

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 751**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04800881 .7**

96 Fecha de presentación: **05.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1692272**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **MÉTODO DE ENSAYO DE INHIBICIÓN Y DISPOSITIVO PARA LA DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.**

30 Prioridad:
18.11.2003 US 523065 P
25.05.2004 US 574252 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.01.2012

73 Titular/es:
CHARM SCIENCES INC.
659 ANDOVER STREET
LAWRENCE, MA 01843-1032, US

72 Inventor/es:
SALTER, Robert, S.;
SAUL, Steven, J.;
ROSSI, Martin, T. y
MARKOVSKI, Robert J

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 371 751 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

Método de ensayo de inhibición y dispositivo para la detección de antibióticos

Los antibióticos usados en los piensos para animales o para tratar animales de granja, tales como ganado para leche o carne y ganado porcino, ocasionalmente contaminan la cadena alimentaria. Los peligros asociados a estos residuos no deseados incluyen reacciones alérgicas, propagación de organismos resistentes y otros riesgos para la salud a largo plazo. Como consecuencia, agencias gubernamentales como el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la FDA ("Food and Drug Administration") de los Estados Unidos exigen la monitorización de dichos residuos en los alimentos. Alimentos tales como la leche, la carne, el pollo, el marisco y los piensos para animales se evalúan de forma rutinaria para determinar la posible presencia de estos residuos. En la presente memoria nosotros describimos un método cómodo de usar para detectar una serie de residuos en un único ensayo de amplio espectro.

Se pueden evaluar diversas partes y excreciones de animales para determinar la presencia de antibióticos. Los ensayos de antibióticos en riñón incluyen ensayos para riñón de cerdo y riñón de ternero. Los problemas de algunos de los ensayos disponibles, particularmente en la industria porcina, incluyen sensibilidades que no coinciden bien con los límites gubernamentales o de la industria. Algunos ensayos son demasiado sensibles para determinados antibióticos y poco sensibles para otros.

Las sensibilidades de los ensayos de inhibición de crecimiento microbiano disponibles actualmente se basan principalmente en parámetros que afectan la sensibilidad del ensayo a todos los fármacos. Dichos parámetros incluyen el organismo de crecimiento usado, la cantidad o la concentración de organismo de crecimiento usado, las dimensiones del recipiente, el volumen de medio, el tipo de medio, la mezcla de nutrientes, el tiempo y la temperatura de incubación. Como consecuencia, si un ensayo es adecuadamente sensible a algunos fármacos, pero demasiado sensible a otros fármacos, puede que se necesiten otros métodos para ajustar la sensibilidad.

Otro problema de algunos ensayos es que pueden requerir procedimientos de extracción incómodos o el uso de disolventes orgánicos que deben ser eliminados de la muestra antes de la operación del ensayo. Esto añade una etapa de procedimiento incómoda. Algunos ensayos también son incómodos de llevar a cabo, ya que requieren la incubación de un bastoncillo de algodón de muestreo en un lecho de cultivo bacteriano y la inoculación de una superficie de agar con esporas justo antes de llevar a cabo el ensayo.

Además de los problemas de tiempo de ensayo elevado, sobre-sensibilidad, sub-sensibilidad y extracción, ninguno de los ensayos disponibles actualmente se proporcionan en un formato todo-en-uno, en el que todos los reactivos del ensayo y todos los dispositivos de muestreo se encuentren en un único instrumento de ensayo.

Resumen

En la presente memoria nosotros describimos varias realizaciones de un aparato de ensayo y de un método para detectar antibióticos en una muestra de ensayo usando la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano. Algunas realizaciones incluyen todos los reactivos para un cultivo microbiano en un formato listo para usar. El cultivo puede incluir, por ejemplo, nutrientes, agar, uno o más tampones, esporas e indicador de color. Alternativamente, uno cualquiera de dichos componentes, o más de uno, pueden proporcionarse separadamente, por ejemplo en un compartimento de reactivos separado, denominado de aquí en adelante "compartimento". En una realización del formato listo para usar, el usuario sólo tiene que añadir la muestra, o extracto de muestra, e incubar durante un periodo de tiempo prescrito, por ejemplo de aproximadamente 1,5 a 4 horas, a una temperatura prescrita, por ejemplo de aproximadamente 55-70 grados Celsius, y observar los resultados.

Si se requiere una extracción, se puede proporcionar un agente de extracción por separado del resto de reactivos. En un ejemplo, el agente de extracción se encuentra en un compartimento. El compartimento que contiene el agente de extracción se puede incluir en una unidad de ensayo que incluya al resto de componentes de ensayo. La unidad de ensayo puede incluir el compartimento contenido dentro de un vial unido al fondo de la unidad de ensayo. Los cierres del compartimento pueden ser cierres de una membrana permeable a una aguja, tal como cierres de lámina metálica o cierres tipo lámina o cierres de plástico o similares. El pinchado de los cierres permite que el agente de extracción entre en contacto con el cultivo. El usuario sólo tiene que añadir la muestra al agente de extracción, poner en contacto la muestra extraída con el cultivo e incubar durante el periodo de tiempo prescrito a la temperatura prescrita. El agente de extracción puede ser una disolución tamponante capaz de extraer fármacos antimicrobianos de una muestra de riñón, tal como una muestra de riñón bovino o porcino. El agente de extracción también puede ser un reactivo utilizado simplemente para retirar la muestra de un bastoncillo de algodón de muestreo y transferirla al cultivo.

Algunas realizaciones incluyen dos o más tampones (denominados de aquí en adelante politampón) que tienen múltiples valores de pKa. Un politampón puede mejorar la estabilidad antes del ensayo y/o después del ensayo del cultivo, así como otros aspectos del comportamiento del ensayo. La estabilidad después del ensayo permite que los resultados se mantengan a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo extendido, por ejemplo de 6-8 horas o más, sin ningún cambio en el resultado del ensayo. El politampón puede premezclarse con el cultivo o puede proporcionarse por separado, tal como en un compartimento diferente para una adición posterior.

La siguiente descripción describe la reducción de la sensibilidad del cultivo microbiano frente a ciertos inhibidores de crecimiento de cultivo. En algunos ensayos de inhibición del crecimiento, se puede usar la inhibición de cultivo microbiano mediante antibióticos procedentes de una muestra, o revertir dicha inhibición, como mecanismo de monitorización de antibióticos. La sensibilidad de dichos ensayos se puede ajustar poniendo en contacto el cultivo con al menos un reactivo de ajuste. Los ejemplos de reactivos de ajuste incluyen proteínas de unión, enzimas, análogos químicos y/o anticuerpos que se unan a antibióticos, o que inhiban su eficacia. El reactivo de ajuste se puede usar para ajustar la sensibilidad del ensayo para al menos un antibiótico u otro inhibidor de crecimiento de cultivo. Un ejemplo de enzima microbiana útil como ligando de ajuste es un receptor/ligando antibiótico procedente de la pared celular de microbios tales como *Bacillus (Geobacillus) stearothermophilus (B. st.)*. El reactivo de ajuste se puede aplicar de varias formas, por ejemplo combinado con un cultivo o caldo, aplicado en la parte superior de un cultivo sólido, tal como una matriz de agar, añadido sobre un bastoncillo de algodón de muestreo o contenido en un tampón de dilución.

Los posibles reactivos de ajuste incluyen receptores/ligandos de antibióticos aislados de bacterias, anticuerpos monoclonales y policlonales. Cuando el reactivo de ajuste es un ligando de antibiótico, tal como una proteína de unión, por ejemplo un receptor o anticuerpo de antibiótico bacteriano, el reactivo de ajuste puede reducir la disponibilidad de antibióticos capaces de inhibir el crecimiento del cultivo particular usado, como mediante unión al antibiótico. De forma similar, los reactivos de ajuste pueden incluir sustancias que, más que unirse al antibiótico, reducen la influencia del antibiótico sobre el organismo de crecimiento.

Algunas realizaciones incluyen un aparato de ensayo con un cultivo sólido o semisólido en el interior de un vial. El cultivo puede incluir todos o parte de los productos bioquímicos del ensayo, que incluyen agar, nutrientes, indicadores de color, uno o más tampones y esporas. En una realización, el cultivo, antes de la adición de la muestra de ensayo, se ajusta a un pH superior a aproximadamente 8. Dicho pH puede ayudar a evitar la contaminación del cultivo, por ejemplo con moho, y prolongar el periodo de caducidad pre-ensayo. El vial puede incluir un extremo de fondo sellado y un sello de membrana sobre el extremo superior. En la operación del ensayo el usuario puede pinchar el sello con, por ejemplo, una punta de pipeta y a continuación dispensar la muestra, por ejemplo una muestra de 200 microlitros de leche, al interior del vial.

Algunas realizaciones incluyen la unidad de ensayo completa que contiene todos los reactivos, premezclados juntos y listos para ser usados en un cultivo y, además, un instrumento de muestreo, tal como un bastoncillo de algodón o sonda y un agente de extracción opcional. La sonda se puede usar para absorber y aplicar la muestra a los reactivos dentro del aparato de ensayo y puede comprender un material absorbente tal como un material absorbente y fibroso de algodón o de tipo algodón. Un ejemplo de dicho instrumento de muestreo es un bastoncillo de algodón o sonda en el formato de un POKETSWAB (POKETSWAB es un marca registrada de Charm Sciences, Inc. Lawrence, MA). El formato del POKETSWAB proporciona la ventaja de un movimiento controlado del bastoncillo de algodón en el dispositivo de ensayo que proporciona un soporte físico para el bastoncillo de algodón. Por ejemplo, el bastoncillo de algodón puede moverse de manera controlable en el compartimento de reactivo que contiene un tampón de extracción. Usando el dispositivo POKETSWAB, el algodón puede permanecer dentro del agente de extracción el tiempo deseado. Además de la comodidad de administrar el bastoncillo de algodón al cliente en un dispositivo todo en uno, el POKETSWAB proporciona el soporte físico de tal manera que el algodón permanecerá dentro de la disolución de agente de extracción o de tampón sin que el usuario proporcione un soporte externo al bastoncillo de algodón mientras esté humedecido. Tras la extracción de la muestra, el bastoncillo de algodón, o punta de sonda, se mueve longitudinalmente a través de un sello, permitiendo con ello que la muestra fluya sobre o dentro del cultivo.

De acuerdo con la presente invención, el método de ensayo se usa para reducir la sensibilidad de un cultivo microbiano frente a la familia beta-lactama de antibióticos. Una proteína de unión de beta-lactama se usa para reducir de forma selectiva la sensibilidad del ensayo frente a las beta-lactamas. La sensibilidad del ensayo no se verá afectada significativamente respecto a los antibióticos o inhibidores que no sean beta-lactamas. En una realización, el ligando de beta-lactama es un receptor procedente de *B. st.* y el cultivo está constituido por esporas de *B. st.*

Breve descripción de las Figuras

Figuras 1-9: son ilustraciones que muestran una realización en la que se usa el formato POKETSWAB.

Figura 1: es un dibujo de la perspectiva de despiece del bastoncillo de algodón **1** unido a la empuñadura del bastoncillo de algodón **2**. El bastoncillo de algodón **1** se usa para obtener una muestra.

Figura 2: es un dibujo de la perspectiva de despiece del montaje del POKETSWAB entero **8** con el bastoncillo de algodón **1** en la posición de pre-uso dentro del cuerpo del bastoncillo de algodón **7**.

Figura 3: es un dibujo de la perspectiva de despiece que muestra el montaje del vial **4** retirado del cuerpo del POKETSWAB **7**.

Figura 4: es un dibujo de la perspectiva de despiece del montaje de vial **4** que muestra las líneas de sección transversal **9** y el compartimento **5**.

Figura 5: es una vista de sección transversal del montaje mostrado en la figura 4 con el cultivo **15** en el fondo del vial **4** por debajo del compartimento **5** con agente de extracción **11** u otro reactivo adicional sellado en su interior.

Figura 6: es un dibujo de la perspectiva de despiece del montaje de POCKETSWAB en uso **8** en el que se ha obtenido la muestra y el bastoncillo de algodón **1** se ha movido a través del sello **12** que cubre el montaje de vial **4**.

5 Figura 7: es una vista de sección transversal del montaje mostrado en la figura 6. La punta del bastoncillo de algodón **3** ha atravesado el sello **12** que cubre el montaje de vial **4**. El sello **13** de la parte superior del montaje de compartimento **5** todavía no ha sido perforado.

Figura 8: es un dibujo de la perspectiva de despiece del montaje de POCKETSWAB en uso **8** en el que se ha obtenido la muestra y el bastoncillo de algodón **1** ha atravesado el sello **12** que cubre el montaje de vial **4** y el sello **13** que cubre la parte superior del montaje de compartimento **5** para entrar en contacto con el reactivo **11** del interior del montaje de compartimento **5**.

Figura 9: es una vista de sección cruzada del montaje mostrado en la figura 8. La punta del bastoncillo de algodón **3** ha atravesado el sello **12** que cubre tanto el montaje de vial **4** como el sello **13** de la parte superior del montaje de compartimento **5**. El sello **14** de la parte inferior del montaje de compartimento **5** todavía no ha sido perforado.

15 Figura 10: es una vista de sección transversal del montaje de vial **4** después de que la punta del bastoncillo de algodón **3** haya atravesado todos los sellos de membrana **12**, **13** y **14**, que cubre el montaje de vial **4**, la parte superior y la parte inferior del montaje de compartimento **5**. El líquido, por ejemplo un agente de extracción, que ya se ha puesto en contacto con la muestra, se deja fluir, o mojar, sobre el cultivo **15** del fondo del montaje de vial **4**. Tras mezclar la muestra y perforar el sello, el bastoncillo de algodón **1** es retirado hasta la posición de pre-uso y no está en contacto con el cultivo **15**.

Figura 11 y Figura 12: son dibujos de perspectiva de una realización en la que se suministran múltiples viales para muestras múltiples. La perforación, u otras uniones desmontables, permiten al usuario determinar el número de ensayos a llevar a cabo a la vez. En la porción inferior de cada montaje de vial **4** se encuentra el cultivo **15**. También se puede suministrar el montaje opcional de compartimento **5**. En la parte superior del montaje de vial **4** hay una cobertura perforable **12** que puede ser, por ejemplo, una membrana o lámina metálica perforable. El montaje de vial **4** también puede enhebrarse **9** para una unión opcional al aparato de ensayo POCKETSWAB o para facilitar el cierre. En la operación del ensayo, se puede usar un bastoncillo de algodón o una punta de pipeta para perforar el sello **12** de la parte superior del vial **4** antes de la aplicación de la muestra de ensayo al cultivo **15**. Si también se tiene el montaje de compartimento **5** dentro del montaje de vial **4**, se puede usar una punta de pipeta para mezclar la muestra con los reactivos dentro del montaje de compartimento **5** y para perforar los diversos sellos.

Descripción detallada

Una realización descrita en la presente memoria implica un método, dispositivo y kit de fácil manejo para la detección de un amplio abanico de residuos de compuestos antibacterianos en una muestra tal como un producto agrícola. Los antibióticos que pueden detectarse incluyen beta-lactamas, sulfonamidas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglicósidos, quinolonas y anfenícolos. En una realización, el usuario del ensayo añade la muestra, incuba y observa los resultados.

Un mecanismo útil de detección de antibióticos es la inhibición del crecimiento microbiano. Los ejemplos de microbios útiles para dicha aplicación incluyen: *B. st.*; *B. subtilis*; *B. megaterium*; *S. aureus*; *Ps. aeuginosa*; *E. coli* y *B. licheniformis*. Generalmente los microbios que exhiben una inhibición de crecimiento detectable en presencia de antibióticos pueden ser útiles. Otros ejemplos de ensayos de inhibición de crecimiento microbiano incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. Nº 5.354.663 y 5.489.532, y en la solicitud de patente PCT WO 96/23901. Los microbios que esporulan, tal como el *B. st.*, son particularmente útiles.

Uno de los beneficios de los ensayos de inhibición microbiana es que pueden ser de espectro amplio en comparación con ensayos basados en unión de antibióticos específicos o de familia, tales como los que utilizan anticuerpos u otros ligandos/receptores bacterianos. Por ejemplo, los antibióticos de beta-lactama y de sulfonamida provocarán ambos algo de inhibición del crecimiento de *B. st.* La sensibilidad de los ensayos de inhibición microbiana disponibles actualmente se basa en parámetros que incluyen el organismo de crecimiento particular usado, la concentración de bacterias o esporas, los nutrientes proporcionados y el tiempo y temperatura de incubación usados. Por tanto, en el ejemplo de *B. st.*, el uso de uno de estos parámetros para ajustar la sensibilidad del ensayo puede producir una reducción de la sensibilidad a todos o a varios de los antibióticos que se pretende detectar. Sin embargo, puede ser deseable reducir la sensibilidad del ensayo de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano sólo a determinados antibióticos, u otros inhibidores tales como sólo aquellos para los que el ensayo sea demasiado sensible. Por ejemplo, usando *B. st.*, puede ser deseable reducir la sensibilidad del ensayo sólo a beta-lactamas y no a sulfonamidas u otros fármacos o inhibidores.

55 Se utiliza una proteína de unión aislada de bacterias, a veces denominada receptor, receptor de antibiótico, ligando de antibiótico o receptor bacteriano, como ligando de ajuste sola o en combinación con anticuerpos específicos. Las proteínas bacterianas que son sensibles a múltiples antibióticos, tal como a una familia de antibióticos, por ejemplo

las beta-lactamas, pueden permitir un ajuste de la sensibilidad de múltiples antibióticos frente a los cuales la proteína de unión particular es sensible. Los ligandos de antibiótico, tales como anticuerpos, que son más específicos permiten un ajuste de la sensibilidad más específico.

5 Un antibiótico ligado mediante un reactivo de ajuste puede quedar como no disponible, o menos disponible, para la inhibición del crecimiento bacteriano. Sin pretender establecer una teoría, los ligandos de antibióticos que se emplean sobre agar, u otro cultivo sólido, pueden crear sustancias de grandes pesos moleculares que no difunden fácilmente en un cultivo sólido. Los reactivos de ajuste, tales como los ligandos, combinados en un medio de cultivo sólido o líquido, pueden desactivar, debilitar o interferir con las propiedades antimicrobianas, o afectar al antibiótico. Por tanto, otras sustancias que no sean ligandos antimicrobianos pueden ser útiles para ajustar la sensibilidad del
10 ensayo, incluyendo enzimas, tales como beta-lactamasa, que destruyen la actividad antibiótica o si no desactivan antibióticos o sustancias que compiten con los antibióticos en la célula bacteriana, tales como análogos. Una sustancia de este tipo es el ácido para-aminobenzoico (PABA), un análogo de las sulfonamidas con el que compiten las sulfonamidas en determinadas rutas metabólicas bacterianas. Otros reactivos de ajuste igualmente útiles pueden incluir sustancias que cambien la estructura de un antibiótico, o que reduzcan la actividad o desactiven el antibiótico
15 diana o la familia de antibióticos diana. Los ligandos de antibiótico también pueden incluir bacterias no viables o extractos bacterianos tales como extracto de pared celular.

Los reactivos de ajuste, que incluyen los ligandos de antibiótico, pueden ser específicos de un fármaco particular para el cual el ensayo no ajustado es excesivamente sensible, o pueden tener afinidad por múltiples fármacos. El reactivo de ajuste se puede añadir con la muestra o se puede pre-mezclar en un cultivo. Un ejemplo de un reactivo
20 de ajuste para múltiples fármacos es un receptor microbiano, tal como el receptor o receptores de beta-lactama aislados de *B. st.*, tal como se describe en las Patentes de EE.UU. 4.239.745 y 4.239.852. Otras posibles fuentes de receptores de beta-lactama incluyen organismos del género *Bacillus* que incluyen *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*. Otras fuentes posibles incluyen *S. aureus*, *Ps. auginosa*, *B. licheniformis* y *E. coli*. Los ejemplos de reactivos de ajuste específicos útiles para fármacos particulares incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales. Otros ejemplos de usos de anticuerpos para ajustar la sensibilidad se proporcionan en la Patente de EE.UU.
25 6.319.466.

Los ligandos de antibióticos se pueden aislar de bacterias y purificarse usando técnicas conocidas. En una realización, se usa ligando de beta-lactama aislado de *B. st.* para ajustar la sensibilidad de un ensayo de inhibición microbiana usando *B. st.* como organismo de crecimiento. En dicha realización, la sensibilidad del ensayo frente a
30 todas las beta-lactamas se reduce, mientras que la sensibilidad del ensayo frente al resto de antibióticos para los cuales la *B. st.* es sensible permanecen relativamente no afectados. Esto es útil, por ejemplo, cuando la sensibilidad de la diana está en los niveles Europeos de multi-residuos (MRLs) y/o en los niveles de seguridad de EE.UU., niveles regulatorios que permiten que la beta-lactama en tejido esté por encima de los niveles de detección de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano de *B. st.* no ajustado.

35 Otros ligandos de antibióticos que pueden ser útiles incluyen receptores aislados de varias partes de células bacterianas o de otro tipo, que incluyen el ribosoma o parte del ribosoma al cual se pueden unir determinados antibióticos. Los ejemplos de antibióticos que se unen o que inhiben la función de ribosoma incluyen tetraciclinas, sulfonamidas o fluoroquinolonas. La inhibición del crecimiento bacteriano por acción de antibióticos tales como tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas puede ajustarse mediante la adición de dichos ligandos. Además, en
40 algunas realizaciones el reactivo de ajuste/ligando puede ser un elemento aislado procedente del mismo organismo usado para producir el cultivo.

Otros métodos útiles para ajustar la sensibilidad incluyen añadir células muertas y/o extracto sin purificar que contengan los ligandos/receptores deseados.

45 En una realización, mostrada en las figuras, se proporciona un cultivo sólido en una cámara de reactivos tal como un vial **4** o un dispositivo tipo vial. Localizado en el mismo dispositivo puede haber un compartimento **5** que contiene un agente de extracción apropiado o un diluyente líquido **11**. En una realización, se añade un ligando de antibiótico en la parte superior del cultivo sólido **15**. En una realización adicional, el ligando de antibiótico se almacena por separado y se añade al cultivo sólido **15**, junto a la adición de muestra, antes de la adición de muestra o justo después. En otra realización, el ligando de antibiótico se incluye pre-aplicado en el bastoncillo de algodón de
50 muestreo **1**, por ejemplo mediante unión covalente al bastoncillo de algodón **1**.

En una realización para la detección de antibióticos en una muestra que requiere extracción, se usa un agente de extracción antes de añadir la muestra al cultivo. Un agente de extracción que separe fármacos antimicrobianos de una muestra, o de un bastoncillo de algodón u otro dispositivo de muestreo, evita métodos de extracción complicados o el uso de disolventes orgánicos. Un ejemplo de agentes de extracción útiles incluye una combinación
55 de Base Trizma y fosfato potásico, tal como Fosfato monobásico de potasio en agua a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, por ejemplo aproximadamente 7,5. Dicho tampón de extracción puede suministrarse separado del cultivo o, para facilitar el uso, en un dispositivo de ensayo de todo en uno tal como el formato POCKETSWAB **8**. Usando el formato POCKETSWAB **8**, tras la extracción de la muestra el agente de extracción (que contiene la muestra) simplemente se combina con los reactivos de ensayo para la incubación. Dichos agentes
60 de extracción pueden extraer antibióticos de la muestra o simplemente actuar para transferir la muestra, que incluye

el antibiótico, desde el bastoncillo de algodón, u otro dispositivo de muestreo, hasta el cultivo.

El formato POCKETSWAB **8** se describe en la patente de EE.UU. número 5.965.453. En el formato POCKETSWAB **8**, el agente de extracción puede encontrarse en un compartimento **5**. El compartimento **5** puede estar situado dentro del dispositivo, por encima del cultivo **15**. El dispositivo **5** puede estar sellado en la parte superior **13** y en la parte inferior **14**, tal como con un sello de membrana, por ejemplo, láminas metálicas perforables, en ambos extremos para retener el tampón o agente de extracción en su interior. Cuando se usa el formato POCKETSWAB **8**, se retira el bastoncillo de algodón **1** y se pone en contacto con la muestra. Tras el contacto con la muestra, el bastoncillo de algodón **1** se usa para perforar el primer sello **12** (el sello del vial **4**) y a continuación el sello superior **12** del compartimento, introduciéndolo de este modo en el compartimento **5** y poniéndolo en contacto con el agente de extracción. Tras un tiempo de extracción suficiente, se perfora el segundo extremo sellado **14** (el extremo inferior) del compartimento **5**, permitiendo que el contenido fluya sobre el cultivo **15**. La muestra es incubada por encima de temperatura ambiente, por ejemplo entre aproximadamente 60 grados C y aproximadamente 70 grados C, tal como aproximadamente a 64 grados C. Se determina la germinación de esporas y/o el crecimiento bacteriano, o la ausencia del mismo, mediante observación de los cambios en los indicadores de crecimiento del cultivo **15**.

Los posibles indicadores de crecimiento incluyen indicadores que sufren un cambio detectable en función del crecimiento o de la inhibición del cultivo, tal como indicadores de pH e indicadores de oxidación/reducción (redox). Por ejemplo, los indicadores que cambian de color en presencia de un ácido o una base tal como a un color amarillento si el entorno es ácido o a un color púrpura/azul si es básico o neutro. En el caso de crecimiento bacteriano, o de crecimiento bacteriano después de germinación de esporas, se produce ácido. Por tanto, los indicadores reflejarán la creación de un entorno crecientemente ácido según vaya progresando el crecimiento bacteriano. Si el crecimiento bacteriano o la germinación de esporas son inhibidos, por ejemplo por antibióticos u otros inhibidores presentes en la muestra, el entorno será menos ácido. El color del indicador ácido/base reflejará dicha acidez relativamente baja.

Algunas realizaciones utilizan un politampón. Un ejemplo de dicho politampón es una combinación de tampones, uno con un pKa por encima de 7, por ejemplo de aproximadamente 8 a aproximadamente 11, y otro con un pKa por debajo de 7, por ejemplo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,3. El politampón se puede incluir en el cultivo, en un compartimento separado, o se puede proporcionar separadamente para una adición posterior. Cuando está premezclado con el cultivo, el politampón puede usarse para estabilizar el sistema de reactivos antes de la operación del ensayo y para estabilizar los resultados después de que el ensayo se haya completado.

En un ejemplo particular de un politampón combinado con el cultivo, se usan borato y succinato. El borato ayuda a proporcionar un entorno de pH elevado para estabilizar el cultivo durante el almacenamiento pre-ensayo. El succinato ayuda a proporcionar un entorno de pH bajo para estabilizar el pH del sistema después de la operación del ensayo. Por ejemplo, en una muestra negativa el pH del cultivo se reducirá según vayan germinando las esporas y multiplicándose las bacterias. Tras la finalización del ensayo el color del cultivo reflejará los resultados del ensayo. El tampón con pKa inferior a 7, por ejemplo succinato, ayudará a estabilizar el pH del entorno ahora ácido, minimizando con ello un cambio adicional de color, o previniéndolo. La presión externa para el cambio de pH, por ejemplo una menor temperatura después de que el ensayo se haya retirado de una incubadora y el ensayo vuelva a temperatura ambiente, puede provocar que el cultivo se vuelva más básico y, por tanto, el ensayo aparecerá como más positivo. Un tampón con pKa inferior a 7 ayudará a estabilizar el resultado incluso después de volver a temperatura ambiente. En otra realización el tampón de pKa elevado es Base Trizma y puede combinarse con un tampón de pKa bajo tal como succinato.

La selección de tampones vendrá regida por una serie de factores. Un factor es evitar tampones que sean particularmente sensibles a los cambios de temperatura del ensayo. Otro factor es el pH de partida del tampón particular. Por ejemplo, la Base Trizma puede proporcionar menos estabilidad frente a la temperatura que el borato. Sin embargo, la Base Trizma puede proporcionar un pH de partida más básico y, por tanto, una sensibilidad y estabilidad del ensayo posiblemente mejores en comparación con el borato. En una realización se usa Base Trizma para ajustar el pH del cultivo pre-uso a un pH superior a aproximadamente 8, por ejemplo aproximadamente 10,5.

Ajustar el pH del cultivo de partida hasta un pH relativamente alto también es un método para mejorar la sensibilidad y/o la caducidad del ensayo. Un pH inicial elevado, por ejemplo por encima de aproximadamente pH 7,5, por ejemplo aproximadamente pH 8 o superior, tal como en el intervalo entre aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente pH 11, puede ayudar a prevenir una germinación prematura de las esporas. El entorno de pH elevado también puede ayudar a evitar la contaminación con moho. Generalmente, el entorno de pH elevado puede ayudar a extender la fecha de caducidad del cultivo antes de su uso.

En otra realización se pueden evaluar múltiples muestras de ensayo usando una placa de ensayo, por ejemplo, una placa de ensayo de 96 pocillos. En dicha realización, se pueden proporcionar simultáneamente en el pocillo el medio de cultivo y los ligandos de ajuste. En otra realización se suministran múltiples viales, por ejemplo unidos unos a otros mediante un plástico de perforación o rompible, de tal modo que se pueden suministrar fácilmente al usuario uno o varios ensayos.

Ejemplo 1: Preparación de cultivo sólido (Matriz de agar)

Se puede usar el siguiente cultivo para la detección de antibióticos y otros inhibidores en una serie de matrices que incluyen, por ejemplo, orina, leche, agua, aves de corral, marisco, pienso y extractos de piensos y carne, tal como muestras de riñón.

5 Se preparó una disolución de púrpura de bromocresol (BCP)/Tris combinando 25 mL de una disolución de Base Trizma (TBS), incluyendo la disolución 2,5 gramos de Base Trizma en 100 mL de agua desionizada o de ósmosis inversa (agua DI/OI), con 100 miligramos de BCP y mezclando bien. El medio se preparó disolviendo 5 gramos de glucosa y 1 gramo de Caldo Mueller Hinton (el caldo Mueller Hinton incluye, en agua filtrada purificada, 2 gramos por litro (g/L) de extracto de carne, 17,5 g/L de hidrosilato ácido de caseína y 1,5 g/L de almidón, pH 7,3 a 25 grados C) en 100 mL de agua DI/OI. A continuación se preparó una disolución de trimetropim 0,01 mg/mL en agua DI/OI y se
10 añadieron 1,2 mL al medio. Después se añadieron al medio 20 mL de BCP/Tris (filtrado en condiciones estériles a través de un filtro de 0,45 micras).

Se preparó agar combinando 0,3 gramos de Difco Bacto-Agar (referencia nº 0140-01), 0,225 de NaCl y 17,485 de agua DI/OI. La mezcla se calentó hasta 95°C y a continuación se retiró del calor y se dejó enfriar hasta 75°C. A continuación se añadieron 6 mL de medio (preparado como se ha descrito anteriormente con BCP/Tris) al agar y se
15 mezcló durante 5 minutos. La mezcla se enfrió hasta 57°C y se añadió 1 mL de disolución de esporas (concentración de 1000 millones de cfu/mL), y se mezcló durante 5 minutos. Se dispensaron 0,200 mL al fondo del vial 4.

Ejemplo 2: Ensayo de servicio sencillo

El vial 4 dispensado se preparó como se describe en el ejemplo 1. Se preparó un agente de extracción añadiendo
20 4,8 gramos de Base Trizma al 47,2% y fosfato potásico monobásico al 52,5% a 1000 mL de agua DI/OI (el pH debería ser de 7,5 +/- 0,10). El agente de extracción se selló dentro del compartimento 5 y el compartimento 5 se añadió al vial 4. El vial 4 se selló con una lámina de aluminio aplicando calor.

Ejemplo 3: Procedimiento de bastoncillo de algodón de riñón de servicio sencillo

(Nota: este procedimiento se describe a continuación usando un formato en el que el bastoncillo de algodón se suministra empaquetado dentro de la unidad de ensayo, tal como en el PocketSwab).

25 El procedimiento de bastoncillo de algodón de riñón de servicio sencillo se llevó a cabo en primer lugar haciendo una incisión de 7,5 cm (3 pulgadas) en el riñón. A continuación se retiró el bastoncillo de algodón 1 de la unidad de ensayo, la unidad de ensayo en la forma de un POCKETSWAB, tirando suavemente y girando la manivela 2 hacia fuera del cuerpo de la unidad de ensayo 7. A continuación el bastoncillo de algodón 1 se insertó en la incisión del riñón dejándolo en reposo durante 15 minutos para permitir una absorción completa del líquido en el bastoncillo de
30 algodón 1. El bastoncillo de algodón 1 se volvió a insertar apretando ligeramente hacia abajo y girando para hacer encajar los hilos 6 y atornillando la manivela lentamente hacia abajo hasta aproximadamente medio camino. La punta 3 del bastoncillo de algodón perforó los sellos 12, 13 y 14 sumergiendo la punta 3 del bastoncillo de algodón en el agente de extracción dentro del compartimento 5, donde permaneció durante 2 minutos. A continuación el bastoncillo de algodón 1 se atornilla hacia abajo hasta el final. Tras agitar y tapar el vial 4 para llevar el líquido residual al fondo del vial 4 y en contacto con el cultivo 15, colocamos el vial 4 en un bloque térmico fijado a 67°C y se
35 incubó durante 2,5 horas (si se evalúa orina en lugar de riñón, incubar durante 4 horas). Tras 2,5 horas se retiró el vial 4 de la incubadora y se observó el color del vial en comparación con los colores de referencia. Si el control negativo no se ajusta al color especificado en el protocolo se continúa con la incubación otros 10 minutos más.

40 Usando el procedimiento anterior con la adición adicional de diversas cantidades de unidades de receptor de beta-lactama en la parte superior del cultivo, entre 0,3 unidades y 5,0 unidades, la sensibilidad del ensayo a penicilina G se redujo empleando cantidades variables dependiendo de la cantidad de receptor añadido. Véase más adelante el ejemplo 5 para la determinación de unidades de receptor.

Ejemplo 4: Ensayo de orina de servicio sencillo

45 El cultivo se prepara como se ha descrito en el ejemplo 1. Se prepara el agente de extracción como se ha descrito en el ejemplo 2. El ensayo se lleva a cabo como en el ejemplo 3 excepto que la punta 3 del bastoncillo de algodón se dejó reposar en la muestra de orina 10 segundos para permitir una absorción completa en la punta 3 del bastoncillo de algodón, seguido de una incubación de 4 horas.

Ejemplo 5: Ensayo de riñón de servicio sencillo de sensibilidad ajustada con ligando de ajuste (receptor) combinado con los reactivos de ensayo

50 Se preparó el cultivo como en el Ejemplo 1. Antes de dispensar 200 microlitros al vial 4, se prepara el ligando de antibiótico, en este ejemplo un ligando de antibiótico procedente de la pared celular de *B. st.*, también conocido como receptor. Se mezclan cantidades variables de unidades de receptor inhibidor en el cultivo. Se define el receptor como la proteína extraída de la membrana celular de *B. st.* Una unidad (1 U) de receptor es la cantidad de receptor que, en el ensayo, revertirá la inhibición del crecimiento de cultivo de 12,5 ppb de penicilina G.

ES 2 371 751 T3

El receptor es útil en una serie de formas que incluyen la forma purificada, en forma de pasta celular en la que el receptor es un componente de la célula entera, o en la forma de fragmentos celulares rotos.

Los resultados de los experimentos se muestran en las Tablas 1, 2 y 3.

5 Los resultados de la Tabla 1 proceden de ensayos que usan el cultivo descrito en el Ejemplo 1 y con la adición de receptor añadido en tampón de lavado (la composición del tampón de lavado es de 4,8 gramos de Base Trizma al 47,2% y Fosfato Potásico Monobásico al 52,5% en 1000 mL de agua DI/OI) a 0, 0,3 unidades (U), 1,0 U, 2,0 U, 5,0 U por ensayo. La muestra contenía las siguientes cantidades de penicilina G: 0, 5 partes por billón (ppb), 10 ppb, 12,5 ppb, 25 ppb y 50 ppb. Como se muestra, 1,0 U es suficiente para revertir el resultado de una muestra de 12,5 ppb de penicilina G. Los resultados son positivos (+) o negativos (-).

10

Tabla 1

ID de muestra	0	5 ppb	10 ppb	12,5 ppb	25 ppb	50 ppb
0 U	-	+	+	+	+	+
0,3	-	-	-	+	+	+
1,0	-	-	-	-	+	+
2,0	-	-	-	-	+	+
5,0	-	-	-	-	+	+

Los datos de la Tabla 2 muestran que cuando se añade 1 U ó sensibilidad de receptor frente a fármacos diferentes a beta-lactamas los resultados no cambian. Los resultados son positivos (+), negativos (-) o de límite entre positivo y negativo (+/-). Las abreviaturas son penicilina G (PenG); sulfametazina (SMZ); sulfadimetoxina (SDM); tilosina (TY); gentamicina (G); oxitetraciclina (OT).

15

Tabla 2

Fármaco y Concentración	Sin receptor	Con receptor
Negativo	-	-
PenG 12,5 ppb	+	-
PenG 25 ppb	+	+
SMZ 50 ppb	-	-
SMZ 100 ppb	+/-	+/-
SMZ 200 ppb	+/-	+/-
SDM 50 ppb	+/-	+/-
SDM 100 ppb	+/-	+/-
SDM 200 ppb	+	+
TY 300	+/-	+/-
TY 500	+	+
TY 800	+	+
G 400	+/-	+/-
G 600	+/-	+/-
G 800	+/-	+/-
OT 250	+	+
OT 500	+	+
OT 750	+	+

Los resultados de la Tabla 3 muestran que el receptor puede añadirse en diferentes localizaciones o componentes dentro del ensayo para alcanzar un resultado igual o similar. Los resultados mostrados son de muestras negativas y de muestras que contienen 12,5 ppb de penicilina G y 50 ppb de penicilina G. Los resultados son positivos (+) o negativos (-).

20

Tabla 3

Localización del receptor	0	12,5 ppb	50 ppb
Control – sin receptor	-	+	+
Receptor añadido al tampón	-	-	+
Receptor añadido a la superficie del cultivo	-	-	+
Receptor añadido seco sobre el bastoncillo de algodón	-	-	+
Receptor mezclado en el cultivo	-	-	+/-

Ejemplo 6: Preparación de medio de cultivo que contiene dos tampones

Se puede usar el siguiente cultivo para la detección de antibióticos y otros inhibidores en una serie de matrices que incluyen, por ejemplo, orina, leche o muestras de riñón, y puede usarse solo en un recipiente de ensayo o en la unidad de ensayo de servicio sencillo o en ejemplos de ajuste de la sensibilidad.

Se preparó una disolución de BCP/Borato/Succinato añadiendo 3,8 gramos de borato y 6 gramos de succinato a 100 mL de agua desionizada/ósmosis inversa (agua DI/OI) en una matraz de 125 mL. Se añadieron 50 miligramos de BCP a un tubo cónico de 50 mL y se añadieron 5 mL de la disolución de borato/succinato a los 50 miligramos de BCP y se mezcló.

Para preparar el medio, se disolvieron 5 gramos de glucosa y 1 gramo de caldo Mueller Hinton en 100 mL de agua DI/OI. Se prepararon 1,2 mL de una disolución 0,01 mg/mL de trimetoprim en agua DI/OI y se añadieron al medio. Se añadieron 20 mL de BCP/Borato/Succinato al medio y el medio se filtró en condiciones estériles a través de un filtro de 0,45 micras, y a continuación se enfrió a 4 grados C.

Se preparó agar combinando 0,3 gramos de Difco Bacto-Agar (referencia nº 0140-01), 0,225 de NaCl y 17,485 de agua DI/OI. La mezcla se calentó hasta 95°C y a continuación se retiró del calor y se dejó enfriar hasta 75°C. A continuación se añadieron 6 mL de medio (preparado como se ha descrito antes con BCP/Tris) al agar y se mezcló durante 5 minutos. La mezcla se enfrió hasta 57°C y se añadió 1 mL de disolución de esporas (concentración de 1000 millones de cfu/mL) y se mezcló durante 5 minutos. Se dispensaron 0,200 mL en el fondo de cada uno de los viales.

Tras dispensar, se lleva a cabo un ensayo para determinar si la sensibilidad es la adecuada. Si la sensibilidad no es la adecuada se repite el procedimiento usando más esporas (sub-sensibilidad) o menos esporas (si hay sobre-sensibilidad).

La siguiente Tabla 4 muestra los resultados de ensayos de detección de antibióticos que usan el cultivo descrito en el Ejemplo 6. En la operación del ensayo se pipetearon 200 microlitros de diversas muestras de leche, contaminadas con concentraciones conocidas de antibióticos, en los viales de ensayo y se incubaron durante el tiempo prescrito (en este ensayo, 2 horas y 10 minutos) y a la temperatura prescrita (64 grados C +/- 2 grados C). La incubación se realizó en una incubadora Charm I Inctronic. Los resultados se registraron inmediatamente después de terminar el ensayo (Color 1) y después de dejar en reposo a temperatura ambiente durante 16 horas (Color 2). Los resultados presentados están en partes por billón (ppb). Se evaluaron 4 muestras para cada concentración, excepto para el control negativo de leche (16 muestras) y 3 ppb de pen G (2 muestras) y amoxicilina (2 muestras). Las abreviaturas son penicilina G (PenG); sulfametazina (SMZ); sulfadimetoxina (SDM); tilosina (TY); gentamicina (G); oxitetraciclina (OT); pirlimicina (Pirl); amoxicilina (Amox); ampicilina (Amp); cloxacilina (Clox); ceftiofur sodio (Ceft); cefaprina (Ceph); tilmicosina (Til); sulfadoxina (SDN); neomicina (Neo). Los resultados de color 1 y 2 son un resultado negativo, 3 es un resultado límite y 4 y 5 son un resultado positivo.

Tabla 4

Fármaco:	Conc.	Color 1	% Pos.	Color 2	% Pos.	Niveles de tolerancia	
						EE.UU.	UE/MRL
PenG	4	5	100%	5	100%	5	4
PenG	3	5	100%	5	100%	5	4
Amox	6	5	100%	5	100%	10	4
Amp	5	5	100%	4	100%	10	4
Clox	30	4	100%	5	100%	10	30
Clox	50	5	100%	5	100%	10	30
OT	200	2	0%	2	0%	300	100
OT	300	5	100%	4	100%	300	100
SMZ	100	5	100%	5	100%	10	100

Fármaco:	Conc.	Color 1	% Pos.	Color 2	% Pos.	Niveles de tolerancia	
						EE.UU.	UE/MRL
SMZ	200	5	100%	4	100%	10	100
SDM	25	4	100%	5	100%	10	100
SDM	50	5	100%	5	100%	10	100
G	300	4	100%	4	100%	30	100
G	400	5	100%	5	100%	30	100
TY	40	5	100%	4	100%	50	50
TY	50	5	100%	5	100%	50	50
Pirl	100	4	100%	4	100%	400	100
Pirl	200	5	100%	5	100%	400	100
Ceft	50	1	0%	1	0%	50*	100**
Ceft	100	2	0%	2	0%	50*	100**
Ceph	10	5	100%	5	100%	20	60
SDN	100	5	100%	4	100%	NL	NL
Til	80	5	100%	5	100%	NL	NL
Neo	750	5	100%	5	100%	NL	NL
Leche	0	1	0%***	1	0%	N/A	N/A

* fármaco original presentado

** fármaco original total y metabolito

*** muestras de tanque en masa individuales

Ejemplo 7: Preparación de cultivo que contiene dos tampones

Se puede usar el siguiente cultivo para la detección de antibióticos y otros inhibidores en una serie de matrices que incluyen, por ejemplo, orina, carne, ave de corral, marisco, leche o muestras de riñón, y se puede usar en una variedad de formatos que incluyen ejemplos de ajuste de sensibilidad o de servicio sencillo.

- 5 Se preparó una disolución de Trizma/Succinato añadiendo 2,5 gramos de Base Trizma y 6 gramos de Succinato a 100 mL de agua desionizada/ósmosis inversa (agua DI/OI) en un matraz de 125 mL. Entonces se añadieron 40 miligramos de BCP (véase el Ejemplo 1 para la preparación de BCP) a un tubo cónico de 50 mL y se añadieron 25 mL de la disolución de Trizma/Succinato a los 40 miligramos de BCP y se mezcló.

- 10 El medio se preparó disolviendo 5 gramos de glucosa y 1 gramo de caldo Mueller Hinton en 100 mL de agua DI/OI. Se añadieron 1,2 mL de una disolución 0,01 mg/mL de trimetoprim en agua DI/OI al medio. Se añadieron 20 mL de la preparación de BCP/Trizma/Succinato al medio y el medio se filtró en condiciones estériles a través de un filtro de 0,45 micras y se enfrió a 4 grados c.

- 15 Se combinaron 0,3 gramos de Difco Bacto-Agar (Referencia nº 0140-01), 0,225 de NaCl y 17 mL de agua DI/OI y se mezclaron y calentaron hasta 95°C. La mezcla se retiró del calor y se dejó enfriar hasta 75°C y a continuación se añadieron 6 mL de medio (con BCP/Tris) y se mezcló durante 5 minutos. La mezcla se enfrió hasta 57°C y se añadieron 2 mL de esporas (concentración de 1000 millones de cfu/mL) y se mezcló durante 5 minutos. Se dispensaron 0,200 mL en el fondo de cada vial. Tras dispensar, se llevaron a cabo ensayos para determinar si la sensibilidad era la adecuada. Si la sensibilidad no era la adecuada, se repite el procedimiento usando más esporas (si es sub-sensible) o menos esporas (si es sobre-sensible).

- 20 La siguiente Tabla 5 muestra los resultados de ensayos de detección de antibióticos realizados usando el cultivo descrito en el Ejemplo 6. En la operación del ensayo se pipetearon 200 microlitros de varias muestras de leche, contaminadas con concentraciones conocidas de antibióticos, en viales y se incubaron durante el tiempo prescrito (en este ensayo, 2 horas 30 minutos) y a la temperatura prescrita (64 grados C +/- 2 grados C). Los resultados se registraron inmediatamente después de la finalización del ensayo y 16 horas después. La incubación se realizó en varias incubadoras Charm Inctronic I. Las concentraciones presentadas están en partes por billón (ppb). Se analizaron 4 muestras para cada concentración, excepto las 16 muestras negativas y 2 muestras para cada uno de los ensayos de 3 ppb de pen G y amoxicilina. Las abreviaturas son penicilina G (PenG); sulfametazina (SMZ); sulfadimetoxina (SDM); tilosina (TY); gentamicina (G); oxitetraciclina (OT); pirlimicina (Pirl); amoxicilina (Amox); ampilicina (Amp); cloxacilina (Clox); ceftiofur sodio (Ceft); cefaprina (Ceph); tilmicosina (Til); sulfadoxina (SDN); neomicina (Neo).
- 25
- 30

Tabla 5

Fármaco:	Conc.	Resultado	% Pos.	Resultado 16 h	% Pos.	Niveles de tolerancia	
						EE.UU.	UE/MRL
PenG	4	Pos	100%	Pos	100%	5	4
PenG	3	Pos	100%	Pos	100%	5	4
Amox	6	Pos	100%	Pos	100%	10	4
Amp	5	Pos	100%	Pos	100%	10	4
Clox	30	Pos	100%	Pos	100%	10	30
Clox	50	Pos	100%	Pos	100%	10	30
OT	200	Pos	0%	Pos	0%	300	100
OT	300	Pos	100%	Pos	100%	300	100
SMZ	100	Pos	100%	Pos	100%	10	100
SMZ	200	Pos	100%	Pos	100%	10	100
SDM	25	Pos	100%	Pos	100%	10	100
SDM	50	Pos	100%	Pos	100%	10	100
G	300	Pos	100%	Pos	100%	30	100
G	400	Pos	100%	Pos	100%	30	100
TY	40	Pos	100%	Pos	100%	50	50
TY	50	Pos	100%	Pos	100%	50	50
Pirl	100	Pos	100%	Pos	100%	400	100
Pirl	200	Pos	100%	Pos	100%	400	100
Ceft	50	Pos	100%	Pos	100%	50*	100**
Ceft	100	Pos	100%	Pos	100%	50*	100**
Ceph	10	Pos	100%	Pos	100%	20	60
SDN	100	Pos	100%	Pos	100%	NL	NL
Til	80	Pos	100%	Pos	100%	NL	NL
Neo	750	Pos	100%	Pos	100%	NL	NL
Leche	0	Neg	0%***	Neg	0%	N/A	N/A

* fármaco original sólo

** fármaco original total y metabolito

*** muestras de tanque en masa individuales

Ejemplo 8: Preparación de cultivo que contiene dos tampones

Se puede usar el siguiente cultivo para la detección de antibióticos y otros inhibidores en una serie de formatos y matrices que incluyen, por ejemplo, orina, leche o muestras de riñón.

- 5 Se preparó una disolución de BCP/Borato/Succinato añadiendo 3,8 gramos de borato y 2,7 gramos de succinato a 100 mL de agua desionizada/ósmosis inversa (agua DI/OI) en un matraz de 125 mL. Se añadieron 100 miligramos de BCP a un tubo cónico de 50 mL y se añadieron 25 mL de la disolución de borato/succinato a los 100 miligramos de BCP y se mezclaron.

- 10 Para preparar el medio, se disolvieron 5 gramos de glucosa en 100 mL de agua DI/OI. Se añadieron 1,2 mL de una disolución de 0,01 mg/mL de trimetoprim en agua DI/OI al medio junto con 20 mL de la preparación de BCP/borato/succinato. El medio se filtró en condiciones estériles a través de un filtro de 0,45 micras y se enfrió hasta 4 grados C.

- 15 Se combinaron 0,3 gramos de Difco Bacto-Agar (referencia nº 0140-01), 0,225 de NaCl y 18 mL de agua DI/OI y se mezcló y calentó hasta 95°C. A continuación se dejó enfriar la mezcla hasta 75°C, tras lo cual se añadieron 6 mL de medio y se mezcló durante 5 minutos. Entonces se dejó enfriar la mezcla hasta 57°C y se añadió 1 mL de esporas (concentración de 1000 millones de cfu/mL) y se mezcló durante 5 minutos. Se dispensaron 0,200 mL en el fondo de cada vial.

Tras dispensar, se llevan a cabo ensayos para determinar si la sensibilidad es la adecuada. Si la sensibilidad no es

la adecuada se repite el procedimiento usando más esporas (si es sub-sensible) o menos esporas (si es sobre-sensible).

Ejemplo 9 – Dispensar el cultivo

- 5 Para dispensar de forma eficiente el cultivo (tal como se requiere en los ejemplos previos), que contiene esporas de *B. st.*, en el fondo del vial 4, el agar debe calentarse hasta aproximadamente 57 grados C. Se dispensa rápidamente, por ejemplo en menos de una hora, preferiblemente en 45 minutos o menos, de tal modo que el cultivo pueda enfriarse rápidamente. Si el cultivo no se enfría rápidamente las esporas, por ejemplo esporas de *B. st.*, pueden germinar prematuramente. Es decir, las esporas germinarían antes de la aplicación de la muestra. Una germinación prematura excesiva reduciría la sensibilidad del ensayo.
- 10 Otro método para evitar una germinación prematura de esporas, que puede usarse sólo o en combinación con un dispensado rápido, consiste en aumentar el pH del cultivo, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente pH 11. El aumento de pH proporciona condiciones no óptimas para la germinación de esporas. El aumento de pH también permite una mayor estabilidad en periodos de tiempo de almacenamiento largos.

Ejemplo 10 – Tampón de dilución

- 15 En algunas realizaciones y ejemplos, tales como el ejemplo 4, en los que la matriz de la muestra que se está evaluando es variable, se puede usar un tampón de dilución para estandarizar la matriz de la muestra. En el ejemplo 4 se describe un ensayo para orina. En este ejemplo, para estandarizar la muestras de orina antes de su evaluación, se diluye la muestra aproximadamente 1 a 20 con una mezcla de agente de extracción (4,8 gramos de Base Trizma al 47,2% y fosfato potásico monobásico al 52,5% en 1000 mL de agua DI/OI, el pH debería ser de 7,5 +/- 0,10)
- 20 combinado con aproximadamente 8-10 gramos por litro de extracto de carne. Otras muestras, que incluyen piensos y agua, se pueden diluir de manera similar (por ejemplo el agua se diluye 1 a 5, el pienso 1 a 30). Diluyendo la muestra se reduce de forma similar la sensibilidad del ensayo.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para reducir la sensibilidad frente a una familia de antibióticos de beta-lactama de un ensayo de inhibición de crecimiento microbiano para detectar la presencia de inhibidores microbianos en una muestra, que comprende:

- 5 a) preparar un cultivo microbiano que presentará inhibición de crecimiento cuando se ponga en contacto con un antibiótico de beta-lactama;
- b) añadir una proteína de unión de beta-lactama al cultivo;
- c) añadir la muestra al cultivo;
- d) desarrollar el cultivo;
- 10 e) cuantificar el crecimiento de cultivo,

en donde la falta de crecimiento de cultivo refleja la presencia de un inhibidor de crecimiento microbiano y en donde la sensibilidad del ensayo a la familia de beta-lactamas se reduce añadiendo proteína de unión de beta-lactama.

15 **2.-** El método de la reivindicación 1 que además comprende extraer el antibiótico de la muestra y añadir el extracto al cultivo.

3.- El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de unión de beta-lactama se combina con la muestra antes o después de añadir la muestra al cultivo.

4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la proteína de unión de beta-lactama se añade al cultivo antes o después de añadir la muestra al cultivo.

20 **5.-** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo microbiano comprende esporas.

6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende añadir al cultivo microbiano al menos dos tampones, en donde uno de dichos al menos dos tampones tiene un pKa por encima de 7 y el otro de dichos tampones tiene un pKa inferior a 7.

25 **7.-** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH del cultivo microbiano, antes de añadir la muestra, está por encima de aproximadamente pH 8,0.

8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cuantificación del crecimiento del cultivo comprende determina un cambio en el pH del cultivo.

30 **9.-** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de unión de beta-lactama procede de un organismo del género *Bacillus*.

10.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de unión de beta-lactama procede de la familia microbiana presente en el cultivo microbiano.

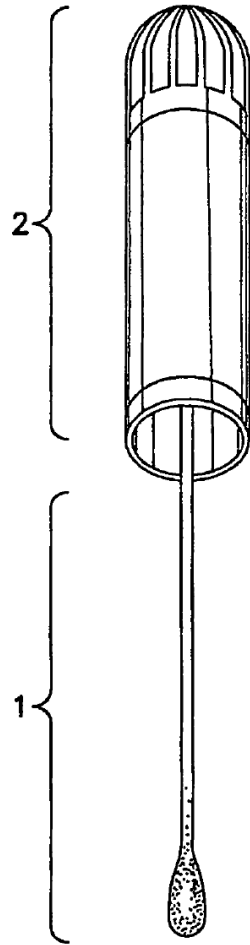


FIG. 1

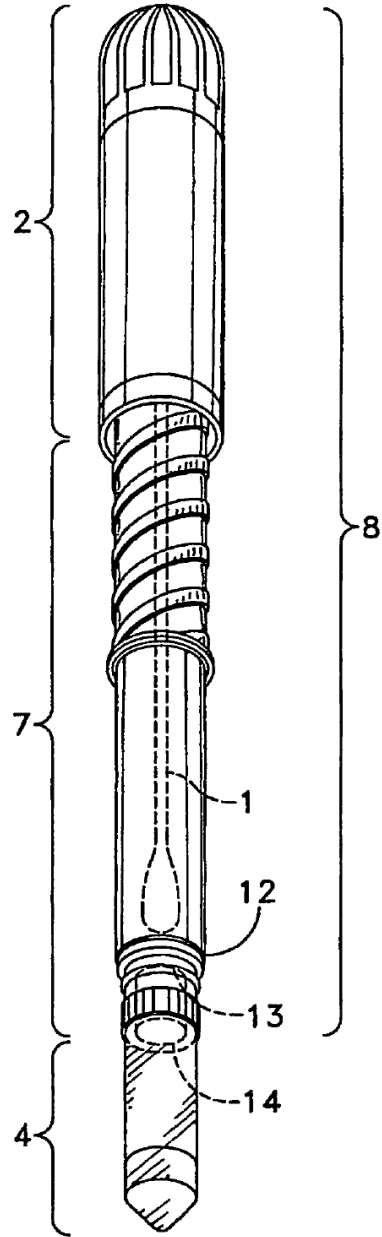


FIG. 2

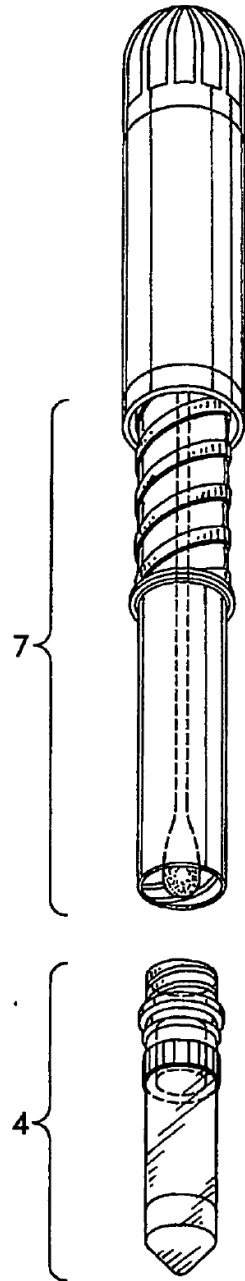


FIG. 3

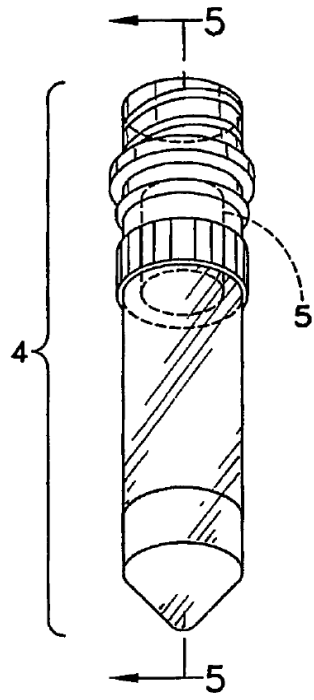


FIG. 4

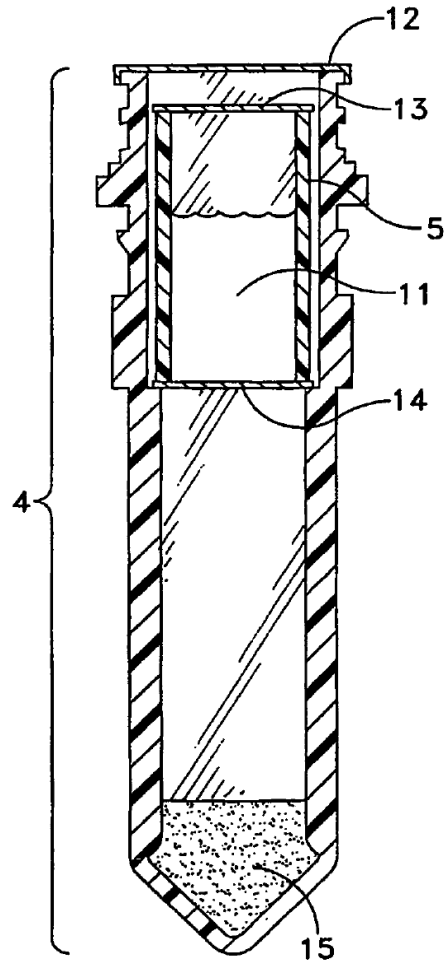


FIG. 5

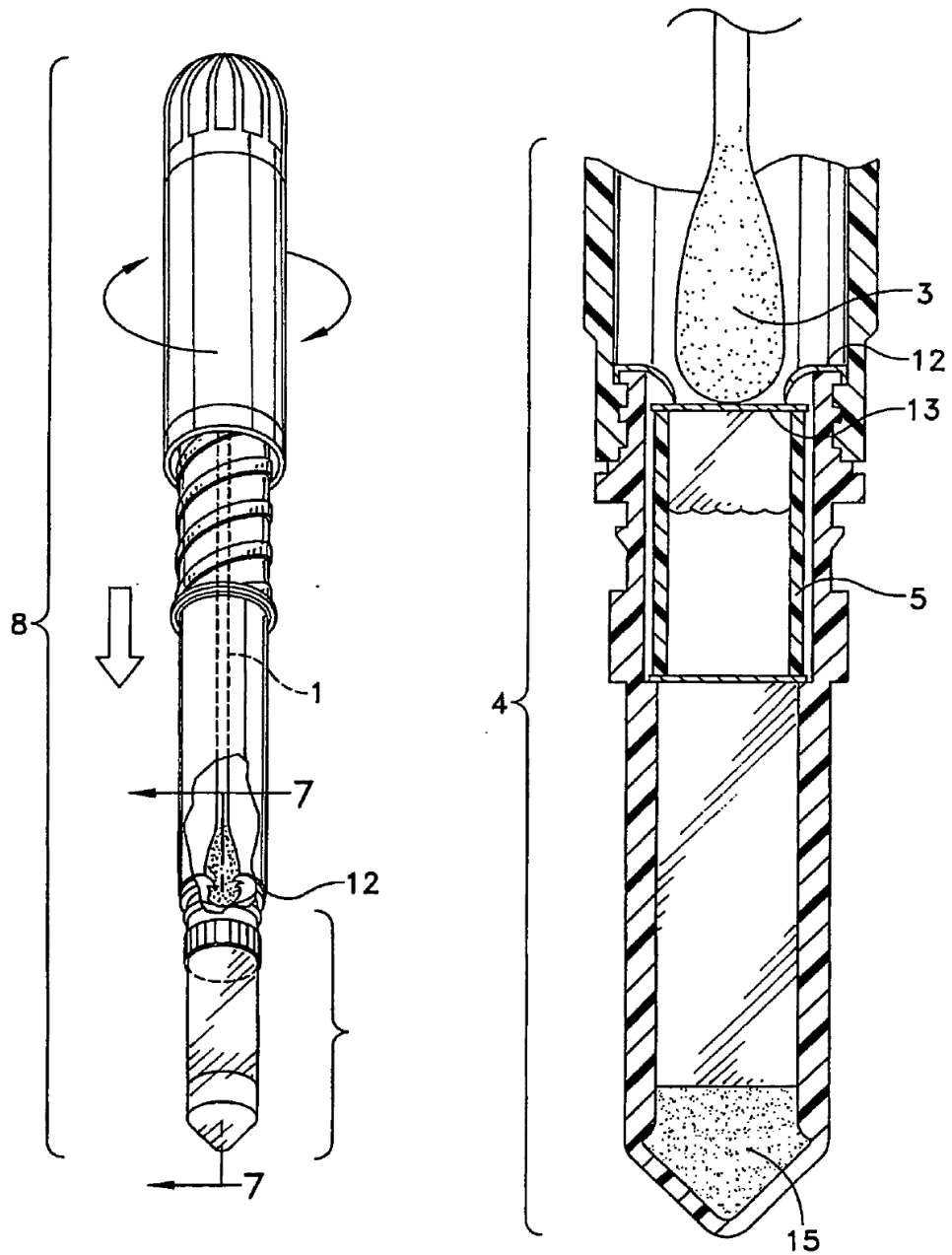


FIG. 6

FIG. 7

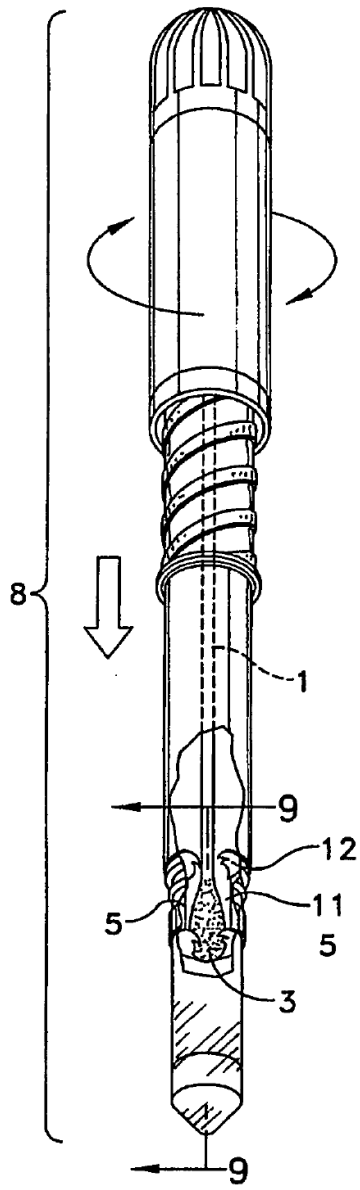


FIG. 8

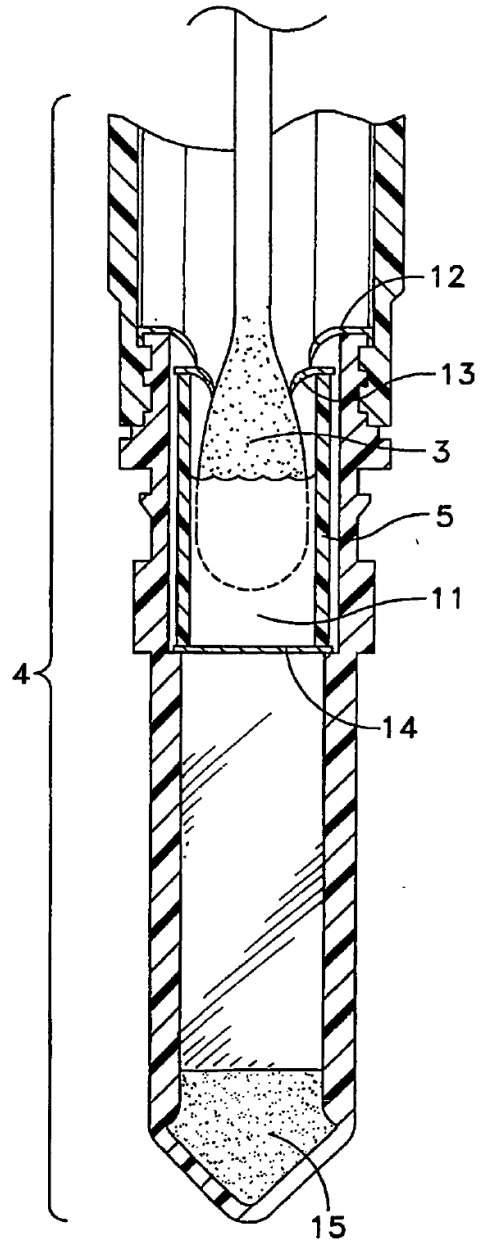


FIG. 9

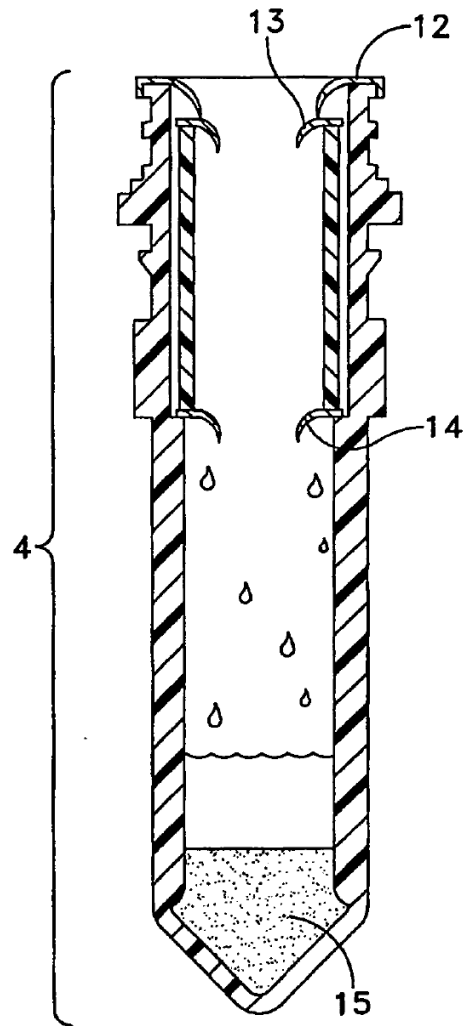


FIG. 10

