

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 764**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2005 E 10161897 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2230313**

54 Título: **Protocolos de rastreo de lotes múltiples de composiciones modulares para la detección de patógenos, contaminantes microbianos y/o constituyentes**

30 Prioridad:

**06.08.2004 US 599473 P**

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

**14.12.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL HEALTH, INC.  
(100.0%)  
15300 Bothell Way NE  
Lake Forest Park, WA 98155, US**

72 Inventor/es:

**SAMADPOUR, MANSOUR**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 798 764 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

Protocolos de rastreo de lotes múltiples de composiciones modulares para la detección de patógenos, contaminantes microbianos y/o constituyentes

5

## CAMPO DE LA INVENCION

Los aspectos de la presente invención se refieren, en general, a mejorar la eficacia de la producción de alimentos y productos relacionados con la salud (p. ej., productos farmacéuticos) y su seguridad y calidad. Las realizaciones particulares se refieren a procedimientos novedosos para ensayar patógenos microbianos que permitan una sensibilidad mejorada, ahorros de costes y trazabilidad (p. ej., seguimiento de la fuente) para fines de recuperación. Los procedimientos son extensamente aplicables a muchas áreas de los productos incluyendo, pero sin limitación, productos de vacuno, cerdo, oveja, bisonte, ciervo, alce, aves de corral (p. ej., pollo y pavo) y pescado y otros mariscos, productos agrícolas, jugos, productos lácteos, productos secos (cereales, frutos secos, etc.), frutas y verduras, hierbas y especias y todas las maneras de alimentos crudos y elaborados, muestras medioambientales (agua, agua residual, suelo, muestras superficiales, muestras de aire tomadas por burbujeos y filtración, etc.), productos farmacéuticos y otros tipos de muestras que se tienen que analizar usando protocolos de enriquecimiento-detección de microorganismos.

## 20 REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad para el Número de Serie de Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 60/599.473, presentada el 06 de agosto de 2004 y titulada PROTOCOLOS DE RASTREO DE LOTES MÚLTIPLES DE COMPOSICIONES HÚMEDAS MODULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS, CONTAMINANTES MICROBIANOS Y/O CONSTITUYENTES que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

25

## ANTECEDENTES

Los fabricantes y las respectivas agencias reguladoras se esfuerzan por mejorar continuamente la seguridad y la calidad de alimentos, productos farmacéuticos, productos nutracéuticos, agua y el medio ambiente. Bajo recientes directrices y pautas del Departamento de Agricultura de los EE. UU., Servicio de Inspección y Seguridad de los Alimentos (FSIS), muchos productores de alimentos en los Estados Unidos han adoptado planes de muestreo que implican el ensayo, por ejemplo, en recortes de vacuno crudo y/o carne picada de *E. coli* O157:H7 y en los productos listos para comer de *Listeria monocytogenes* y/o *Salmonella*. Se observan tendencias similares en otros países, para productos retenidos para consumo doméstico y/o exportación. Por ejemplo, la industria farmacéutica gasta considerables recursos en ensayo de esterilidad y seguimiento medioambiental y la industria del agua y de las aguas residuales y sus respectivas agencias reguladoras destinan considerables recursos a controlar la calidad del agua (p. ej., bebida, fuentes recreativas y de la industria pesquera), aguas residuales (tratadas y no tratadas) y lodo (biosólidos). La preocupación por la calidad del aire ha dado como resultado el control en el aire interior de la presencia de contaminantes microbianos y patógenos. Estos planes de muestreo asociados con dicho ensayo determinan, por ejemplo, la disposición de productos y los lotes de producción o dan como resultado decisiones que consideran la seguridad del agua, que acogen aguas y aguas recreativas y el impacto del vertido de agua residual y la calidad del aire.

La técnica operativa con respecto a dichos esfuerzos por el control de la «retención y liberación» del producto comprende diversos planes diferentes de muestreo, siguiendo típicamente pautas de la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF) para ensayo de productos alimenticios, pautas de FDA y USDA o EPA, o planes de muestreo intuitivos. La característica común de estos planes de muestreo es que se combinan diversas muestras que representan lotes de producción o una serie de muestras medioambientales en un lote de producción combinado previamente al muestreo. Por ejemplo, un plan típico para detección de patógenos microbianos requiere tomar más de una muestra, por ejemplo, entre diez (10) y sesenta (60) trozos de muestra de un lote de muestras dado (lote de producción combinado), para formar una muestra de material compuesto para ensayo. El número de trozos tomados para formar la muestra de material compuesto depende, bajo ICMSF u otras pautas reguladoras, del resultado de la infección/envenenamiento (p. ej., la importancia), el nivel de peligro y el aumento potencial en los niveles de peligro debido a almacenamiento. Lo mismo es válido en la detección de constituyentes microbianos y/u organismos de la alteración. Con respecto a los ensayos con *E. coli* O157, por ejemplo, un plan típico requiere tomar 60 muestras (p. ej., trozos de muestra) de un lote de producción para formar una sola muestra de material compuesto. Con respecto a *Listeria monocytogenes*, típicamente se toman treinta (30) muestras de un lote de producción para formar una muestra de material compuesto. Con respecto a ensayo de esterilidad, un plan típico puede requerir para la composición 10-100 unidades del producto y en el caso de muestreo medioambiental, con

60

frecuencia se forma el material compuesto con 2-10 muestras. Generalmente, el número de muestras que componen el material compuesto refleja: la sensibilidad global del procedimiento de ensayo y el límite de detección que se aplica a la unidad de ensayo; la capacidad para concentrar/enriquecer la muestra de material compuesto para conseguir la sensibilidad deseada y el coste de muestreo en comparación con el coste de análisis.

5 Los costes asociados al ensayo de alimentos son sustanciales y por consiguiente los productores con frecuencia recurren a aumentar el tamaño del «lote de producción» que se tiene que ensayar. Por ejemplo, el lote de producción de tamaño estándar en ensayo en recortes de *E. coli* O157 en la industria de vacuno de los EE. UU. es cinco (5) «combinaciones» (pesando cada combinación aproximadamente 907 kg (2.000 libras)) y de *Listeria* y *Salmonella* en  
 10 productos listos para comer (LPC), es una muestra de material compuesto por línea de producción por turno. Un problema principal asociado al uso de lotes de ensayo de gran tamaño es que una gran cantidad de productos se debe degradar o destruir en el caso de que haya una determinación positiva de un patógeno. Adicionalmente, debido a la naturaleza de combinación «repartición por lotes» (combinar, para fines de formación del lote de ensayo, varios sublotes independientes que se extienden colectivamente por un largo periodo de tiempo de producción), es muy difícil  
 15 investigar la causa del incumplimiento y la localización de la fuente/causa y no se pueden tomar eficazmente medidas de recuperación. Además, formar materiales compuestos de un gran número de muestras puede dar como resultado una sensibilidad reducida para la unidad de ensayo y tener un efecto desfavorable en el límite de detección.

Normalmente, una vez que se construye una muestra de material compuesto (siguiendo la técnica con respecto a  
 20 ensayo particular) se enriquece después por la presencia de un patógeno/microbio dado por adición de cantidades apropiadas de medios de enriquecimiento e incubación a una temperatura apropiada durante una cantidad de tiempo dada. Si está presente el patógeno/microbio, entonces crece y se multiplica en las condiciones favorables de enriquecimiento y de ese modo proporciona más material que se puede detectar por análisis posteriores. Después se ensaya la muestra de material compuesto por uno o más procedimientos reconocidos en la técnica, disponibles,  
 25 incluidos, por ejemplo, enriquecimiento seguido por ensayos basados en inmunoanálisis o procedimientos basados en la PCR o cultivo del organismo de interés u otros procedimientos basados en ADN o inmunológicos.

La técnica anterior descrita ya presenta diversas deficiencias sustanciales. *Primero*, incluso aunque el lote de producción de la técnica anterior incluye diversos sublotes de producción (por ejemplo, 5 combinaciones/palés de  
 30 productos o un turno completo de producción), si se obtiene una determinación positiva para el lote de producción (muestra de ensayo de material compuesto), se rechaza el lote completo de producción (las 5 combinaciones/palés o un turno de producción) y se desvía a usos finales económicamente no deseables (*p. ej.*, cocina o desecho), incluso aunque el patógeno de interés pueda ser confinado a sólo una porción limitada de los sublotes de producción (correspondiendo a una o dos combinaciones/palés o una hora de producción) que comprende el lote de producción.

35 *Segundo*, la técnica actual no permite volver a ensayar cualquier sublote de producción, principalmente debido a que los contaminantes microbianos se propagan desigualmente por los productos y en muchos casos los niveles de contaminación son mínimos y pueden estar presentes en porciones muy pequeñas de los productos en cada sublote. Por lo tanto, una vez que se construye una muestra de material compuesto si su ensayo da positivo se destruyen  
 40 todos los sublotes. Las agencias de regulación no permiten volver a ensayar los sublotes, asumido de antemano el argumento de que después de que el ensayo de un lote de producción de positivo, los resultados negativos del ensayo obtenidos para sublotes de producción o incluso una nueva muestra de material compuesto del lote de producción, no tienen sentido puesto que los contaminantes microbianos no están presentes de manera uniforme en los productos.

45 *Tercero*, los protocolos actuales para recoger una muestra de material compuesto que represente un lote de producción con frecuencia agrupan juntos sublotes de producción que no están relacionados debido al tipo de producto u horas de producción. Esto hace que investigar la naturaleza del incumplimiento sea una tarea difícil incluso cuando esté disponible información relevante. Como ejemplo, con frecuencia hay disponible información sobre una base «por combinación» que incluye (pero sin limitación) hora de producción, fuente vendedora de materias primas, empleados  
 50 de producción presentes y estado operativo de etapas del proceso de intervención microbiana. Sin embargo, cuando se incluyen cinco combinaciones/palés no relacionados en un lote de producción es mucho más duro analizar racionalmente la información disponible puesto que no hay manera de determinar qué combinación o combinaciones contenían el patógeno (como se indicó anteriormente, el muestreo de nuevo de la técnica anterior no es una opción viable puesto que puede no proporcionar el mismo resultado). Asimismo, para el ensayo de esterilidad, cuando el  
 55 ensayo de la muestra de material compuesto da positivo, se desechará la producción entera.

Por lo tanto, hay mucha necesidad en la técnica de poner en práctica protocolos de ensayo nuevos y eficaces que proporcionen una mayor medida de seguridad de que el producto alimenticio es seguro, que proporcione alivio económico al productor y que permita un seguimiento eficaz del lote o los lotes contaminados con fines de recuperación  
 60 (*p. ej.*, establecer con exactitud el momento de la contaminación y determinar el segmento de producción que fue afectado).

## RESUMEN DE LA INVENCION

Los aspectos de la presente invención proporcionan nuevos procedimientos de ensayo y detección, de enriquecimiento, para la detección de patógenos u otros microbios, por ejemplo, en alimentos, agua, agua residual, muestras industriales, farmacéuticas, botánicas, medioambientales y otros tipos de muestras analizadas por procedimientos de detección (*p. ej.*, procedimientos de enriquecimiento-detección). Según aspectos particulares, en el caso de que un programa de ensayo microbiológico implique formar un material compuesto de una serie de muestras para formar un lote de ensayo, el enriquecimiento independiente de cada uno de los componentes de la muestra de material compuesto se realiza con la formación posterior de una muestra de material compuesto modular (*p. ej.*, módulos húmedos) por combinación de porciones de cada enriquecimiento independiente, que permite la determinación del resultado del ensayo para cada subunidad individual del material compuesto a diferencia de la generalización de los resultados de la muestra de ensayo a todas sus subunidades. Esta determinación del resultado individual se consigue volviendo a ensayar las muestras de enriquecimiento individuales en el caso de que el ensayo de enriquecimiento del material compuesto sea positivo.

En aspectos preferidos, se define un lote declarable como una sola unidad de un lote de material compuesto modular (*p. ej.*, húmedo modular) más bien que un lote de material compuesto completo constituido por múltiples sublotes. Por ejemplo, se define un lote de producción declarable como una sola unidad de producción y corresponde a una sola unidad de un lote de producción de material compuesto húmedo modular, más bien que (como en la técnica anterior) como un lote de material compuesto completo constituido por múltiples unidades de producción (múltiples sublotes). Con respecto a ensayar cada lote declarable (*p. ej.*, cada única unidad de producción), se recoge por separado una pluralidad de trozos/porciones de muestra de cada único lote declarable (*p. ej.*, de cada única unidad de producción; unidad de ensayo individual) y se forma un material compuesto para formar, por ejemplo, una «*muestra de lotes de producción de una sola unidad*» (que corresponde, en cada caso, a una sola unidad particular de producción), que se enriquece usando protocolos apropiados de enriquecimiento para permitir que los niveles del organismo objetivo alcancen los niveles de detección y uniformidad de presencia en la muestra enriquecida. Se pueden retirar múltiples alícuotas del medio de enriquecimiento para análisis. Así se sortea el problema de la técnica anterior de tener que volver a muestrear un lote de producción de ensayo en el caso de que los contaminantes microbianos no estén presentes de manera uniforme por todo el producto.

En el contexto ejemplar de únicas unidades de producción enriquecidas, se retiran (asépticamente) porciones iguales de tampón de enriquecimiento, de cada muestra de lotes de producción de una sola unidad y se combinan para formar una *Muestra de Material Compuesto Húmedo Modular* (MMCHM). La MMCHM se ensaya después usando un ensayo apropiado (ensayo de detección) para el agente objetivo (*p. ej.*, organismo objetivo). Si se obtiene un resultado *negativo* de la MMCHM, entonces se liberan todos los lotes de producción de una sola unidad individuales. Significativamente, si se obtiene un resultado *positivo* de una MMCHM, los tampones de enriquecimiento de cada una de las muestras de lotes de producción de una sola unidad individuales se ensayan por separado (individualmente), usando el mismo protocolo de ensayo o un protocolo de ensayo con sensibilidad mejorada o cualquier protocolo de ensayo apropiado. Según aspectos preferidos particulares, la señal obtenida de una MMCHM se debe a uno o más de sus componentes (*p. ej.*, lotes declarables (*p. ej.*, unidades de producción únicas enriquecidas individualmente)) y es posible, por lo tanto, en todos los casos examinar una señal positiva en una o más subunidades individuales por ensayo de cada muestra de enriquecimiento individual para el mismo objetivo. Cuando se obtiene una determinación *positiva* para una muestra de lotes declarable, individual (*p. ej.*, muestra de lotes de producción de una sola unidad), se estima que ese lote declarable particular (*p. ej.*, lote de producción de una sola unidad) es positivo y se toman acciones apropiadas basadas en el resultado. En el caso de ensayo de patógeno/microbiano para alimentos, se pueden desviar los sublotes positivos individuales para cocina, desecho u otros puntos finales de seguridad aceptable. Se estima que el resto de las unidades de ensayo enriquecidas individualmente que dan negativo al ensayo son negativas y se declararán como tales (se validan).

## 50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los aspectos particulares proporcionan nuevos procedimientos de enriquecimiento, ensayo y validación para la detección de patógenos u otros microbios en cualquier tipo de muestras (*p. ej.*, lotes de producción de alimentos, agua, agua residual, muestras industriales, farmacéuticas, botánicas, medioambientales, etc.) analizables por procedimientos de enriquecimiento y detección. En aspectos preferidos, un lote de ensayo (lote de producción de una sola unidad), más bien que (como en la técnica anterior) un lote de material compuesto constituido por múltiples lotes de ensayo (*p. ej.*, unidades de lotes de producción de una sola unidad), se define y se establece como la única unidad de producción. Se recoge por separado una pluralidad de porciones (*p. ej.*, porciones de producto) de cada lote de ensayo (*p. ej.*, lote de producción de una sola unidad) y se forma material compuesto para formar una correspondiente serie de muestras de lotes de ensayo (*p. ej.*, muestras de lotes de producción de una sola unidad), que se enriquecen usando protocolos de enriquecimiento adecuados para permitir que agentes/organismos objetivo alcancen niveles detectables y uniformidad en la muestra. En realizaciones particulares, se retiran porciones iguales de tampón de

enriquecimiento (preferentemente de manera aséptica) de las muestras enriquecidas y se combinan para formar una muestra de material compuesto modular (*p. ej.*, muestra de material compuesto húmedo modular; MMCHM). La MMCHM, por ejemplo, se ensaya usando un ensayo de detección adecuado para el agente/organismo objetivo. Si se obtiene un resultado *negativo* de la MMCHM, entonces se validan todos los lotes de producción de una sola unidad  
 5 individuales y se pueden liberar. Si se obtiene un resultado *positivo* de una MMCHM, la muestra de enriquecimiento que corresponde a lotes de ensayo individuales (*p. ej.*, lotes de producción de una sola unidad individuales) se ensayan por separado (individualmente), usando el mismo protocolo de ensayo o un protocolo más sensible. Si se obtiene una determinación *positiva* para cualquier muestra de lotes de ensayo (*p. ej.*, muestra de lotes de producción de una sola unidad, individuales), ese respectivo lote particular se desvía a cocina, desecho u otro punto final de seguridad  
 10 aceptable. Si se obtiene una determinación *negativa* para una muestra de lotes de ensayo individuales (*p. ej.*, muestra de lotes de producción de una sola unidad), entonces se valida ese lote particular y se puede liberar. De esta manera, cualquier lote miembro de la MMCHM que de ensayo *negativo* usando el mismo procedimiento (aproximadamente 5 veces más sensible respecto a la técnica anterior) o un procedimiento mejorado (aproximadamente cincuenta veces más sensible), se validará y se podrá liberar para su consumo.

15

### DEFINICIONES

La expresión «lote de ensayo» o «lote declarable» como se usa en la presente invención para referirse a una colección de uno o más ejemplares de un medio o proceso (*p. ej.*, colección de ejemplares de aire, agua, sólidos o de productos  
 20 de un proceso de producción, etc.), donde tal colección se puede muestrear tomando porciones de uno o más de sus ejemplares y donde uno o más ejemplares de la colección se unen operacionalmente de una manera (*p. ej.*, proximidad, tiempo, etapa de proceso, etc.) por lo cual la información procedente de porciones tomadas como muestras es operacionalmente aplicable a todos los ejemplares de la colección y así al lote de ensayo. En casos particulares, porciones son sinónimo de ejemplares.

25

La expresión «única unidad de producción» o «lote de producción de una sola unidad» como se usa en la presente invención es una forma de lote de ensayo y se refiere a una única unidad de producción (*p. ej.*, para recortes de vacuno una «combinación» o para almendras un «bote») más bien que, como en la técnica anterior, a un material compuesto  
 30 constituido por múltiples unidades de producción únicas no unidas operacionalmente (sublotes de producción).

30

La expresión «porción de producto» como se usa en la presente invención se refiere a un trozo de producto (*p. ej.*, un trozo de recorte de vacuno sólido, etc.), alícuota de producto (*p. ej.*, un volumen de jugo líquido) o peso de producto (*p. ej.*, un peso de pudín semisólido). Una sola unidad de producción está constituida por múltiples porciones de producto. En realizaciones preferidas, el número de porciones de producto que comprende una única unidad de  
 35 producción es suficientemente grande para que retirar unas porciones de producto para formar una muestra no imponga una pérdida económica inaceptable para el productor. En casos particulares, una porción de producto puede ser un ejemplar de un lote de ensayo como se definió anteriormente.

La expresión «formación de material compuesto» como se usa en la presente invención se refiere a combinar una serie de porciones de producto únicas para formar una muestra más grande. En realizaciones preferidas, el número y la selección de porciones de producto únicas para combinar conforman planes de muestreo con base estadística que pretenden formar una muestra típica o promedio que sea representativa del lote de ensayo (*p. ej.*, una sola unidad de  
 40 producción) que se esté muestreando.

La expresión «muestra de lotes de ensayo» o «muestra de lotes de producción de una sola unidad» o «muestra de lotes de una sola unidad de producción», como se usa en la presente invención se refiere a una muestra formada por combinación de múltiples porciones de producto a partir de un lote de ensayo (*p. ej.*, una sola unidad de producción), de manera que cada muestra de ensayo (*p. ej.*, cada muestra de lotes de producción de una sola unidad) se atribuye a un correspondiente lote de ensayo particular (*p. ej.*, unidad de producción). Para muestras de lotes de producción,  
 50 el número de porciones/trozos combinados puede ser esencialmente cualquier número, pero preferentemente se selecciona de manera que conformen planes de muestreo con base estadística. Preferentemente, el número de trozos combinados se selecciona del grupo del intervalo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 y de aproximadamente 40 a  
 55 aproximadamente 50 porciones de producto. Preferentemente, el número de porciones de producto independientes se selecciona de manera que se proporcione un tamaño de muestra que sea igual a o mayor que, el requerido por el análisis posterior que se tiene que aplicar.

La expresión «enriquecimiento» como se usa en la presente invención se refiere a la incubación de una muestra de lotes de ensayo (*p. ej.*, muestra de lotes de producción de una sola unidad) bajo condiciones adecuadas para permitir  
 60 que los niveles de un agente/organismo objetivo que esté presente alcancen niveles detectables y llegue a ser uniforme o sustancialmente uniforme por toda la muestra de lotes de ensayo enriquecida (*p. ej.*, muestra de lotes de producción

de una sola unidad). Preferentemente, el enriquecimiento comprende la adición de una cantidad de un medio de enriquecimiento o tampón a una muestra y la incubación de la muestra a una temperatura favorable durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el organismo crezca y se multiplique.

- 5 La expresión «medio de enriquecimiento» como se usa en la presente invención se refiere a una mezcla que contiene nutrientes y que tiene propiedades (p. ej., pH y/o contenido en oxígeno) que favorecen el crecimiento del agente/organismo objetivo. Preferentemente, el medio de enriquecimiento se formula para imitar el entorno del agente/organismo objetivo o sacar ventaja de una propiedad metabólica conocida del agente/organismo objetivo. Preferentemente, el medio de enriquecimiento omitirá nutrientes necesarios por competición de agentes/organismos no deseados. Preferentemente, el medio de enriquecimiento incluirá agentes selectivos que inhibirán la competición de agentes/organismos no deseados. Un ejemplo de un medio de enriquecimiento es el usado para el aislamiento de bacterias que fijan el nitrógeno (las que pueden usar gas nitrógeno como su única fuente de nitrógeno) no contiene fuente de nitrógeno fijado en el medio. Un segundo ejemplo es un medio de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias capaces de utilizar ácido 2,4-diclorofenoxiacético (también conocido como 2,4-D, un herbicida común) como fuente de carbono y energía. El medio de enriquecimiento se formula para contener benzoato como el único compuesto orgánico.

- La expresión «enriquecimiento húmedo» como se usa en la presente invención se refiere a diluir una muestra de lotes de producción de una sola unidad, sólida, semisólida o líquida (muestra de lotes de una sola unidad de producción) con medio de enriquecimiento en una relación de aproximadamente 1:10 (p/v), consistente con procedimientos convencionales para extender y ensayar una variedad de agentes/organismos objetivo como se explica en procedimientos publicados ampliamente reconocidos. Por ejemplo, el procedimiento convencional para extender y ensayar coliformes, coliformes fecales y *E. Coli* en alimentos, comprende una dilución 1:10 de las muestras (p. ej., 50 g en 450 ml) (véase, p. ej., FDA Bacteriology Analytical Manual Online de EE.UU., Capítulo 4 y 4A, que describe procedimientos de dilución 1:10 estándar para ensayar coliformes, coliformes fecales y *E. Coli* en alimentos, marisco y jugos).

- La expresión «enriquecimiento seco» como se usa en la presente invención se refiere a enriquecer una muestra de lotes de producción de una sola unidad, sólida, semisólida o líquida, o sin adición de otros compuestos si las propiedades intrínsecas de la muestra (actividad acuosa, nutrientes y pH) son suficientes/apropiadas para fomentar el crecimiento del agente/organismo objetivo o por dilución de la muestra con cantidades mínimas de medio de enriquecimiento en relaciones que oscilan de aproximadamente 0,1 (p/v) a aproximadamente 1 (p/v).

- La expresión «muestra de material compuesto modular» como se usa en la presente invención se refiere a una muestra formada por retirada, preferentemente de manera aséptica, de porciones iguales de cada una de una pluralidad de muestras de lotes de producción de una sola unidad, enriquecidas y combinación de las porciones retiradas.

- La expresión «ensayo de detección adecuado» como se usa en la presente invención se refiere a cualquier ensayo que sea adecuado para detectar un agente/organismo particular. Preferentemente, el ensayo se optimiza para detectar el agente/organismo particular y se puede combinar con una o más etapas de concentración para la concentración del agente/organismo que se esté ensayando.

- La expresión «validación» como se usa en la presente invención con respecto a lotes de producción se refiere a la determinación de que el ensayo de una muestra particular sea *negativo* usando el ensayo de detección. En el caso de que el ensayo de una muestra de material compuesto modular sea *negativo*, todas las muestras de lotes de producción de una sola unidad que comprenden la muestra de material compuesto se validan junto con los respectivos lotes de producción de una sola unidad, que se quitan así para su liberación. En el caso de que el ensayo de una muestra de material compuesto modular sea *positivo*, los lotes de producción de una sola unidad, individuales, aún se pueden validar sin embargo si el respectivo ensayo de muestras de lotes de producción de una sola unidad, particular, es *negativo*.

«Recorte» se refiere a pequeños trozos de carne y grasa que se eliminan, por ejemplo, durante el proceso de elaboración del vacuno para producir trozos primarios y subprimarios y cortes comercializables.

- «Ensayo de recortes» se refiere al proceso de ensayar en un recorte o materias primas que se tienen que usar para la producción de carne picada, el contenido microbiano/patógeno.

- Una «combinación» o «bote de combinaciones» se refiere, en la industria del vacuno, a la unidad de envase de la unidad de producción única. Alternativamente las materias primas que corresponden a una única unidad de producción que se tiene que ensayar se pueden envasar en cajas, bolsas u otros envases apropiados, que se pueden poner, por ejemplo, en palés.

Una «unidad de lote de material compuesto» o «unidad de cinco lotes de combinación» se refiere a una unidad de *materia compuesta* constituida por cinco combinaciones (bote de combinaciones). En planes de muestreo de la técnica anterior, la unidad del lote de material compuesto representa la materia prima (recorte de material compuesto) en que se basa el muestreo, ensayo y aceptación o rechazo.

5

Por lo tanto, según aspectos particulares, se define un lote de ensayo (o unidad de ensayo) (*p. ej.*, un lote de producción de una sola unidad o lote de unidad de producción única) y se toma como uno o más ejemplares unidos operacionalmente de un medio o proceso. Un lote de ensayo puede ser una sola unidad de producción (*p. ej.*, una única combinación, bote, palé o segmento de producción, etc.) o una única muestra medioambiental (*p. ej.*, única muestra de aire, única muestra de agua y de agua residual, etc.), más bien que, como en la técnica anterior, como un material compuesto de múltiples unidades de producción o muestras medioambientales.

En realizaciones preferidas, se recoge una serie de trozos o porciones de muestra a partir de un lote de ensayo (*p. ej.*, a partir de una sola unidad de producción (*p. ej.*, a partir de la única combinación, bote, palé o segmento de producción, etc.) y se forma un material compuesto para formar una «muestra de ensayo de única unidad» (o «muestra de lotes de producción de única unidad»). En realizaciones particulares (*p. ej.*, enriquecimiento húmedo), se añade tampón de enriquecimiento a la muestra. En realizaciones alternas, se hace «enriquecimiento seco» (como se definió en la presente invención anteriormente).

Significativamente, en el procedimiento de formación de material compuesto modular, inventivo (*p. ej.*, modular húmedo), se enriquecen *por separado* las muestras tomadas de cada unidad de producción usando protocolos de enriquecimiento apropiados para permitir que se alcancen los niveles de detección del organismo objetivo y *la uniformidad de presencia* en la muestra enriquecida. En aspectos preferidos, tal enriquecimiento obvia el problema de la técnica anterior de tener contaminantes microbianos que no estén presentes uniformemente por toda la muestra de producto. Específicamente, mientras los microbios no estén distribuidos uniformemente necesariamente en alimentos, agua, aire, productos farmacéuticos, etc., después de enriquecer una muestra como se describe en la presente invención, los microbios objetivo están presentes uniformemente o al menos sustancialmente uniformemente, en el medio de enriquecimiento o se extraen de los enriquecimientos secos o semisecos.

Siguiendo a la incubación del organismo objetivo, se retiran (asépticamente) porciones iguales de tampón o muestra de enriquecimiento para cada una de las diversas muestras de lotes de ensayo (*p. ej.*, de diversas muestras de lotes de producción de una sola unidad; preferentemente 5) y se trabajan para formar una Muestra de Material Compuesto Húmedo Modular (MMCHM). La MMCHM se ensaya después usando un ensayo apropiado (ensayo de detección) para el organismo objetivo. Si se obtiene un resultado *negativo* de la MMCHM, entonces se liberan todos los Lotes de producción de una sola unidad, individuales

Si se obtiene un resultado *positivo* de una MMCHM, se ensayan entonces por separado (individualmente) los tampones de enriquecimiento de cada una de las muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, usando el mismo protocolo de ensayo o cualquier otro ensayo apropiado. Alternativamente, se usa un protocolo aumentado que usa una etapa de concentración para el organismo objetivo, tal como separación de perlas inmunomagnéticas, cromatografía de afinidad, etc., seguido por un procedimiento de detección apropiado, para ensayar las muestras de lotes de ensayo individuales enriquecidas (*p. ej.*, las muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales).

En aspectos preferidos, los procedimientos inventivos de análisis se modifican por introducción de una etapa de concentración (*p. ej.*, empleando perlas paramagnéticas recubiertas de anticuerpo en el procedimiento (*p. ej.*, detección a base de ADN, detección a base de biosensores, detecciones microbiológicas clásicas, etc.)). Las perlas paramagnéticas recubiertas de anticuerpo, por ejemplo, proporcionan un incremento de 10 veces aproximadamente en sensibilidad. Esta etapa de concentración, combinada con el hecho de que las muestras de lotes de ensayo individuales (*p. ej.*, muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales) no están diluidas 5 veces en relación con la MMCHM, permite un incremento total de 50 veces en la sensibilidad en relación con protocolos de muestreo y ensayo de la técnica anterior. Si se usa un dispositivo de flujo lateral para la detección, puede o no usarse dicha concentración inmunomagnética, en cuyo caso la sensibilidad de detección se incrementa por aproximadamente 5 veces.

55

En el caso de que se obtenga una determinación *positiva* (resultado del ensayo) para cualquier muestra de lotes de ensayo individuales (*p. ej.*, muestra de lotes de producción de una sola unidad), se estima que ese correspondiente lote de ensayo particular (*p. ej.*, lote de producción de una sola unidad) es positivo y se toman entonces las decisiones apropiadas sobre los resultados positivos (*p. ej.*, en el caso de productos alimenticios, desviación a cocina, desecho u otro punto final de seguridad aceptable). Para cada una del resto de las muestras de lotes de ensayo (*p. Ej.*, muestras de lotes de producción de una sola unidad) que pertenecen a la MMCHM positiva, en el caso de que se obtenga una determinación *negativa*, se estima que esa muestra de lotes de ensayo particular (*p. ej.*, la muestra de lotes de

60

producción de una sola unidad) es negativa. De esta manera, cualquier lote de ensayo (*p. ej.*, cualquier lote de producción de una sola unidad) que sea un miembro del grupo de lotes de ensayo (*p. ej.*, lotes de producción de una sola unidad) que comprenda una correspondiente MMCHM, se considerará que es negativo, si el ensayo da *negativo* usando el mismo procedimiento (aproximadamente 5 veces más sensible en relación con la técnica anterior) o el  
5 procedimiento mejorado (aproximadamente cincuenta veces más sensible).

En realizaciones preferidas alternas, se reconstruye una nueva Muestra de Material Compuesto Húmedo Modular de los lotes miembros (lotes de ensayo) que dan ensayo *negativo* y se somete a una tercera capa de ensayo para mostrar de nuevo (confirmar) que son negativos. Específicamente, si uno de los cinco lotes de ensayo individuales (*p. ej.*, lotes  
10 de producción de una sola unidad, individuales) ha dado ensayo positivo (y los otros cuatro negativos) y los protocolos requieren el ensayo de materiales compuestos que consisten en cinco lotes de ensayo, una nueva muestra de lotes de ensayo única puede formar un nuevo lote de ensayo y se puede usar junto con las cuatro muestras negativas para formar una nueva MMCHM.

15 Los procedimientos de la presente invención proporcionan ahorros económicos sustanciales para las industrias de la alimentación y farmacéutica debido a la precisión en la detección en el contexto de porciones de producción unidas operacionalmente (*p. ej.*, lotes de ensayo; unidades de producción únicas, lotes de producción de una sola unidad) que están contaminadas. Los procedimientos inventivos evitan la destrucción innecesaria de lotes *negativos* que están condenados debido a encontrarse asociados (*p. ej.*, simplemente debido a que estaban agrupados con un lote de  
20 unidad de producción múltiple de la técnica anterior de material compuesto contaminado en un protocolo de ensayo de la técnica anterior). En el caso de que se obtenga una determinación *positiva*, se desvía una cantidad menor de material a un uso final económicamente no deseable. La invención propuesta tiene sustancial utilidad (*p. ej.*, ocasiona ahorros, exactitud y precisión en el establecimiento con exactitud de problemas) en la industria del medio ambiente.

25 Adicionalmente y significativamente, es más fácil examinar la fuente de la contaminación y aplicar medidas de recuperación, debido a que el componente de ensayo de una sola unidad señala, por ejemplo, a un solo punto de producción o un único sitio de muestreo.

Aspectos preferidos particulares:

30 El aspecto particular proporciona un procedimiento de muestreo, ensayo y validación de lotes de ensayo que comprende: recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo, comprendiendo cada lote de ensayo una colección de uno o más ejemplares unidos operacionalmente, donde la colección se puede muestrear tomando porciones de las mismas; combinar las porciones recogidas correspondientes  
35 a cada uno de los lotes de ensayo para proporcionar una correspondiente serie de muestras de lotes de ensayo, en que cada muestra de lotes de ensayo se atribuye a un lote de ensayo correspondiente particular; incubar la serie de muestras de lotes de ensayo en condiciones adecuadas para permitir que los niveles de un agente u organismo objetivo que está presente en una o más de las muestras alcancen niveles detectables y lleguen a ser uniformes o sustancialmente uniformes, por la respectiva muestra o muestras, para proporcionar una serie de muestras de lotes  
40 de ensayo enriquecidas; retirar, asépticamente, porciones iguales de cada muestra de lotes de ensayo enriquecidas y combinar las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular y ensayar la muestra de material compuesto modular, usando un ensayo de detección adecuado, para el agente u organismo objetivo, donde en el caso de que dicho ensayo sea negativo se validen todas las muestras de lotes de ensayo y donde en el caso de que dicho ensayo sea positivo, los lotes de ensayo individuales se pueden validar aún sin embargo por ensayo  
45 adicional de una porción de la respectiva muestra de lotes de ensayo enriquecida usando el mismo protocolo o uno más sensible y obteniendo un resultado de ensayo negativo.

En aspectos particulares, el lote de ensayo se selecciona del grupo que consiste en un lote medioambiental que comprende uno o más ejemplares medioambientales unidos operacionalmente, lote farmacéutico que comprende uno  
50 o más ejemplares farmacéuticos unidos operacionalmente, lote de producto de una sola unidad que comprende uno o más ejemplares de producto unidos operacionalmente y combinaciones de los mismos. En aspectos particulares, el lote de ensayo es un lote de producción de una sola unidad, constituido por ejemplares de producto unidos operacionalmente. En aspectos particulares, los ejemplares de producto son sinónimo de porciones de producto. En aspectos particulares, los procedimientos comprenden además incubar la muestra de material compuesto modular  
55 previamente al ensayo. En aspectos particulares, incubar cada muestra de lotes de ensayo comprende añadir una cantidad de medio de enriquecimiento a la muestra y retirar porciones de muestra enriquecida comprende retirar una porción del medio de enriquecimiento para cada muestra enriquecida y combinar las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular. En aspectos particulares, ensayar la muestra de material compuesto modular, usando un ensayo de detección adecuado comprende el uso de una etapa de concentración para  
60 concentrar el agente u organismo microbiano.

En aspectos particulares, en el caso de que el ensayo de la muestra de material compuesto modular sea positivo y

donde se ensayen además los lotes de ensayo individuales, tal ensayo adicional comprende el uso del protocolo más sensible. Preferentemente, el protocolo más sensible comprende el uso de una etapa de concentración para concentrar el agente u organismo microbiano, junto con el mismo protocolo de ensayo usado para ensayar la muestra de material compuesto modular.

5

En aspectos particulares, los procedimientos comprenden además formar una muestra de material compuesto modular adicional de las muestras de lotes de ensayo enriquecidas y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando el mismo ensayo o un ensayo diferente adecuado, para confirmar el estado del ensayo. En aspectos particulares, los procedimientos comprenden además formar una muestra de material compuesto modular adicional de una muestra de lotes de ensayo enriquecida adicional junto con cualquier muestra de lotes de ensayo enriquecida que de ensayo negativo y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando el mismo ensayo o un ensayo diferente adecuado. En aspectos particulares, los procedimientos comprenden además, en el caso en que el ensayo de la muestra de material compuesto modular de negativo, formar una muestra de material compuesto modular adicional a partir de las muestras de lotes de ensayo enriquecidas y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando un ensayo adecuado diferente, para confirmar el estado de ensayo negativo.

10

15

En aspectos particulares, el lote de ensayo se selecciona del grupo de lotes que consiste en una sola combinación, un solo bote, un solo palé y un segmento de producción Preferentemente, el número de lotes de ensayo es de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o aproximadamente 5.

20

En aspectos particulares, los procedimientos comprenden además, en el caso de que el ensayo de la muestra de material compuesto modular sea positivo, determinar qué lotes de ensayo individuales son positivos y la aplicación de medidas de recuperación que sean específicas para uno o más lotes de ensayo individuales que den ensayo positivo. En aspectos particulares, recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo una serie de porciones seleccionadas del grupo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 y de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 porciones. Preferentemente, recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo aproximadamente 30 a aproximadamente 60 porciones. Alternativamente, recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo aproximadamente 30 porciones. Preferentemente, recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo aproximadamente 60 porciones.

35

Aspectos particulares proporcionan un procedimiento de muestreo, ensayo y validación de lotes de ensayo, que comprende: recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de producción de una sola unidad, comprendiendo cada uno de los lotes de producción de una sola unidad una colección de uno o más ejemplares de producto, donde la colección se puede muestrear tomando porciones de las mismas; combinar las porciones de producto recogidas que corresponden a cada uno de los lotes de producción de una sola unidad para proporcionar una correspondiente serie de muestras de lotes de producción de una sola unidad, donde cada muestra de lotes de producción de una sola unidad se atribuye a un correspondiente lote de producción de una sola unidad, particular; incubar la serie de muestras de lotes de producción de una sola unidad en condiciones adecuadas para permitir que los niveles de un agente u organismo objetivo que esté presente en una o más de las muestras de lotes de producción de una sola unidad alcancen niveles detectables y lleguen a ser uniformes o sustancialmente uniformes, por la respectiva muestra o muestras, para proporcionar una serie de muestras de lotes de producción de una sola unidad, enriquecidas; retirar, asépticamente, porciones iguales de cada muestra de lotes de producción de una sola unidad, enriquecida y combinar las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular y ensayar la muestra de material compuesto modular, usando un ensayo de detección adecuado, para el agente u organismo objetivo, donde en el caso de que dicho ensayo sea negativo se validen todas las muestras de lotes de producción de una sola unidad y en el que en el caso de que dicho ensayo sea positivo, los lotes de producción de una sola unidad individuales aún se puedan validar sin embargo por ensayo adicional de una porción de la respectiva muestra de lotes de producción de una sola unidad, enriquecida, usando el mismo protocolo o uno más sensible y obteniendo un resultado de ensayo negativo.

55

Cláusulas:

1. Un procedimiento de muestreo, ensayo y validación de lotes de ensayo, que comprende:

60

- a) recoger por separado una pluralidad de porciones de cada una de una pluralidad de lotes de ensayo, donde cada uno de los lotes de ensayo comprende una colección de uno o más ejemplares, donde la colección puede muestrearse tomando porciones de las mismas;
- b) combinar las porciones recogidas correspondientes a cada uno de los lotes de ensayo para proporcionar un

- conjunto correspondiente de muestras de lotes de ensayo, donde cada muestra de lotes de ensayo se atribuye a un lote de ensayo correspondiente particular;
- 5 c) incubar el conjunto de muestras de lotes de ensayo en condiciones adecuadas para permitir que los niveles de un agente u organismo objetivo que esté presente en una o más de las muestras alcancen niveles detectables y se vuelvan uniformes, o sustancialmente uniformes, en la una o más muestras respectivas, para proporcionar un conjunto de muestras de lotes de ensayo enriquecidas;
- 10 d) retirar, asépticamente, porciones iguales de cada muestra de lote de ensayo enriquecida y combinar las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular; y
- e) ensayar la muestra de material compuesto modular, utilizando un ensayo de detección adecuado, para el agente u organismo objetivo, donde cuando dicho ensayo es negativo, todas las muestras de lotes de ensayo se validan, y cuando dicho ensayo es positivo, los lotes de ensayo individuales aún pueden validarse mediante ensayos adicionales de una porción de la muestra de lote de ensayo enriquecida respectiva utilizando el mismo protocolo o uno más sensible y obteniendo un resultado negativo.
- 15 2. El procedimiento de la cláusula 1, donde el lote de ensayo se selecciona del grupo que consiste en un lote medioambiental que comprende uno o más ejemplares medioambientales unidos operacionalmente, lote farmacéutico que comprende uno o más ejemplares farmacéuticos unidos operacionalmente, lote de producto de una sola unidad que comprende uno o más ejemplares de producto unidos operacionalmente y combinaciones de los mismos.
- 20 3. El procedimiento de la cláusula 1, donde el lote de ensayo es un lote de producción de una sola unidad, constituido por ejemplares de producto unidos operacionalmente.
4. El procedimiento de la cláusula 3, donde los ejemplares de productos son sinónimos de porciones de productos.
- 25 5. El procedimiento de la cláusula 1, que comprende además incubar la muestra de material compuesto modular de d), antes de ensayar en e).
6. El procedimiento de la cláusula 1, donde la incubación de cada muestra de lote de ensayo en c) comprende agregar una cantidad de medio de enriquecimiento a la muestra, y donde la retirada en d) comprende la retirada de una porción del medio de enriquecimiento de cada muestra enriquecida y la combinación de las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular.
- 30 7. El procedimiento de la cláusula 1, donde ensayar la muestra de material compuesto modular, usando un ensayo de detección adecuado comprende el uso de una etapa de concentración para concentrar el agente u organismo microbiano.
- 35 8. El procedimiento de la cláusula 1, donde en el caso de que el ensayo en e) de la muestra de material compuesto modular sea positivo y donde se ensayen además los lotes de ensayo individuales, tal ensayo adicional comprende el uso del protocolo más sensible.
- 40 9. El procedimiento de la cláusula 8, donde el protocolo más sensible comprende el uso de una etapa de concentración para concentrar el agente u organismo microbiano, junto con el mismo protocolo de ensayo usado para ensayar la muestra de material compuesto modular.
- 45 10. El procedimiento de la cláusula 1, que comprende además formar una muestra de material compuesto modular adicional de las muestras de lotes de ensayo enriquecidas de c) y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando el mismo ensayo o un ensayo diferente adecuado, para confirmar el estado del ensayo.
11. El procedimiento de la cláusula 1, que comprende además formar una muestra de material compuesto modular adicional de una muestra de lotes de ensayo enriquecida adicional junto con cualquier muestra de lotes de ensayo enriquecida de c) que de ensayo negativo en e) y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando el mismo ensayo o un ensayo diferente adecuado.
- 50 12. El procedimiento de la cláusula 1, que comprende además, en el caso en que el ensayo de la muestra de material compuesto modular en e) de negativo, formar una muestra de material compuesto modular adicional a partir de las muestras de lotes de ensayo enriquecidas de c) y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando un ensayo adecuado diferente, para confirmar el estado de ensayo negativo.
- 55 13. El procedimiento de la cláusula 1, donde el lote de ensayo se selecciona del grupo de lotes que consiste en una sola combinación, un solo bote, un solo palé y un segmento de producción
- 60 14. El procedimiento de la cláusula 1, donde el número de lotes de ensayo es de aproximadamente 3 a

aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o aproximadamente 5.

15. El procedimiento de la cláusula 1, que comprende además, en el caso de que el ensayo de la muestra de material compuesto modular sea positivo, determinar qué lotes de ensayo individuales son positivos y la aplicación de medidas de recuperación que sean específicas para uno o más lotes de ensayo individuales que den ensayo positivo.

16. El procedimiento de la cláusula 1, donde, en a) recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo una serie de porciones seleccionadas del grupo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 y de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 porciones.

17. El procedimiento de la cláusula 1, donde, en a) recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo aproximadamente 30 a aproximadamente 60 porciones.

18. El procedimiento de la cláusula 1, donde, en a) recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo aproximadamente 30 porciones.

19. El procedimiento de la cláusula 1, donde, en a) recoger por separado una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo aproximadamente 60 porciones.

20. Un procedimiento de muestreo, ensayo y validación de lotes de ensayo, que comprende:

a) recoger por separado una pluralidad de porciones de cada una de una pluralidad de lotes de producción de una sola unidad, donde cada uno de los lotes de producción de una sola unidad comprende una colección de uno o más ejemplares de producto, donde la colección puede muestrearse tomando porciones de las mismas;

b) combinar las porciones de producto recogidas correspondientes a cada uno de los lotes de producción de una sola unidad para proporcionar un conjunto correspondiente de muestras de lote de producción de una sola unidad, donde cada muestra de lote de producción de una sola unidad se atribuye a un lote de producción de una sola unidad correspondiente;

c) incubar el conjunto de muestras de lotes de producción de una sola unidad en condiciones adecuadas para permitir que los niveles de un agente u organismo objetivo que esté presente en una o más de las muestras de lotes de producción de una sola unidad alcancen niveles detectables y se vuelvan uniformes, o sustancialmente uniformes, en la una o más muestras respectivas, para proporcionar un conjunto de muestras de lotes de producción de una sola unidad enriquecidas;

d) retirar, asépticamente, porciones iguales de cada muestra de lote de producción de una sola unidad enriquecida y combinar las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular;

e) ensayar la muestra de material compuesto modular, utilizando un ensayo de detección adecuado, para el agente u organismo objetivo, donde cuando dicho ensayo es negativo, todas las muestras de lotes de producción de una sola unidad se validan, y cuando dicho ensayo es positivo, los lotes de producción de una sola unidad individuales aún pueden validarse mediante ensayos adicionales de una porción de la muestra de lote de producción de una sola unidad enriquecida respectiva utilizando el mismo protocolo o uno más sensible y obteniendo un resultado negativo.

Los siguientes ejemplos son ejemplares, y no deben interpretarse para limitar el alcance de los aspectos de la presente invención que se reivindican a continuación.

#### EJEMPLO I

(Los presentes procedimientos inventivos se mostraron para proporcionar una ventaja económica sustancial, mientras proporcionan seguridad mejorada e implantación de medidas de recuperación)

Actualmente, el «lote de producción» de tamaño estándar para ensayo en recortes de *E. coli* O157 en la industria del vacuno en los EE.UU. es una combinación de cinco *combinaciones*, donde cada *combinación* representa una única unidad de producción y pesa aproximadamente 907 kg (2.000 libras). Se implantó un procedimiento de muestras de material compuesto modular inventivo y en particular un procedimiento de Muestras de Material Compuesto Húmedo Modular (MMCHM) a un productor de vacuno de los EE. UU. La TABLA 1 muestra, según aspectos particulares, el resultado de ensayar 62.919 muestras MMCHM y volver a ensayar después las muestras (combinaciones) de lotes de producción de una sola unidad, individuales, siempre que se obtuviera un resultado *positivo* de la muestra MMCHM.

La TABLA 1 muestra que de cada 62.919 muestras MMCHM, un total de 217 proporcionó un resultado de ensayo *positiva* para *E. coli* O157. Usando protocolos de la técnica anterior, todos los lotes de producción de una sola unidad que comprenden las 271 muestras positivas irían a hacerse o degradarse a cocina: Como cada MMCHM representa cinco lotes de producción de una sola unidad de 907 kg (2.000 libras) cada uno, esto representaría aproximadamente 1.228.985 kg (2.710.000 libras) de producto (es decir, 271 x 5 x 2.000 libras = 2.710.000 libras).

Específicamente, las muestras de lotes de producción de una sola unidad individuales que comprenden la MMCHM se analizaron por separado a continuación de cada resultado *positivo* de la MMCHM. Como se puede ver en la TABLA I, sólo 391 muestras de lotes de producción de una sola unidad individuales proporcionaron un resultado *positivo* de cada total acumulado de 1.085 muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, que comprenden las muestras MMCHM que proporcionaron un resultado *positivo*. Si sólo se desviaban los 391 lotes de producción de una sola unidad, individuales, que proporcionaban un resultado de muestra *positiva* para hacerse o se degradaba a cocina, esto representaría 354.637 kg (782.000 libras) de producto. Los 694 lotes de producción de una sola unidad, individuales, restantes, correspondientes a 874.348 kg (1.928.000 libras) de producto son, según aspectos preferidos de la presente invención, validados y se pueden liberar a la cadena de comercio.

El producto, en este Ejemplo I, que produce este productor de vacuno de EE.UU. fue recorte de vacuno. La liberación de los 874.348 kg (1.928.000 libras) validados de recorte de vacuno en el comercio usando la presente invención, en vez de desviar o degradar el producto, recorte, representa un ahorro de costes para el productor de aproximadamente 2.500.000 \$, en relación con los procedimientos de la técnica anterior. Adicionalmente, el ensayo de los lotes de producción de una sola unidad por protocolos de ensayo aumentados (que representan un incremento de 5 a 50 veces en sensibilidad en relación con el ensayo de MMCHM) proporciona una garantía adicional *sustancial* de la seguridad de los productos alimenticios.

Además, como se indicó en líneas generales anteriormente bajo «ANTECEDENTES», la información está frecuentemente disponible en una base «por combinación» que incluye pero sin limitación, hora de producción, fuente vendedora de materias primas, empleados de producción presentes y estado operacional de las etapas del proceso de intervención microbiana. Sin embargo, cuando se incluyen cinco *combinaciones* no relacionadas en un “lote de producción” combinado (como en la técnica anterior) es mucho más duro analizar racionalmente la información disponible puesto que no hay manera de determinar que combinación o combinaciones contenían el patógeno (como se indicó anteriormente, el volver a muestrear en la técnica anterior no es una opción viable puesto que puede no proporcionar el mismo resultado).

Por contraste, en este Ejemplo I y según aspectos preferidos de la presente invención, cualquier información específica de la combinación incluyendo, pero sin limitación, hora de producción, fuente vendedora de materias primas, empleados de producción presentes y estado operacional de las etapas del proceso de intervención microbiana, se puede aplicar en el contexto de los 391 lotes de producción de una sola unidad, individuales, que proporcione un resultado de muestra *positivo*, proporcionando de ese modo un medio eficaz no sólo para examinar la contaminación, sino también para afectar a medidas de recuperación a la vista de la misma.

**TABLA 1:** Resultados de muestreo de material compuesto húmedo modular de 62.919 lotes múltiples y número del Lote de Unidades de Producción Individual (LUPI) que dieron ensayo positivo cuando la MMCHM dio ensayo positivo

Ubicación	N.º de análisis totales	N.º de positivos	1 IPUL	2 IPULs	3 IPULs	4 IPULs	5 IPULs
Est. A, B, C.	62.919	271	180	39	18	11	7

**EJEMPLO II**

(Según aspectos particulares de la presente invención, los procedimientos de muestreo inventivos tienen utilidad *sustancial* en el contexto de productos Listos Para Comer (LPC) (p. ej., productos cárnicos y de aves de corral))

Bajo las directrices del Departamento de Agricultura de los EE.UU., Servicio de Inspección y Seguridad de los Alimentos (USDA FSIS), los productores de productos cárnicos y de aves de corral Listos Para Comer (LPC) pueden adaptar un programa de muestreo de “producto final” como verificación de que su producto está exento del patógeno *Listeria monocytogenes*. La frecuencia de muestreo del producto final se selecciona por el productor/establecimiento, en función de estadísticas de muestreo válidas. Típicamente, las muestras se recogen en momentos aleatorios durante un turno de la producción (p. ej., de «limpieza a limpieza») y de diversas líneas de producto. Las muestras se combinan para formar una muestra de material compuesto y se añade tampón de enriquecimiento a la muestra de material compuesto para permitir que la *Listeria* spp. o *L. monocytogenes* crezca y se multiplique bajo las condiciones favorables de enriquecimiento, proporcionando de ese modo más material que se pueda detectar por posterior análisis.

Según aspectos particulares de la presente invención, el productor de productos cárnicos o de aves de corral LPC recoge muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales. Preferentemente, el productor define y produce estos lotes de una sola unidad de tal manera que se maximice la información disponible para investigar la naturaleza de un incumplimiento. Por ejemplo, las posibles definiciones de un lote de producción de una sola unidad individual incluyen, pero se limitan a, todo el producto producido por una línea de producción particular (o producido por una línea de producción particular en un periodo de tiempo particular), un volumen de producto tal como un palé de cajas envasadas producidas en una línea de producción particular o un área de producción en la planta, etc.

Se recogen muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, a las que, se añade medio/tampón de enriquecimiento en realizaciones de enriquecimiento húmedo. A continuación de la incubación en condiciones adecuadas para permitir que los niveles de un agente u organismo objetivo que esté presente alcancen niveles detectables y lleguen a ser uniformes o sustancialmente uniformes por la respectiva muestra o muestras, se combinan alícuotas del medio/tampón de enriquecimiento de muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, para formar una MMCHM. Se analiza después en la MMCHM la presencia o ausencia de, por ejemplo, *Listeria* spp. O *L. monocytogenes*. En el caso de que se obtenga un resultado *positivo* para la MMCHM, la muestra de medio/tampón de enriquecimiento de las muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, que comprenden la MMCHM se analiza usando los mismos protocolos de ensayo o aumentados.

Los lotes de producción de una sola unidad, individuales, para los que el medio/tampón de enriquecimiento de la correspondiente muestra proporciona un resultado *positivo* se desvían para cocina, desecho u otro punto final de seguridad. Los lotes de producción de una sola unidad, individuales, para los que el medio/tampón de enriquecimiento de la correspondiente muestra proporciona un resultado *negativo* se liberan al comercio. La última fracción representa un ahorro de coste directo para el productor en relación con soluciones de la técnica anterior donde se define que un "lote de producción" incluye múltiples lotes de producción de una sola unidad (p. ej., múltiples líneas de producto y un periodo de tiempo prolongado ("limpieza a limpieza")).

Además, por definición y establecimiento de los lotes de producción de una sola unidad, individuales, de tal manera que se maximice la información disponible para investigar la naturaleza de un incumplimiento, el productor puede estrechar el alcance de la investigación y aplicar recursos de recuperación más eficazmente y eficientemente. Por ejemplo, en el caso de que se asocie un resultado o resultados *positivos* con una o más líneas de producción específicas, se usan condiciones de salubridad agresivas objetivo para resolver el problema. Alternativamente, por ejemplo, en el caso de que se asocie un resultado o resultados *positivos* con uno o más productos específicos, la determinación de si las materias primas están contaminadas o si las etapas de intervención microbiana del proceso se estaban realizando apropiadamente se usa eficazmente y eficientemente.

### 35 **EJEMPLO III**

(Según aspectos particulares de la presente invención, los procedimientos de muestreo inventivos tienen utilidad sustancial para proporcionar medios de coste eficaz y seguimiento eficaz de los niveles de patógenos en productos de frutos secos (p. ej., productos de la almendra) y similares).

Se puede producir un gran número de productos de la almendra usando uno o más procesos incluyendo hacer astillas, escaldar, blanquear, cortar en lonchas, tostar y cortar en dados. También se pueden aplicar tratamientos antimicrobianos tales como el uso de óxido de propileno. En la práctica, estos procesos se pueden usar en muchas diversas combinaciones y la salida de un proceso puede ser la entrada de otro. Esto hace que sea muy difícil examinar producto acabado todo el camino de vuelta a las materias primas.

Como se indicó por un reciente brote, los productos de la almendra son susceptibles de contaminación por *Salmonella* spp. Según aspectos adicionales, los procedimientos de la presente invención proporcionan un medio de coste eficaz de implantación de un programa de seguimiento eficaz para niveles de patógenos en productos de frutos secos (p. ej., productos de la almendra). En tales realizaciones, los productos de la almendra finales de cada tipo se recogen en momentos aleatorios durante un turno de la producción. El productor define y establece lotes de producción de una sola unidad, individuales, como la cantidad de producto producida durante un turno de producción (de «limpieza a limpieza») o como alguna unidad de producción más pequeña (p. ej., un «camión») siempre que se recoja una muestra de cada uno de dicho lote de producción de una sola unidad. Las muestras de lotes de producción de una sola unidad se combinan para formar una correspondiente muestra de material compuesto y, en realizaciones de enriquecimiento húmedo, se añade medio/tampón de enriquecimiento a la muestra de material compuesto para permitir que crezca y se multiplique *Salmonella* spp. en las condiciones favorables de enriquecimiento (como se describió en la presente invención anteriormente), proporcionando de ese modo más material que se pueda detectar por posteriores análisis.

Alícuotas del medio/tampón de enriquecimiento de muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, se combinan para formar una MMCHM. Se analizó la presencia o ausencia de, por ejemplo, *Salmonella*

spp. en la MMCHM. En el caso de que se obtuviera un resultado *positivo* para la MMCHM, cada tampón de enriquecimiento de las muestras de lotes de producción de una sola unidad, individuales, que comprende esa MMCHM se analiza usando los mismos protocolos de ensayo o aumentados.

- 5 Los lotes de producción de una sola unidad, individuales, para los que el tampón de enriquecimiento de la correspondiente muestra proporciona un resultado *positivo* se devuelven para aplicación de etapas de intervención microbiana adicionales (*p. ej.*, tostado) o se desvían a un punto final de seguridad (*p. ej.*, un producto cocinado). Los lotes de producción de una sola unidad, individuales, para los que el tampón de enriquecimiento de la correspondiente muestra proporciona un resultado *negativo* se validan de ese modo y se liberan al comercio. La última fracción
- 10 representa un ahorro de costes directo para el productor en relación con las soluciones de la técnica anterior donde no se hace un ensayo eficaz y el descubrimiento de contaminación con un patógeno conduce a retiradas de producto a gran escala.

- Además, por definición y establecimiento de los lotes de producción de una sola unidad de producción, individuales,
- 15 de tal manera que se maximice la información disponible para investigar la naturaleza de un incumplimiento, el productor puede estrechar el alcance de investigación y aplicar recursos de recuperación más eficaz y eficientemente. Por ejemplo, los procesos usados para producir el producto o los productos de la almendra que proporcionan resultado o resultados *positivos* se analizan racionalmente y se determinan asociaciones entre la contaminación de patógenos y uno o más de los procesos de: hacer astillas, escaldar, blanquear, cortar en lonchas, tostar y cortar en dados y se
- 20 aplican medidas de recuperación eficaces y eficientes, objetivo.

#### **EJEMPLO IV**

- (Según aspectos particulares de la presente invención, los procedimientos de muestreo inventivos tienen utilidad
- 25 sustancial en el contexto de los contaminantes que entran en una línea de producción en un momento dado y después se libera)

- El ensayo de esterilidad de alimentos y productos farmacéuticos o el ensayo de pureza de procesos de fermentación con frecuencia implican la combinación de una serie de muestras para formar un lote de ensayo de material
- 30 compuesto. La detección de contaminación microbiana en la muestra de material compuesto, como se discutió con detalle en la presente invención anteriormente, da como resultado el rechazo de la producción entera. En términos prácticos, con frecuencia un contaminante establecido con exactitud entra en la producción en un momento determinado y después se libera en unos minutos. Los aspectos de la presente invención permiten identificar el tiempo de entrada y la eliminación informada de productos (lotes de ensayo operacionalmente unidos) flanqueando el hecho
- 35 de la contaminación.

#### **EJEMPLO V**

- (Según aspectos particulares de la presente invención, los procedimientos de muestreo inventivos tienen utilidad
- 40 sustancial en el contexto del seguimiento medioambiental (*p. ej.*, con muestras de agua, agua residual, lodo, suelo, esponjas superficiales, frotis superficiales, condensados, aire o líquidos))

- En el contexto del seguimiento medioambiental, cuando varias muestras (agua, agua residual, lodo, suelo, esponjas superficiales, frotis superficiales, condensados, aire o líquidos) se mezclan y se someten a enriquecimiento, seguido
- 45 por ensayo para detectar contaminación ambiental, la invención actual permite establecer con exactitud los lotes de ensayo (*p. ej.*, unidad o unidades unidas operacionalmente) que son positivos para el microbio de interés.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de muestreo, ensayo y validación de lotes de ensayo, que comprende:
- 5 a) recoger una pluralidad de porciones de cada una de una pluralidad de lotes de ensayo, comprendiendo cada uno de los lotes de ensayo una colección de uno o más ejemplares, donde cada lote de ensayo se muestrea por separado tomando dicha pluralidad de porciones de las mismas;
- 10 b) combinar las porciones recogidas correspondientes a cada uno de los lotes de ensayo individuales para proporcionar un conjunto correspondiente de muestras de lotes de ensayo independientes, donde cada muestra de lotes de ensayo independiente se atribuye a un lote de ensayo independiente correspondiente particular;
- 15 c) incubar el conjunto de muestras de lotes de ensayo independiente en condiciones adecuadas para permitir que los niveles de un agente u organismo objetivo que esté presente en una o más de las muestras de lote de ensayo independientes alcancen niveles detectables y se vuelvan uniformes, o sustancialmente uniformes, en la una o más muestras independientes respectivas, para proporcionar un conjunto de muestras de lotes de ensayo enriquecidas independientes;
- 20 d) retirada, preferentemente de manera aséptica, preferentemente porciones iguales de cada muestra de lote de ensayo independiente enriquecida, y combinar las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular; y
- e) ensayar la muestra de material compuesto modular, utilizando un ensayo de detección adecuado, para el agente u organismo objetivo, donde en el caso de que dicho ensayo es negativo, todas las dichas muestras de lotes de ensayo independientes se validan, y donde en el caso de que dicho ensayo es positivo, los lotes de ensayo individuales aún pueden validarse mediante ensayos adicionales de una porción de la muestra de lote de ensayo independiente enriquecida respectiva utilizando el mismo protocolo o uno más sensible y obteniendo un resultado negativo.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además formar una muestra de material compuesto modular adicional de las muestras de lotes de ensayo enriquecidas de c) y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando el mismo ensayo o un ensayo diferente adecuado, para confirmar el estado del ensayo.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además formar una muestra de material compuesto modular adicional de una muestra de lotes de ensayo enriquecida adicional junto con cualquier muestra de lotes de ensayo enriquecida de c) que dé ensayo negativo en e) y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando el mismo ensayo o un ensayo diferente adecuado.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además, en el caso en que el ensayo de la muestra de material compuesto modular en e) de negativo, formar una muestra de material compuesto modular adicional a partir de las muestras de lotes de ensayo enriquecidas de c) y ensayar la muestra de material compuesto modular adicional usando un ensayo adecuado diferente, para confirmar el estado de ensayo negativo.
- 40 5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además, en el caso de que el ensayo de la muestra de material compuesto modular sea positivo, determinar qué lotes de ensayo individuales son positivos y la aplicación de medidas de recuperación que sean específicas para uno o más lotes de ensayo individuales que den ensayo positivo.
- 45 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el lote de ensayo se selecciona del grupo que consiste en un lote medioambiental que comprende uno o más ejemplares medioambientales unidos operacionalmente, lote farmacéutico que comprende uno o más ejemplares farmacéuticos unidos operacionalmente, lote de producto de una sola unidad que comprende uno o más ejemplares de producto unidos operacionalmente y combinaciones de los mismos.
- 50 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el lote de ensayo es un lote de producción de una sola unidad, constituido por ejemplares de producto unidos operacionalmente.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde los ejemplares de producto son sinónimos de porciones
- 55 de productos.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además incubar la muestra de material compuesto modular de d), antes de ensayar en e).
- 60 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la incubación de cada muestra de lote de ensayo en c) comprende agregar una cantidad de medio de enriquecimiento a la muestra, y donde la retirada en d) comprende la retirada de una porción del medio de enriquecimiento de cada muestra enriquecida y la

combinación de las porciones retiradas para proporcionar una muestra de material compuesto modular.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde ensayar la muestra de material compuesto modular, usando al menos uno o un ensayo de detección adecuado comprende el uso de una etapa de concentración para concentrar el agente u organismo microbiano.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en el caso de que el ensayo en e) de la muestra de material compuesto modular sea positivo y donde se ensayen además los lotes de ensayo individuales, tal ensayo adicional comprende el uso del protocolo más sensible.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 12, donde el protocolo más sensible comprende el uso de una etapa de concentración para concentrar el agente u organismo microbiano, junto con el mismo protocolo de ensayo usado para ensayar la muestra de material compuesto modular.
- 15 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el lote de ensayo se selecciona del grupo de lotes que consiste en una sola combinación, un solo bote, un solo palé y un segmento de producción
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el número de lotes de ensayo es de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o aproximadamente 5, 20 preferentemente de 3 a 10.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, donde, en a) recoger una pluralidad de porciones de cada uno de una pluralidad de lotes de ensayo comprende recoger por separado de cada lote de ensayo una serie de porciones seleccionadas del grupo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a 25 aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 y de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 porciones, preferentemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 porciones, más preferentemente aproximadamente 30 porciones o aproximadamente 60 porciones.