeria* spp u otras cepas de bacterias.

Métodos para detectar bacterias de acuerdo con las alternativas descritas

15 En alternativas descritas se describe un método para detectar bacterias en una muestra, el método comprende cultivar la muestra en la presencia de concentraciones biológicamente eficaces de: iones de magnesio no quelados; y un secuestrante de oxígeno. En alternativas de veladas, el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS.

20 En una serie adicional de alternativas descritas se describe un método para detectar bacterias en una muestra, comprendiendo el método la etapa de cultivar la muestra en la presencia de una combinación biológicamente eficaz de iones de magnesio no quelados y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en una sal de litio, una sal de hierro (III), una sal de piruvato y un agente selectivo. En alternativas descritas, el cultivo tiene lugar en presencia de al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis componentes seleccionados del grupo que consiste en un tampón quelante sustancialmente no de magnesio, una sal de magnesio, una sal de litio, una sal de hierro (III), una sal de piruvato y un agente selectivo. En alternativas descritas, el método comprende cultivar las bacterias en un  
25 medio de acuerdo con la realización. En alternativas descritas, la detección comprende adicionalmente una etapa de PCR, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo. En alternativas descritas, el cultivo tiene lugar en presencia de un agente selectivo. En alternativas descritas, las bacterias son *Listeria* spp y en realizaciones, la detección comprende cultivar preferentemente una especie de bacteria que puede ser *Listeria* spp.  
30

35 En alternativas descritas, tras cultivar los microorganismos en los medios de acuerdo con las alternativas descritas durante un período de tiempo adecuado en condiciones de cultivo adecuadas, la presencia del microorganismo de interés se detecta mediante uno cualquiera de un intervalo de métodos fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a métodos de detección mediante PCR, detección con PCR en tiempo real, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo. Los métodos inmunológicos pueden incluir inmunoprecipitación, transferencias, inmunorradioensayo o inmunoprecipitación asociada con ligandos magnéticos, o puede usar cualquier otro método adecuado.

40 En alternativas descritas particulares, se calienta una alícuota del cultivo o se trata de otro modo para eliminar los microorganismos antes del ensayo. La muestra calentada se puede procesar entonces mediante la metodología deseada para identificar la presencia de antígenos o de secuencias diagnóstico de ácido nucleico del microorganismo de interés.

45 En alternativas descritas, el medio se puede usar en combinación con la tecnología patentada existente de FoodChek™, denominada en lo sucesivo en el presente documento como MICT. Ampliamente, en un ejemplo del uso de la metodología MICT, una alícuota del cultivo enriquecido se calienta 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 estrecha llamada zona de captura. El  
50 flujo capilar toma el líquido cargado a través del lecho de la muestra al lecho conjugado, en donde la bacteria diana se une a las partículas cubiertas con 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, el complejo inmunitario no se forma, las partículas no se acumulan en la línea de captura y el resultado del test es negativo. Además, 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. El 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 al ensayo o a las líneas de control. El  
60 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 y la fecha de expiración, que se imprimen junto con el resultado del ensayo. La aplicación detallada y el uso de tal metodología de detección será fácilmente entendida por los expertos en la materia. Las realizaciones de la tecnología MICT para ensayar o determinar la presencia o ausencia de un microorganismo se exponen en uno o  
65

más de los documentos US7323139, US6927570, US6607922, US6597176, US6518747, US6483303, US 6046585, US6275031, US6437563.

5 En alternativas descritas, el medio puede reemplazar al menos la primera etapa de enriquecimiento en los protocolos para el aislamiento y la identificación de microorganismos, y en alternativas descritas, estos son *Listeria* spp.

Suplementos de acuerdo con las alternativas descritas

10 En una serie adicional de alternativas descritas, se describe una composición para suplementar un medio de cultivo, comprendiendo el suplemento unas concentraciones biológicamente eficaces de: iones de magnesio no quelados; y de un secuestrante de oxígeno. En alternativas descritas, el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS.

15 En variantes de las alternativas descritas, la composición comprende una mezcla concentrada de tampón quelante no de magnesio y una concentración biológicamente eficaz de uno o más de una sal de magnesio, una sal de litio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato. En alternativas descritas, la composición comprende una combinación biológicamente eficaz de al menos dos, tres o cuatro, o cinco componentes seleccionados del grupo que consiste en una sal de magnesio, una sal de litio, una sal de hierro (III) y una sal de piruvato.

20 En alternativas descritas, la composición comprende un agente selectivo. En alternativas descritas, la composición es para cultivar *Listeria* spp. En alternativas descritas, las composiciones se usan para cultivar bacterias que pueden ser *Listeria* spp.

Kits de acuerdo con las alternativas descritas

25 En una serie adicional de alternativas descritas, se describen kits para cultivar bacterias y, de acuerdo con la invención, tales bacterias son *Listeria* spp. En alternativas descritas, el kit comprende un tampón quelante que no contiene magnesio; y un secuestrante de oxígeno. En alternativas descritas, el secuestrante de oxígeno se selecciona del grupo que consiste en una sal de piruvato, catalasa, una sal de tioglicolato, cisteína, oxyrase™, Na<sub>2</sub>S y FeS.

30 En alternativas descritas, un kit comprende uno, dos, tres o cuatro componentes seleccionados del grupo que consiste en una sal de litio, una sal de hierro (III), una sal de piruvato, una sal de magnesio y un tampón quelante no de magnesio. En alternativas descritas, el kit también comprende un agente selectivo y, en alternativas adicionales descritas, comprende instrucciones de cómo usar el kit para cultivar las bacterias o cómo cultivar preferentemente las bacterias.

35 En alternativas descritas, los medios y los métodos de acuerdo con las alternativas descritas son o pueden ser adecuados para reemplazar las etapas de doble enriquecimiento usadas en protocolos comunes para el aislamiento y la identificación de las bacterias, que pueden ser *Listeria* spp, con una única etapa de enriquecimiento. En alternativas descritas, el medio permite o puede permitir la reducción del tiempo de enriquecimiento necesario para la detección de una bacteria a aproximadamente 24 h o menos, y en alternativas descritas, puede permitir que el tiempo de enriquecimiento sea menos de aproximadamente 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 45 15 horas. En alternativas descritas, una única ronda de cultivo es suficiente para alcanzar la sensibilidad de cultivo para la mayoría de las tecnologías actuales, que pueden ser capaces de detectar bacterias a niveles de entre aproximadamente 10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup> ufc/ml en aproximadamente 21 horas, 22 horas, 23 horas o 24 horas de incubación. In alternativas descritas, es posible lograr estos resultados incluso con un inóculo inicial débil.

### 50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no de limitación.

En un ejemplo, se describe el caldo y su uso para cultivar *Listeria* spp.

55

Tabla 6: Muestra la composición de medio de cultivo de *Listeria* de acuerdo con un ejemplo

Ingredientes	Fabricantes	Cantidad (g/l)
Fitona	BD BBL (211906)	5
Triptona	Oxoid (LP0042)	5
Extracto de ternera	BD BBL (212303)	5
Extracto de levadura	BD Bacto	5
	(212750)	
Sal de sodio-Mops	Sigma (M9381)	13,7
Ácido libre de Mops	Sigma (M1254)	8,5
Citrato férrico III	Sigma (F6129)	0,5
Cloruro de litio	Sigma (L4408)	8
MgSO <sub>4</sub>	BDH (BDH0246)	2
Piruvato de sodio	Sigma (15990)	1
Suplemento de enriquecimiento selectivo* que comprende:	Oxoid (SR0141E)	2,7 ml
Cicloheximida	66-81-9	33,75 mg
Ácido nalidixico	3374-05-8	27 mg
Hidrocloruro de acriflavina	8048-52-0	10,125 mg
*Reconstituir un frasco como se indica, y añadir 2,7 ml del contenido a 1 l de medio de <i>Listeria</i> . Esterilizar el caldo base de enriquecimiento con el suplemento mediante tratamiento con autoclave a 110 °C durante 15 minutos.		

En una serie adicional de ejemplos se describe un medio, su preparación y su uso. **Reactivos:** Medio enriquecido con Actero *Listeria*. - Medio optimizado de manera específica para el crecimiento y la recuperación de *Listeria* spp. en un enriquecimiento de una única etapa. De acuerdo con el ejemplo, el medio se proporciona en dos formatos: una botella de 500 g y un pack de 20 sobres individuales de 4,9 g de polvo cada uno.

**Suministros y reactivos adicionales:** Agua estéril, destilada/desionizada. Cualquier fuente.; El caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) (Lab M Limited, Lancashire, Reino Unido) se usa para el ensayo de desinfectantes y eficacia sanitaria; Agar Oxford modificados (MOX; Difco Becton Dickinson, Nueva Jersey, EE.UU.); El agar Rapid'L.mono (RLM; Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canadá) es un medio cromogénico para la detección, enumeración y diferenciación de *Listeria* spp., específicamente, *L. monocytogenes* de muestras de alimento y ambientales; Sistema de panel de ensayos bioquímicos API® (Biomereieux, Marcy- L'etoile, Francia); Esponjas de muestreo de celulosa estéril no bactericida de 8x4x0,3 cm humedecidas previamente con D/E; Bolsas stomacher estériles con filtro; Tubos de polipropileno con tapa. Disponibles de múltiples fuentes; Pipetas de transferencia desechables. Cualquier fuente; Aguja de inoculación de plástico y 10 µl de bucles calibrados. Cualquier fuente. Aparatos: Homogeneizador Stomacher Seward 400 (Seward, Londres, Inglaterra). - Para la mezcla concienzuda de esponjas de muestra ambiental en caldo de enriquecimiento; Micropipeta y puntas estériles desechables; Incubador estacionario Symphony™ (VWR, EE.UU.) o equivalente. - Para proporcionar 29 °C±0,5 °C; Incubador estacionario, modelo 1555 (VWR, EE.UU.) o equivalente. - Para proporcionar 35 °C±2 °C.

**Preparación general de los medios:** Para preparar el Actero *Listeria*, suspender 53,8 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar la mezcla a 100°C y agitar constantemente hasta la disolución completa del polvo (aprox. 35 min). Dispensar en recipientes finales y esterilizar mediante tratamiento con autoclave a 110°C durante 15 min. No es necesario tratar con autoclave el medio si se usa inmediatamente tras la preparación. El uso de agua estéril es recomendable en este caso.

**Preparación de la muestra:** Para preparar esponjas de muestra ambiental, hacer un frotis de una superficie ambiental de 100 cm<sup>2</sup> usando esponjas de muestreo de celulosa no bactericidas humedecidas previamente con caldo D/E neutralizante aproximadamente 5 veces en vertical y 5 veces en horizontal (de arriba a abajo o de lado a lado se considera una vez). Colocar cada esponja en una bolsa de muestra estéril y mantener a 4°C±2°C hasta el ensayo.

**Análisis:** Añadir 90 ml de Actero *Listeria* precalentado a 29°C±0,5 °C a cada esponja de muestra en una única bolsa, mantener 30 segundos y enriquecer a 29 C±0,5 °C durante 24 horas. Mezclar a mano es una alternativa aceptable para el mantenimiento. Para mezclar a mano, masajear cada esponja durante aproximadamente un

minuto. Al final del periodo de enriquecimiento, cultivar en estrías las muestras directamente en placas de agar MOX y/o RLM. Confirmar las presuntas colonias de *Listeria* spp. tal como se recomienda en MLG 8.07 (12) o enviarlas al laboratorio independiente para su confirmación.

- 5 **Interpretación y comunicación del resultado:** Si no se han encontrado colonias sospechosas con la morfología típica de *Listeria* spp. en placas de agar MOX y/o RPM tras 48±2 h de incubación total, la muestra se considera negativa para *Listeria* spp. Si se han encontrado colonias sospechosas con la morfología típica de *Listeria* spp. en placas de agar MOX y/o RPM tras 48±2 h de incubación total, la muestra debería considerarse como potencialmente positiva. Las colonias sospechosas se deben confirmar de acuerdo con el Capítulo 8.07 de USDA FSIS Microbiology Laboratory Guidebook.

- 10 **Otros suplementos, reactivos y aparatos usados en el presente estudio:** Placas de agar sangre de caballo con sobrecapa (agar HBO o HL; Quélab Inc., Quebec, Canadá); Caldo Lactobacillus M.R.S. (MRS; Quélab Inc., Quebec, Canadá); Caldo modificado de la Universidad de Vermont (UVM; Quélab Inc, Quebec, Canadá) - se usa para el aislamiento y el enriquecimiento selectivo de *L. monocytogenes*; Caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado con ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS-BLEB; Oxoid LTD, Ontario, Canadá); Agar tripticasa de soja (TSA; Quélab Inc., Quebec Canadá) con extracto de levadura al 0,6 % (TSA-YE; Extracto de levadura Bacto™; BD Diagnostics, Nueva Jersey, EE.UU.); Placas de agar tripticasa de soja con sangre de oveja al 5 % (agar sangre; BBL™Stacker™, proporcionado por BD Diagnostics, Nueva Jersey, EE.UU.); Caldo de tripticasa de soja (TSB; Quélab Inc., Quebec, Canadá) con extracto de levadura al 0,6 % (TSB-YE; Extracto de levadura Bacto™, BD Diagnostics, Nueva Jersey, EE.UU.); Stomacher Seward Circulator 3500 (Seward, Londres, Inglaterra). - Para la mezcla concienzuda de esponjas de muestra ambiental en caldo de enriquecimiento; Mezclador de vórtice (VWR, EE.UU.).

- 25 Estudios de validación interna: Los siguientes estudios de validación interna se realizaron en los laboratorios de Maxivet Inc., una compañía subsidiaria de FoodChek Systems Inc.

Estudio de robustez: El estudio de robustez se llevó a cabo para evaluar los efectos de perturbaciones en dos parámetros del método (la temperatura y el tiempo de incubación), que pueden afectar a la realización del Actero *Listeria*. Las variables de robustez y sus respectivos intervalos se muestran en la Tabla 1.

- 30 Metodología: Cada condición de intervalo de ensayo se evaluó usando cultivos puros. Una cepa diana, *L. monocytogenes* HPB 5949, y una cepa no diana, *E. faecalis* ATCC 19433, se ensayaron. *L. monocytogenes* HPB 5949 se ensayó en placas de agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35°C± 1°C. Unas pocas colonias de la cepa diana se transfirieron a 9 ml de TSB-YE durante 6-7 h a 35°C. El cultivo se diluyó a 1:10 en TSB-YE fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. Después se diluyó el cultivo para obtener un nivel de inoculación fraccional (< 1 UFC por muestra) en el caldo ALEM.

Para la cepa no diana se usó la misma metodología de cultivo excepto en que el nivel de inoculación fue aproximadamente 10 veces más concentrado que el del organismo diana.

Diez (10) réplicas de la bacteria diana y 5 réplicas de la bacteria no diana se ensayaron para cada parámetro.

- 40 Al final del periodo de enriquecimiento, las muestras se cultivaron en estrías en placas de agar MOX y RLM para confirmar el crecimiento de *Listeria*.

Resultados: De acuerdo con el análisis de PDD, no se observaron diferencias significativas entre cada uno de los parámetros analizados, ya que los intervalos de confianza entre los valores de dPDD de condiciones extremas contienen un cero (Tabla 7). Por lo tanto, la capacidad del medio Actero para recuperar *L. monocytogenes* HPB 5949 no se vio afectada a lo largo de los intervalos de temperatura y de tiempo ensayados.

- 45 La presencia de la cepa no diana de *E. faecalis* ATCC 19433 en las muestras de ALEM no se detectó en ningún caso (datos no mostrados).

50

Tabla 7: Resultados de robustez del método con ALEM

**Inclusividad:** Para ensayar la capacidad de Actero *Listeria* para enriquecer una variedad de *Listeria* spp., se analizaron 54 cepas (Tabla 8) que representan 6 especies del género *Listeria* con un énfasis en el patógeno humano

Parámetro patrón	Condición		N"	Condición A			Condición B			dPDD (AB) <sup>a</sup>	IC 95 % <sup>f</sup>
	A	B		x <sup>b</sup>	PDD (A) <sup>c</sup>	IC 95 %	X	PDD (B) <sup>d</sup>	IC 95 %		
Temperatura de incubación (29 °C)	22 h	28 h	10	4	0,4	(0,168, 0,687)	6	0,6	(0,313, 0,814)	-0,2	(-0,528, 0,206)
Tiempo de incubación (24 h)	28°C	30°C	10	3	0,3	(0,108, 0,603)	4	0,4	(0,168, 0,687)	-0,1	(-0,446, 0,282)

<sup>a</sup>N - número de porciones de ensayo;  
<sup>b</sup>x - número de porciones de ensayo positivas;  
<sup>c</sup>PDD(A) - resultados positivos para la condición A divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>d</sup>PDD(B) - resultados positivos para la condición B divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>e</sup>dPDD(AB) - diferencia entre los valores PDD de la condición A y de la condición B;  
<sup>f</sup>IC 95 % - intervalo de confianza del 95 % (si el IC del 95 % de un valor dPDD no contiene cero, entonces la diferencia es estadísticamente significativa al nivel del 5 %).

5 *L. monocytogenes* (33 aislados pertenecientes a los 8 serotipos más prevalentes).

Metodología: Todas las cepas de *Listeria* se cultivaron en estría en placas de agar sangre y se incubaron durante toda la noche a 35°C. Unas pocas colonias se transfirieron a 10 ml de TSB-YE durante 6-7 horas a 35°C. Cada cultivo se diluyó a 1:10 en TSB-YE fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. El cultivo después se diluyó para inocular aproximadamente 5-20 UFC de cada cepa en 10 ml del caldo ALEM. Cada cepa se incubó por triplicado a 29°C durante 24 h. Al final del periodo de enriquecimiento, las muestras se cultivaron en estrías en placas de agar MOX y RLM para confirmar el crecimiento de *Listeria*.

Resultados: Los resultados del estudio de inclusividad se resumen en la tabla 7. Todas las 54 cepas de *Listeria* ensayadas fueron capaces de crecer en 24 h a 29°C usando ALEM.

Tabla 8: Listado de aislados de *Listeria* - Resultados del estudio de inclusividad

n.º	Género y especie	Número de cepa	Serotipo	Fuente <sup>a</sup>	Origen	Resultado
1	<i>Listeria grayi</i>	HPB 1114	-	Health Canada	Sin datos disponibles	+
2	<i>Listeria grayi</i>	B-33023 (ATCC19120)	-	ARS	Heces de chinchilla	+
3	<i>Listeria grayi</i>	B-33018 (ATCC25401)	-	ARS	Maíz plantado	+
4	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 700545	-	ATCC	Sin datos disponibles	+
5	<i>Listeria innocua</i>	HPB 118	-	Health Canada	Alimentos	+
6	<i>Listeria innocua</i>	HPB 34	-	Health Canada	Sin datos disponibles	+
7	<i>Listeria innocua</i>	B-33314 (OB10387)	-	ARS	Palitos de jamón/queso/pavo	+
8	<i>Listeria innocua</i>	MAX-L-3	-	IRDA	Aislado de campo	+
9	<i>Listeria innocua</i>	512	-	CRDA	Sin datos disponibles	+
10	<i>Listeria ivanovii</i>	MAX-L-6	-	IRDA	Aislado de campo	+
11	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 191 19	-	ATCC	Oveja	+
12	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC BAA-139	-	ATCC	Agua de lavar	+
13	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 43256	1/2b	ATCC	Queso estilo mexicano	+
14	<i>Listeria monocytogenes</i>	MAX-PT-O-2	1/2a	IRDA	Estiércol (suelo)	+
15	<i>Listeria monocytogenes</i>	513	4b	CRDA	Sin datos disponibles	+
16	<i>Listeria monocytogenes</i>	514	4b	CRDA	Sin datos disponibles	+
17	<i>Listeria monocytogenes</i>	515	4b	CRDA	Sin datos disponibles	+

ES 2 627 344 T3

n.º	Género y especie	Número de cepa	Serotipo	Fuente <sup>a</sup>	Origen	Resultado
18	<i>Listeria monocytogenes</i>	516	1/2a	CRDA	Sin datos disponibles	+
19	<i>Listeria monocytogenes</i>	517	4b	CRDA	Sin datos disponibles	+
20	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5255	1/2a	Health Canada	Pozo de estiércol	+
21	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5916	1/2b	Health Canada	Alimento - lechuga	+
22	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5904	1/2a	Health Canada	Alimento - lechuga	+
23	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5254	1/2b	Health Canada	Ternera - Estiércol fresco	+
24	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5089	1/2c	Health Canada	Alimento - Carne	+
25	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5949	1/2c	Health Canada	Alimento - Carne lista para el consumo	+
26	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5668	3a	Health Canada	Alimentos	+
27	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 4141	3b	Health Canada	Alimento - Pavo crudo	+
28	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 3	4b	Health Canada	Alimento - leche	+
29	<i>Listeria monocytogenes</i>	HPB 5246	4c	Health Canada	Ternera - Pozo de estiércol	+
30	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2010-00482	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
31	<i>Listeria monocytogenes</i>	STF-2010-02440	4b	LEPAQ	Cabeza de oveja	+
32	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2010-00483	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
33	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2010-00159	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
34	<i>Listeria monocytogenes</i>	STF-2010-03562	1/2a	LEPAQ	Leche	+
35	<i>Listeria monocytogenes</i>	STF-2010-03540	1/2b	LEPAQ	Leche	+
36	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2009-01007	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
37	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHY-2010-03610	1/2a	LEPAQ	Tejido reciente: hígado y riñón	+
38	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHY-2010-00373	1/2a	LEPAQ	Leche	+
39	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2010-00055	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
40	<i>Listeria monocytogenes</i>	STF-2010-00989	1/2a	LEPAQ	Leche	+
41	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2010-00122	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
42	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2010-00150	1/2a	LEPAQ	Cabra	+
43	<i>Listeria monocytogenes</i>	STF-2011-00729	1/2a	LEPAQ	Leche	+

n.º	Género y especie	Número de cepa	Serotipo	Fuente <sup>a</sup>	Origen	Resultado
44	<i>Listeria monocytogenes</i>	SHT-2011-00011	1/2a	MAPAQ-FMV	Oveja viva	+
45	<i>Listeria monocytogenes</i>	STF-2010-06277-1	1/2a	LEPAQ	Cabra muerta	+
46	<i>Listeria seeligeri</i>	MAX-L-4	-	IRDA	Aislado de campo	+
47	<i>Listeria seeligeri</i>	MAX-PT-LAI-3	-	IRDA	Aislado de campo	+
48	<i>Listeria seeligeri</i>	HPB 3522	-	Health Canada	Ambiental - Agua de campo	+
49	<i>Listeria seeligeri</i>	HPB 272	-	Health Canada	Animal - leche cruda	+
50	<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	-	ATCC	Suelo	+/-
51	<i>Listeria welshimeri</i>	HPB 5864	-	Health Canada	Alimento - bebedero de pollos	+
52	<i>Listeria welshimeri</i>	HPB 1137	-	Health Canada	Alimento - bebedero de pollos	+
53	<i>Listeria welshimeri</i>	B-33020 (ATCC35897)	-	ARS	Vegetación en descomposición	+
54	<i>Listeria welshimeri</i>	B-33328 (OB20088)	-	ARS	Cerdo a la barbacoa con salsa	+

<sup>a</sup>ATCC: American Type Culture Collection, Manassas (VA), Estados Unidos. IRDA: Research and Development Institute for the Agri-Environment, Quebec (QC), Canadá. CRDA: Food Research and Development Center, St-Hyacinthe (QC), Canadá. LEPAQ: Laboratory of Expertise in Animal Pathology of Quebec, Quebec (QC), Canadá. ARS: Agricultural Research Service, Washington (DC), Estados Unidos. MAPAQ: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec, Quebec (QC), Canadá. FMV: Laboratory of Bacteriology, Diagnostic Service, Faculty of Veterinary Medicine, St-Hyacinthe (QC), Canadá.

+ Presencia de colonias típicas de *Listeria* spp.

+/- Presencia de colonias típicas de *Listeria* spp. en MOX y/o RLM observadas solo cuando el inóculo era mayor de 50 UFC/10 ml del medio.

**Exclusividad:** Treinta (30) cepas que no eran de *Listeria*, enumeradas en la Tabla 9, se analizaron para determinar la capacidad del Actero *Listeria* para discriminar microorganismos diana de microorganismos no diana. Las cepas, pertenecientes a 19 géneros diferentes de bacterias y levaduras, se eligieron debido a que son parientes cercanos a *Listeria* spp. o debido a que se encuentran en el mismo ambiente.

**Metodología:** Cada cepa que no es de *Listeria* se cultivó en estría en placas de agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35°C y después se cultivaron en sus condiciones óptimas tal como se indica en la Tabla 9. Cada suspensión se diluyó para inocular 10 ml del ALEM con una concentración 10 veces mayor de la que se usó para los microorganismos diana. Esta etapa se realizó por triplicado. El cultivo creció a 29°C durante 24 h. Al final del período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron en estría en placas de agar MOX y RLM para verificar su capacidad para crecer en el ALEM.

**Resultados:** Los resultados obtenidos del estudio de exclusividad se resumen en la Tabla 9. Ninguna de las cepas ensayadas dio un resultado positivo tras el enriquecimiento en ALEM en las condiciones ensayadas.

Tabla 9: Listado de aislados de no *Listeria* - Resultados del estudio de exclusividad

n.º	Microorganismo	Número de cepa	Fuente <sup>a</sup>	Origen	Resultado
1	<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATCC 8750	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
2	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
3	<i>Bacillus subtilis</i>	MAX-B-1	Maxivet Inc.	Estiércol	Sin crecimiento
4	<i>Campylobacter jejuni</i> <sup>€</sup>	-	Sin datos disponibles	Aislado de campo	Sin crecimiento
5	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	FMV	Infección de las uñas	Sin crecimiento
6	<i>Carnobacterium divergens</i>	ATCC 35677	ARS	Ternera molida envasada al vacío	Sin crecimiento
7	<i>Carnobacterium mobile</i>	ATCC 49516	ARS	Carne de pollo irradiada	Sin crecimiento
8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	FMV	Espuito	Sin crecimiento
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 23355	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento

n.º	Microorganismo	Número de cepa	Fuente <sup>a</sup>	Origen	Resultado
11	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 8459	ARS	Productos diarios (queso)	Sin crecimiento
12	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	FMV	Aislado clínico	Sin crecimiento
13	<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 13337	FMV	tipo 32011 de Stuart	Sin crecimiento
14	<i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC 9341	FMV	Suelo	Sin crecimiento
15	<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	ATCC 314	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
16	<i>Lactobacillus casei</i> *	ATCC 393	ARS	Productos diarios (queso)	Sin crecimiento
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	ATCC 14917	ARS	Repollo en vinagre	Sin crecimiento
18	<i>Lactococcus lactis</i> * <sup>€</sup>	ATCC 7963	ARS	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC 8086	ARS	Habichuelas de fermentación	Sin crecimiento
20	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	Sin datos disponibles	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MSR-0132	FMV	Suelo	Sin crecimiento
22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
23	<i>Pseudomonas putida</i>	-	Maxivet Inc.	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
24	<i>Rhodococcus equi</i> *	ATCC 6939	FMV	Absceso pulmonar de potro	Sin crecimiento
25	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Sin datos disponibles	Tejido, animal	Sin crecimiento
26	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	FMV	Aislado clínico	Sin crecimiento
27	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	MAPAQ	Sin datos disponibles	Sin crecimiento
28	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	FMV	Mastitis	Sin crecimiento
29	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-	FMV	Mastitis	Sin crecimiento
30	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13812	FMV	Sin datos disponibles	Sin crecimiento

<sup>a</sup>ARS: Agricultural Research Service, Washington (DC), Estados Unidos. FMV: Laboratory of Bacteriology, Diagnostic Service, Faculty of Veterinary Medicine, St-Hyacinthe (QC), Canadá. MAPAQ: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec, Quebec (QC), Canadá.  
\*48 h de incubación en caldo MRS.  
\*\*48 h de incubación en caldo TSB.  
<sup>€</sup>CO<sub>2</sub> al 5 %

Ensayo lote a lote: El objetivo de este estudio es asegurar que la fabricación es consistente entre los lotes del medio.

- 5 Metodología: Se usaron tres lotes independientes para confirmar la reproducibilidad de la fabricación del ALEM. Cada lote se evaluó usando una cepa diana, *L. monocytogenes* HPB 5949, y una cepa no diana, *E. faecalis* ATCC 19433. La cepa diana se cultivó en estrías en placas de agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35 °C. Unas pocas colonias se transfirieron a 9 ml de TSB-YE durante 6-7 horas a 35°C. El cultivo bacteriano se diluyó a 1:10 en TSB-YE fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. El cultivo se diluyó después para obtener un inóculo fraccional (aproximadamente 0,5 UFC por muestra) en 10 ml del caldo ALEM.
- 10 Para la cepa no diana, se usó la misma metodología de cultivo excepto en que el nivel de inoculación fue aproximadamente 5 CFU (10 veces más concentrado que el del organismo diana). Diez (10) réplicas de la bacteria diana y 5 réplicas de la bacteria no diana se ensayaron. Los cultivos crecieron a 29°C durante 24 h. Al final del período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron en estría en placas de agar MOX y RLM para la confirmación.
- 15 Resultados: Se llevó a cabo una realización del ensayo con éxito con tres lotes diferentes del Actero Listeria. La estabilidad del proceso de fabricación se probó mediante el análisis de PDD con un intervalo de confianza del 95 % (véase la Tabla 10).

Tabla 10: Resultados del ensayo lote a lote de ALEM

Nivel de inóculo, UFC/muestra	N <sup>a</sup>	Lote 1		Lote 2		Lote 3		dPDD (CB) <sup>f</sup>	IC del 95 % <sup>g</sup>			
		x <sup>b</sup>	PDD (A) <sup>c</sup>	IC del 95 %	X	PDD (B) <sup>d</sup>	IC del 95 %			X	PDD <sup>e</sup>	IC del 95 %
0,7	10	3	0,3	(0,108, 0,603)	4	0,4	(0,168, 0,687)	2	0,2	(0,057, 0,510)	-0,2	(-0,521, 0,187)

<sup>a</sup>N - número de porciones de ensayo;  
<sup>b</sup>X - número de porciones de ensayo positivas;  
<sup>c</sup>PDD(A) - resultados positivos para el lote 1 divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>d</sup>PDD(B) - resultados positivos para el lote 2 divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>e</sup>PDD(C) - resultados positivos para el lote 3 divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>f</sup>dPDD(CB) - diferencia entre valores extremos de PDD (valores PDD del lote 3 y valores PDD del lote 2);  
<sup>g</sup>IC del 95 % - intervalo de confianza del 95 % (si el IC del 95 % de un valor dPDD no contiene cero, entonces la diferencia es estadísticamente significativa al nivel del 5 %).

Ensayo de estabilidad: La estabilidad del ALEM preparado se examinó durante un período de almacenamiento de 6 semanas a 4°C en la oscuridad. El rendimiento del ALEM se ensayó a las 0 (recién preparado), 2, 4 y 6 semanas de almacenamiento, usando bacterias diana y no diana.

5 Metodología: El Actero Listeria se evaluó para cada punto temporal de almacenamiento propuesto usando una cepa diana, *L. monocytogenes* HPB 5949, y una cepa no diana, *E. faecalis* ATCC 19433. La cepa diana se cultivó en estría en placas de agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35°C. Unas pocas colonias se transfirieron a 9 ml de TSB-YE durante 6-7 horas a 35°C. El cultivo se diluyó a 1:10 en TSB-YE fresco y se incubó durante toda la noche a la misma temperatura. Después, el cultivo de la bacteria diana se diluyó para obtener un inóculo fraccional (0,5 UFC por muestra) en 10 ml del caldo ALEM. Para la cepa no diana, se usó la misma metodología de cultivo  
10 excepto en que el nivel de inoculación fue aproximadamente 5 CFU (10 veces más concentrado que el del organismo diana). Diez (10) réplicas de la bacteria diana y 5 réplicas de la bacteria no diana se ensayaron. Los cultivos crecieron a 29°C durante 24 h. Al final del período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron en estría en placas de agar MOX y RLM para la confirmación.

15 Resultados: Los resultados del estudio de estabilidad se comunican en la Tabla 11. Los intervalos de confianza entre los valores de dPDD de dos puntos temporales extremos de almacenamiento del ALEM preparado, contienen un cero que confirma una ausencia de cambios significativos en el rendimiento de los medios tras 45 días de almacenamiento en comparación con los medios recién preparados. Tampoco se determinaron diferencias  
20 significativas entre otros puntos temporales de almacenamiento del ALEM preparado diferentes (datos no mostrados). Estos datos indican que el ALEM preparado se puede almacenar a 4°C sin ningún cambio significativo en los valores del rendimiento durante 45 días tras la preparación.

Estudio matricial: El estudio matricial se realizó para evaluar la capacidad del caldo ALEM para recuperar las *Listeria* spp. del acero inoxidable en una etapa de enriquecimiento.  
25

Los aislados usados para estos estudios son aislados de campo que se originan a partir de alimento y están bien caracterizados mediante un laboratorio de investigación de Health Canada. La cepa HPB 5949 de *Listeria monocytogenes* y la cepa HPB 118 de *L. innocua* se usarán para validar el ensayo con superficies de acero  
30 inoxidable y plástico, respectivamente.

El estudio que usa las placas de acero inoxidable se llevó a cabo en Maxivet Inc., y el otro que usa las superficies de plástico se realizó en colaboración con un laboratorio externo (véase la sección "Estudio de validación independiente").  
35

Tabla 11: Resultados del ensayo de estabilidad de ALEM

N <sup>a</sup>	Tiempo de almacenamiento de ALEM preparado, Día														IC del 95 % <sup>j</sup>		
	0				14				30				45				
	I <sup>h</sup>	x <sup>c</sup>	PDD (A) <sup>d</sup>	IC del 95 %	I	X	PDD (B) <sup>e</sup>	IC del 95 %	I	X	PDD (C) <sup>f</sup>	IC del 95 %	I	X		PDD (D) <sup>g</sup>	IC del 95 %
10	0,7	3	0,3	(0,108, 0,603)	0,5	3	0,3	(0,108, 0,603)	0,5	4	0,4	(0,168, 0,687)	0,2	2	0,2	(0,057, 0,510)	(-0,435, 0,265)

<sup>a</sup>N - número de porciones de ensayo;  
<sup>h</sup>I - nivel del inóculo, UFC/porción;  
<sup>c</sup>X - número de porciones de ensayo positivas;  
<sup>d</sup>PDD(A) - resultados positivos para el ALEM recién preparado divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>e</sup>PDD(B) - resultados positivos para el ALEM almacenado 14 días divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>f</sup>PDD(C) - resultados positivos para el ALEM almacenado 30 días divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>g</sup>PDD(D) - resultados positivos para el ALEM almacenado 45 días divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>j</sup>IC del 95 % - intervalo de confianza del 95 % (si el IC del 95 % de un valor dPDD no contiene cero, entonces la diferencia es estadísticamente significativa al nivel del 5 %).  
 El dPDD(AD) para los resultados presentados es de -0,1, representando la diferencia entre los valores PDD de puntos temporales extremos de almacenamiento del medio preparado (0 y 45 días) así como entre valores PDD de niveles extremos de inóculo (0,2 y 0,7 UFC/porción);

## ES 2 627 344 T3

Metodología: Preparación del inóculo: *L. monocytogenes* HPB 5949, usado como una cepa diana, y *E. faecalis* ATCC 19433, usado como un competidor, se cultivaron en estría en placas de agar sangre y se incubaron durante toda la noche a 35°C. Unas pocas colonias se transfirieron a 10 ml de TSB-YE durante 6-7 h a 35°C. Los cultivos se diluyeron a 1:10 en TSB-YE fresco y se incubaron toda la noche a la misma temperatura. Después de la incubación, los cultivos se conservaron a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Se usó una mezcla de cepa diana y de cepa no diana (proporción 1:10) como inóculo para placas de acero inoxidable. La mezcla se preparó como sigue. La *L. monocytogenes* HPB 5949 se diluyó en leche seca sin grasa (NFDM) al 10% para obtener resultados positivos fraccionarios. Además, el cultivo de *E. faecalis* también se diluyó en NFDM al 10% para obtener una concentración 10 veces mayor de la de la cepa diana. La concentración de célula bacteriana de cada cepa se verificó mediante trenzado antes de mezclarlas.

Preparación de la muestra ambiental: Las placas de acero inoxidable de 100 cm<sup>2</sup> se obtuvieron de un proveedor especializado en la industria alimenticia. Antes de su uso, todas las placas se lavaron y se esterilizaron mediante tratamiento con autoclave.

Cuarenta (40) placas de acero inoxidable se inocularon con 250 µl de la mezcla de cultivo (preparada tal como se describe en la sección 6.1.1.) extendiendo muchas gotas por toda la superficie. Después, otras 10 placas de acero inoxidable se inocularon con 250 µl de NFDM al 10% como control negativo.

Las superficies se secaron durante 18-20 h dentro de una cabina cerrada de seguridad biológica de flujo laminar a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). De cada placa se hizo un frotis usando esponjas de muestreo de celulosa no bactericida (Nasco Whirl-Pak Speci-Sponge, Nasco, EE.UU.) humedecidas previamente con caldo D/E neutralizante aproximadamente 5 veces en vertical y 5 veces en horizontal (arriba y abajo o de lado a lado se considera una vez). Cada esponja se colocó en una bolsa de muestra estéril y se mantuvo a temperatura ambiente durante al menos 2 h. La mitad de las esponjas de muestras de los frotis de placas de acero inoxidable inoculadas y sin inocular se analizaron usando el protocolo del desarrollador del método (protocolo ALEM) descrito a continuación. Las restantes esponjas de muestra se analizaron usando el método de referencia MLG 8.07.

Procedimiento de enriquecimiento con ALEM: Un conjunto de esponjas de muestra (20 inoculadas y 5 sin inocular) se trató como sigue: Se añadieron 90 ml de ALEM precalentado a  $29 \pm 0,5^\circ\text{C}$  en cada muestra de una única esponja en cada bolsa. Las muestras se mantuvieron 30 segundos y se enriquecieron a  $29 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 24 h. Al final del período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron en estrías directamente en placas de agar MOX y RLM usando un bucle calibrado de 10 µl. Las presuntas colonias de *L. monocytogenes* se confirmaron mediante un ensayo bioquímico rápido usando API de *Listeria* tal como se recomienda por MLG 8.07.

Confirmación del enriquecimiento con ALEM: Los resultados obtenidos de acuerdo con el protocolo ALEM se confirmaron mediante doble enriquecimiento seguido del protocolo de referencia USDA-FSIS. Para ello,  $0,1 \pm 0,02$  ml de la muestra enriquecida con ALEM se transfirieron en  $10 \pm 0,5$  ml de MOPS-BLEB y se incubaron a  $35 \pm 2,0^\circ\text{C}$  durante 24 h. Después se cultivó en estrías en placas de agar MOX y se incubaron a  $35 \pm 2,0^\circ\text{C}$  durante 24-28 h.

Las colonias sospechosas se transfirieron desde placas de agar MOX a agar HL y se incubaron a  $35 \pm 2,0^\circ\text{C}$  durante 18-26 h. Se realizó un rápido procedimiento bioquímico usando API de *Listeria* para confirmar las presuntas colonias aisladas positivas tal como se recomienda por MLG 8.07.

Método de enriquecimiento de referencia y confirmación: El segundo conjunto de esponjas de muestra (20 inoculadas y 5 sin inocular) se mantuvieron en 225±5 ml de caldo UVM durante  $2 \pm 0,2$  min, se enriquecieron a  $30 \pm 2,0^\circ\text{C}$  durante  $22 \pm 2$  h. Tras esto, se transfirieron  $0,1 \pm 0,02$  ml de la muestra enriquecida con UVM a  $10 \pm 0,5$  ml de MOPS-BLEB y se incubaron a  $35 \pm 2,0^\circ\text{C}$  durante 18-24±2 h.

Al final de cada período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron directamente en estría en placas de agar MOX. Todas las puestas presuntamente positivas se confirmaron mediante un procedimiento bioquímico rápido usando API de *Listeria* realizado de acuerdo con MLG 8.07. Resultados: Los resultados del estudio matricial de ALEM se presentan en la Tabla 12. Quince (15) de 20 muestras inoculadas y tratadas de acuerdo con el protocolo del método del desarrollador se confirmaron como positivas. Por el contrario, solo 5 resultados positivos se observaron entre las 20 muestras inoculadas que se habían procesado usando el protocolo del método de referencia. No se hallaron falsos negativos en todas las muestras ensayadas.

Tabla 12: Resultados comparativos para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de esponja de placas de acero inoxidable

Estadística	I <sup>a</sup> , UFC/muestra de ensayo		Candidato presunto (CP)			Candidato confirmado (CC)			Método del candidato (C)			Método de referencia (R)			C vc R	CP vc CC
	N <sup>b</sup>	X <sup>e</sup>	PDD(CP) <sup>d</sup>	N	X	PDD(CC) <sup>e</sup>	N	X	PDD(C)	N	X	PDD(R) <sup>f</sup>	N	X	dPDD(C, R) <sup>g</sup>	dPDD(CP, CC) <sup>h</sup>
Estimado	5	0	0,00	5	0	0,00	5	0	0,00	5	0	0,00	5	0	0,00	0,00
LCL			0,00			0,00			0,00			0,00			-0,43	-0,43
UCL			0,43			0,43			0,43			0,43			0,43	0,43
Estimado	20	15	0,75	20	15	0,75	20	15	0,75	20	5	0,25	20	5	0,50	0,00
LCL			0,53			0,53			0,53			0,11			0,19	-0,26
UCL			0,89			0,89			0,89			0,47			0,70	0,26

<sup>a</sup>I - nivel del inóculo, UFC/muestra;

<sup>b</sup>N - número de porciones de ensayo;

<sup>c</sup>X - número de muestras de ensayo positivas;

<sup>d</sup>PDD(CP) - resultados presuntos positivos del método del candidato divididos entre el número total de ensayos;

<sup>e</sup>PDD(CC) - resultados presuntos positivos confirmados del método del candidato divididos entre el número total de ensayos;

<sup>f</sup>PDD(R) - resultados positivos confirmados del método de referencia divididos entre el número total de ensayos;

<sup>g</sup>dPDD(C, R) - diferencia entre los valores de PDD del resultado método del candidato y del resultado del método de referencia;

<sup>h</sup>dPDD(CP, CC) - diferencia entre los valores de PDD del resultado presunto del método del candidato y del resultado confirmado del método del candidato.

## ES 2 627 344 T3

Estudio de validación independiente: El estudio de validación se realizó en colaboración con un laboratorio de ensayo externo acreditado, Agat Laboratories (Sant-Laurent, Quebec, Canadá) bajo la supervisión de AOAC.

5 Comparación del método: El estudio de comparación del método se realizó para evaluar la capacidad del caldo ALEM para recuperar la *Listeria* spp. de muestras ambientales en placas de plástico tras 24 horas de enriquecimiento a 29°C.

10 Metodología: Preparación del inóculo: *L. innocua* MAX-L-3, usado como cepa diana, se cultivó en estría en placas de agar sangre y se incubó durante toda la noche a 35°C. Unas pocas colonias se transfirieron a 10 ml de TSB-YE durante 6-7 h a 35°C. El cultivo se diluyó a 1:10 en TSB-YE fresco y se incubó toda la noche a la misma temperatura. Después de la incubación, el cultivo se almacenó a 4±2°C hasta su uso. El cultivo se diluyó en leche seca sin grasa (NFDM) al 10 % para inocular superficies ambientales de plástico en un nivel de inoculación bajo con el objetivo de obtener resultados positivos fraccionarios. La concentración de células bacterianas se verificó tras la inoculación mediante trenzado.

15 Preparación de la muestra: Las placas de plástico de 100 cm<sup>2</sup> se obtuvieron de un proveedor especializado en la industria alimenticia. Antes de su uso, todas las placas se lavaron y se esterilizaron mediante tratamiento con autoclave.

20 Cuarenta (40) placas de plástico se inocularon con 250 µl del cultivo de *L. innocua* MAX-L-3 (preparado tal como se describe en la sección 1.1.1.) extendiendo muchas gotas por toda la superficie. Después otras 10 placas de plástico se inocularon con 250 µl de NFDM al 10 % como control negativo. Las superficies se secaron durante 18-20 h dentro de una cabina cerrada de seguridad biológica de flujo laminar a temperatura ambiente (22 ± 2°C).

25 Las esponjas de muestra medioambiental se obtuvieron como sigue: se hizo un frotis de cada placa de plástico usando esponjas de muestreo de celulosa no bactericida (Nasco Whirl-Pak Speci-Sponge, Nasco, EE.UU.) humedecidas previamente con caldo D/E neutralizante aproximadamente 5 veces en vertical y 5 veces en horizontal (arriba y abajo o de lado a lado se considera una vez). Cada esponja se colocó en una bolsa de muestra estéril y se mantuvo a temperatura ambiente durante al menos 2 h.

30 La mitad de las esponjas de muestra de las placas de plástico inoculadas con frotis y sin inocular se analizaron usando el protocolo del desarrollador del método (protocolo ALEM) descrito a continuación. Las restantes esponjas de muestra se analizaron usando el método de referencia MLG 8.07.

35 Protocolo de enriquecimiento con ALEM: Un conjunto de esponjas de muestra (20 inoculadas y 5 sin inocular) se trató como sigue: Se añadieron 90 ml de ALEM precalentado a 29±0,5°C en cada muestra de una única esponja en cada bolsa. Las muestras se mantuvieron 30 segundos y se enriquecieron a 29±0,5°C durante 24 h. Al final del período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron directamente en estrías en placas de agar MOX y RLM. Las presuntas colonias de *L. innocua* se confirmaron mediante un ensayo bioquímico rápido usando API de *Listeria* tal como se describe en el método de referencia de MLG 8.07.

Confirmación del enriquecimiento con ALEM: Los resultados obtenidos de acuerdo con el protocolo ALEM se confirmaron mediante doble enriquecimiento, tal como se recomienda en el protocolo de referencia de USDA-FSIS.

45 Para ello, 0,1±0,02 ml de la muestra enriquecida con ALEM se transfirieron en 10±0,5 ml de MOPS-BLEB y se incubaron a 35±2,0°C durante 24 h. Después se cultivó en estrías en placas de agar MOX y se incubaron a 35±2,0°C durante 24-28 h.

50 Las colonias sospechosas se transfirieron desde placas de agar MOX a agar HL y se incubaron a 35±2,0°C durante 18-26 h. Se realizó un rápido procedimiento bioquímico usando API de *Listeria* para confirmar las presuntas colonias aisladas positivas tal como se recomienda por el método de referencia de MLG 8.07.

55 Método de enriquecimiento de referencia y confirmación: El segundo conjunto de esponjas de muestra (20 inoculadas y 5 sin inocular) se mantuvieron en 225±5 ml de caldo UVM durante 2±0,2 min, se enriquecieron a 30±2,0°C durante 22±2 h. Tras esto, se transfirieron 0,1 ±0,02 ml de cada muestra enriquecida con UVM a 10±0,5 ml de MOPS-BLEB y se incubaron a 35±2,0°C durante 18-24±2 h.

60 Al final de cada período de enriquecimiento, las muestras se cultivaron directamente en estría en placas de agar MOX. Todas las puestas presuntamente positivas se confirmaron mediante un procedimiento bioquímico rápido usando API de *Listeria* de acuerdo con el método de referencia de MLG 8.07.

65 Resultados: Los resultados del estudio de comparación del método se presentan en la Tabla 13. Basado en los análisis no pareados del PDD y de la Chi cuadrada, no se detectó diferencia significativa entre el protocolo del método del desarrollador y el protocolo del método de referencia para la recuperación de *L. innocua* de la superficie plástica de contacto con alimento. No se comunicó ningún resultado falso negativo ni falso positivo. La tabla 14 resume los parámetros de rendimiento para el método de Actero *Listeria*.

Tabla 13: Resultados comparativos para la detección de *L. innocua* en muestras de esponja de placas de plástico

Estadística	I <sup>a</sup> , UFC/muestra de ensayo		Candidato presuntivo (CP)			Candidato confirmado (CC)			Método del candidato (C)			Método de referencia (R)			C vc R	CP vc CC
	N <sup>b</sup>	x <sup>c</sup>	PDD(CP)	N	X	PDD(CC)	N	X	PDD(C)	N	X	PDD(R)	N	X	PDD(C, R)	dPDD (CP, CC)
Estimado	5	0	0,00	5	0	0,00	5	0	0,00	5	0	0,00	5	0	0,00	0,00
LCL			0,00			0,00			0,00			0,00			-0,43	-0,43
UCL			0,43			0,43			0,43			0,43			0,43	0,43
Estimado	20	7	0,35	20	7	0,35	20	7	0,35	20	6	0,30	20	6	0,05	0,00
LCL			0,18			0,18			0,18			0,15			-0,23	-0,28
UCL			0,57			0,57			0,57			0,52			0,32	0,28

<sup>a</sup> I - nivel del inóculo, UFC/muestra;  
<sup>b</sup> N - número de porciones de ensayo;  
<sup>c</sup> X - número de muestras de ensayo positivas.  
<sup>d</sup> PDD(CP) - resultados presuntos positivos del método del candidato divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>e</sup> PDD(CC) - resultados presuntos positivos confirmados del método del candidato divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>f</sup> PDD(R) - resultados positivos confirmados del método de referencia divididos entre el número total de ensayos;  
<sup>g</sup> dPDD(CP) - diferencia entre los valores de PDD del resultado del método del candidato y del resultado del método de referencia;  
<sup>h</sup> dPDD(CP) - diferencia entre los valores de PDD del resultado presuntivo del método del candidato y del resultado confirmado del método del candidato.

Tabla 14: Resumen de los parámetros de rendimiento para el método Actero Listeria

Matriz	Cepa	I <sup>a</sup> , UFC/muestra de ensayo	N <sup>h</sup>	Referencia confirmada positiva (CP)	Candidato presunto positivo (CP)	Candidato confirmado positivo (CC)	Sensibilidad, %	Especificidad, %	Precisión, %	Aceptación del método, %	$\chi^2$
Placa de acero	<i>L. monocytogenes</i>	0,00	5	0	0	0	n/a	100	n/a		
Placa de inoxidable HPB 5949	<i>L. monocytogenes</i>	3,2	20	5	15	15	100	100	300	100	9,8
Placa de plástico L-3	<i>L. innocua</i> MAX-	0,00	5	0	0	0	n/a	100	n/a	100	0,1
		6,20	20	6	7	7/6	100	100	117	100	0,1

<sup>a</sup> I - nivel del inóculo, UFC/muestra;  
<sup>b</sup> N - número de porciones de ensayo;  
<sup>c</sup>  $\chi^2$  se define mediante el análisis no pareado de Cochran-Mantel-Haenszel (resultados de  $\chi^2$  mayores de 3,84 indican una diferencia significativa entre dos métodos en un nivel de intervalo de confianza del 95 %);  
n/a - no aplicable.

**REIVINDICACIONES**

1. Un medio de cultivo que comprende:
- 5        5 g/l de fitona;  
5 g/l de triptona;  
5 g/l de extracto de ternera;  
5 g/l de extracto de levadura;  
22,2 g/l de tampón MOPS;
- 10       0,5 g/l de citrato de hierro (III);  
8 g/l de cloruro de litio;  
2 g/l de MgSO<sub>4</sub>; y  
1 g/l de piruvato de sodio,
- 15       y que comprende ácido nalidíxico, cicloheximida e hidrocloreuro de acriflavina.
2. Un método para cultivar bacterias *Listeria spp* presentes en una muestra biológica, que comprende cultivar la muestra en el medio de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20       3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que adicionalmente comprende detectar las bacterias cultivadas, en donde dicha detección comprende una etapa de PCR, unión a lectina, difusión simple, difusión lateral, detección inmunológica, flujo lateral o flujo continuo.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 en la que dicha detección tiene lugar tras cultivar dicha muestra a una temperatura de entre aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 38°C y durante menos de aproximadamente 24 horas.
- 25       5. Un kit adecuado para cultivar *Listeria spp.*, comprendiendo el kit el medio de acuerdo con la reivindicación 1.
- 30       6. El medio de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho ácido nalidíxico está presente a una concentración de 27 mg/l, dicha cicloheximida está presente a una concentración de 33,75 mg/l y dicho hidrocloreuro de acriflavina está presente a una concentración de 10,125 mg/l.
7. El medio de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha *Listeria spp.* está comprendida en una muestra biológica que se ha congelado, refrigerado, molido, triturado, enlatado, tratada con calor, secado, preservado o refinado.
- 35       8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la *Listeria spp.* comprende una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, y *Listeria grayi*.
- 40

## 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

- US 10597909 A [0002]
- US 6483303 B [0049] [0068]
- US 6597176 B [0049] [0068]
- US 6607922 B [0049] [0068]
- US 6927570 B [0049] [0068]
- US 7323139 B [0049] [0068]
- US 6518747 B [0068]
- US 6046585 A [0068]
- US 6275031 B [0068]
- US 6437563 B [0068]

10

### Literatura no patente citada en la descripción

- MENDONCA, A., F. ; KNABEL, S., J. A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 4001-4008 [0002]
- BEUMER R. R. ; TE GIFFEL M. C. ; ANTHONIE S. V. R. ; COX L. J. The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. *F. Microbiol.*, 1996, vol. 13 (2), 137-148 [0002]
- TEO, A., Y-L. ; KNABEL, S., J. Development of a Simple Recovery-Enrichment System for Enhanced Detection of Heat-Injured *Listeria monocytogenes* in Pasteurized Milk. *J. Food Prot.*, 2000, vol. 63 (4), 462-472 [0002]
- BUSCH SV ; DONNELLY CW. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, vol. 58 (1), 14-20 [0002]
- The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. BUCHRIESER C ; ROCOURT J. *Listeria*, listeriosis, and food safety. Marth EH. CRC Press, 2007, 896 [0002]
- LANG HALTER E ; NEUHAUS K ; SCHERER S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 27 April 2012 [0002]
- BERTSCH D ; RAU J ; EUGTER MR ; HAUG MC ; LAWSON PA ; LACROIX C ; MEILE L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 20 April 2012 [0002]
- The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. PAINTER J ; SLUTSKER L. *Listeria*, listeriosis, and food safety. CRC Press, 2007, 896 [0002]
- The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. WESLEY IV. *Listeria*, listeriosis, and food safety. CRC Press, 896 [0002]
- RAMASWAMY V ; CRESENCE VM ; REJITHA JS ; LEKSHMI MU ; DHARSANA KS ; PRASAD SP ; VIJILA HM. *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.*, 2007, vol. 40 (1), 4-13 [0002]
- KOCH J ; STARK K. Significant increase of listeriosis in Germany--epidemiological patterns 2001-2005. *Euro Surveill.*, 2006, vol. 11 (6), 85-8 [0002]
- *Incidence of Foodborne Illness*, 2010, <http://www.cdc.gov/Features/dsFoodborneIllness/> [0002]
- *EU summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks*, 2009, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf> [0002]
- SCALLAN E ; HOEKSTRA RM ; ANGULO FJ ; TAUXE RV ; WIDDOWSON M-A ; ROY SL ; JONES JL ; GRIFFIN PM. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis.*, 2011, vol. 17 (1), 126-8 [0002]
- GANDHI M ; CHIKINDAS ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol.*, 2007, vol. 113 (1), 1-15 [0002]
- Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Microbiology Laboratory Guidebook. 2011 [0002]
- DONNELLY C. W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. *Journal of AOAC International*, 2002, vol. 85 (2), 495-500 [0002]
- KNABEL S. J. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. *Journal of AOAC International*, 2002, vol. 85 (2), 501-504 [0002]