

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 974**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013** **E 13186447 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016** **EP 2713162**

54 Título: **Procedimiento de medición y kit para la medición de la concentración de antibióticos**

30 Prioridad:

27.09.2012 KR 20120108074

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

25.04.2017

73 Titular/es:

**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION
FOUNDATION DANKOOK UNIVERSITY (33.3%)
126 Jukjeon-dong, Suji-gu, Yongin-si
Gyeonggi-do 448-701, KR;
REPUBLIC OF KOREA (MINISTRY OF FOOD AND
DRUG SAFETY) (33.3%) y
SPECIALTY LAB SOLUTION CO., LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LIM, HEUNG BIN;
KO, JUNG AH;
KIM, SU JI;
PARK, KI HWAN;
KIM, KYU HEON;
LEE, HWA JUNG y
HAN, SANG BAE**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 609 974 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

Procedimiento de medición y kit para la medición de la concentración de antibióticos.

5 REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud de Patente Coreana Nº 2012-0108074 depositada el 27 de septiembre de 2012 en la Korean Intellectual Property Office (KIPO).

10 ANTECEDENTES

1. Campo técnico

[0002] Los ejemplos de realizaciones de la presente invención se refieren en general a un procedimiento y a un kit para la medición de la concentración de un antibiótico.

2. Técnica relacionada

[0003] Los antibióticos son metabolitos que son producidos por microorganismos, y por lo tanto pueden ser usados en pequeñas cantidades para inhibir el crecimiento de otros microorganismos o para destruir otros microorganismos. Por lo tanto, los antibióticos han sido ampliamente usados en los animales destinados al consumo doméstico, tales como cerdos, pollos y reses. Sin embargo, dado que los antibióticos usados en los animales destinados al consumo doméstico no se descomponen fácilmente en el cuerpo de un animal, los antibióticos pueden ser fácilmente introducidos en el cuerpo del animal cuando se ingiere el animal destinado al consumo doméstico.

25 Los antibióticos introducidos en el cuerpo del animal pueden afectar al sistema nervioso central, y desencadenar también resistencias en los patógenos a los suministros médicos.

[0004] Por lo tanto, la monitorización de la concentración de los antibióticos en los animales destinados al consumo doméstico se considera uno de los aspectos clave en los ensayos de seguridad alimentaria.

30

[0005] El documento JP H 07 151756 A describe un procedimiento para la medición de un anticuerpo. Para separar de forma rápida y fácil sustancias sin reaccionar de un producto de reacción y limpiar las sustancias sin reaccionar, se usan partículas magnéticas y partículas fluorescentes. Se hacen reaccionar un primer reactivo que contiene partículas magnéticas insolubles portadoras del anticuerpo que se encuentra con el anticuerpo que se va a medir, y el anticuerpo que se va a medir, entre sí en un medio líquido contenido en un recipiente de reacción.

35 Después de la reacción, las partículas magnéticas son atraídas hacia la pared del recipiente mediante la utilización de la acción de un campo magnético, y el medio líquido se retira del recipiente. Entonces se hace reaccionar un segundo agente que contiene partículas insolubles marcadas con un pigmento fluorescente portadoras de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo que se va a medir, y las partículas magnéticas atraídas hacia la

40 pared del recipiente, entre sí, en el medio líquido. A continuación, las partículas magnéticas son atraídas de nuevo hacia la pared del recipiente mediante la utilización de la acción del campo magnético, y el medio líquido y las partículas marcadas con pigmento sin reaccionar se retiran, y después se mide la intensidad de la fluorescencia de las partículas marcadas con pigmento que han reaccionado con las partículas magnéticas.

45 **[0006]** YOSHIO KOBAYASHI ET AL: "Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a seeded polymerization technique and their photo-bleaching property" COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, vol. 242, nº 1-3. 15 de junio de 2004, páginas 47-53, describen el recubrimiento con sílice de microesferas de poliestireno incorporadas con colorantes fluorescentes (microesferas fluorescentes) mediante una técnica de polimerización por siembra basada en el método de Stober. El recubrimiento con sílice de

50 los microesferas fluorescente se lleva a cabo en presencia de 0-10 g/l de polivinilpirrolidona (PVP), 1,13-17 M de agua, 0-1,2 M de amoníaco acuoso y 0,00038-0,2 M de tetraetoxiortosilicato (TEOS). La adición de PVP suprime la producción de partículas libres de sílice y mejora la uniformidad del espesor de la cubierta. El espesor de la cubierta de sílice aumenta desde 13 hasta 138 nm con un aumento en la concentración de TEOS a 10 g/l PVP, 0,4 M de amoníaco acuoso y 10,9 M de agua. El espesor también aumenta con la concentración de amoníaco y con la

55 concentración de agua. Las microesferas fluorescentes recubiertas de sílice muestran una fluorescencia más estable a la irradiación con un láser que las microesferas no recubiertas.

[0007] WACHIRA TANSUB ET AL: "Synthesis of Antibodies-Conjugated Fluorescent Dye-Doped Silica Nanoparticles for a Rapid Single Step Detection of Campylobacter jejuni in Live Poultry", JOURNAL OF

NANOMATERIALS, vol. 22, nº 1, 1. Enero de 2012, páginas 1743-7, describen la preparación de nanopartículas de sílice dopadas con un colorante fluorescente conjugadas con anticuerpos (FDS-NP) para la detección de células de *Campylobacter jejuni* bajo un microscopio de fluorescencia. Las partículas preparadas mediante técnicas de microemulsión en sol-gel tienen una forma redonda con un tamaño medio de 43 ± 4 nm. Son muy fotoestables y emiten una fuerte fluorescencia de color naranja durante 60 min. Ambas propiedades funcionalizadas de amina y de carboxilo son evidentes a partir de los espectros de FTIR y de FT Raman. Las FDS-NP conjugadas con anticuerpos contra *C. jejuni* están bien dispersadas en una solución de PBS a 20 mM de NaCl. La conjugación con anticuerpos monoclonales contra *C. jejuni* tuvo éxito. La observación directa de las FDS-NP conjugadas con anticuerpos que se unen a *C. jejuni* con una cámara de recuento de Petroff Hausser a 40x es evidente. Las diferentes distancias focales separan claramente bajo el microscopio las FDS-NP unidas de las no unidas.

[0008] HECTOR FONT ET AL: "Immunochemical Assays for Direct Sulfonamide Antibiotic Detection In Milk and Hair Samples Using Antibody Derivatized Magnetic Nanoparticles", Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 56, no. 3, 13 de febrero de 2008, páginas 736-743, describen dos ensayos de inmunoadsorción enzimática directa (ELISA) para la detección de residuos del antibiótico sulfonamida en muestras de leche. Uno de ellos es la utilización de nanopartículas magnéticas (MNP) para la captura/enriquecimiento del objetivo (Ab-MNP-ELISA), y el segundo se lleva a cabo mediante la utilización de placas de microtitulación. Unos anticuerpos policlonales selectivos, creados contra el ácido 5-[6-(4-amino-bencensulfonilamino)-piridin-3-il]-2-metil-pentanoico (SA1), usados junto con un trazador enzimático preparado con el mismo hapteno, permitieron alcanzar un límite de detección (LOD) menor de $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ para ambos formatos de ELISA. Se detectan sulfapiridina, sulfametoxipiridazina, sulfatiazol y sulfacrolpiridazina por debajo de los límites residuales máximos establecidos por la Unión Europea para estos antibióticos en la leche ($100 \mu\text{g l}^{-1}$). Los estudios de los efectos y la precisión de la matriz realizados con leche entera y con extractos de cabello indicaron la ausencia de interferencias de estas matrices de muestras y unos valores de recuperación muy buenos, especialmente cuando se usa el formato Ab-MNP. Las muestras de leche y los extractos de cabello se miden sin ningún tratamiento previo.

RESUMEN

[0009] Consecuentemente, se proporcionan ejemplos de realizaciones de la presente invención para obviar sustancialmente uno o más de los problemas debidos a las limitaciones y los inconvenientes de la técnica anterior.

[0010] Los ejemplos de realizaciones de la presente invención proporcionan un procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico, que incluye procesos simples y tiene un límite de detección bajo.

[0011] También, los ejemplos de realizaciones de la presente invención proporcionan un kit para la medición de la concentración de un antibiótico, que incluye procesos simples y tiene un límite de detección bajo.

[0012] En algunos ejemplos de realizaciones, un procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico incluye la preparación de partículas magnéticas unidas a un antibiótico, la preparación de partículas fluorescentes recubiertas con sílice a las que está unido que al menos un anticuerpo del antibiótico, dejando que las partículas magnéticas reaccionen con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, e irradiando las partículas fluorescentes recubiertas con sílice que han reaccionado con haces de láser.

[0013] En otros ejemplos de realizaciones, un kit para la medición de la concentración de un antibiótico incluye una primera unidad de medición que comprende partículas magnéticas a las que está unido un grupo funcional capaz de unirse a un antibiótico, y una segunda unidad de medición que comprende partículas fluorescentes recubiertas con sílice a las que está unido un anticuerpo del antibiótico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] Los ejemplos de realizaciones de la presente invención serán más evidentes mediante la descripción detallada de los ejemplos de realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos anexos, en los que:

la FIG. 1 es un diagrama que muestra las fórmulas químicas de los antibióticos enrofloxacino, ciprofloxacino, salinomocina y sulfatiazol;

la FIG. 2 es un diagrama conceptual que muestra esquemáticamente un procedimiento para la medición de la concentración de enrofloxacino según un ejemplo de realización de la presente invención;

la FIG. 3 es un diagrama de flujo que muestra esquemáticamente un procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención;

la FIG. 4 es una gráfica que muestra los resultados de la medición del isotiocianato de fluoresceína (FITC) y de las partículas de FITC recubiertas con sílice en una prueba de estabilidad frente al pH;

la FIG. 5 es una gráfica que muestra los resultados de la medición del FITC, de partículas de formadas por FITC y de partículas de FITC recubiertas con sílice en una prueba de estabilidad frente al fotoblanqueamiento;

5 la FIG. 6 es una gráfica que muestra los resultados de la medición del FITC en una prueba de estabilidad de inactivación con metales; y

la FIG. 7 es una gráfica que muestra los resultados de la medición las partículas de FITC recubiertas con sílice en una prueba de estabilidad de inactivación con metales.

10 DESCRIPCIÓN DE LOS EJEMPLOS DE REALIZACIONES

[0015] Los ejemplos de realizaciones de la presente invención se describen en el presente documento. Sin embargo, los detalles específicos estructurales y funcionales descritos en el presente documento son únicamente con fines representativos de la descripción de los ejemplos de realizaciones de la presente invención, sin embargo,
15 los ejemplos de realizaciones de la presente invención pueden realizarse en muchas formas alternativas y no deben ser interpretados como limitados a los ejemplos de realizaciones de la presente invención establecidos en el presente documento.

[0016] Consecuentemente, aunque la invención es susceptible de varias modificaciones y formas alternativas, a modo de ejemplo se muestran en los dibujos realizaciones específicas de la misma, y se describirán en el presente documento con detalle. Sin embargo, debe entenderse que no hay intención de limitar la invención a las formas descritas en particular, sino más bien al contrario, la invención debe cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que estén en el ámbito de la invención. A lo largo de la descripción de las figuras, los mismos números se refieren a los mismos elementos.
25

[0017] Se entenderá que, aunque en el presente documento pueden usarse los términos primero, segundo, etc. para la descripción de varios elementos, estos elementos no deben estar limitados por estos términos. Estos términos se usan únicamente para distinguir los elementos entre sí. Por ejemplo, un primer elemento podría ser denominado como un segundo elemento, y de forma similar, un segundo elemento podría ser denominado como un
30 primer elemento, sin desviarse del ámbito de la presente invención. Según se usa en el presente documento, el término "y/o" incluye cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los elementos indicados asociados.

[0018] Se entenderá que cuando se indica que un elemento está "conectado" o "acoplado" con otro elemento, puede estar conectado o acoplado directamente al otro elemento, o puede haber presentes elementos
35 intervinientes. Por el contrario, cuando se indica que un elemento está "conectado directamente" o "acoplado directamente" a otro elemento, no hay ningún elemento interviniente presente. Otras palabras que pueden usarse para la descripción de la relación entre los elementos deben ser interpretadas de una forma similar (es decir, "entre" frente a "directamente entre," "adyacente" frente a "directamente adyacente," etc.).

[0019] La terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones en particular, y no pretende ser limitante de la invención. Según se usa en el presente documento, las formas singulares "un," "uno/a" y "el/la" pretenden incluir también las formas plurales, salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Adicionalmente se entenderá que los términos "comprende", "que comprende," "incluye"
45 y/o "que incluye", cuando se usan en el presente documento, indican la presencia de las características, los números enteros, las etapas, las operaciones, los elementos y/o los componentes establecidos, pero no excluyen la presencia o la adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos.

[0020] Salvo que se definan de otro modo, todos los términos (incluyendo los términos técnicos y científicos)
50 usados en el presente documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Adicionalmente se entenderá que los términos, tales como los definidos en los diccionarios de uso habitual, deben ser interpretados de forma que tengan un significado que sea coherente con su significado en el contexto de la técnica pertinente, y no deben ser interpretados en un sentido idealizado o excesivamente formal, salvo que expresamente así se defina en el presente documento.

[0021] También debe apreciarse que en algunas implementaciones alternativas, las funciones/actos indicados en los bloques pueden producirse fuera del orden establecido en los diagramas de flujo. Por ejemplo, dos bloques mostrados sucesivamente pueden ser ejecutados de hecho sustancialmente simultáneamente, o a veces los bloques pueden ejecutarse en el orden inverso, dependiendo de la funcionalidad/actos implicados.
55

[0022] A continuación, en lo sucesivo, se describirán los ejemplos de realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos anexos.

5 **[0023]** La FIG. 1 es un diagrama que muestra las fórmulas químicas de los antibióticos enrofloxacino, ciprofloxacino, salinomicina y sulfatiazol. La FIG. 2 es un diagrama conceptual que muestra esquemáticamente un procedimiento para la medición de la concentración de enrofloxacino según un ejemplo de realización de la presente invención. La FIG. 3 es un diagrama de flujo que muestra esquemáticamente un procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención. A continuación, en lo
10 sucesivo se describirá con detalle adicional el procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico con referencia a las FIGS. 1, 2 y 3.

[0024] El procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención incluye la preparación de partículas magnéticas unidas a un antibiótico, la
15 preparación de partículas fluorescentes recubiertas con sílice a las que se ha unido al menos un anticuerpo del antibiótico, dejando que las partículas magnéticas reaccionen con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S3), e irradiando las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, que han reaccionado con las partículas magnéticas, con haces de láser (S5).

20 **[0025]** El antibiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en enrofloxacino, ciprofloxacino, salinomicina y sulfatiazol.

[0026] Antes de la preparación de las partículas magnéticas unidas al antibiótico, el procedimiento según un ejemplo de realización puede incluir adicionalmente un pretratamiento del antibiótico (S11). Esto es, según un
25 ejemplo de realización de la presente invención, en primer lugar pueden eliminarse las grandes cantidades de proteína y de grasa presentes en la carne de los animales domésticos, tales como un cerdo, un pollo y reses, y puede extraerse un antibiótico de la carne. Algunos ejemplos de procedimientos para la eliminación de las proteínas de la carne pueden incluir la introducción de acetonitrilo en la carne, seguido de someter a la carne a una agitación vorticial y a ultrasonidos. También, un ejemplo de un procedimiento de eliminación de grasas de la carne puede
30 incluir un procedimiento que incluye la recolección del sobrenadante a partir de una solución de la cual se retiran las proteínas, la adición de hexano en la misma proporción de volumen que el acetonitrilo, y someter el sobrenadante a una agitación vorticial y a ultrasonidos. Para la eliminación de las impurezas residuales, puede llevarse a cabo adicionalmente la eliminación de las impurezas que tienen un tamaño de 0,2 μm o más mediante el uso de un filtro de jeringa.

35 **[0027]** La preparación de las partículas magnéticas unidas al antibiótico puede incluir la unión de un grupo amino a las superficies de las partículas magnéticas (S12), y la formación de un enlace amida entre el grupo amino unido a las partículas magnéticas y el antibiótico (S14). En este caso, la unión del grupo amino de las partículas magnéticas (S12) incluye la adición de 3-aminopropiltriethoxisilano (3-APTES) y de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) a
40 las partículas magnéticas, y la agitación de la mezcla resultante.

[0028] Adicionalmente puede llevarse a cabo la adición de un agente de reticulación (S 13) después de la unión del grupo amino a las superficies de las partículas magnéticas (S12). En este caso, como agente de reticulación puede usarse al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en N-(3-dimetilaminopropil)-N'-
45 etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

[0029] El procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención puede incluir adicionalmente la recolección de las partículas magnéticas que han formado el enlace amida con el antibiótico mediante el uso de un imán (S 15) después de la formación del
50 enlace amida entre las partículas magnéticas con el grupo amino unido y el antibiótico. Cuando las partículas magnéticas se recogen mediante el uso del imán, puede facilitarse un aumento en la concentración del antibiótico, que favorece la medición de la concentración del antibiótico.

[0030] La preparación de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice puede incluir la formación de
55 partículas fluorescentes recubiertas con sílice mediante el recubrimiento de partículas fluorescentes que incluyen un primer material fluorescente, con sílice (S21), y la unión de al menos un anticuerpo del antibiótico a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice. Este primer material fluorescente puede ser al menos un material seleccionado entre isotiocianato de fluoresceína (FITC) y cianina (Cy).

5 **[0031]** Aquí, las partículas fluorescentes que incluyen el primer material fluorescente pueden prepararse mediante la completa disolución del primer material fluorescente en un disolvente orgánico mediante la adición del primer material fluorescente al disolvente orgánico y la aplicación de ultrasonidos al primer material fluorescente, y agitando en el disolvente orgánico en el que el primer material fluorescente se disuelve en un estado protegido de la luz.

10 **[0032]** La formación de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice mediante el recubrimiento de las partículas fluorescentes que incluyen el primer material fluorescente con sílice (S21) puede incluir la formación de un sistema en microemulsión inversa mediante la mezcla de una sal de docusato de sodio y agua desionizada (DIW) con heptano y la agitación de la mezcla resultante, la adición de las partículas fluorescentes que incluyen el primer material fluorescente al sistema en microemulsión inversa con agitación, y la adición de TEOS y de NH₄OH en un estado protegido de la luz.

15 **[0033]** Las partículas fluorescentes recubiertas con sílice pueden ser preparadas a entre 10 y 90 °C, y preferentemente a entre 75 y 85 °C.

20 **[0034]** Dado que las superficies de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice están recubiertas con sílice, las partículas fluorescentes recubiertas con sílice pueden verse menos afectadas por una variedad de factores externos. Por ejemplo, cuando las partículas fluorescentes están unidas directamente a moléculas biológicas, la inactivación puede tener lugar debido a varios factores externos tales como disolventes, aire, metales, sales y similares, y con el tiempo puede haber una tendencia a que se produzca una disminución en el grado de fluorescencia. Dado que las partículas fluorescentes recubiertas con sílice se preparan mediante el recubrimiento de las partículas fluorescentes con sílice, las partículas fluorescentes recubiertas con sílice pueden servir para prevenir cualquier efecto de los diversos factores externos y mantener de forma continua el grado inicial de fluorescencia, incluso con el paso del tiempo. Cuando las partículas fluorescentes son recubiertas con sílice de una manera similar, las partículas fluorescentes tienen la ventaja de que pueden ser protegidas frente al fotoblanqueamiento causado por los haces de láser usados como fuente luminosa, y mantener un grado constante de fluorescencia incluso cuando se produce un cambio en el pH.

30 **[0035]** La unión del al menos un anticuerpo del antibiótico a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice puede incluir la unión de un grupo carboxílico a las superficies de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S22), y la formación de un enlace amida entre las partículas fluorescentes recubiertas con sílice con el grupo carboxílico unido y el anticuerpo del antibiótico (S24).

35 **[0036]** La unión del grupo carboxílico a la superficie de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S22) puede incluir la mezcla de 3-APTES y de TEOS con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice con agitación, y la disolución de anhídrido succínico en dimetilsulfóxido (DMSO), y la mezcla de la mezcla resultante con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice con agitación.

40 **[0037]** El procedimiento según la presente invención puede incluir adicionalmente la adición de un agente de reticulación (S23) después de la unión del grupo carboxílico a las superficies de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S22). Aquí, el agente de reticulación puede seleccionarse entre N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), y una combinación de los mismos.

45 **[0038]** El procedimiento según la presente invención puede incluir adicionalmente la medición de la cantidad de anticuerpo del antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S25) después de la unión del uno o más anticuerpos de los antibióticos a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice. Por lo tanto, cuando a continuación se mide la cantidad de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice mediante el uso de un ensayo de fluorescencia, puede medirse fácilmente la cantidad del anticuerpo del antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, lo que hace posible reducir adicionalmente el límite de detección de la medición de la concentración del antibiótico unido al anticuerpo del antibiótico.

50 **[0039]** La medición de la cantidad de anticuerpo del antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S25) puede incluir la mezcla de un segundo material fluorescente al que está unido un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo del antibiótico, con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, y la medición del primer material fluorescente y del segundo material fluorescente mediante el uso de rayos de luz con diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, cuando se mide el grado de fluorescencia del primer material fluorescente mediante el uso de rayos de luz con unas primeras longitudes de onda, que inciden sobre el primer material fluorescente, el grado de fluorescencia del segundo material fluorescente se mide mediante el uso de rayos

de luz con unas segundas longitudes de onda, que inciden sobre el segundo material fluorescente, y se comparan y analizan los grados de fluorescencia del primer y del segundo material fluorescente, puede medirse la cantidad de antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice individuales.

5 **[0040]** La reacción de las partículas magnéticas con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S3) puede incluir la realización de una reacción de antígeno/anticuerpo entre el antibiótico unido a las partículas magnéticas y el anticuerpo del antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice. La reacción de antígeno/anticuerpo es muy específica, dado que esta reacción se realiza seleccionando únicamente un antígeno contra el anticuerpo. Dado que el anticuerpo del antibiótico selecciona y reacciona únicamente con el antibiótico, las
10 partículas magnéticas unidas al antibiótico pueden unirse a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice unidas al anticuerpo del antibiótico. Por lo tanto, puede asociarse directamente el grado de fluorescencia de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice con la concentración del antibiótico.

[0041] Después de la reacción de las partículas magnéticas con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice (S3), el procedimiento según la presente invención puede incluir adicionalmente la recolección de las
15 partículas magnéticas, que han reaccionado con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, mediante el uso de un imán (S4). Cuando las partículas magnéticas se recogen mediante el uso del imán, puede aumentarse la concentración del antibiótico y de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, lo que favorece la medición de la concentración del antibiótico.
20

[0042] La recolección de las partículas magnéticas, que han reaccionado con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, mediante el uso del imán (S4) puede llevarse a cabo junto con la recolección de las partículas magnéticas que forman el enlace amida con los antibióticos mediante el uso del imán (S 15), o puede llevarse a cabo una de las operaciones de recolección.
25

[0043] La irradiación de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, que han reaccionado con las partículas magnéticas, con haces de láser (S5) puede incluir adicionalmente la medición del grado de fluorescencia de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice mediante el uso de un ensayo de fluorescencia. El ensayo de fluorescencia puede ser, por ejemplo, un ensayo mediante el uso de un microscopio de fluorescencia inducida por
30 láser (LIFM).

[0044] El procedimiento descrito anteriormente para la medición de la concentración de un antibiótico puede ser útil para medir rápidamente la concentración del antibiótico con unos procesos simples y baratos. También, según el procedimiento descrito anteriormente para la medición de la concentración de un antibiótico, la
35 concentración del antibiótico objetivo que se va a medir puede medirse de forma precisa incluso cuando el antibiótico objetivo está presente en una cantidad extremadamente pequeña. Esto es, el límite de detección para la medición de la concentración de un antibiótico mediante el uso de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) es de aproximadamente 1 ppb, pero el límite de detección del procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención puede reducirse hasta
40 0,045 ppb.

[0045] En lo sucesivo, a continuación, se describirá el kit para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención. Dado que el kit para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención es el kit usado en el
45 procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico según un ejemplo de realización de la presente invención, por claridad se describirán las diferencias entre los dos kits.

[0046] El kit para la medición de la concentración de un antibiótico incluye una primera unidad de medición que comprende partículas magnéticas a las que se ha unido un grupo funcional capaz de unirse al antibiótico, y una
50 segunda unidad de medición que comprende partículas fluorescentes recubiertas con sílice a las que se ha unido un anticuerpo del antibiótico. En este caso, el grupo funcional capaz de unirse al antibiótico puede ser un grupo amino.

[0047] El kit para la medición de la concentración de un antibiótico es fácilmente portátil dado que el kit incluye únicamente la primera unidad de medición y la segunda unidad de medición. Según se ha descrito
55 anteriormente, el kit para la medición de la concentración de un antibiótico también puede usarse para medir rápidamente una concentración muy pequeña del antibiótico con unos procesos simples y baratos.

[0048] A continuación, en lo sucesivo, se describirá la presente invención con más detalle mediante los Ejemplos preparativos, los Ejemplos experimentales y los Ejemplos comparativos. Sin embargo, debería entenderse

que los detalles descritos en el presente documento se proporcionan únicamente a modo de ilustración de la presente invención, y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

<Ejemplo preparativo 1> Elaboración de un kit para la medición de la concentración de enrofloxacin

5

(1) Preparación de partículas magnéticas a las que se ha unido un grupo amino

[0049] Se añadieron 55 µl de 3-APTES y de TEOS conjuntamente a partículas magnéticas, y se hicieron reaccionar durante 24 horas con agitación para la unión de un grupo amino a las superficies de las partículas magnéticas.

10

(2) Preparación de partículas de FITC recubiertas con sílice a las que se ha unido al menos un anticuerpo de enrofloxacin

15 ① Preparación de partículas de núcleo que incluyen FITC (denominadas en lo sucesivo "partículas de FITC")

[0050] Se añadieron 10 mg de FITC a 10 ml de etanol, y se sometieron a ultrasonidos durante 5 minutos de forma que se disolviera completamente el FITC en el etanol. A continuación se añadieron al mismo 50 µl de 3-APTES, y se agitó durante 24 horas con una barra imantada. La agitación se lleva a cabo en un estado en el que se protegía de la luz con papel de plata, de forma que se evitara el contacto directo del FITC con la luz.

20

② Preparación de partículas de FITC recubiertas con sílice

[0051] Se añadieron 5 mmol de sal de docusato de sodio y 860 µl de DIW a 48 ml de heptano, y se agitaron con una barra imantada durante 10 minutos para preparar un sistema en microemulsión inversa. Se añadieron 300 µl de partículas fluorescentes que incluían FITC al sistema de microemulsión inversa, y se agitó con una barra imantada durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 430 µl de TEOS y 270 µl de NH₄OH al 25 % que servían como catalizador, y se hicieron reaccionar durante 24 horas en un estado protegido de la luz por papel de plata.

25

30 ③ Unión del grupo carboxílico a las superficies de las partículas de FITC recubiertas con sílice

[0052] Se añadieron 55 µl de 3-APTES y de TEOS conjuntamente a las partículas de FITC recubiertas con sílice, y se hicieron reaccionar durante 24 horas con agitación para la activación de un grupo amino en superficies de las partículas de FITC recubiertas con sílice. A continuación, para sustituir el grupo amino por un grupo carboxílico, se disolvió anhídrido succínico en DMSO, se añadió a las partículas de FITC recubiertas con sílice, y se hicieron reaccionar de nuevo durante 2 horas con agitación.

35

④ Unión de al menos un anticuerpo de enrofloxacin a las partículas de FITC recubiertas con sílice a las que se ha unido un grupo carboxílico

40

[0053] Los agentes de reticulación, EDC y NHS, se añadieron conjuntamente en una proporción de 2:1 a las partículas de FITC recubiertas con sílice con el grupo carboxílico unido. A continuación se añadieron 10 µl de un anticuerpo de enrofloxacin, y se hicieron reaccionar durante 2 horas.

45 **<Ejemplo preparativo 2> Elaboración de un kit para la medición de la concentración de ciprofloxacino**

[0054] Se elaboró un kit para la medición de la concentración de ciprofloxacino sustancialmente de la misma forma que en el Ejemplo preparativo 1, excepto porque se usó un anticuerpo de ciprofloxacino en lugar del anticuerpo de enrofloxacin usado en el Ejemplo preparativo 1.

50

<Ejemplo preparativo 3> Elaboración de un kit para la medición de la cantidad del anticuerpo unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice

(1) Preparación de partículas de Cy5 recubiertas con sílice a las que se ha unido al menos un anticuerpo de enrofloxacin

55

[0055] Se prepararon partículas de Cy5 recubiertas con sílice a las que se ha unido al menos un anticuerpo de enrofloxacin sustancialmente de la misma forma que en el Ejemplo preparativo 1 (2), excepto porque se usó Cy5 en lugar del FITC usado en el Ejemplo preparativo 1 (2).

(2) Preparación de FITC al que se ha unido un anticuerpo secundario específico de enrofloxacin

[0056] Los agentes de reticulación EDC y NHS se añadieron conjuntamente en una proporción de 2:1 al FITC. A continuación se añadieron 100 µl de un anticuerpo secundario específico del anticuerpo de enrofloxacin, y se hicieron reaccionar durante 2 horas.

<Ejemplo preparativo 4> Preparación de la muestra de pretratamiento

[0057] Para eliminar las proteínas se añadió acetonitrilo a una muestra de carne picada. La mezcla resultante complementada con un disolvente se sometió a una agitación vorticial y a ultrasonidos con agitación durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió, y se añadió hexano en la misma proporción de volumen que el acetonitrilo, de forma que se eliminaran las grasas. A continuación, el sobrenadante se sometió a una agitación vorticial y a ultrasonidos con agitación durante 10 minutos. Después se eliminó una capa de grasa. Para eliminar las impurezas residuales, las impurezas con un tamaño de 0,2 µm o más se eliminaron mediante el uso de un filtro de jeringa.

<Ejemplo experimental 1> Prueba de estabilidad de las partículas de FITC recubiertas con sílice

(1) Prueba de estabilidad frente al pH

[0058] Se preparó un vial, se almacenó en HNO₃ al 20 % y se lavó varias veces con DIW para eliminar los metales presentes en el vial, o los iones capaces de tener cualquier efecto. Se pusieron soluciones (desde pH 1 hasta 13) en viales a unas dosis de 1 ml. Para la preparación de las soluciones con un pH desde 1 hasta 13, los valores de pH de las soluciones se ajustaron con NaOH y HNO₃. Se añadieron 2 µl de las partículas fluorescentes, es decir, FITC o partículas de FITC recubiertas con sílice, a las soluciones, y se hicieron reaccionar durante una hora mientras se rotaban con un rotador. El grado de fluorescencia se midió mediante el uso de un LIFM. Los resultados de la medición obtenidos en la prueba de estabilidad frente al pH se muestran en la FIG. 4.

(2) Prueba de estabilidad frente al fotoblanqueamiento

[0059] Se disolvió FITC en etanol y se diluyó con DIW. También se diluyeron las partículas de FITC y las partículas de FITC recubiertas con sílice con DIW, y se probaron de la misma forma a la descrita, preparando así una muestra. La muestra se irradió de forma continua con haces de láser, y la intensidad de la fluorescencia se midió cada minuto durante un total de 20 minutos mediante el uso de un tubo fotomultiplicador (PMT) y un contador de fotones. Los resultados obtenidos en la medición de la prueba de estabilidad frente al fotoblanqueamiento se muestran en la FIG. 5.

(3) Prueba de estabilidad de inactivación con metales

[0060] Las concentraciones de Na⁺ y de K⁺ en forma de iones cloruro se ajustaron a 0, 10, 50, 100, 200, 500, 700, 1.000 y 5.000 µg/ml. Las soluciones de metales preparadas se pusieron en viales a unas dosis de 1 ml según la concentración, y se añadieron 2 µl de las partículas fluorescentes, es decir, de FITC o de las partículas de FITC recubiertas con sílice, a los viales, y se mezclaron concienzudamente. Se midieron los grados de fluorescencia de las mezclas resultantes mediante el uso de un LIFM, un PMT y un contador de fotones. Debido a que el FITC no se disuelve fácilmente en el DIW, el FITC se disolvió en 1 mg/ml de etanol, y se diluyeron 10 µl de la solución con 1 ml del DIW que se va a usar. Los resultados obtenidos en la medición de la prueba de estabilidad de inactivación con metales se muestran en las FIG. 6 y 7. La FIG. 6 muestra los resultados de la medición del FITC en la prueba de estabilidad de inactivación por metales, y la FIG. 7 muestra los resultados de la medición de las partículas de FITC recubiertas con sílice en la prueba de estabilidad de inactivación por metales.

<Ejemplo experimental 2> Experimento para la medición de la cantidad de anticuerpo unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice

[0061] La cantidad de anticuerpo unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice se midió mediante el uso del kit elaborado en el Ejemplo preparativo 3. Más particularmente, se preparó una mezcla que incluye partículas de Cy5 recubiertas con sílice a las que se ha unido al menos un anticuerpo de enrofloxacin, y FITC al que se ha unido un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo de enrofloxacin. La mezcla se irradió con haces de láser rojo de He/Ne a 632,8 nm para la medición del grado de fluorescencia de Cy5, y con haces de láser azul a 473 nm en estado sólido bombeado por diodo (DPSS) mediante el uso de un LIFM. Se compararon y analizaron el grado de fluorescencia de la Cy5, que representa la cantidad de partículas de Cy5 recubiertas con

silíce, y el grado de fluorescencia del FITC, que representa la cantidad del anticuerpo de enrofloxacino. Como resultado se reveló que el anticuerpo de enrofloxacino estaba presente a una concentración de 5,28 nmol en las superficies de las partículas de Cy5 recubiertas con sílice.

5 <Ejemplo 1 > Experimento para o la medición de la concentración de enrofloxacino

[0062] Cuando se midieron 10 ng/ml de enrofloxacino con el kit para la medición de la concentración de enrofloxacino preparado en el Ejemplo preparativo 1, se midieron 6,95 ng/ml de enrofloxacino.

10 <Ejemplo 2> Experimento para la medición de la concentración de ciprofloxacino

[0063] Cuando se midieron 10 ng/ml de ciprofloxacino con el kit para la medición de la concentración de ciprofloxacino preparado en el Ejemplo preparativo 2, se midieron 7,34 ng/ml de ciprofloxacino.

15 <Ejemplo comparativo 1>

[0064] Cuando se midieron 10 ng/ml de enrofloxacino con el kit para la medición de la concentración de enrofloxacino mediante el uso de un ELISA, se midieron 2,17 ng/ml de enrofloxacino.

20 <Ejemplo comparativo 2>

[0065] Cuando se midieron 10 ng/ml de ciprofloxacino con el kit para la medición de la concentración de ciprofloxacino mediante el uso de un ELISA, se midieron 2,94 ng/ml de ciprofloxacino.

25 [0066] Según los ejemplos de realizaciones de la presente invención, el procedimiento y el kit para la medición de la concentración de un antibiótico tienen los siguientes efectos.

[0067] Esto es, puede medirse la concentración del antibiótico rápidamente con procesos simples y baratos.

30 [0068] También puede medirse la concentración exacta del antibiótico, que está presente en una cantidad extremadamente baja.

[0069] Los efectos según la presente invención no están limitados por la descripción detallada ilustrada anteriormente, y en esta memoria descriptiva está incluida una amplia variedad efectos.

35

[0070] Mientras que se han descrito con detalle los ejemplos de realizaciones de la presente invención y sus ventajas, debería entenderse que en el presente documento pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y alteraciones sin desviarse del ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la medición de la concentración de un antibiótico, que comprende:
- 5 la preparación de partículas magnéticas unidas a un antibiótico;
la preparación de partículas fluorescentes recubiertas con sílice a las que se ha unido al menos un anticuerpo del antibiótico;
dejar que las partículas magnéticas reaccionen con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice; e
la irradiación de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, que han reaccionado con las partículas
10 magnéticas, con haces de láser.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el antibiótico es al menos un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en enrofloxacino, ciprofloxacino, salinomina y sulfatiazol.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la preparación de las partículas magnéticas unidas al antibiótico comprende:
- la unión de un grupo amino a las superficies de las partículas magnéticas; y
la formación de un enlace amida entre las partículas magnéticas con el grupo amino unido, y el antibiótico.
20
4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente:
- la adición de un agente de reticulación después de la unión del grupo amino a las superficies de las partículas magnéticas.
25
5. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente:
- la recolección de las partículas magnéticas que forman el enlace amida con el antibiótico mediante el uso de un imán después de la formación del enlace amida entre las partículas magnéticas con el grupo amino unido y el
30 antibiótico.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la preparación de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice comprende:
- 35 la formación de partículas fluorescentes recubiertas con sílice mediante el recubrimiento de partículas fluorescentes que incluyen un primer material fluorescente con sílice; y
la unión de al menos un anticuerpo del antibiótico a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el primer material fluorescente es al menos un
40 material fluorescente seleccionado del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína y cianina.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la unión del anticuerpo del antibiótico a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice comprende:
- 45 la unión de un grupo carboxílico a las superficies de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice; y
la formación de un enlace amida entre las partículas fluorescentes recubiertas con sílice con el grupo carboxílico unido y el anticuerpo del antibiótico.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
- 50 la adición de un agente de reticulación después de la unión del grupo carboxílico a las superficies de las partículas fluorescentes recubiertas con sílice.
10. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente:
- 55 la medición de la cantidad del anticuerpo del antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice después de la unión del uno o más anticuerpos del antibiótico a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la medición de la cantidad de anticuerpo del

antibiótico unido a las partículas fluorescentes recubiertas con sílice comprende:

la mezcla de un segundo material fluorescente al que se han unido anticuerpos secundarios específicos del anticuerpo del antibiótico con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice; y

5 la medición del primer material fluorescente y del segundo material fluorescente mediante el uso de rayos de luz con diferentes longitudes de onda.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

10 la recolección de las partículas magnéticas, que han reaccionado con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice, mediante el uso de un imán después de la reacción de las partículas magnéticas con las partículas fluorescentes recubiertas con sílice.

13. Un kit para la medición de la concentración de un antibiótico, que comprende:

15

una primera unidad de medición que comprende partículas magnéticas a las que se ha unido un grupo funcional capaz de unirse a un antibiótico; y

una segunda unidad de medición que comprende partículas fluorescentes recubiertas con sílice a las que se ha unido un anticuerpo del antibiótico.

20

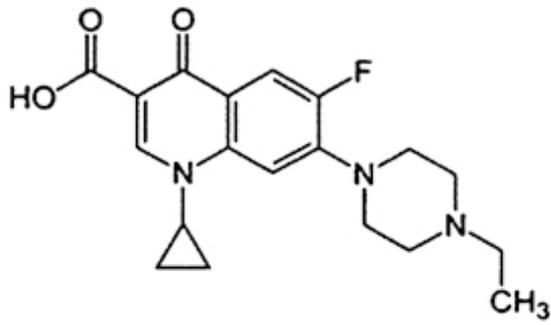
14. El kit de la reivindicación 13, en el que el grupo funcional es un grupo amino.

15. El kit de la reivindicación 13, en el que el antibiótico es al menos un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en enrofloxacino, ciprofloxacino, salinomicina y sulfatiazol.

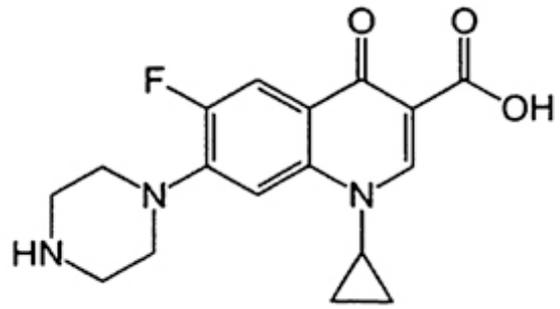
25

16. El kit de la reivindicación 13, en el que las partículas fluorescentes recubiertas con sílice son al menos un material fluorescente seleccionado del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína y cianina.

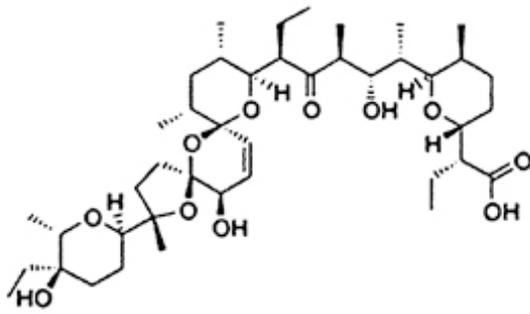
FIG. 1



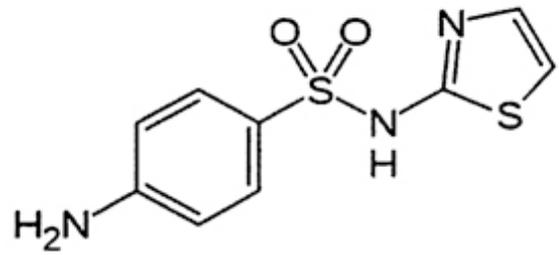
Enrofloxacin



Ciprofloxacin



Salinomycin



Sulfathiazol

FIG. 2

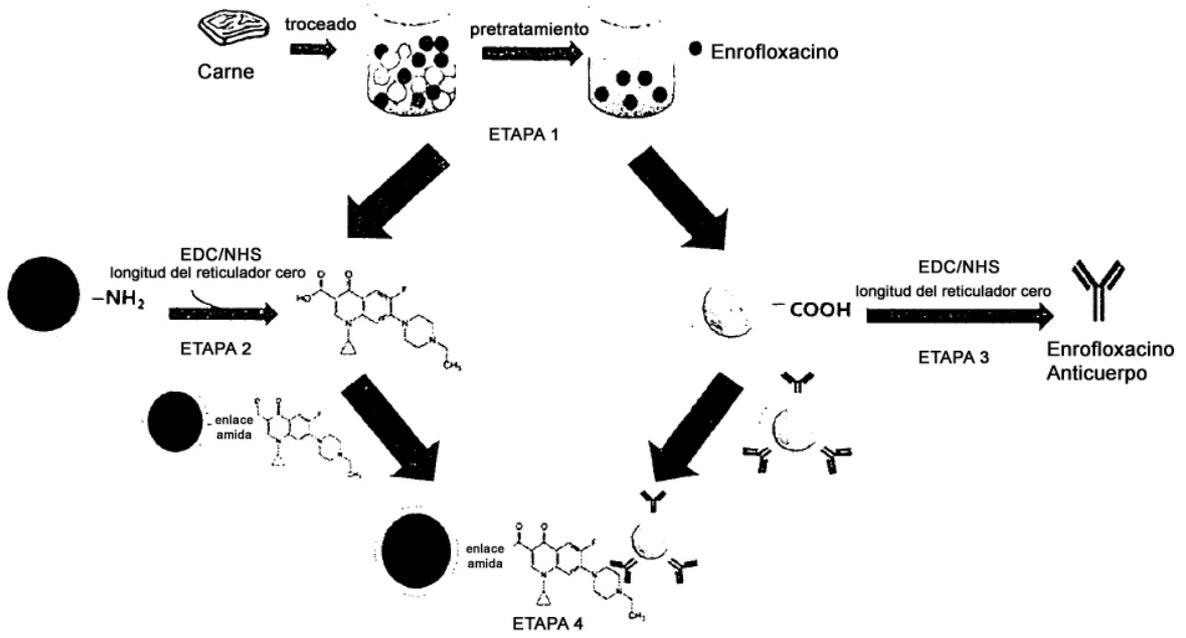


FIG. 3

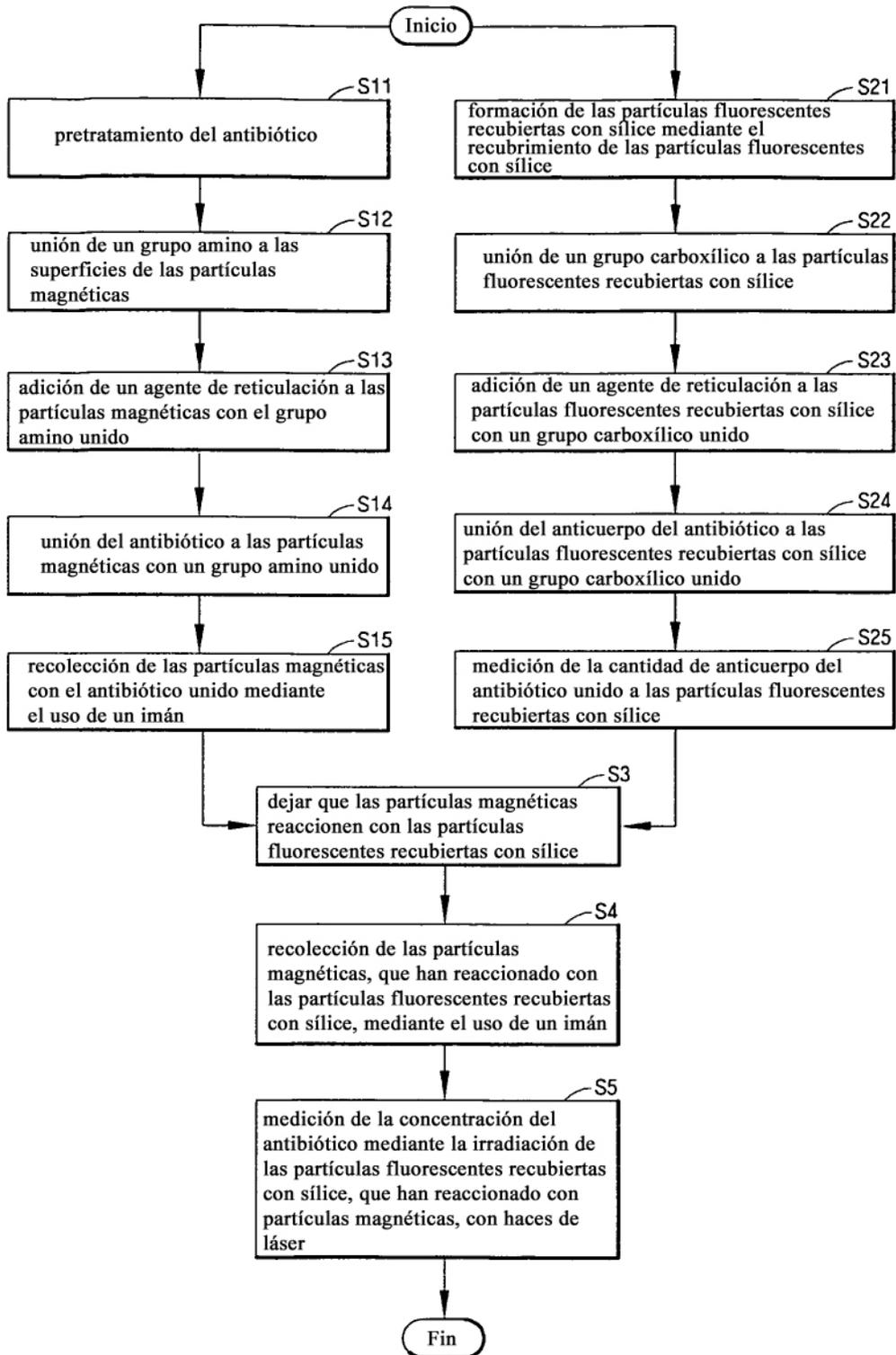


FIG. 4

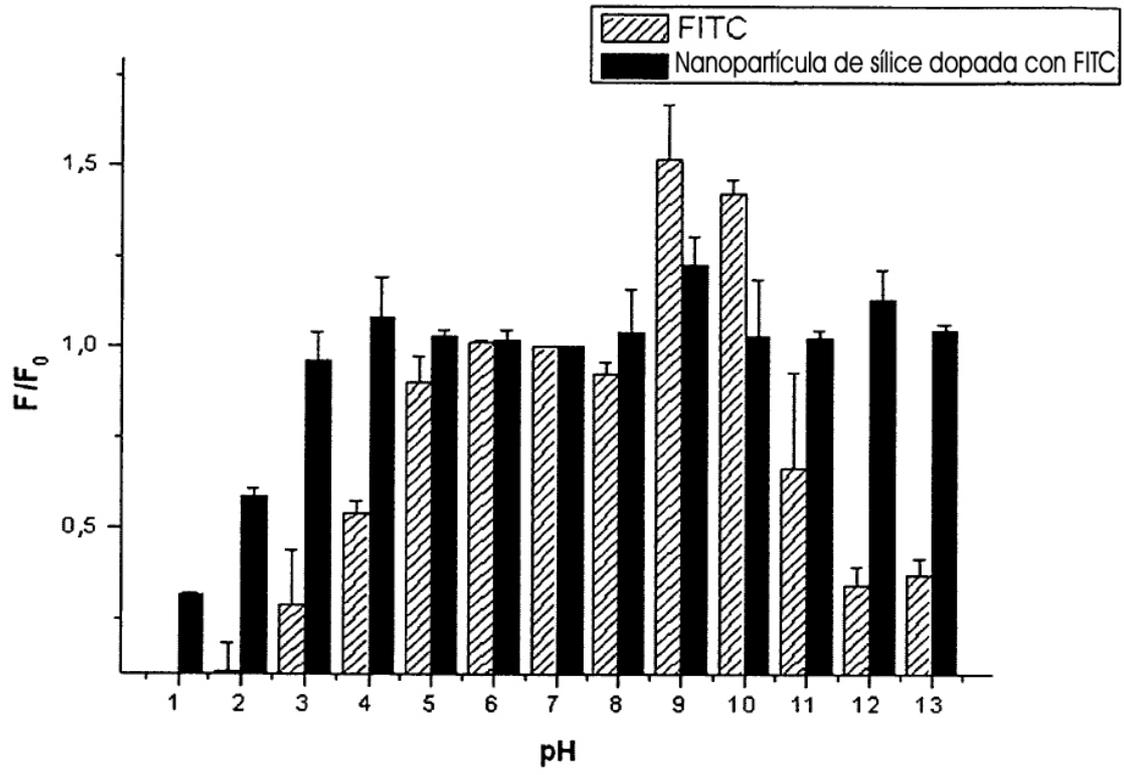


FIG. 5

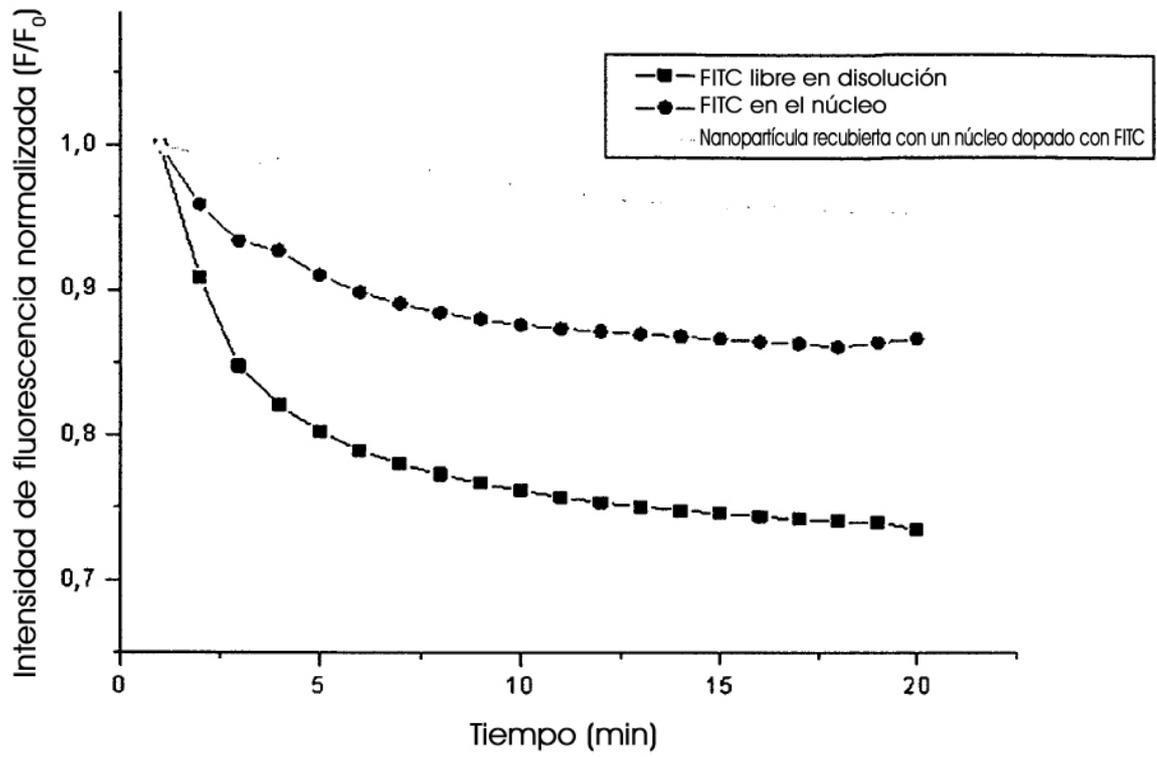


FIG. 6

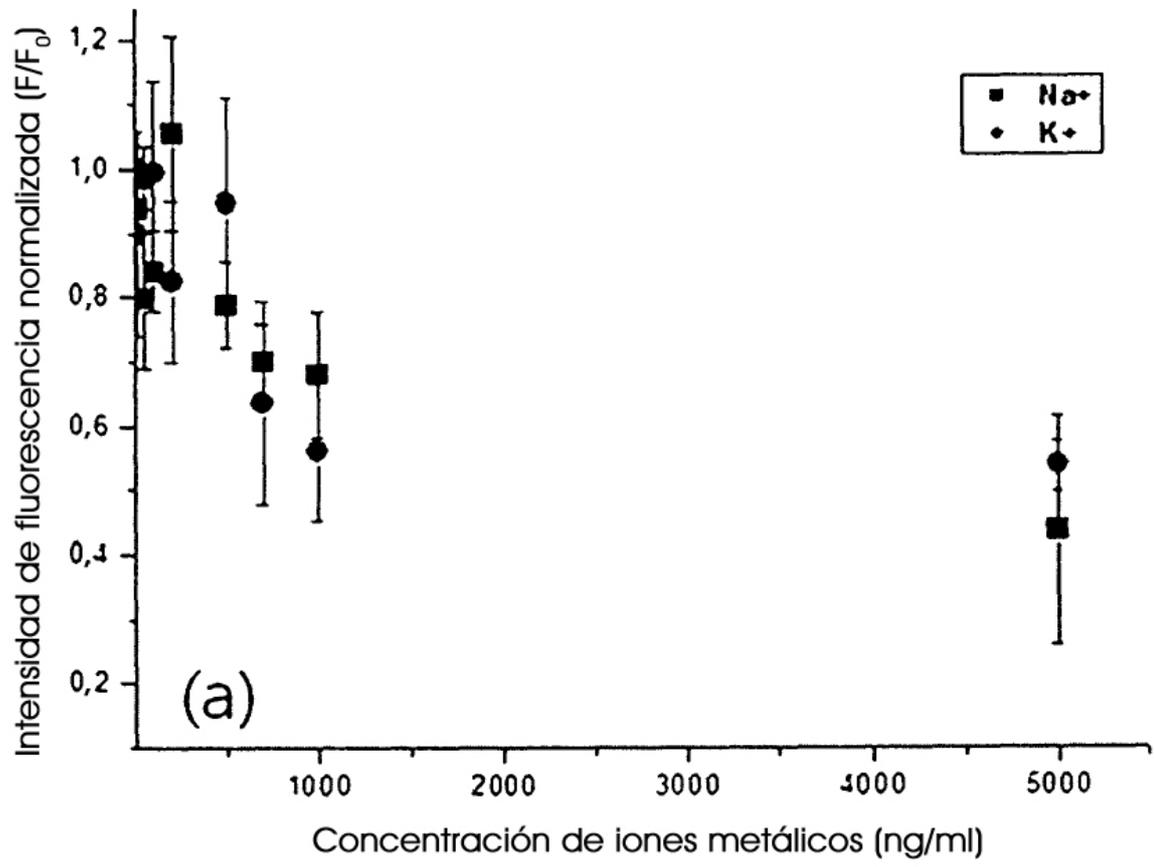


FIG 7

