

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 385**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2016** E 16192488 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** EP 3305908

54 Título: **Medio nutriente líquido para el cultivo de clostridios perjudiciales en queserías y procedimientos para su detección**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2020

73 Titular/es:
SY-LAB VERTRIEBSGESELLSCHAFT M.B.H.
(100.0%)
Tullnerbachstrasse 61-65
3011 Neupurkersdorf, AT

72 Inventor/es:
BRÄNDLE, JOHANNA;
DOMIG, KONRAD;
SCHINKINGER, MANFRED y
STOCKER, WOLFGANG

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 385 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 nutriente líquido para el cultivo de clostridios perjudiciales en queserías y procedimientos para su detección

La invención se refiere a un medio nutriente líquido para el cultivo de clostridios perjudiciales en queserías así como a un procedimiento para la detección selectiva de microbios esporulados anaerobios productores de ácido butírico del género *Clostridium* en leche y queso.

Antecedentes

Cuando la leche de quesería está contaminada con esporas de *Clostridium*, durante la maduración del queso curado debido a la germinación de estas esporas, se produce un defecto característico del queso, la denominada hinchazón tardía. El grupo de los clostridios perjudiciales en queserías comprende, en particular, los clostridios que forman ácido butírico. La presencia del ácido butírico de olor rancio y la fuerte formación de gas dan como resultado características sensoriales no deseadas, la formación de grietas y perforaciones irregulares y conducen a grandes pérdidas económicas. Dado que solo unas pocas esporas por litro de leche cruda pueden causar estos defectos del queso, la detección cuantitativa fiable es esencial para la producción de queso. Además, el registro preciso de los recuentos de esporas también es importante en aquellas zonas en las que el recuento de esporas en la leche cruda se considera un parámetro de calidad y, por lo tanto, influye en el precio de la leche. Además, se puede hacer una declaración sobre el tipo de forraje utilizado (heno, hierba o ensilaje) a través del número de microbios esporulados anaerobios en la leche cruda.

Los clostridios productores de ácido butírico pertenecen al género grande y muy heterogéneo *Clostridium* (Blaschek, 1999). Los clostridios productores de ácido butírico se asignan a este respecto a un clúster propio, Clúster 1, *Clostridium sensu stricto* (Rainey, 2009). A este respecto se trata de bacilos Gram positivos que pueden crecer solo en condiciones estrictamente anaerobias. El contenido de G + C de sus ácidos nucleicos varía entre el 22 y el 35% y la similitud en sus secuencias de ARNr 16s está entre el 92 y el 99% (Rainey, 2009). Son capaces de producir endosporas resistentes que no pueden ser inactivadas por temperaturas extremas (calor y frío), radiación ni por valores de pH extremos. Además, estos microorganismos pueden colonizar muchos hábitats diferentes con fuertes variaciones estacionales y, además, encontrar condiciones ideales de propagación en la hierba ensilada. Los clostridios pasan ilesos por el tracto digestivo de los rumiantes, por lo que la contaminación de la leche cruda generalmente se produce a través de la contaminación fecal.

En el caso de las 4 especies más comúnmente aisladas de la leche y el queso, se trata de *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium tyrobutyricum*, describiéndose *C. tyrobutyricum* como el principal agente causante de los defectos del queso (Zangerl 1993, Julien et. al. 2008).

Para poder detectar incluso pequeñas cantidades de agentes patógenos en queserías, la detección se realiza actualmente a través del procedimiento del número más probable ("Most Probable Number") (MPN). El procedimiento MPN intenta determinar estadísticamente el "número más probable de bacterias" mediante intentos repetidos de pesadas. A este respecto, de cada pesada se examinan varias repeticiones en paralelo. A medida que aumenta el número de paralelos, aumenta a este respecto la precisión. La muestra generalmente se diluye en una serie de etapas decimales y de cada una de estas diluciones en serie se inoculan de 3 a 5 repeticiones en un caldo de cultivo correspondiente y se incuban. Los caldos de cultivo se recubren con un tapón de parafina y se incuban anaeróticamente durante al menos 3 a 5 días. El crecimiento se detecta después a través de la formación de gas y el ascenso del tapón de parafina. A partir del número de tubos positivos en cada una de las tres etapas de dilución, se obtiene una combinación numérica (= clave de autenticación), a la que puede asignarse mediante métodos estadísticos un "número más probable de bacterias" (MPN) por litro de muestra. La clave de autenticación de MPN se puede convertir a este respecto fácilmente en el número más probable de bacterias (recuento de esporas) a través de las tablas estadísticas correspondientes (tablas de MPN) (Bergere J. y Sivelä S., 1990).

Brändle et. al. (2016) describen en detalle los medios nutrientes disponibles actualmente y utilizados para la detección de clostridios perjudiciales en queserías. Las formulaciones más utilizadas son a este respecto aquellas basadas en el uso del medio reforzado para clostridios ("Reinforced Clostridial Medium", RCM) desarrollado por Hirsch y Grinstead (1954). RCM contiene esencialmente los siguientes componentes:

triptona o peptona

extracto de carne

extracto de levadura

almidón

glucosa

acetato de sodio

cisteína (generalmente en forma de cisteína HCl)

cloruro de sodio

5 Todos estos medios nutrientes utilizados para la detección de clostridios perjudiciales en queserías generalmente usan una etapa de pasteurización de laboratorio para eliminar la flora acompañante que no forma esporas. Además, a menudo se agrega lactato para promover el crecimiento de clostridios perjudiciales en queserías. Sin embargo, a pesar de estas precauciones y de una incubación estrictamente anaerobia, otros microorganismos que están presentes en la muestra, que son termoestables y se pueden propagar en condiciones anaerobias, pueden crecer y simular la presencia de perjudiciales en queserías y, por lo tanto, falsear el resultado. Dado que ninguno de los medios nutrientes conocidos garantiza una seguridad suficiente para la detección fiable y comparable, no ha sido posible desarrollar hasta ahora un método estándar correspondiente para la detección.

10 Los métodos actualmente disponibles para la detección de clostridios perjudiciales en queserías también son extremadamente laboriosos y requieren mucho tiempo. Según el método de MPN, por ejemplo, se deben investigar al menos 3 diluciones de muestra secuenciales en cada caso en 5 repeticiones, en donde los resultados generalmente están disponibles solo después de 3 a 10 días de incubación.

15 La invención busca eliminar los problemas mencionados anteriormente así como superar las desventajas de la técnica anterior, y se plantea el objetivo de proporcionar un medio nutriente del tipo mencionado al comienzo, con el cual se hace posible una evaluación más simple de los resultados y se puede acortar el tiempo de detección. Además, el medio nutriente será capaz de lograr una minimización de los resultados positivos falseados.

20 Un objetivo adicional de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para la detección de esporas de clostridios perjudiciales en queserías en muestras de leche según el método del número más probable (MPN) que, con la ayuda del nuevo medio nutriente, proporciona una cuantificación más rápida y más fiable de las esporas de clostridios.

Compendio

25 El primer objetivo mencionado anteriormente se consigue mediante un medio nutriente líquido para el cultivo de clostridios perjudiciales en queserías que contiene un medio reforzado para clostridios (RCM) para la incubación con muestras de leche o queso que comprende rojo neutro como indicador, así como cicloserina y trimetoprim.

30 Un sistema indicador de color a base del indicador de redox rojo neutro, que puede reducir los clostridios formadores de ácido butírico y, que, a este respecto, cambia el color de rojo a amarillo, simplifica la determinación del crecimiento de los organismos diana en medios nutrientes líquidos y facilita significativamente la evaluación que actualmente solo se realiza a través de la formación de gas o el ascenso del tapón de parafina con el que se recubre la muestra.

Preferiblemente, la concentración de rojo neutro en la incubación es de 0,010 a 0,025 g/l, preferiblemente de 0,015 g/l.

35 El medio nutriente contiene una combinación de los antibióticos cicloserina y trimetoprim que, como se muestra a continuación en los ejemplos, son adecuados para suprimir el crecimiento de la flora acompañante no deseada, como *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. y, al mismo tiempo, para estimular un mejor crecimiento de los organismos diana, tales como *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. Sporogenes*.

De acuerdo con una realización preferida, la concentración de trimetoprim durante la incubación es de 17 mg/l a 35 mg/l, preferiblemente de 28 mg/l. Otra realización preferida del medio nutriente de acuerdo con la invención se caracteriza por que la concentración de cicloserina en la incubación es de 200 mg/l.

40 El objetivo principal de la presente invención también era desarrollar un procedimiento para la detección específica de microbios esporulados anaerobios en la leche y los productos lácteos y, en particular, también desarrollar para este procedimiento, un medio de cultivo optimizado que permita la detección sensible de incluso pequeñas cantidades de esporas, al tiempo que suprime de manera óptima la flora acompañante.

45 Un objetivo adicional de la invención se consigue en un procedimiento para detectar clostridios perjudiciales en queserías en la leche según el procedimiento del número más probable (MPN) usando el medio nutriente líquido de la invención, en donde la leche se incuba con el medio nutriente, por que la incubación la leche se lleva a cabo a un pH de 6,0-7,0, preferiblemente 7,0, en condiciones anaerobias y la muestra se evalúa después de la incubación con respecto a un cambio de color.

50 En una realización preferida, el medio nutriente se mezcla a este respecto con la leche, siendo el porcentaje de la leche > 50% en volumen, por ejemplo, del 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, con particular preferencia, del 75%.

A este respecto, el medio nutriente modificado contiene, por así decirlo, la leche que va a examinarse como el constituyente líquido principal y los nutrientes conocidos del medio RCM, así como el indicador (y opcionalmente la combinación de antibióticos cicloserina + trimetoprim) para la estimulación máxima del crecimiento de los clostridios

productores de ácido butírico cuando se incuban bajo exclusión de oxígeno.

Según otra realización preferida, la incubación se lleva a cabo mediante múltiples repeticiones de diluciones de muestra en serie en placas de microtitulación y la evaluación se realiza mediante medición de fluorescencia, en la que el medio nutriente se mezcla con la leche en una relación en volumen de medio nutriente:leche = 9:1 o mayor.

5 En esta realización, el “constituyente de la leche” del medio nutriente se mantiene relativamente bajo para asegurar la medición de la señal de fluorescencia indicadora.

Descripción detallada

10 El medio nutriente para la detección de clostridios productores de ácido butírico de acuerdo con la invención consiste en los nutrientes de RCM triptona, extracto de carne, extracto de levadura, almidón, glucosa, acetato de sodio, cisteína y cloruro de sodio (en las concentraciones o intervalos de concentración en sí conocidos de la bibliografía y habituales en el comercio), así como rojo neutro, mayormente en forma de un concentrado líquido. Los componentes de nutrientes también pueden ser reemplazados por nutrientes comparables (en concentraciones comparables).

15 Si, en el procedimiento de detección, se usan mayores cantidades de la muestra de ensayo, es decir, leche o muestra mezclada con leche UHT (aislado de queso) para la incubación con el medio nutriente, la preparación de muestra tiene una fuerte turbidez propia y la detección de la turbidez no puede usarse como indicador del crecimiento de los microorganismos. Además, si se omite un recubrimiento de la suspensión de muestra con parafina, la formación de gas asociada con el desplazamiento del tapón de parafina, tampoco se puede usar como indicador de crecimiento.

20 Por el contrario, el indicador redox rojo neutro utilizado según la invención se reduce con clostridios (Jonsson, 1990) y, por lo tanto, puede usarse tanto por un simple cambio de color de rojo a amarillo como por una señal de fluorescencia (excitación a 450-470 nm y emisión a 550-590 nm) como detección para el crecimiento de gérmenes diana.

25 Cuando se usa > 50% en volumen, es decir, por ejemplo 3 partes, de la muestra de ensayo para la incubación con el medio nutriente en el sistema indicador de acuerdo con la invención, la detección solo es posible a través del cambio de color. La opción de detección de fluorescencia solo es posible debido a la fluorescencia intrínseca de la muestra (leche) exclusivamente cuando se usan cantidades más pequeñas de muestra, es decir, cuando el medio nutriente se mezcla con la muestra en una relación de volumen mayor, es decir, 9:1 o mayor.

30 Los medios nutrientes líquidos actualmente utilizados para detectar clostridios en el procedimiento MPN se basan en el medio RCM descrito anteriormente, que contiene los componentes básicos de crecimiento necesarios para el cultivo. La flora acompañante no deseada se suprime en los procedimientos estándar a base de RCM mediante pasteurización de laboratorio a 80-85 °C y la flora acompañante aerobia, además, mediante una incubación con exclusión de oxígeno mediante la aplicación de capas de parafina en los medios nutrientes. Sin embargo, ambas medidas generalmente no son suficientes para suprimir eficazmente la flora acompañante no deseada, y los recuentos de esporas a menudo se falsean debido al crecimiento de la flora acompañante.

35 En numerosos trabajos ya han descrito ensayos en los que se suprimió el crecimiento de la flora acompañante no deseada mediante la adición de distintos antibióticos. Sin pretender ser exhaustivos, se utilizaron a este respecto los antibióticos polimixina B, sulfadizina, cicloserina y trimetoprim, principalmente en combinación de 3 a 4 de los componentes mencionados (Abgrall et al. (1985), Bourgeois et al. (1984), Batina et al (1997), Jonsson (1990), Roux y Raoult (2004)). Sin embargo, también se ha demostrado que mayormente se detecta una inhibición indeseable del cultivo de clostridios que va a detectarse.

45 La combinación de cicloserina y trimetoprim se usa como una combinación preferida de los componentes selectivos del medio nutriente para la supresión de la flora acompañante, esencialmente Bacillus spp. y Paenibacillus spp. La combinación de estas sustancias no tiene a este respecto ningún efecto adverso sobre el crecimiento de los organismos diana. Incluso se ha encontrado que la adición de trimetoprim en el intervalo de concentración preferido acelera sorprendentemente el crecimiento de los organismos diana. Los resultados respectivos se resumen en la Tabla 1. Como se puede ver en esta tabla, los tiempos de detección para los organismos diana (*Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes* y *Cl. beijerinckii*) se redujeron significativa y parcialmente a la mitad.

Tabla 1: Comparación del tiempo de detección (tiempo hasta la aparición de un cambio de color visible) durante la incubación con o sin adición de trimetoprim.

Código	Especie	Cepa	Sin trimetoprim	Con trimetoprim
			Valor medio aritm. [h]	
CI 2	<i>Cl. sporogenes</i>	Uni Graz 8260	30,8	15,0
CI 3	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	NCDO 1759	43,0	33,0

ES 2 755 385 T3

CI 9	<i>Cl. sporogenes</i>	LMG 8421; ATCC 3584; DSM 795	37,0	19,0
CI 12	<i>Cl. sporogenes</i>	ATCC 19404	15,9	12,5
CI 13	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 202	28,5	21,5
CI 14	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	DSM 663	31,6	21,5
CI 15	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	DSM 664	24,5	20,0
CI 16	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	IMB 4132 2020	35,0	23,0
CI 17	<i>Cl. butyricum</i>	DSM 2477 4P 1	15,3	7,5
CI 18	<i>Cl. butyricum</i>	DSM 2478 MMP3	24,8	19,0
CI 19	<i>Cl. butyricum</i>	DSM 10702; ATCC 19398	11,0	8,0
CI 20	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	DSM 2637	45,7	41,0
CI 22	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 2008	28,5	12,5
CI 24	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 2007	17,8	12,0
CI 25	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	IMB 4132 2022	46,8	28,0
CI 26.2	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 2023	-	31,5
CI 29.2	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	IMB 4132 2010	30,0	28,0
CI 31	<i>Cl. beijemickii</i>	IMB 4132 2014	35,5	29,0
CI 33	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	IMB 4132 2018	40,5	26,0
CI 34	<i>Cl. beijerinckii</i>	DSM-1820	31,5	24,0
CI 36	<i>Cl. beijerinckii</i>	DSM-791	35,3	25,0
CI 37	<i>Cl. acetobutylicum</i>	LMG 5710; DSM 792	-	37,5
CI 40	<i>Cl. beijerinckii</i>	LMG 1219; ATCC 6015	28,3	22,5
CI 201	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 201	28,5	14,5
CI1904	<i>Cl. sporogenes</i>	IMB 4132 1904	19,3	10,0
CI 2002	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 2002	26,8	18,0
CI2013	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	IMB 4132 2009	29,0	24,0
CI 2016	<i>Cl. beijerinckii</i>	IMB 4132 2016	18,0	13,0
CI 2021	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	IMB 4132 2021	18,0	14,5
I 18	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	27,8	19,0
I 19	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	25,0	19,0
I 20	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	36,0	19,0
I 22	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	26,5	18,0
I 23	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	31,5	19,0
I 52	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	31,5	19,0
I 53	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	31,5	22,0

I 54	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	31,5	19,0
I 56	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	30,0	19,0
I 57	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	40,5	37,0
I 62	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	42,0	28,0
I 63	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	42,0	35,5
K 6.5	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	48,0	27,0
K 8.1	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	30,8	19,0
K 11.2	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	27,0	27,0
K 13.2	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	31,5	24,5
K 13.5	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	31,5	19,0
K 16.3	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	27,0	19,0
K 18.1	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	22,5	18,0
K 18.2	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	29,3	24,5
K 25.1	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	46,0	39,0
K 26.1	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	37,0	22,0
K 27.1	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	37,0	27,5
K 27.9	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	39,0	24,0
K 28.5	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	aislado de queso	33,5	24,0

5

También se ha encontrado que trimetoprim es adecuado para la supresión de *Paenibacillus thermophilus*, que está presente en una gran cantidad de muestras examinadas de quesos de leche cruda y puede dar resultados falsos positivos en el método según Bryant y Burkey. Como se muestra a continuación, trimetoprim fue capaz de suprimir el crecimiento de *Paenibacillus thermophilus* así como *Paenibacillus barengoltzii* en las concentraciones de 17,5 µg/ml, 28 µg/ml así como 35 µg/ml y no tuvo ningún efecto adverso en los organismos diana (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados de la composición de medios nutrientes según la invención en diferentes concentraciones de trimetoprim

Aislado	Crecimiento con cambio de color concentración de trimetoprim			
	0	17,5 µg/ml	28 µg/ml	35 µg/ml
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	+	+	+	+
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+	+	+
<i>Paenibacillus thermophilus</i>	+	-	-	-
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	+	-	-	-
<i>Paenibacillus peoriae</i>	-	-	-	-

10 El procedimiento de detección se basa en una incubación de una serie de repeticiones de diluciones de muestras en serie en la composición de medios nutrientes proporcionada durante un período de tiempo determinado para permitir que crezcan los gérmenes diana. Según lo determinado por los inventores, en el procedimiento de acuerdo con la invención, es suficiente un tiempo de incubación de 48 horas en condiciones estrictamente anaerobias en una mezcla del 80% de CO₂, 10% de N₂ y 10% de H₂, para dejar que el indicador de redox contenido en el medio cambie

de rojo a amarillo en el caso del crecimiento de los gérmenes diana y así detectar el crecimiento de los gérmenes diana. Para lograr condiciones anaerobias, también se pueden usar kits de generación de gas disponibles comercialmente en los sistemas de incubación correspondientes.

5 El cambio de color puede determinarse sin aparatos correspondientes a simple vista, pero también por medio de los correspondientes sistemas de evaluación fotoóptica. Para medir las señales de fluorescencia, se requiere un sistema de evaluación de fluorescencia.

Según la invención, el procedimiento de detección se lleva a cabo a un pH final del medio nutriente (incluida la muestra de ensayo) de 6,0 a 7,2, preferiblemente de 6,5 a 7,2, lo más preferiblemente a pH 7,0.

10 El procedimiento de detección según la invención permite detectar en forma fiable recuentos de esporas de 75 a 59.000 esporas por litro de leche. Mediante el uso de sistemas de microtitulación correspondientes, el límite de detección del procedimiento puede incluso reducirse a < 30 esporas por litro.

La invención se explicará con más detalle a continuación por medio de ejemplos de realizaciones preferidas.

Ejemplos

Un ejemplo preferido de una composición del medio nutriente según la invención se da en la Tabla 3:

15 **Tabla 3:** Composición del medio nutriente (como un concentrado 4x)

Medio basal (RCM)	Concentración
Triptona	20 g/l
Extracto de carne	40 g/l
Extracto de levadura	12 g/l
Almidón	4 g/l
D(+) glucosa	20 g/l
Acetato de sodio	12 g/l
Cisteína-HCl	2 g/l
NaCl	20 g/l
Aditivos	
Rojo neutro	0,060 g/l
D-Cicloserina	800 mg/l
Trimetoprim	112 mg/l

Para la producción del medio nutriente según la invención o para el procedimiento según la invención, también se puede usar un medio RCM disponible comercialmente.

Producción del medio nutriente (medio de ensayo):

20 Los componentes se pesan, a excepción de cicloserina y trimetoprim, en cualquier orden y se disuelven en agua destilada. El pH se ajusta a pH = 8,0 con solución de hidróxido de sodio 5 M y el medio basal (RCM) + indicador (rojo neutro) se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Después de la esterilización en autoclave, el valor de pH es de 7,3 y, después de la adición de la muestra (3 partes de leche), alcanza el pH de 7,0 previsto para el ensayo.

25 Trimetoprim y D-cicloserina se preparan como solución madre y se agregan al medio basal + indicador solo antes de su uso. La D-cicloserina se disuelve en una concentración de 0,9 g en 18 ml de agua destilada y luego se filtra bajo esterilidad a través de un filtro estéril con un tamaño de poro de 0,2 µm. A 100 ml de medio basal + indicador (concentrado 4x) se añaden 1,6 ml de la solución de cicloserina. Trimetoprim se prepara como solución madre en dimetilsulfóxido (126 mg de trimetoprim sobre 4,5 ml de DMSO). A 100 ml de medio basal terminado + indicador (concentrado 4x), se añaden 0,4 ml de la solución madre.

30 Realización del procedimiento de detección

De acuerdo con una realización preferida, se usan placas de microtitulación estándar de 96 pocillos. Estas placas tienen 8 pocillos dispuestos en 12 filas verticales. Las primeras 4 filas (32 pocillos) se cargan con 0,24 ml de cada muestra de ensayo (leche o muestras de queso homogeneizadas en leche estéril, que previamente se pasteurizaron por incubación durante 20 minutos a 80 °C) y por pocillo se proveen de 0,08 ml de un concentrado estéril del medio nutriente según la invención.

Del mismo modo, los 32 pocillos de las filas 5-8 se proveen cada uno de 0,12 ml de muestra u homogeneizado de muestra y 0,04 ml cada uno de un concentrado estéril del medio nutriente según la invención, así como los 32 pocillos de las filas 9-12 se proveen de 0,06 ml de muestra u homogeneizado de muestra y cada uno de 0,02 ml del concentrado estéril (4x) del medio nutriente. La carga de las placas de microtitulación con muestra y medio nutriente se puede realizar a este respecto con pipetas automáticas o en forma totalmente automática mediante un sistema de robot adecuado para la carga de placas de microtitulación. Del mismo modo, el medio nutriente y la muestra ya se pueden mezclar en la relación 1:3 antes de pipetear, y se pueden pipetear juntos en las cantidades y gradaciones mencionadas anteriormente en los pocillos individuales de las placas de microtitulación. Las placas de microtitulación se incuban a continuación a 37 °C en condiciones anaerobias (mezcla del 10% de CO₂, 10% de H₂ y 80% de N₂) durante 48 horas.

Dependiendo del grado de contaminación presente, después de la incubación en las repeticiones se produce cierta distribución de pocillos positivos y negativos, que puede evaluarse por su color (rojo = negativo, amarillo = positivo) o por una señal fluorescente correspondiente (positiva) o ausencia de señal de fluorescencia (negativa). Mediante el cálculo estadístico, se puede asignar un posible recuento microbiano (recuento de esporas de MPN) a cada posible distribución de pocillos cubiertos y descubiertos dentro de las etapas de dilución investigadas.

Al evaluar los pocillos individuales, se detectan los cambios de color (rojo a amarillo) o se detecta una señal de fluorescencia, y el "recuento bacteriano más probable" se calcula preferiblemente mediante un software correspondiente para calcular los resultados de MPN sobre la base de las diluciones de muestra utilizadas y el número de repeticiones utilizadas. El uso de 32 repeticiones por etapa de dilución, así como la pequeña gradación de las concentraciones utilizadas (dilución en serie de 2 veces) permite a este respecto una precisión muy alta del cálculo estadístico.

En el ejemplo descrito anteriormente, se analizaron en total 13,44 ml de muestra en 3 etapas de dilución en serie de 2 veces. De esta manera, se podían detectar de manera fiable recuentos de esporas de 75 a 59.000 esporas por litro de leche.

La Tabla 4 muestra una comparación de métodos en el ensayo del método preferido de la presente invención con el método según Bryant y Burkey usado en la actualidad en forma rutinaria. Se puede ver que los números de esporas de acuerdo con Bryant y Burkey, debido a la menor selectividad de este procedimiento, en general son significativamente más altos que los determinados en forma real con el procedimiento de la invención.

Al menos para las muestras n.º 5, 21, 24, 31 y 34, se comprobaron a este respecto, mediante procedimientos biológicos moleculares, además de la detección de *Clostridium tyrobutyricum*, también la presencia de microorganismos que figuran entre los organismos diana, tales como *Staphylococcus pasteurii*, *Bacillus thuringensis*, *Bacillus toyonensis*, *Staphylococcus petrasii*, *Streptococcus mitis* o *Clostridium subterminale*. Estos organismos no diana pueden producir una detección positiva (crecimiento con formación de gas) en el método de Bryant y Burkey. Se ha demostrado que estos aislados pueden suprimirse en el crecimiento en el procedimiento de acuerdo con la invención o mediante el uso del medio nutriente que contiene cicloserina y trimetoprim según la invención y no pueden desencadenar un cambio de color.

Tabla 4: Comparación de los resultados en el ensayo de 39 muestras de leche cruda con el procedimiento según la invención y el procedimiento según Bryant y Burkey.

Muestra	Valor medio (procedimiento según la invención) después de 48 horas	Valor medio (Bryant y Burkey) después de 7 días
1	5485	>16000
2	4063	9200
3	1170	2600
4	10698	>16000
5	1587	2950
6	2860	10700

ES 2 755 385 T3

7	4980	>16000
8	344	2050
9	7647	7300
10	6603	12600
11	114	<180
12	7955	>16000
13	<75	315
14	<75	<180
15	<75	495
16	<75	<180
17	>58700	>16000
18	<75	190
19	<75	190
20	5070	9200
21	550	1500
22	878	3250
23	6865	12600
24	9520	>16000
25	353	495
26	113	620
27	1345	6350
28	2285	4450
29	1565	4450
30	466	2850
31	190	620
32	2310	10700
33	897	1075
34	3700	12600
35	1870	1245
36	1335	4450
37	4455	12600
38	<30	<180
39	<30	<180

Bibliografía

- Abgrall B., Bourgeois C. y Bourva F. (1985) *Lait* 65, 45-53
- Batina P., Arnold F., Bedouet L., Robreau G., Talbot F., y Malcoste (1997) *Journal of Applied Microbiology* 82, 619-624
- 5 • Bergere J. L. y Sivelä S. (1990), *Bulletin of the International Dairy Federation*, 18-23
- Blaschek H. P. (1999), *Encyclopedia of Food Microbiology*, 428-451
- Bourgeois C. M., Le Parc O., Abgrall B. y Clerte J. (1984) *Journal of Dairy Science*, 67, 2493-2499
- Brändle J., Dornig J. y Kneifei W. (2016) *Food Control* 67, 96-113
- Hirsch A. y Grinstead E. (1954) *J. Dairy. Res.* 21. 101-110
- 10 • Jonsson A. (1990) *Journal of Dairy Science* 73, 719-725
- Julien M. C., Dion P., Lafreniere C., Antoun H. y Drouin P.(2008) *Applied an Environmental Microbiology* 74, 6348-6357
- Rainey F. A., Hollen B. J. y Small A. (2009) *Bergey 's Manual of Systematic Microbiology Vol. 3 The Firmicutes*, 736-827
- 15 • Roux V. y Raoult D. (2004) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 5, 1049-1054
- Zangerl P. (1993), *Deutsche Milchwirtschaft* Vol. 19, 936-940

REIVINDICACIONES

1. Medio nutriente líquido para el cultivo de clostridios perjudiciales en queserías que contiene un medio reforzado para clostridios (MCR) para la incubación con muestras de leche o queso, caracterizado por que comprende rojo neutro como indicador y cicloserina y trimetoprim.
- 5 2. Medio nutriente líquido según la reivindicación 1, caracterizado por que la concentración de rojo neutro en la incubación es de 0,010 a 0,025 g/l, preferiblemente de 0,015 g/l.
3. Medio nutriente líquido según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la concentración de trimetoprim en la incubación es de 17 mg/l a 35 mg/l, preferiblemente de 28 mg/l.
- 10 4. Medio nutriente líquido según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la concentración de cicloserina en la incubación es de 200 mg/l.
5. Procedimiento para la detección de clostridios perjudiciales en queserías en la leche según el método del número más probable (MPN) usando un medio nutriente líquido según una de las reivindicaciones 1-4, en el que la leche se incuba con el medio nutriente, caracterizado por que la incubación de la leche se lleva a cabo a un pH de 6,0-7,2, preferiblemente 7,0, en condiciones anaerobias y la muestra se evalúa después de la incubación con respecto a un cambio de color.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que el medio nutriente se mezcla con la leche, en el que el porcentaje de la leche es > 50% en volumen, preferiblemente del 75%.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la incubación se lleva a cabo mediante múltiples repeticiones de diluciones de muestra en serie en placas de microtitulación y la evaluación se efectúa mediante medición de fluorescencia, mezclándose el medio nutriente con la leche en una relación en volumen de medio nutriente:leche = 9:1 o mayor.
- 20