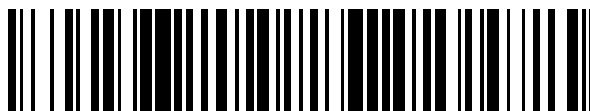


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 065**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/EP2012/074742**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12797927 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2788765**

54 Título: **Método de detección de bacterias en la leche**

30 Prioridad:

09.12.2011 EP 11192838

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

18.07.2017

73 Titular/es:

SIETZEMA, SIETZE (100.0%)

J. Wapstraweg 4

8385 GS Vledderveen, NL

72 Inventor/es:

SIETZEMA, SIETZE

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 625 065 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 detección de bacterias en la leche

5 **Antecedentes de la invención**

10 [0001] Ciertas bacterias ocasionan enfermedades, especialmente mastitis, en las vacas lecheras, cuya enfermedad puede afectar negativamente la calidad de la leche. Así p. ej., la mastitis es una enfermedad infecciosa en la ubre o los pezones de una vaca individual, y en la leche producida por tales vacas estarán generalmente presentes bacterias de mastitis. Pueden ser varios los distintos tipos de bacterias que intervengan ocasionando mastitis, es decir que no hay un solo tipo o una sola cepa de bacteria de mastitis, sino muchos. Los tipos de bacterias que ocasionan mastitis generalmente varían según los casos.

15 [0002] Puesto que especialmente en las operaciones de producción de productos lácteos a escala industrial los productos lácteos son generalmente producidos mezclando la leche de una pluralidad de vacas, dichos productos contendrán cierta cantidad de gérmenes indeseables, como p. ej. bacterias productoras de mastitis, cuando algunas vacas estén infectadas, aunque la mayoría de las vacas que generan la leche estén sanas. Sin embargo, no son predecibles a priori los tipos y las concentraciones de las células bacterianas comprendidas en la leche infectada que termine siendo mezclada con la leche finalmente reunida.

20 [0003] La mastitis es controlada por el gobierno en muestras de leche para el control del pago. Una concentración demasiado alta de bacterias en la leche suministrada es una indicación de mastitis, de forma tal que el productor de leche obtiene tan sólo un precio más bajo por unidad cuantitativa de leche suministrada. Tras varios suministros con una alta cuenta de células bacterianas, el suministro de leche puede ser incluso de hecho prohibido.

25 [0004] Cuando se produce mastitis, los veterinarios (o los productores de leche) vienen a menudo usando un cóctel de antibióticos a fin de matar y/o desmembrar las bacterias, en la esperanza de que el cóctel cubra el espectro bacteriano realmente presente, pero sin determinar inicialmente qué tipos de bacteria están de hecho interviniendo. En el peor de los casos se usan unos tras otros o bien simultáneamente antibióticos incorrectos, o antibióticos no específicamente adecuados para ese tipo particular o esos tipos particulares de bacterias.

30 [0005] Este uso incontrolado de antibióticos viene ocasionando cada vez más mutaciones bacterianas que presentan una incrementada inmunidad contra los antibióticos. Ésta es una situación peligrosa también para la salud pública.

35 **Breve Exposición de la Invención**

40 [0006] Es un importante objetivo de la invención el de crear un método perfeccionado para detectar bacterias de distintos tipos en la leche, especialmente en un sistema de detección (total o al menos parcialmente) automática. En realizaciones preferidas, la invención permite la detección selectiva y específica de bacterias o tipos de bacterias, y prominentemente entre los mismos, de bacterias productoras de mastitis. La invención permite tal detección específica también cuando está presente en la leche más de un tipo de bacteria, puesto que permite la detección de varios distintos tipos de bacterias consecutiva o simultáneamente. El método inventivo además hace posible determinar el tipo o los tipos de bacterias que esté/n ocasionando la infección, tal como p. ej. la mastitis, a fin de estar en condiciones de seleccionar y dosificar los antibióticos correctos a administrar a la vaca.

45 Estos y otros objetivos son alcanzados por el contenido definido en las reivindicaciones adjuntas.

50 [0007] Más específicamente, un método perfeccionado para detectar bacterias en la leche incorpora los pasos definidos en la reivindicación 1. La leche es puesta en contacto con una preparación que comprende una cantidad eficaz de más de un tipo de anticuerpos, fijándose cada tipo a un distinto tipo de bacterias a detectar, o a una pluralidad de tales tipos; antes o después de dicha puesta en contacto, dichos anticuerpos son coloreados con una preparación colorante, siendo dicha preparación colorante seleccionada de forma tal que los anticuerpos coloreados con la misma presentan una diferencia de concentración de color y/o un cambio de color al quedar en contacto con dichas bacterias. La concentración de anticuerpos coloreados fijados a las bacterias en dicha leche es determinada a partir de la presencia y en su caso de la intensidad relativa del color producido poniendo a dicha leche en contacto con dichos anticuerpos coloreados sin separar las bacterias de la leche, usando un colorante fluorescente para anticuerpos y un citómetro de flujo como detector. Estos pasos pueden usarse en cualquier secuencia adecuada, en donde generalmente, sin embargo, el paso de utilizar la concentración de color producida combinando los anticuerpos coloreados con las bacterias necesariamente irá a continuación del paso en poner en contacto a dichos anticuerpos y dichas bacterias.

55 En realizaciones preferidas, el método inventivo comprende:

60 a dicho método, en donde dichos anticuerpos son capaces de fijarse específicamente a bacterias productoras de mastitis;

a dicho método, en donde dicha preparación comprende más de dos, más preferiblemente más de tres, aún más preferiblemente más de cuatro y con la máxima preferencia cinco o más tipos distintos de anticuerpos, fijándose cada tipo específicamente a un distinto tipo de bacteria o a una pluralidad de tales tipos.

5 **[0008]** El cambio de color y/o el cambio de concentración puede ser usado para determinar el tipo de células, especialmente bacterias, presente en la leche, y preferiblemente también para determinar la cantidad relativa de dichas células.

10 **[0009]** En la ciencia médica es del dominio público la técnica de detectar bacterias usando anticuerpos específicos en tejidos y fluidos corporales. Son sin embargo de aplicación a tales usos conocidos condiciones específicas que sitúan a tales métodos conocidos aparte del método inventivo.

Descripción Detallada

15 **[0010]** La mastitis redunda en una incrementada cantidad de bacterias por unidad de peso o volumen de leche. Las bacterias pueden ser contadas por el principio del citómetro de flujo por medio del uso de técnica de fluorescencia.

20 Técnica de fluorescencia significa en este caso que las bacterias son combinadas (y por consiguiente se las hace reaccionar) con un anticuerpo adecuadamente coloreado y la combinación es pasada por una celda de flujo donde bajo la influencia de luz de fluorescencia las células individuales combinadas con los anticuerpos dan un pulso de luz. El número de pulsos de luz es detectado y está en correlación con el número de células bacterianas.

25 **[0011]** Hay varios grupos de bacterias que producen mastitis. La invención se basa en el hecho de que anticuerpos específicos se fijan tan sólo a tipos específicos de bacterias. Con estos datos es posible identificar distintas bacterias por medio del uso de distintos anticuerpos.

30 Es posible usar un único tipo de anticuerpo para detectar y medir la concentración de básicamente un único tipo de bacteria. Sin embargo, puesto que generalmente intervendrá más de un tipo de bacteria, y a menudo no hay información a priori de qué clases de bacterias se encontrarán, es preferible añadir hasta 5 (o incluso más) clases distintas de anticuerpos a una muestra de leche. Preferiblemente, éstos serán seleccionados para abarcar los tipos más comunes de bacterias que se encuentran en la práctica. Cada grupo de anticuerpos es previamente coloreado con un correspondiente número (de hasta 5 o más) de distintas soluciones colorantes específicas. P. ej., el uso de 5 coloraciones distintas hace que sea posible que estén presentes 5 colores distintos, y éstos pueden ser detectados individualmente por el específico Método 1 A.

35 **Método 1 A**

40 **[0012]** Cuando anticuerpos coloreados rodean bacterias (unidos o fijados a las mismas) en una muestra de leche, el color de la leche (o leche clarificada) cambia bajo la influencia de las bacterias. Este cambio de color puede ser detectado por un específico detector de colores.

45 **[0013]** Al pasar las bacterias por una celda de flujo provista de uno o varios distintos detectores de colores (luz de fluorescencia), el número de bacterias puede ser contado sobre la base del cambio de color ocasionado por los anticuerpos coloreados.

50 Este cambio de color es dependiente del tipo de anticuerpos coloreados. Los anticuerpos que se usen pueden ser particularmente seleccionados para un tipo particular de bacteria, si el mismo es ya conocido. Generalmente es sabido qué tipo o tipos de bacterias producen la mastitis, y la elección de anticuerpos coloreados estará generalmente basada en este conocimiento. De esta manera puede detectarse y medirse qué tipo de bacteria está produciendo en la vaca una enfermedad, como p. ej. la mastitis.

Método 1 B

55 **[0014]** Anticuerpos coloreados que se fijan a específicas bacterias no coloreadas en una muestra de leche producirán bajo la influencia de luz de fluorescencia en un citómetro de flujo un pulso de luz. Debido al hecho de que varios anticuerpos se fijarán a una sola bacteria, hay una diferencia en los pulsos de salida de luz entre un único anticuerpo libre en la muestra de leche y pluralidades de anticuerpos en torno a las bacterias que pasan por el citómetro de flujo, y por consiguiente las bacterias pueden ser detectadas por medio de la distinta intensidad de pulsos de luz producida.

60 **Método 1 C**

[0015] Usando el principio de anticuerpos fijados a bacterias, como se ha expuesto en el Método 1 A y en el Método 1 B, la detección puede ser también realizada filtrando la muestra de leche. Para detectar las bacterias en la muestra de leche rodeadas de anticuerpos (unidas o fijadas a los mismos), la muestra de leche puede ser microfiltrada de forma tal

que todas las bacterias, rodeadas o no rodeadas por anticuerpos, quedarán en la superficie del filtro. En la superficie del filtro puede usarse un microscopio o cualquier otro sistema de detección, de fluorescencia o no de fluorescencia, para identificar o reconocer las bacterias rodeadas de anticuerpos.

5 **[0016]** El citómetro de flujo preferiblemente tiene 5 o más detectores de colores distintos. Estos detectores reaccionan a 5 colores distintos. Cuando un flujo de bacterias coloreadas pasa por el objetivo del microscopio, habrá un número de pulsos en correspondencia con el número de bacterias que pasan.

10 **[0017]** Cuando entre las bacterias coloreadas se detecten también pulsos (aprox. del mismo tamaño) con distintos colores, esto es una indicación de reacción de anticuerpos en una mastitis producida por distintas bacterias, y con ello puede hacerse la selección de antibióticos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección de la presencia de bacterias en la leche, en donde la leche es puesta en contacto con una preparación que comprende una cantidad eficaz de al menos un tipo de anticuerpos, siendo dichos anticuerpos capaces de fijarse específicamente a las bacterias a detectar;
- 10 antes o después de dicha puesta en contacto se colorean dichos anticuerpos con una preparación colorante, siendo dicha preparación colorante seleccionada de forma tal que los anticuerpos coloreados con la misma presentan un cambio de color o un cambio de la concentración de color al estar en contacto con dichas bacterias; y se determina la concentración de anticuerpos coloreados fijados a bacterias en dicha leche a partir de la presencia y/o de la intensidad relativa del cambio de color que se ocasiona al poner a dicha leche en contacto con dichos anticuerpos coloreados; **caracterizado por el hecho de que** dicha preparación comprende más de un tipo de anticuerpos, fijándose cada tipo de anticuerpos específicamente a un tipo distinto de bacterias o a una pluralidad de tales tipos de bacterias, en donde el cambio de color es detectado, cualitativa y/o
- 15 cuantitativamente, sin separar las bacterias de la leche, usando un colorante fluorescente para anticuerpos y un citómetro de flujo como detector.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde dichos anticuerpos son capaces de fijarse específicamente a bacterias productoras de mastitis.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha preparación comprende más de dos, más preferiblemente más de tres, aún más preferiblemente más de cuatro y con la máxima preferencia cinco o más tipos distintos de anticuerpos, fijándose cada tipo específicamente a un tipo distinto de bacterias o a una pluralidad de tales tipos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cambio de color es usado para determinar el tipo o los tipos de bacterias en la leche, y preferiblemente también para determinar la cantidad relativa (concentración) de dichas bacterias.