

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 994**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/EP2014/058778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14721816 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2992108**

54 Título: **Método para la determinación de la presencia de un antibiótico en un líquido**

30 Prioridad:

**02.05.2013 EP 13166187**

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

**27.11.2017**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon, 1  
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**JAGESAR, DHIREDJ CHANDRE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 643 994 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 para la determinación de la presencia de un antibiótico en un líquido

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un ensayo nuevo y mejorado de inhibición del crecimiento microbiano para la determinación de la presencia o la ausencia de un antibiótico en una muestra tal como leche.

### 10 **Antecedentes de la invención**

Actualmente, los antibióticos se usan frecuentemente en la práctica veterinaria no solamente para el tratamiento de infecciones bacterianas, sino con fines profilácticos para mejorar la productividad de los productos alimenticios. En los últimos años, este abuso irresponsable de los antibióticos como medida preventiva ha sido un factor decisivo para favorecer el crecimiento de resistencia bacteriana.

Se sabe que los restos de antibióticos están entre los contaminantes más frecuentemente detectados en la leche y en los productos lácteos y causan problemas importantes en este sector industrial a nivel económico.

20 Para evitar el efecto negativo de los restos de antibiótico en la salud humana y en el ecosistema completo, se han establecido límites máximos de residuos (MRL) para antimicrobianos en productos alimenticios de origen animal por diversos legisladores (tal como la UE). El MRL es la concentración máxima de residuos de una sustancia farmacológicamente activa que puede permitirse en alimentos u origen animal.

25 Se han desarrollado ensayos de inhibición del crecimiento microbiano para la determinación de la presencia o la ausencia de residuos de antibióticos en una muestra. Los ejemplos de dichos ensayos se han descrito en, por ejemplo, el documento EP 0 005 891 A y el documento EP 0 285 792A. Estos ensayos descritos en los mismos son ensayos listos para su uso para hacer uso de un organismo de ensayo y una molécula indicadora, por ejemplo, un indicador de pH y/u oxidorreducción. El principio general de este ensayo es que, cuando un antibiótico está presente en una muestra en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento del organismo de ensayo, el color del indicador permanecerá igual, mientras que cuando no se produce inhibición, el crecimiento del organismo de ensayo viene acompañado por la formación de ácido o de metabolitos reducidos u otros fenómenos que inducirán una señal indicadora.

35 En general, un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano tiene que cumplir las siguientes especificaciones legislativas básicas e identificar de forma fiable la presencia de residuos de antimicrobianos en las muestras examinadas en concentraciones iguales a los MRL. Sin embargo, existen ensayos de inhibición del crecimiento microbiano que son incapaces de detectar algunos residuos de antimicrobianos en sus respectivos MRL, es decir, tienen una sensibilidad limitada por ciertos antibióticos. En particular, los ensayos de inhibición del crecimiento microbiano actualmente comercializados tienen una sensibilidad limitada por antibióticos de aminoglucósido.

40 En el documento EP 1 639 122A se ha descrito que la sensibilidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano puede aumentarse usando el indicador azul de bromotimol. Sin embargo, el uso de este indicador cambia predominantemente la sensibilidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano por los antibióticos de beta-lactama.

El documento WO 2005/005655 divulga un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano que ensaya la presencia de un antibiótico en una muestra, cuya sensibilidad se aumenta añadiendo indicadores específicos al ensayo.

50 En vista de ello, aún existe la necesidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano con una sensibilidad aumentada por, por ejemplo, antibióticos de aminoglucósido.

### **Sumario de la invención**

55 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano simple, barato y fácil de usar, ampliamente aplicable para la determinación de la presencia o la ausencia de un antibiótico en una muestra tal como leche. Sorprendentemente, se ha descubierto que la sensibilidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano para antibióticos de aminoglucósido puede aumentarse cuando se añade un antibiótico de aminoglucósido tal como estreptomina al ensayo.

### 60 **Descripción detallada de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de un antibiótico en una muestra, comprendiendo el método las etapas de (a) poner en contacto la muestra con un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo, un indicador y un antibiótico de aminoglucósido, (b) cultivar el organismo de ensayo y (c) detectar la cantidad de crecimiento del

organismo de ensayo, donde la ausencia de crecimiento refleja la presencia de un antibiótico en la muestra.

Opcionalmente, el método comprende la etapa de preparar el organismo de ensayo antes de poner en contacto el organismo de ensayo con la muestra. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para detectar la presencia o la ausencia de un antibiótico en una muestra, comprendiendo el método las etapas de (a) preparar un organismo de ensayo, (b) poner en contacto la muestra con un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo, un indicador y un antibiótico de aminoglucósido, (c) cultivar el organismo de ensayo y (d) detectar la cantidad de crecimiento del organismo de ensayo, donde la ausencia de crecimiento refleja la presencia de un antibiótico en la muestra.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un antibiótico de aminoglucósido para aumentar la sensibilidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano para la determinación de la presencia de un antibiótico en una muestra. En una realización, el antibiótico en la muestra es un antibiótico de aminoglucósido.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un envase cerrado que comprende al menos un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo, un indicador y un antibiótico de aminoglucósido, donde la concentración del antibiótico de aminoglucósido en el ensayo es de 10 ppm a 10 000 ppm.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende un antibiótico de aminoglucósido y un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo y un indicador.

Las siguientes realizaciones son aplicables a todos los aspectos de la invención.

En una realización de la invención, el antibiótico de aminoglucósido se añade al ensayo antes de cultivar el organismo de ensayo, es decir, antes de iniciar el ensayo. También puede añadirse después del inicio del ensayo, pero esto es menos preferido. En una realización, el antibiótico de aminoglucósido se añade a la muestra. Esto puede hacerse antes, durante o después de poner en contacto la muestra con el ensayo. En una realización preferida, el antibiótico de aminoglucósido se añade al ensayo, es decir, es parte del medio de ensayo. Preferiblemente, el antibiótico de aminoglucósido está presente en el ensayo, es decir, en el medio de ensayo, antes de poner en contacto el ensayo con la muestra. En otras palabras, el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano comprende el antibiótico de aminoglucósido en ausencia de muestra. Aún en otras palabras, el medio de ensayo del ensayo de inhibición del crecimiento microbiano comprende el antibiótico de aminoglucósido antes de que la muestra se añada al medio de ensayo.

El ensayo es capaz de determinar la presencia de un antibiótico en una muestra. El antibiótico a determinar puede ser un antibiótico de una familia de antibióticos que se selecciona del grupo que consiste en la familia de antibióticos de beta-lactama, la familia de antibióticos de tetraciclina, la familia de antibióticos de sulfonamida, la familia de antibióticos de aminoglucósido, la familia de antibióticos de macrólido, la familia de lincosamidas y la familia de antibióticos de quinolona. Sin embargo, el ensayo también puede usarse para detectar otros antibióticos diferentes a los mencionados anteriormente.

Debido a la presencia de un antibiótico de aminoglucósido en el ensayo, la sensibilidad del ensayo por antibióticos de aminoglucósido tal como estreptomina y dihidroestreptomina aumenta. Sorprendentemente, se descubrió que la presencia del antibiótico de aminoglucósido en el ensayo no tenía efecto sobre la sensibilidad del ensayo por otras clases de antibióticos tales como beta-lactamas (por ejemplo, penicilina G) y tetraciclinas (por ejemplo, oxitetraciclina). La presencia de un antibiótico de aminoglucósido en el ensayo, por tanto, aumenta específicamente la sensibilidad del ensayo por antibióticos de aminoglucósido.

En una realización, el antibiótico de aminoglucósido se selecciona del grupo que consiste en estreptomina, dihidroestreptomina, amikacina, apramicina, arbekacina, astromicina, bekanamicina, dibekacina, frameticina, gentamicina, higromicina B, isepamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestreptomina, riboestamicina, sisomicina, espectinomicina, tobramicina y verdamicina. La expresión "antibiótico de aminoglucósido" también incluye mezclas de dos o más antibióticos diferentes de aminoglucósido. Por ejemplo, puede usarse cualquier combinación de dos o más antibióticos del grupo mencionado anteriormente. En una realización preferida, el antibiótico de aminoglucósido usado en los diversos aspectos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en estreptomina y dihidroestreptomina.

En una realización, la concentración del antibiótico de aminoglucósido es entre 10 ppm y 10 000 ppm, preferiblemente entre 100 ppm y 10 000 ppm y más preferiblemente entre 500 ppm y 5 000 ppm. A efectos de clarificación exclusivamente, los intervalos de concentración mencionados se refieren a la concentración de antibiótico de aminoglucósido en el ensayo en ausencia de muestra.

En una realización, el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano comprende un indicador. En otras palabras, el indicador está presente en el medio de ensayo. El término "indicador" se refiere a una sustancia usada para medir

(por ejemplo, por cambio de color o por fluorescencia) el estado de un medio de ensayo con respecto a la presencia de un componente particular (por ejemplo, un ácido, una base, agentes oxidantes o reductores). Son particularmente útiles indicadores que, tras cambiar de un estado a otro, proporcionan una señal visualmente detectable tal como un cambio en el color o fluorescencia. La cantidad de indicador en el medio de ensayo es generalmente entre 0,01 y 50 g/l de medio de ensayo, preferiblemente de entre 0,1 y 10 g/l, más preferiblemente de entre 0,5 y 5 g/l, mucho más preferiblemente de entre 1 y 3 g/l. El indicador puede ser un indicador de pH, un indicador de oxidorreducción o una combinación de los mismos. El término también puede hacer referencia a dos o más indicadores. Los expertos en la materia apreciarán que son adecuados muchos indicadores para el propósito de la presente invención. Los ejemplos de indicadores adecuados pueden encontrarse en el manual H.J. Conn's Biological Stains, R.D. Lillie ed., Baltimore, 1969.

El ensayo puede tener la forma de un líquido, un sólido o una matriz de tipo gel. En una realización de la invención, el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano comprende además un agente gelificante. La expresión "agente gelificante", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto que ayuda a cambiar una mezcla en un gel o a adoptar la forma de un gel. Los ejemplos de agentes gelificantes adecuados en los diversos aspectos de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, agar, gelatina, ácido algínico y sales del mismo, carragenina, algarrobina (goma de algarrobo) hidroxipropil guar y derivados de la misma, alga Eucheuma procesada y similares. el agar es el agente gelificante preferido. En una realización, se introduce un organismo de ensayo y un indicador y opcionalmente otros ingredientes adicionales tales como el antibiótico de aminoglucósido en una solución de agar. La solución de agar se deja solidificar para formar el medio de ensayo de modo que el organismo de ensayo permanezca vivo, pero no pueda multiplicarse a causa de, por ejemplo, la baja temperatura. En general, el agente gelificante constituirá una gran parte del medio de ensayo. La cantidad de agente gelificante en el ensayo es generalmente entre 1 y 200 g/l de medio de ensayo, preferiblemente de entre 2 y 50 g/l, más preferiblemente de entre 5 y 20 g/l, mucho más preferiblemente de entre 7 y 15 g/l.

Cuando el medio de ensayo tiene la forma de una matriz sólida, puede comprender un material de vehículo tal como cerámica, algodón, vidrio, una partícula metálica, un polímero de cualquier condición o forma, un silicato, una esponja, lana y similares. Como alternativa, el ensayo puede tener la forma de un comprimido, disco o filtro de papel que comprende el organismo de ensayo, el indicador y opcionalmente nutrientes. Los tres constituyentes pueden estar presentes en un único comprimido, pero también en dos o más comprimidos. Por supuesto, pueden usarse los sistemas de ensayo que combinan medios de ensayo en forma sólida, líquida y/o de tipo gel.

Opcionalmente, el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano también puede contener nutrientes, estabilizantes, sales, tampones y/o agentes que aumentan la viscosidad. El término "nutriente" como se usa en este documento se refiere a una sustancia nutritiva o un ingrediente que promueve y/o es necesario para el crecimiento del organismo de ensayo. Los nutrientes adecuados dependen del microorganismo usado en el sistema de ensayo. El medio de ensayo puede comprender dos o más nutrientes diferentes. Incluyen, aunque sin limitación, fuentes de carbono asimilables tales como carbohidratos tales como, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y dextrosa; fuentes de nitrógeno asimilables tales como aminoácidos tales como, por ejemplo, peptona o triptona; fuentes de vitaminas y factores de crecimiento tales como extracto de ternera o levaduras; y fuentes de minerales tales como sales de metales alcalinotérreos tales como sales de, por ejemplo, bario o calcio. Los ingredientes adicionales adecuados que pueden estar presentes en el ensayo de acuerdo con la presente invención son conocidos para los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación, otros agentes (diferentes de un antibiótico de aminoglucósido) que aumentan o disminuyen la sensibilidad del ensayo por antibióticos.

En una realización de la invención, el organismo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en una especie de *Bacillus*, una especie de *Escherichia* y una especie de *Streptococcus*. "Organismo de ensayo" como se usa en este documento también incluye esporas, por ejemplo, esporas de cualquiera de estas especies. En una realización preferida de la invención, el organismo de ensayo es termófilo. Los ejemplos son *Bacillus stearothermophilus* o *Streptococcus thermophilus*, siendo preferido *Bacillus stearothermophilus*. Estas especies pueden introducirse en el ensayo como unidades capaces de producir colonias o unidades formadoras de colonias (UFC). El término "UFC" como se usa en este documento se refiere a la cantidad de organismos de ensayo, esporas de organismo de ensayo, esporas parcialmente germinadas de organismos de ensayo, células vegetativas o cualquier mezcla de las mismas capaces de producir colonias de organismos. La concentración de dichas UFC se expresa como unidades formadoras de colonia por ml de medio de ensayo (UFC/ml) y está habitualmente en el intervalo de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{12}$  UFC/ml, preferiblemente de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml, más preferiblemente de  $2 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$  UFC/ml, mucho más preferiblemente de  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml o aún más preferiblemente de  $5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  UFC/ml.

En una realización de la invención, la muestra puede obtenerse de un líquido corporal, de un órgano, de carne o de huevos. Los antibióticos también podrían estar presentes en productos alimenticios en que se añaden estos productos animales como ingrediente. Los ejemplos de productos alimenticios son leche, productos lácteos procesados (por ejemplo, nata, yogur); carne de vaca, de cerdo, de aves de corral y de pescado; mariscos tales como langostinos; hígado; productos cárnicos procesados tales como salchichas; comidas listas para comer y alimentos para bebés. Los antibióticos también podrían estar presentes en líquidos corporales o en tejidos animales, que son adecuados para examen por, por ejemplo, autoridades de inspección alimentaria. Los ejemplos son sangre, tejido renal o preorina obtenidos del riñón y de la orina. La orina y la sangre son adecuados para examen antes del

sacrificio del animal. Los antibióticos también pueden estar presentes en agua residual, en agua de cualquier tipo de industria, etc. En una realización preferida, la muestra es orina, sangre, huevo, miel, riñón, carne, hígado, pescado, langostino, pienso y/o leche, siendo la leche la más preferida. La leche puede obtenerse de vacas, pero también de ovejas, cabras, yaks, búfalo de agua, caballos, renos y camellos. En una realización preferida, la muestra es una muestra líquida. En una realización, la muestra podría no ser líquida y un líquido que comprende el antibiótico o antibióticos tiene que extraerse de la muestra.

Preferiblemente, hay mínima o ninguna germinación y crecimiento del organismo de ensayo antes de la adición de la muestra líquida. Esto se consigue clasificando y manteniendo el ensayo en condiciones que comprenden una temperatura desfavorable y/o un valor de pH desfavorable y/o la ausencia de nutrientes esenciales para la germinación y el crecimiento del organismo de ensayo. Por supuesto, las condiciones no deben causar daño irreversible a todas las UFC presentes en el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano.

Después de poner en contacto la muestra con el organismo de ensayo, se permite que tenga lugar el crecimiento del organismo de ensayo durante un periodo suficientemente largo para que los organismos de ensayo crezcan en caso de que no haya antibiótico presente. El periodo puede determinarse incluyendo una muestra de control, es decir, una muestra que está libre de antibióticos, y finalizando la incubación de todas las muestras ensayadas cuando el ensayo que mide la muestra de control ha cambiado de color. También puede decidirse incubar todas las muestras durante un periodo fijo de tiempo. El crecimiento se induce añadiendo nutrientes, opcionalmente antes de poner en contacto dicha muestra, y/o elevando la temperatura y/o proporcionando un valor de pH en que el organismo de ensayo sea capaz de crecer. Como alternativa, estas condiciones pueden establecerse antes del contacto de la muestra líquida con el organismo de ensayo. Por ejemplo, el crecimiento del organismo de ensayo puede tener lugar cuando el organismo de ensayo se incuba a una temperatura que conduce al crecimiento del organismo de ensayo.

La ausencia del crecimiento refleja la presencia de un antibiótico en la muestra, mientras que el crecimiento refleja la ausencia de un antibiótico en una muestra. Como se indica anteriormente, la presencia de un antibiótico se determina por un cambio del indicador o de los indicadores usados. Habitualmente, cuando hay un antibiótico presente en una muestra, no hay cambio en el indicador. Cuando no hay antibiótico presente en una muestra, se producirá crecimiento microbiano produciendo un cambio de indicador. Cuando, por ejemplo, dicho cambio es un cambio de color, dicho cambio de color puede observarse visualmente. Sin embargo, dicho cambio de color también puede determinarse usando una disposición que genera datos de imagen digital o una disposición que genera datos de imagen analógica y convierte dichos datos de imagen analógica en datos de imagen digital seguido por interpretación de dichos datos de imagen digital por un procesador informático. Un ejemplo de dicha disposición, es decir, un dispositivo de lectura de muestras tal como un escáner acoplado a un ordenador personal, se describe en el documento WO 03/033728. Otro ejemplo de dicha disposición, es decir, un dispositivo combinado de incubación de la muestra y lectura de la muestra (tal como un escáner combinado con una incubadora) acoplado a un ordenador personal se describe en el documento WO 2007/090683.

Opcionalmente, ciertos ingredientes de ensayo se esterilizan y habitualmente el pH del ensayo se ajusta al valor requerido. Opcionalmente, las muestras pueden mezclarse (por ejemplo, con otras muestras, pero también con sales, compuestos tamponantes, nutrientes, estabilizantes, enzimas y similares), concentradas y/o diluidas (por ejemplo, con líquidos de dilución tales como agua, disolventes y similares) antes de la adición al organismo de ensayo.

En una realización de la invención, el organismo de ensayo se cultiva incubándolo durante un periodo predeterminado, preferiblemente en un marco de tiempo de 0,5 a 6 horas, más preferiblemente entre 0,75 a 5 horas, mucho más preferiblemente entre 1,0 a 4 horas y en particular entre 2 y 3,5 horas. Preferiblemente, el organismo de ensayo se incuba a una temperatura predeterminada, preferiblemente la temperatura óptima de crecimiento del organismo de ensayo. Cuando, por ejemplo, se usan organismos de ensayo termófilos, dicha temperatura es preferiblemente entre 40 y 70°C, más preferiblemente entre 50 y 65°C, mucho más preferiblemente entre 60 y 64°C. Opcionalmente, dicha reacción puede realizarse con la ayuda de un dispositivo termostático. Como alternativa, el tiempo necesario para el crecimiento del organismo de ensayo es igual al tiempo que se requiere para que una muestra de calibración con una cantidad conocida de antibiótico induzca un cambio en el indicador o el tiempo es necesario para que una muestra de control sin antibiótico induzca un cambio en el indicador.

En una realización de la invención, hay al menos un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano presente en un envase. El ensayo comprende al menos un organismo de ensayo, un indicador y un antibiótico de aminoglucósido, donde la concentración del antibiótico de aminoglucósido en el ensayo es de 10 ppm a 10 000 ppm.

En una realización preferida, el envase está cerrado. "Cerrado" como se usa en este documento significa que el ensayo o los ensayos que están presentes dentro del envase no han estado aún en contacto con una muestra. El envase puede ser una caja o cualquier otra unidad de envasado adecuada. Puede fabricarse de cualquier material adecuado para fabricar unidades de envasado. Preferiblemente, el envase comprende más de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano. El ensayo de inhibición del crecimiento microbiano puede estar presente en un recipiente. El recipiente puede tener cualquier forma y tamaño y puede ser de cualquier material disponible, con la condición de que sea posible la observación de los cambios del indicador. El recipiente puede ser un tubo (por

ejemplo, una ampolla), pero también puede ser un pocillo tal como un pocillo que es parte de una placa, por ejemplo, una placa de microvaloración, es decir, una placa plana con múltiples pocillos. El envase cerrado puede comprender, por ejemplo, 5 placas, 10 placas o 20 placas y/o 25 tubos o 100 tubos.

5 El envase puede comprender además un dispositivo de muestreo. Un dispositivo de muestreo es un dispositivo con la ayuda del cual puede añadirse líquido al ensayo de inhibición del crecimiento microbiano. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, una jeringa, una pipeta o un sistema automatizado de pipeteo. Dicha jeringa o pipeta puede estar diseñada de tal manera que con solamente un modo de operación pueda extraerse un volumen predeterminado de la muestra de líquido a analizar. Opcionalmente, pueden aplicarse sistemas conocidos en la técnica con los que puede manejarse más de una jeringa o pipeta con una única manipulación. Opcionalmente, el envase comprende además un medio para precintar los recipientes después de haber añadido la muestra a los recipientes y/o durante la incubación de los recipientes. Además, el envase puede comprender un adjunto con instrucciones para su uso y/o un medio para establecer el tiempo necesario para la incubación.

15 La invención también se refiere a un kit que comprende (a) un antibiótico de aminoglucósido y (b) un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano. Como se indica anteriormente, el ensayo puede estar presente en un recipiente. El antibiótico de aminoglucósido también puede estar presente en un recipiente. El antibiótico de aminoglucósido puede añadirse al ensayo poco antes de usar el ensayo.

20 Opcionalmente, la relación de la muestra al medio de ensayo excede 2:3 (0,68:1) (v/v). Preferiblemente, dicha relación es de al menos 20:27 (0,74:1) (v/v), más preferiblemente dicha relación es de al menos 25:27 (0,93:1) (v/v); mucho más preferiblemente dicha relación es de al menos 2:1 (v/v). Se ha descubierto que no hay razones técnicas para un límite superior a la cantidad de muestra. En la práctica, este volumen no debe exceder el contenido máximo del recipiente que aloja el medio de ensayo. Por ejemplo, en un recipiente de 2 ml que tiene 0,2 ml de medio de ensayo, no debe añadirse más de 1,8 ml de muestra de líquido. En la práctica, los recipientes para realizar el método de la presente invención tienen un volumen que pocas veces excede de 50 ml y, por tanto, la cantidad de muestra de líquido a añadir no debe exceder 50 ml, preferiblemente 10 ml, más preferiblemente 5 ml, aún más preferiblemente 2 ml, mucho más preferiblemente 1 ml. Por tanto, en general, el límite superior de la relación del volumen de muestra de líquido a volumen de medio de ensayo es 250:1 (v/v), preferiblemente 50:1 (v/v), más preferiblemente 25:1 (v/v), aún más preferiblemente 10:1 (v/v), mucho más preferiblemente 5:1 (v/v). En una realización preferida, el volumen de la dilución/muestra es mayor que el volumen del medio de ensayo.

Opcionalmente, el envase puede comprender además un dispositivo termostático, con la ayuda del cual las muestras pueden mantenerse a una temperatura preestablecida, tal como la temperatura a la el organismo de ensayo muestra suficiente crecimiento. Preferiblemente, dicho dispositivo termostático se diseña de tal manera que puede alojar los recipientes. Opcionalmente, el dispositivo termostático está acoplado a un medio para establecer el tiempo necesario para la incubación, de modo que se detiene el calentamiento y/o la refrigeración una vez transcurrido un periodo preestablecido.

40 Opcionalmente, el envase comprende además un soporte de datos cargado con un programa informático adecuado para dar instrucciones a un ordenador para analizar los datos digitales obtenidos de un dispositivo de lectura de muestra. Dicho soporte de datos puede ser cualquier soporte adecuado para el almacenamiento de información digital tal como un CD-ROM, un disquete, un DVD, una tarjeta de memoria extraíble, una cinta magnética o similares. De forma ventajosa, dicho soporte de datos cargado con un programa informático proporciona acceso fácil a los últimos programas informáticos disponibles adecuados para su uso en el método de la presente invención.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1**

50 **Efecto de un antibiótico de aminoglucósido en el medio de ensayo sobre el límite de detección de antibióticos de aminoglucósido en un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano**

55 Para establecer el efecto de un antibiótico de aminoglucósido sobre la sensibilidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano por antibióticos de aminoglucósido, se realizó la siguiente serie de experimentos.

60 Como referencia, se usó un sistema de ensayo disponible en el mercado sin ningún antibiótico de aminoglucósido añadido (DSM Delvotest<sup>®</sup> SP-NT, placas que contienen 8 x 12 pocillos de ensayo). Además, se prepararon dos sistemas de ensayo diferentes modificando el ensayo de referencia añadiendo el antibiótico de aminoglucósido estreptomycinina al medio de ensayo en una concentración final de 100 ppm o de 1000 ppm.

65 Se midieron los límites de detección de cuatro antibióticos diferentes en el ensayo de referencia y en los ensayos con medio modificado que contiene diferentes concentraciones de estreptomycinina. Los antibióticos que se midieron fueron estreptomycinina y dihidroestreptomycinina (DH-estreptomycinina) (ambos pertenecientes a la familia de antibióticos de aminoglucósido), penicilina G (perteneciente a la familia de antibióticos de beta-lactama) y oxitetraciclina (perteneciente a la familia de antibióticos de tetraciclina). Se midieron cinco concentraciones diferentes de cada

antibiótico (véase la tabla 1). Se añadieron cien microlitros de leche sin antibiótico o cien microlitros de leche con adiciones de las concentraciones respectivas de antibiótico al medio de ensayo (170 µl) y se incubaron a 64°C en un baño de agua.

5 Los ensayos se determinaron visualmente en el punto en el tiempo en que una muestra sin antibiótico había cambiado de color de púrpura a amarillo. En este punto, las placas se refrigeraron en un baño de hielo durante 5 minutos. Las placas enfriadas se exploraron en un escáner Delvo®. El color de cada pocillo se expresó como un valor Z; un color púrpura da lugar a un valor Z positivo, mientras que un color amarillo tiene un valor Z negativo. El valor Z de los resultados de ensayo con muestras sin antibiótico es típicamente  $-5 < Z < -10$ . La descripción detallada de la tecnología de exploración y la expresión del color en valores Z se describen en el documento WO 10 03/033728.

15 Para la determinación del límite de detección para cada antibiótico, se construyó una función de respuesta a dosis (valor Z frente a la concentración de antibiótico). El límite de detección se define como la concentración de antibiótico en la que la función de respuesta a dosis con forma de S tiene un valor Z igual al valor de corte. Para Delvotest® SP-NT se usó un valor Z de corte de 0. Los límites de detección calculados se resumen en la tabla 2.

20 Los resultados muestran claramente que la adición de un antibiótico de aminoglucósido al medio de ensayo provoca que el sistema de ensayo tenga una sensibilidad fuertemente aumentada por antibióticos de aminoglucósido, mientras que la sensibilidad por antibióticos de beta-lactama y antibióticos de tetraciclina permanece inalterada.

Tabla 1: concentración de antibiótico de las muestras de leche con adiciones

Estreptomina (en ppmm)	DH-estreptomina (en ppmm)	Penicilina G (en ppmm)	Oxitetraciclina (en ppmm)
0	0	0	0
100	100	0,3	50
200	200	1,0	100
500	500	2,0	200
1000	1000	3,0	300
2500	2500	4,0	500

25 Tabla 2: límite de detección de diferentes antibióticos en Delvotest® SP-NT que contienen diferentes concentraciones de estreptomina

Concentración de estreptomina en el ensayo (en ppmm)	Límite de detección (en ppmm)			
	Estreptomina	DH-estreptomina	Penicilina G	Oxitetraciclina
0	2005	1471	1,04	264
100	1186	982	0,96	239
1000	676	445	1,07	343

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la presencia de un antibiótico en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:
  - 5 (a) poner en contacto la muestra con un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo, un indicador y un antibiótico de aminoglucósido,
  - (b) cultivar el organismo de ensayo, y
  - (c) detectar la cantidad de crecimiento del organismo de ensayo, en el que la ausencia de crecimiento refleja la presencia de un antibiótico en la muestra,
- 10 en el que el medio de ensayo del ensayo de inhibición del crecimiento microbiano comprende el antibiótico de aminoglucósido antes de añadir la muestra al medio de ensayo.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico de aminoglucósido se selecciona del grupo que consiste en estreptomina, dihidroestreptomina, amikacina, apramicina, arbekacina, astromicina, bekanamicina, dibekacina, framiketina, gentamicina, higromicina B, isepamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestreptomina, riboestamicina, sisomicina, espectinomicina, tobramicina y verdamicina.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el indicador es un indicador de pH y/o un indicador de oxidorreducción.
- 25 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el organismo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en una especie de *Bacillus*, una especie de *Escherichia* y una especie de *Streptococcus*.
- 30 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra es una muestra de líquido.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra es leche.
- 35 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el organismo de ensayo es termófilo.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el ensayo comprende además un agente gelificante.
- 40 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la concentración del antibiótico de aminoglucósido es de 10 ppmm a 10 000 ppmm.
- 45 10. Uso de un antibiótico de aminoglucósido para aumentar la sensibilidad de un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano para la determinación de la presencia de un antibiótico en una muestra.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el antibiótico en la muestra es un antibiótico de aminoglucósido.
- 50 12. Un envase cerrado que comprende al menos un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo, un indicador y un aminoglucósido, en el que la concentración del antibiótico de aminoglucósido en el ensayo es de 10 ppmm a 10 000 ppmm.
13. Un envase cerrado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el ensayo está presente en un tubo o en un pocillo de una placa.
- 55 14. Un kit que comprende:
  - a) un antibiótico de aminoglucósido, y
  - b) un ensayo de inhibición del crecimiento microbiano, comprendiendo dicho ensayo al menos un organismo de ensayo y un indicador.