

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 822**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/JP2012/065150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12878885 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2863223**

54 Título: **Procedimiento para detectar sustancias específicas en la leche**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2018

73 Titular/es:
ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
1-105 Kanda Jinbocho Chiyoda-ku Tokyo
101-8101, JP

72 Inventor/es:
MAEHANA KOJI y
MATSUYAMA KENJI

74 Agente/Representante:
DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 683 822 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 para detectar sustancias específicas en la leche

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche utilizando una reacción antígeno-anticuerpo y a un kit de detección.

10 Antecedentes técnicos

La leche de animales de ganadería, de los cuales los ejemplos típicos son vacas, ovejas y cabras, no es estéril y puede estar contaminada con ciertos microorganismos debido a enfermedades o al medio ambiente. En particular, se sabe que los animales con una enfermedad causada por la infección de un microorganismo a menudo descargan una gran cantidad de microorganismos en la leche. Entre las enfermedades típicas de los animales de ganadería causadas por la infección de un microorganismo se incluye la mastitis.

15

La mastitis es la inflamación del sistema galactóforo del tejido de la glándula mamaria, y está causada principalmente por la invasión, ecesis y proliferación de un microorganismo en la ubre. Aunque muchos tipos de animales contraen mastitis, se dice que, especialmente en lo que respecta a la mastitis de las vacas lecheras, del 15 al 40% de las vacas lecheras totales contraen mastitis y, de este modo, es una de las enfermedades extremadamente importantes para los productores de leche. Si una vaca lechera contrae mastitis, no solo se inhibe la función de síntesis de leche dando como resultado la reducción de la cantidad de lactancia, o incluso se suspende la lactancia según sea el caso, sino que también se imponen a los productores de leche enormes pérdidas económicas como el coste del tratamiento médico y la penalización del precio de la leche. Además, también aumenta el trabajo de los productores lecheros, ya que, por ejemplo, el ordeño de las ubres que padecen mastitis debe realizarse por separado para prevenir la infección.

20

La mastitis está causada por la infección de diversos microorganismos, pero los antibióticos que muestran eficacia contra la mastitis pueden diferir dependiendo del tipo de microorganismo causante, y ciertos tipos de microorganismos tienen diferentes características relacionadas con, por ejemplo, la transmisión a otras ubres o individuos, o la manipulación posterior a la infección de los mismo es diferente. Por lo tanto, es extremadamente importante identificar de forma rápida y conveniente el microorganismo causante existente en la leche.

30

Como procedimientos para identificar un microorganismo causante de una enfermedad infecciosa, se conocen procedimientos de identificación basados en cultivo, procedimientos de identificación basados en genes y procedimientos de identificación basados en reacciones antígeno-anticuerpo. Aunque la corriente principal actual del procedimiento para identificar un microorganismo causante de mastitis de animales de ganadería es el procedimiento de identificación basado en el cultivo, el funcionamiento del mismo es complicado y, además, tiene el problema de requerir varios días para obtener resultados. También se ha descrito un procedimiento de identificación basado en la detección de un gen específico mediante un procedimiento de amplificación génica (procedimiento de PCR) (documento no de patente 1). Aunque los resultados con este procedimiento se pueden obtener en aproximadamente un día, todavía tiene el problema de requerir instrumentos y manipulaciones especiales. En los últimos años, se ha desarrollado un aparato para detectar *Staphylococcus aureus*, que es uno de los microorganismos causantes de la mastitis, o *Escherichia coli* mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) sobre la base de una reacción antígeno-anticuerpo (documento no de patente 2). Para este aparato, se prepara un anticuerpo contra un antígeno específico para cada bacteria, y este anticuerpo se fija en un chip SPR y se utiliza. Aunque este procedimiento permite la detección rápida de un microorganismo causante específico, requiere un aparato especial y, por lo tanto, es difícil realizar mediciones con este procedimiento en lugares lácteos prácticos, etc.

35

Se han utilizado ampliamente dispositivos de medición simples que permiten la medición rápida y conveniente en el hogar o la clínica de muestras biológicas, tales como sangre y orina utilizando inmunocromatografía (dispositivo inmunocromatográfico) (por ejemplo, consúltese el documento de patente 1). El procedimiento realizado en estos dispositivos utiliza una tira reactiva que comprende papel de prueba que contiene un primer anticuerpo específico para una sustancia de medición diana (antígeno) y marcada con partículas colorantes tales como oro coloidal y una membrana porosa sobre la cual está inmovilizado un segundo anticuerpo para la captura de la sustancia de medición diana, estando el papel de prueba y la membrana porosa unidos entre sí. Si una muestra de prueba que contiene una sustancia de medición diana se deja caer en la tira, la sustancia de medición diana se une con el anticuerpo marcado con partículas colorantes y/o el anticuerpo inmovilizado sobre la membrana porosa, dando como resultado una línea visualmente distinguible o similar en la membrana. Por lo tanto, al confirmar la presencia o ausencia de dicha línea o similar, se puede detectar la presencia o ausencia de la sustancia a medir.

55

Aunque el documento de patente 1 enseña que el procedimiento mencionado anteriormente puede aplicarse a, además de sangre (sangre completa), plasma, suero, orina, saliva, esputo, sudor, etc., no enseña la aplicación del procedimiento mencionado anteriormente a la leche de animales de ganadería, y no enseña ni sugiere en absoluto los problemas encontrados en el momento de esta aplicación. Además, aunque los procedimientos para aplicar un

65

procedimiento inmunocromatográfico a muestras biológicas, tales como sangre (sangre completa), como muestra de prueba también se dan a conocer en los documentos de patente 2 a 4, estos documentos de patente no enseñan ni sugieren tampoco la aplicación del procedimiento inmunocromatográfico a la leche de animales de ganadería.

5 Para un dispositivo de medición simple que permita la medición rápida y conveniente de leche de animales de ganadería como muestra de prueba, mediante la utilización de un procedimiento inmunocromatográfico en lugares lácteos prácticos, el documento de patente 5 propone un procedimiento que utiliza el procedimiento inmunocromatográfico para leche como muestra de prueba para el propósito de inspeccionar microorganismos causantes de mastitis de animales de ganadería. Este documento de patente enseña que los glóbulos de grasa láctea y la caseína contenidos en la leche inhiben la detección mediante el procedimiento inmunocromatográfico, y es preferente que se eliminen con antelación antes de la prueba. Aunque este documento de patente da a conocer un procedimiento para eliminar glóbulos de grasa láctea y caseína dejando la leche en reposo, separando una capa de nata y realizando un tratamiento con un surfactante, no enseña la eliminación de glóbulos de grasa láctea con un filtro.

15 Además, aunque los documentos de patente 2 a 4 enseñan técnicas de eliminación de contaminantes con un filtro físico o una membrana que muestra afinidad química para su utilización en la aplicación del procedimiento inmunocromatográfico, los procedimientos descritos en estas referencias son procedimientos de aplicación del procedimiento inmunocromatográfico para muestras biológicas, tales como sangre completa, tal como se ha descrito anteriormente, y no son procedimientos para aplicarlos a la leche de animales de ganadería. Los documentos de patente 1 a 4 no enseñan ni sugieren los problemas encontrados en el momento de aplicar el procedimiento inmunocromatográfico a la leche de animales de ganadería, y no enseñan ningún medio para resolver el problema en absoluto.

25 Referencias de la técnica anterior

Documentos de patente

30 Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 1-244370
 Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa no examinada (KOHYO) No. 2003-512624
 Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa no examinada (KOHYO) No. 11-505327
 Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 2002-214236
 Documento de patente 5: Publicación de patente internacional WO 02/075310

35 Documentos no de patente

Documento no de patente 1: J. Dairy. Sci., 84: 74-83
 Documento no de patente 2: Informe de utilización del sistema avanzado de gestión ganadera de JRA (Heisei años fiscales 18 a 20), págs. 58-65

40 El documento US 2004/0096356 A1 da a conocer un dispositivo de ensayo, que puede ser un dispositivo de flujo tangencial, y un procedimiento, permitiendo el dispositivo y el procedimiento la detección y cuantificación de analitos en un producto lácteo líquido, que incluye leche.

45 Características de la invención

Objetivo a alcanzar mediante la invención

50 Un objetivo que debe alcanzarse mediante la presente invención es dar a conocer un procedimiento inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche de un animal de ganadería utilizando una reacción antígeno-anticuerpo, y un kit de detección.

Medios para alcanzar el objetivo

55 El inventor de la presente invención examinó la identificación de microorganismos causantes de la mastitis sobre la base de una reacción antígeno-anticuerpo utilizando un dispositivo inmunocromatográfico. Sin embargo, cuando el inventor de la presente invención examinó si un microorganismo realmente podría detectarse mediante el procedimiento inmunocromatográfico utilizando leche como muestra, se descubrió que la reacción antígeno-anticuerpo no avanzaba en una tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico. El inventor de la presente invención investigó la causa del avance nulo de la reacción antígeno-anticuerpo en la tira reactiva, y como resultado, consideró que la causa del fenómeno anterior podría ser la obstrucción de la tira reactiva unida a una membrana porosa en el dispositivo inmunocromatográfico con una gran cantidad de glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, lo que da como resultado un flujo insuficiente de una solución de revelado. Los dispositivos inmunocromatográficos habitualmente utilizan una tira reactiva que tiene un diámetro de poro de varias decenas de varios cientos de nm para su transporte por la solución de revelado, y con el fin de obtener la velocidad apropiada de la reacción antígeno-anticuerpo. La leche inmediatamente después del ordeño contiene una gran cantidad de

glóbulos de grasa láctea que tienen un diámetro de aproximadamente 1 a 10 y varios micrómetros (aunque el diámetro de partícula de los glóbulos de grasa láctea en leche comercializada o similar se hace de 1 μm o menor, por un tratamiento de homogeneización de los glóbulos de grasa láctea en leche fresca, la leche no sometida al tratamiento de homogeneización contiene glóbulos de grasa láctea que tienen un amplio intervalo de tamaños de partícula), y se consideró que la distribución de tamaños de partícula de los glóbulos de grasa láctea era extremadamente mayor que la de los eritrocitos y, por lo tanto, provocan la obstrucción de la membrana para dificultar la medición.

El inventor de la presente invención realizó diversas investigaciones para alcanzar el objetivo mencionado, como resultado, descubrió que la medición de una sustancia específica contenida en la leche por el procedimiento inmunocromatográfico se habilitó atrapando una parte de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche por un tratamiento de filtrado en el lado aguas arriba de la tira reactiva utilizada en el procedimiento de inmunocromatografía, y se lleva a cabo la presente invención.

De este modo, la presente invención es la siguiente.

[1] Un procedimiento inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica en la leche, que comprende:

(1) la etapa de tratar la leche con un enzima lítico o un surfactante para lisar una bacteria en la leche,

(2) la etapa de poner en contacto la leche de la etapa (1) con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica,

una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, sobre la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica, y

una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en la tercera parte o una parte aguas más arriba, y

(3) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o a una parte aguas más abajo para obtener una señal detectable del marcador en la segunda parte o en una parte aguas más abajo, en el que el procedimiento inmunocromatográfico es un procedimiento de tipo de flujo lateral, la sustancia específica es un componente de una bacteria, o una sustancia secretada por una bacteria, y el tamaño de retención de partículas de los huecos de la tercera parte es de 1 a 3,5 μm .

[2] El procedimiento, según [1], en el que, como mínimo, uno del primer anticuerpo y el segundo anticuerpo, o ambos, son anticuerpos monoclonales.

[3] El procedimiento, según [2], en el que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo son anticuerpos monoclonales.

[4] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [3], en el que la tercera parte está constituida por dos o más tipos de miembros que tienen huecos que pueden eliminar glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partícula.

[5] El procedimiento, según [4], en el que la tercera parte está constituida por un primer miembro dispuesto aguas abajo y un segundo miembro dispuesto aguas arriba, y el tamaño de retención de partículas del segundo miembro es mayor que el tamaño de retención de partículas del primer miembro.

[6] El procedimiento, según [5], en el que el tamaño de retención de partículas del primer miembro es de 1,0 a 2,0 μm , y el tamaño de retención de partículas del segundo miembro es de 3,0 a 3,5 μm .

[7] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [6], en el que el enzima lítico es una autolisina.

[8] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [6], en el que se detecta un estafilococo contenido en la leche utilizando lisostafina como el enzima lítico.

[9] Un kit de detección que comprende una solución de aditivo que contiene un enzima lítico o un surfactante, adecuado para la lisis de una bacteria contenida en la leche, y un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche que ha sido tratada con un enzima lítico o un surfactante, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, sobre la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en el que

el dispositivo inmunocromatográfico es un dispositivo de tipo de flujo lateral,

la sustancia específica es un componente de una bacteria, o una sustancia secretada por una bacteria, en la que la detección de la sustancia específica permite que la bacteria se distinga de otras bacterias al nivel de especie o género; y

el tamaño de retención de partículas de los huecos de la tercera parte es de 1 a 3,5 μm .

Efecto de la invención

Según la presente invención, la presencia o ausencia de una sustancia específica en la leche se puede detectar de

forma rápida y conveniente *in situ*. En particular, cuando se desea diagnosticar la mastitis de la vaca, si se utiliza un marcador visualmente reconocible, la detección se puede llevar a cabo en granjas lecheras sin utilizar ningún aparato, etc., y tampoco es necesario un tratamiento para eliminar la capa de nata. Por lo tanto, el microorganismo causante puede identificarse rápidamente antes de agravar aún más el estado de la enfermedad, y pueden determinarse en una etapa temprana las políticas de tratamiento adecuadas, tales como la selección de antibióticos apropiados y las medidas para prevenir la expansión de la infección.

Descripción breve de los dibujos

[Figura 1] la figura 1 muestra una vista en sección esquemática de la tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico utilizado en el ejemplo 1, que comprende un miembro -1- impregnado con anticuerpo marcado (primera parte), un portador de membrana -2- para revelado cromatográfico (segunda parte), una parte -3- para la captura, un miembro -4- para la adición de la muestra, un miembro -5- para la absorción, un sustrato -6- y un miembro -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte).

[Figura 2] la figura 2 muestra una vista en sección esquemática de otro ejemplo de la tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico.

[Figura 3] la figura 3 muestra una vista en sección esquemática de otro ejemplo adicional de la tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico.

[Figura 4] la figura 4 muestra el efecto de mejora de la sensibilidad de detección de la utilización de una autolisina.

[Figura 5] la figura 5 muestra los resultados de la medición de *Staphylococcus aureus* añadido a la leche de vaca basada en ELISA utilizando acromopeptidasa y lisostafina.

[Figura 6] la figura 6 muestra una vista en sección esquemática de la tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico utilizado en el ejemplo 6, que comprende un miembro -1- impregnado con anticuerpo marcado (primera parte), un portador de membrana -2- para revelado cromatográfico (segunda parte), una parte -3- para la captura, un miembro -4- para la adición de la muestra, un miembro -6- para la absorción y un sustrato -6-.

[Figura 7] la figura 7 muestra los resultados de la detección de *Staphylococcus aureus* contenido en la leche mediante el procedimiento inmunocromatográfico utilizando lisostafina como enzima lítico.

Modos para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se explicará con más detalle.

El dispositivo inmunocromatográfico contenido en el kit de detección de la presente invención es un dispositivo para detectar una sustancia específica contenida en leche que ha sido tratada con un enzima lítico o un surfactante, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, sobre la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa láctea en la leche, en el que

el procedimiento inmunocromatográfico es un procedimiento de tipo de flujo lateral, la sustancia específica es un componente de una bacteria, o una sustancia secretada por una bacteria, en la que la detección de la sustancia específica permite que la bacteria se distinga de otras bacterias al nivel de especie o genero, y

el tamaño de retención de partículas de los huecos de la tercera parte es de 1 a 3,5 μm .

Entre los ejemplos específicos de la estructura de la tira reactiva se incluyen aquellos de las tiras de prueba cuyas vistas esquemáticas en sección se muestran en las figuras 1, 2 y 3. En la figura 1, el miembro -4- para la adición de la muestra y el miembro -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte) están dispuestos integralmente aguas arriba del miembro -1- impregnado con anticuerpo marcado (primera parte). En la figura 2, el miembro -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte) está dispuesto aguas abajo del miembro -1- impregnado con anticuerpo marcado (primera parte), y aguas arriba del portador de membrana -2- para el revelado cromatográfico (segunda parte). En la figura 3, el miembro -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte) está dispuesto aguas abajo del miembro -4- para la adición de la muestra, y aguas arriba del miembro -1- impregnado de anticuerpo marcado (primera parte).

El dispositivo inmunocromatográfico se puede producir de una manera conocida mediante la utilización de materiales comercializados.

El material utilizado para la primera parte no está particularmente limitado, siempre que se elija un material que permita la inmunocromatografía, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen una matriz de fibras de derivado de celulosa, etc., papel de filtro, fibra de vidrio, tela, algodón, etc.

El material utilizado para la segunda parte no está particularmente limitado, siempre que se elija un material que permita la inmunocromatografía, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen nitrato de celulosa, éster de nitrato de celulosa mixto, fluoruro de polivinilideno, nailon y otros.

El material utilizado para la tercera parte tiene huecos que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea

5 contenidos en la leche y que tienen un diámetro de, aproximadamente, 1 a 10 y varios micrómetros. La tercera parte debe estar dispuesta aguas arriba de la segunda parte mencionada anteriormente que comprende una membrana porosa que tiene un diámetro de poro de varias decenas a varios cientos de nm y, preferentemente, está dispuesta aguas arriba de la primera parte mencionada anteriormente, es decir, en una posición en la que una solución de muestra contacta con la tira reactiva y pasa a través de la misma.

10 Los huecos de la tercera parte pueden tener un tamaño que permita la eliminación de glóbulos de grasa láctea, y el tamaño de retención de partícula es de 1 a 3,5 μm . El material no está particularmente limitado, siempre que se elija un material que tenga huecos que muestren un tamaño de retención de partículas dentro del intervalo mencionado anteriormente, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen una matriz de fibras tales como derivados de celulosa, papel de filtro, fibra de vidrio, tela, algodón y otros. El tamaño de retención de partículas significa un tamaño de partícula de los glóbulos de grasa láctea en el que los glóbulos de grasa láctea que tienen un tamaño de partícula no menor que el tamaño de retención de partículas no pueden atravesar los huecos y son retenidos en la tercera parte, y corresponde sustancialmente al tamaño promedio de poro de los huecos de la tercera parte, y el 15 50% o más, preferentemente, el 60% o más, más preferentemente, el 70% o más, aún más preferentemente, el 80% o más, de forma particularmente preferente, el 90% o más y de la manera más preferente, el 98% o más, de los glóbulos de grasa láctea que tienen un tamaño de partícula no menor que el tamaño de retención de partículas no puede pasar a través de los huecos y son retenidos en la tercera parte. La relación de glóbulos de grasa láctea a retener se puede medir mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, se describe que el tamaño de retención de partículas de GF/B, proporcionada por GE Healthcare Bioscience, es de 1,0 μm en el catálogo del mismo (retención de partículas), y dicho tamaño de partícula, tal como se ha mencionado anteriormente, se puede confirmar mediante un procedimiento bien conocido por expertos en la materia.

25 La tercera parte mencionada anteriormente puede comprender un único tipo de material que tiene un tamaño de retención de partículas específico, o puede comprender un laminado que comprende materiales que tienen diferentes tamaños de retención de partículas y que se adhieren integralmente para que el tamaño de retención de partículas se reduzca gradualmente, a efectos de aumentar la eficacia de separación de los glóbulos de grasa. Esta tercera parte, tal como se ha mencionado anteriormente, constituida por dos o más tipos de miembros que pueden eliminar glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partícula, constituye una realización preferente de la presente invención, y en una realización más preferente de la presente invención, se constituye la tercera parte con un primer miembro dispuesto aguas abajo y un segundo miembro dispuesto aguas arriba, y el tamaño de retención de partículas del segundo miembro es mayor que el tamaño de retención de partículas del primer miembro. Cuando la tercera parte está constituida por dichos dos tipos de miembros, es preferente que el tamaño de retención de partículas del primer miembro dispuesto aguas abajo sea de 1,0 a 2,0 μm , y el tamaño de retención de partículas del segundo miembro dispuesto aguas arriba sea de 3,0 a 3,5 μm . Con el fin de detectar una sustancia específica de leche que contiene glóbulos de grasa láctea de alta concentración y una distribución de tamaños de partícula amplia, preferentemente dicha leche sin diluir después del ordeño, con alta sensibilidad, es preferente que la tercera parte esté constituida por una combinación de un miembro que tenga un tamaño de retención de partículas pequeño y un miembro que tenga un tamaño de retención de partículas grande.

40 La primera parte mencionada anteriormente retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra una sustancia específica. Si la primera parte retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra una sustancia específica, la sustancia específica puede detectarse mediante el procedimiento de ensayo en sándwich. El procedimiento de ensayo en sándwich muestra una sensibilidad de detección elevada y da una línea que indica la detección del anticuerpo como resultado positivo, y, por lo tanto, la primera parte retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra una sustancia específica.

50 Cuando la primera parte está fabricada para retener un primer anticuerpo marcado dirigido contra una sustancia específica, dos tipos de anticuerpos, el primer anticuerpo dirigido contra la sustancia específica, y un segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica. Con el fin de permitir la detección de la sustancia específica mediante el procedimiento de ensayo en sándwich, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo mencionados anteriormente son anticuerpos que pueden unirse simultáneamente a la sustancia específica y es preferente que el epítipo de la sustancia específica que será reconocido por el primer anticuerpo mencionado anteriormente sea diferente del epítipo de la sustancia específica que será reconocido por el segundo anticuerpo mencionado anteriormente.

60 En la presente invención, para obtener una señal detectable, se marca el primer anticuerpo retenido por la primera parte. Entre los ejemplos del marcador utilizados para la presente invención se incluyen una partícula de colorante, enzima, radioisótopo, y otros, y es preferente utilizar una partícula de colorante que pueda detectarse visualmente sin ningún equipo especial. Entre los ejemplos de la partícula de colorante se incluyen micropartículas metálicas, tales como las de oro y platino, partículas no metálicas, partículas de látex y otros, pero sin que constituyan limitación. La partícula colorante puede tener cualquier tamaño siempre que la partícula colorante tenga un tamaño tal que pueda transportarse aguas abajo a través del interior de los huecos de la tira reactiva, pero preferentemente, tiene un tamaño de 1 nm a 10 μm , más preferentemente, de 5 nm a 1 μm , aún más preferentemente de 10 a 100 nm, de diámetro.

La sustancia específica medida por la presente invención puede ser cualquier sustancia siempre que sea una sustancia que pueda medirse mediante el procedimiento inmunocromatográfico, pero preferentemente es un componente de una bacteria o una sustancia que es secretada por una bacteria. Más preferentemente, la sustancia específica es la proteína ribosómica L7/L12 de una bacteria. Se puede obtener una alta sensibilidad de detección para la proteína ribosómica L7/L12, ya que existe en las células en un número de copias grande. Además, tal como se muestra en los ejemplos mencionados más adelante, se puede obtener realmente un anticuerpo con el que se puede distinguir una bacteria específica como causa de mastitis de otras bacterias a nivel de especie o género mediante un procedimiento conocido. El tipo de bacteria no está particularmente limitado, y puede ser una bacteria gram-positiva o una bacteria gram-negativa. Entre los ejemplos se incluyen, por ejemplo, bacterias gram-positivas tales como estafilococos (bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus*), preferentemente *Staphylococcus aureus*, y otros, bacterias *Escherichia coli*, pertenecientes al género *Klebsiella*, y otros, pero sin que constituyan limitación.

El anticuerpo mencionado anteriormente se puede preparar mediante el procedimiento descrito en la publicación de Patente internacional WO00/06603. Cuando la proteína ribosómica bacteriana L7/L12 es el antígeno, el anticuerpo puede prepararse utilizando una proteína de longitud completa o un péptido parcial de la proteína ribosómica bacteriana L7/L12 como antígeno, pero preferentemente, se prepara utilizando una proteína de longitud completa como un antígeno. Se puede obtener un antisuero que contiene un anticuerpo (anticuerpo policlonal) que reconoce la proteína ribosómica L7/L12 inoculando a un animal dicho péptido parcial o proteína de longitud completa, tal como se ha mencionado anteriormente, tal como está o reticulada con una proteína transportadora, junto con un adyuvante según sea necesario y recolectando el suero del animal. Además, el anticuerpo también puede purificarse del antisuero y utilizarse. Entre los ejemplos del animal utilizado para la inoculación se incluyen ovejas, caballos, cabras, conejos, ratones, ratas, etc., y ovejas, conejos, etc. son especialmente preferentes para preparar anticuerpos policlonales. Además, es más preferente utilizar, como el anticuerpo, un anticuerpo monoclonal obtenido mediante un procedimiento conocido en el que se prepara una célula de hibridoma, y en este caso, es preferente el ratón como el animal. Como dicho anticuerpo monoclonal, si un anticuerpo monoclonal que reacciona con la proteína ribosómica L7/L12 de una bacteria específica que causa mastitis, pero que no reacciona con la proteína ribosómica L7/L12 de una bacteria que causa mastitis distinta a la bacteria especificada anteriormente, se recupera mediante cribado, puede utilizarse para diagnosticar si un animal sufre una infección por la bacteria o no.

También se puede utilizar un anticuerpo que reconoce una sustancia distinta a la proteína ribosómica L7/L12 como un antígeno, siempre que el anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal que reaccione con un componente de una bacteria específica que causa mastitis o una sustancia secretada por dicha bacteria, pero no reaccione con un componente de una bacteria que causa mastitis que no sea la bacteria anterior o una sustancia secretada por dicha bacteria.

Además, como anticuerpo monoclonal, es preferente utilizar un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo no se inhiba con ningún contaminante distinto de la sustancia específica contenida en la leche. Por ejemplo, la leche contiene una gran cantidad de proteínas, tales como la caseína, y pueden inhibir la reacción de la sustancia específica y el anticuerpo monoclonal. Como anticuerpo monoclonal dirigido contra la sustancia específica preparada de una manera convencional, por ejemplo, se puede elegir y utilizar preferentemente, un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo no está inhibida por la caseína o similar, o un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo apenas se ve afectada por la caseína o similar. Dicho anticuerpo monoclonal se puede preparar fácilmente preparando anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con un antígeno de la manera habitual, y seleccionando posteriormente un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo no está sustancialmente inhibida por un contaminante, tal como la caseína, al examinar si la reacción del antígeno-anticuerpo se inhibe o no en presencia del contaminante.

En la presente invención, la tira reactiva descrita anteriormente se puede utilizar como si fuera un dispositivo inmunocromatográfico, o la tira reactiva se puede almacenar en un estuche para constituir un dispositivo inmunocromatográfico. En el primer caso, si se utiliza un gran volumen de leche como muestra, el dispositivo inmunocromatográfico se utiliza, preferentemente, sumergiendo directamente un extremo de la tira reactiva en la muestra contenida en un recipiente. En el último caso, si el volumen de leche como muestra es pequeño, el dispositivo inmunocromatográfico se utiliza, preferentemente, midiendo un volumen predeterminado de la muestra con una pipeta o similar, y dejando caer la muestra sobre la tira reactiva. En este último caso, el estuche puede tener cualquier forma siempre que la tira reactiva pueda almacenarse. El estuche puede formarse con cualquier material, y entre los ejemplos preferentes se incluyen polipropileno, policarbonato, y otros.

El kit de detección de la presente invención comprende una solución de aditivo que contiene un enzima lítico o surfactante para lisar una bacteria en la leche, por ejemplo, una solución de aditivo para eluir la proteína ribosómica L7/L12 en la solución, y un dispositivo inmunocromatográfico, tal como se ha definido anteriormente, que puede comprender además un recipiente, tal como un microtubo.

El procedimiento inmunocromatográfico de la presente invención es un procedimiento inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende:

(1) la etapa de tratar la leche con un enzima lítico o surfactante para lisar una bacteria en la leche;
 (2) la etapa de poner en contacto la leche de la etapa (1) con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica,
 5 una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, sobre la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica, y una tercera parte aguas arriba de la primera parte y la segunda parte y que tiene huecos para la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en la tercera parte o en otra parte aguas más arriba, y
 10 (3) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o una parte adicional aguas abajo para obtener una señal detectable del marcador en la segunda parte o en una parte aguas más abajo, en el que el procedimiento inmunocromatográfico es un procedimiento de tipo de flujo lateral, la sustancia específica es un componente de una bacteria, o una sustancia secretada por una bacteria, y el tamaño de retención de partículas de los huecos de la tercera parte es de 1 a 3,5 μm .

15 La leche se pone en contacto con la tercera parte mencionada anteriormente o un miembro para la adición de muestras que se localiza en una posición aguas más arriba, tal como está, o como una solución mixta que contiene la solución de aditivo. Cuando la sustancia específica mencionada anteriormente es una sustancia que existe en las células de una bacteria, la bacteria se puede lisar añadiendo directamente un ingrediente surfactante a la leche, o la solución de aditivo mencionada anteriormente, o haciendo que el ingrediente surfactante se retenga en una parte
 20 que se localiza aguas arriba de la segunda parte mencionada anteriormente, preferentemente una parte que se localiza aguas arriba de la primera parte mencionada anteriormente (en relación al tratamiento de lisis celular con un surfactante, consúltese la publicación de Patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 61-111464). Estas técnicas pueden combinarse apropiadamente. Como otro componente de la solución de aditivo, se puede utilizar un tampón apropiado (por ejemplo, MOPSO, etc.), aunque el componente no está particularmente limitado siempre que se elija un componente que no inhiba la reacción antígeno-anticuerpo.

Como otra realización, añadiendo directamente un enzima lítico a la leche, o añadiendo a la solución de aditivo, o inmovilizando un enzima lítico aguas arriba de la segunda parte mencionada anteriormente, preferentemente aguas arriba de la primera parte mencionada anteriormente, leche sometida al tratamiento con el enzima lítico, en la que la sustancia específica contenida en las células queda expuesta fuera de las células, puede fluir hasta la segunda parte
 30 o hasta una parte aguas más abajo, y de este modo la sustancia específica que existe en las células de la bacteria puede detectarse con alta sensibilidad. Estas técnicas pueden combinarse apropiadamente. En una realización preferente, el enzima lítico puede añadirse directamente a la leche, o puede estar contenido en la solución de aditivo mencionada anteriormente, y en una realización particularmente preferente, la solución de aditivo que contiene un enzima lítico mencionado anteriormente puede añadirse a la leche.

El tipo de enzima lítico no está particularmente limitado, y también se pueden utilizar dos o más tipos de enzimas líticos arbitrarios en combinación. Dado que las infecciones de *Escherichia coli*, bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* y *Staphylococcus aureus*, como bacterias etiológicas de la mastitis, se producen frecuentemente, es preferente también utilizar uno o más tipos de enzimas líticos que puedan exhibir una acción bacteriolítica contra estos microorganismos en combinación. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o dos o más tipos de enzimas líticos seleccionadas de lisozima, lisostafina, pepsina, glucosidasa, galactosidasa, acromopeptidasa, β -N-acetilglucosaminidasa, etcétera. Por ejemplo, se ha propuesto un procedimiento para utilizar lisozima y un agente lítico de membrana celular como el enzima lítico (publicación de Patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 63-167799).

Como el enzima lítico, muchas de autolisinas exhiben un efecto lítico elevado, y dichas autolisinas son preferentes (véase la figura 4). Autolisina se refiere a un enzima que es producido por una bacteria en sí misma, y lisa la misma bacteria. Aunque se desconocen los detalles de la razón por la cual ocurre dicha autólisis, se considera que, cuando una bacteria se extiende y se divide, desempeña un papel de lisar y escindir la célula bacteriana. Como autolisinas bacterianas, se conocen lisostafina, acetilglucosaminidasa, acromopeptidasa, etcétera.

Cuando se sospeche especialmente la presencia de *Staphylococcus aureus* como una bacteria etiológica de mastitis, puede ser preferente utilizar lisostafina que muestra específicamente una acción bacteriolítica contra *Staphylococcus aureus* independientemente o en combinación con otro enzima lítico, ya que la tasa de lisis para *Staphylococcus aureus* exhibida por los surfactantes es baja. La publicación de Patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 11-28099 da a conocer un procedimiento de lisis de *Staphylococcus aureus* con lisostafina, y los expertos en la materia pueden obtener fácilmente lisostafina como enzima lítico.

60 La lisostafina de origen natural es una proteasa de zinc producida por *Staphylococcus simulans*, y se sabe que hidroliza enlaces de glicilglicina en las cadenas de glicopéptidos de los peptidoglicanos de la pared celular de *Staphylococcus aureus* o bacterias congéneres de los mismos para lisar la bacteria. En la presente memoria descriptiva, el término lisostafina también significa, además del tipo natural de lisostafina, una lisostafina mutante que tiene la secuencia de aminoácidos del tipo de lisostafina de origen natural, pero que incluye una mutación tal como adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en tal grado que la actividad de hidrólisis mencionada anteriormente no se pierde. Además, el término lisostafina también significa una lisostafina de

tipo modificado que comprende la lisostafina de tipo natural o una lisostafina mutante unida a otro compuesto, por ejemplo, sacárido, polietilenglicol o similares. Estas lisostafinas se pueden obtener mediante el procedimiento basado en el cultivo o la técnica de ingeniería genética descrita en la publicación de Patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 11-28099, o comprando un producto comercial. Cuando se utiliza una lisostafina como enzima lítica, por ejemplo, se puede detectar un antígeno que comprende la proteína ribosómica L7/L12 de *Staphylococcus aureus* mediante el procedimiento inmunocromatográfico, o dicho antígeno, tal como se menciona anteriormente, también se puede detectar con una combinación de un procedimiento inmunocromatográfico y otro procedimiento de ensayo inmunológico u otro procedimiento de ensayo inmunológico en lugar del procedimiento inmunocromatográfico. Entre los ejemplos del procedimiento de ensayo inmunológico distintos del procedimiento inmunocromatográfico se incluyen, por ejemplo, el procedimiento de reacción de aglutinación, el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo fluorescente (FIA), etc., sin que constituyan limitación.

La reacción antígeno-anticuerpo puede detectarse mediante el procedimiento de ensayo en sándwich utilizando el "primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica" retenido por la primera parte, y el "segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica" inmovilizado por la segunda parte. El procedimiento de ensayo en sándwich proporciona una sensibilidad de detección elevada y da una línea que indica la detección del anticuerpo como un resultado positivo.

Los procedimientos inmunocromatográficos se clasifican aproximadamente en los del tipo de flujo lateral utilizando la transferencia de un líquido por capilaridad en una tira reactiva dispuesta en la dirección transversal, y los del tipo de flujo directo en el que se hace pasar un líquido a través de una tira reactiva dispuesta verticalmente desde la parte superior a la inferior de la misma, principalmente por gravedad. En la presente invención se utiliza el de tipo de flujo lateral.

La presente invención se explicará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no queda limitada por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Confirmación del flujo de líquido de la muestra de leche en el procedimiento inmunocromatográfico

(1) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Se preparó el dispositivo inmunocromatográfico que se muestra en la figura 1 como una vista en sección esquemática, de la siguiente manera.

(a) Preparación del anticuerpo contra la proteína ribosómica L7/L12

Como anticuerpo para marcar con oro coloidal, se utilizó el anticuerpo monoclonal contra la proteína ribosómica L7/L12 de *Staphylococcus aureus*. Según el procedimiento descrito en la publicación de Patente internacional WO00/06603, en el ejemplo 5, se obtuvo la proteína ribosómica L7/L12 de *Staphylococcus aureus*, y se preparó el anticuerpo monoclonal utilizando esta proteína. Como anticuerpo monoclonal, una combinación de dos tipos de anticuerpos monoclonales (SA-1 y SA-2) que pueden unirse simultáneamente a diferentes sitios de la proteína ribosómica L7/L12 mencionada anteriormente.

Se confirmó que la combinación de los anticuerpos monoclonales SA-1 y SA-2 reacciona con la proteína ribosómica L7/L12 de *Staphylococcus aureus*, pero no reacciona con la proteína ribosómica L7/L12 de las bacterias que causan mastitis diferentes de *Staphylococcus aureus*, y son anticuerpos cuyas reacciones no son inhibidas por los componentes de la leche, de la siguiente manera.

Se vertió el anticuerpo monoclonal SA-1 (10 µg/ml) y PBS (100 µl) en cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos (Placa ELISA Maxsorp, Nunc), y se permitió la adsorción del anticuerpo durante la noche a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante, se añadió una solución de albúmina de suero bovino al 1% (en PBS, 200 µl), y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para lograr el bloqueo. Después de eliminar el sobrenadante, cada pocillo se lavó varias veces con una solución de lavado (Tween 20 al 0,02%, PBS), se añadió al pocillo cada una de las diversas bacterias mostradas en la tabla 1 (aproximadamente 1×10^8 células/ml) diluidas 10 veces con PBS con Triton X-100 al 0,5%, (100 µl), y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, después de eliminar el sobrenadante, se añadió el anticuerpo monoclonal SA-2 marcado con peroxidasa y diluido con PBS con Tween 20 al 0,02%, hasta una concentración final de 1 µg/ml (100 µl), y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar el sobrenadante, cada pocillo se lavó varias veces más con la solución de lavado, posteriormente se añadió una solución de TMB (KPL, 100 µl) a cada pocillo, y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió ácido clorhídrico 1 mol/l (100 µl) para terminar la reacción, se midió la absorbancia a 450 nm y se evaluó la reactividad sobre la base de la diferencia de la absorbancia de la señal del control negativo (solución que no contiene bacteria). Los resultados se muestran en la tabla 1. Los resultados positivos (+) significan que la diferencia de la absorbancia obtenida después del ELISA y la absorbancia del control negativo fue, como mínimo, 0,5 o mayor, y los resultados negativos (-) significan que la

diferencia de la absorbancia obtenida después del ELISA y la absorbancia del control negativo no fue mayor que 0,1.

[Tabla 1]

Cepa	Resultado	Cepa	Resultado
<i>Bacillus subtilis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Serratiamarcescens</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-
<i>Haemophilus parahaemoliticus</i>	-	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcusintermedius</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus mitior</i>	-
<i>Moraxella catarrharis</i>	-	<i>Streptococcus mitis</i>	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Neisseria lactamica</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Propionibacteriumacens</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-		

5 Se vertió el anticuerpo monoclonal SA-1 (10 µg/ml) y PBS (100 µl) en cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos (Placa ELISA Maxsorp, Nunc), y se permitió la adsorción del anticuerpo durante la noche a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante, se añadió una solución de albúmina de suero bovino al 1% (en PBS, 200 µl), y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para lograr el bloqueo. Después de eliminar el sobrenadante, cada pocillo se lavó varias veces con una solución de lavado (Tween 20 al 0,02%, PBS), se añadieron *Staphylococcus aureus* (aproximadamente 1×10^9 células/ml) diluido 10 veces con PBS con Triton X-100 al 0,5%, (20 µl) y leche (leche de vaca comercial para beber, 80 µl) a los pocillos, y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, después de eliminar el sobrenadante, se añadió el anticuerpo monoclonal SA-2 marcado con peroxidasa y diluido con PBS con Tween 20 al 0,02%, hasta una concentración final de 1 µg/ml (100 µl), y se dejó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar el sobrenadante, cada pocillo se lavó varias veces más con la solución de lavado, posteriormente se añadió la solución de TMB (KPL, 100 µl), y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió ácido clorhídrico 1 mol/l (100 µl) para terminar la reacción, se midió posteriormente la absorbancia a 450 nm y se evaluó la reactividad sobre la base de la diferencia de la absorbancia de la señal del control positivo (solución que no contiene leche), para confirmar que la reactividad no se reducía por la leche.

20 (b) Miembro impregnado con anticuerpos marcados con oro coloidal

25 Se mezcló una solución de oro coloidal (tamaño de partícula 60 nm, 0,9 ml, BB International) con fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,5, se añadió a la mezcla el anticuerpo monoclonal SA-2 a marcar con el oro coloidal (100 µg/ml), y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos para que el anticuerpo se uniera a las superficies de partícula de oro coloidal. Posteriormente, se añadió una solución acuosa al 10% de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración final del 1% a la solución de oro coloidal, y las superficies restantes de las partículas de oro coloidal se bloquearon con BSA para preparar una solución del anticuerpo monoclonal SA-2 marcado con oro coloidal (denominado a continuación "anticuerpo marcado con oro coloidal"). Esta solución se centrifugó (a 15.000 x rpm durante 5 minutos) para precipitar el anticuerpo marcado con oro coloidal, y el sobrenadante se eliminó para obtener el anticuerpo marcado con oro coloidal. Este anticuerpo marcado con oro coloidal se suspendió en tampón de Tris-ácido clorhídrico 20 mM (pH 8,2) que contenía el 0,25% de BSA, el 2,5% de sacarosa y 35 mM de NaCl para obtener una solución de anticuerpo marcado con oro coloidal. Se impregnó una almohadilla de fibra de vidrio con forma de banda (10 mm x 300 mm) con la solución de anticuerpo marcado con oro coloidal (2 ml), y se secó a temperatura ambiente a presión reducida para obtener un miembro -1- impregnado con anticuerpo marcado con oro coloidal (primera parte).

(c) Parte para la captura del complejo de antígeno y anticuerpo marcado con oro coloidal

40 Se preparó una membrana de nitrocelulosa que tenía una anchura de 25 mm y una longitud de 300 mm como un portador de membrana -2- para el revelado cromatográfico con medio de cromatografía (segunda parte).

Se aplicó una solución que contenía el anticuerpo monoclonal SA-1 (1,5 mg/ml) en forma de una línea en un volumen de 1 µl/cm al portador de membrana -2- para el revelado cromatográfico en una posición de 10 mm desde el extremo en el lado del punto de inicio del revelado de cromatografía, y se secó a 50 °C durante 30 minutos y, posteriormente, se sumergió el portador de membrana en una solución de sacarosa al 0,5% durante 30 minutos y se secó durante la noche a temperatura ambiente para obtener una parte -3- para la captura del complejo del antígeno de la proteína ribosómica L7/L12 de *Staphylococcus aureus* y el anticuerpo marcado con oro coloidal.

(d) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Además del miembro -1- impregnado con el anticuerpo marcado mencionado anteriormente y el portador de membrana -2- para el revelado cromatográfico, se preparó un paño de algodón que sirve como miembro -4- para la adición de la muestra y el miembro -7- para eliminar los glóbulos de grasa (tercera parte) y el papel de filtro como miembro -5- para la absorción. Después de que estos miembros se hubieron adherido sobre el sustrato -6- (espesor 254 µm, hecho de poliestireno, que tenía adhesivo para adherir los miembros), el sustrato se cortó a una anchura de 5 mm para preparar el dispositivo inmunocromatográfico cuya vista en sección se muestra en la figura 1. Como el miembro -4- para la adición de la muestra, se utilizaron los miembros que se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

Miembro para la adición de muestra (fabricante)	Tamaño de retención de partículas (µm)	Material	Espesor (µm)
GF/B (GE Healthcare Bioscience)	1,0	Fibra de vidrio	980
GF/AVA (GE Healthcare Bioscience)	1,7	Fibra de vidrio	299
MF1 (GE Healthcare Bioscience)	2	Fibra de vidrio	357
VF1 (GE Healthcare Bioscience)	2,5	Fibra de vidrio	701
VF2 (GE Healthcare Bioscience)	3	Fibra de vidrio	764
GF/DVA (GE Healthcare Bioscience)	3,5	Fibra de vidrio	776
NE107 (Asahi Kasei Fibers)	De varias decenas a varias centenas	Celulosa	410
UR601 (Asahi Kasei Fibers)	De varias decenas a varias centenas	Celulosa	520

(2) Prueba

La medición de la leche de vaca utilizando el dispositivo inmunocromatográfico se realizó de la siguiente manera. Una muestra de leche fresca (100 µl) en la se había detectado *Staphylococcus aureus* se colocó en un microtubo, se añadió a la muestra una solución de aditivo (150 µl, Tween 20 al 1%, NaCl 0,05 M, MOPSO 0,1 M como concentraciones finales, pH 7,5) y se mezcló. El dispositivo inmunocromatográfico obtenido en (1) mencionado anteriormente se sumergió en la solución mixta anterior desde el miembro -4- para la adición de la muestra, el revelado cromatográfico se llevó a cabo por el procedimiento de flujo lateral y se examinó si la solución de revelado fluía al miembro -5- para la absorción.

Los resultados se muestran en la tabla 3. El símbolo + indica que la solución de revelado fluyó al miembro -5- para su absorción, y el símbolo - indica que la solución de revelado se detuvo en el camino hacia el miembro -5- para su absorción. Solo cuando se utilizó un miembro que mostraba un tamaño de retención de partículas no superior a 3,5 µm, la solución fluyó al miembro -5- para su absorción. En los otros casos, el flujo de líquido se detuvo en el medio del portador de membrana 2 para el revelado cromatográfico.

[Tabla 3]

Miembro para la adición de muestra (fabricante)	Resultado
GF/B (GE Healthcare Bioscience)	+
GF/AVA (GE Healthcare Bioscience)	+
MF1 (GE Healthcare Bioscience)	+
VF1 (GE Healthcare Bioscience)	+
VF2 (GE Healthcare Bioscience)	+
GF/DVA (GE Healthcare Bioscience)	+
NE107 (Asahi Kasei Fibers)	-
UR601 (Asahi Kasei Fibers)	-

Ejemplo 2: detección de *Staphylococcus aureus* en leche mediante un procedimiento inmunocromatográfico

(1) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se preparó el dispositivo inmunocromatográfico que se muestra en la figura 1. Como el miembro que sirve como miembro -4- para la adición de la muestra y miembro -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte), se utilizó GF/DVA mencionado en la tabla 2.

(2) Prueba

La medición de la leche de vaca utilizando el dispositivo inmunocromatográfico se realizó de la siguiente manera. Cada una de las muestras de leche fresca 1 a 6 (100 µl) se colocó en un microtubo, se añadió a la muestra una solución de aditivo (150 µl, Tween 20 al 1%, NaCl 0,05 M, MOPSO 0,1 M como concentraciones finales, pH 7,5). y se mezcló. El dispositivo inmunocromatográfico mencionado anteriormente se sumergió en la solución mixta anterior desde el miembro -4- para la adición de la muestra, el dispositivo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos para llevar a cabo el revelado cromatográfico por el procedimiento de flujo lateral y posteriormente se determinó visualmente si el complejo del antígeno de la proteína ribosómica EI L7/L12 y el anticuerpo marcado con oro coloidal fue capturado por la parte -3- para la captura mencionada anteriormente o no, sobre la base de la presencia o ausencia de una línea violeta rojiza que se volvió más o menos visible en proporción a la cantidad de captura.

Por separado, para confirmar la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus* en las muestras de leche, la detección también se realizó por el procedimiento de cultivo. Cada muestra de leche (100 µl) se inoculó en Trypticase Soy Agar II con sangre de oveja al 5% (Becton Dickinson Japan) o en el medio de selección de *Staphylococcus aureus*, X-SA Agar Medium (Nissui) y posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas, y se confirmó la aparición de colonias.

Los resultados de la determinación visual y los resultados del procedimiento basado en el cultivo se muestran en la tabla 4. En los resultados del procedimiento basado en el cultivo, el símbolo + indica que se observó una colonia de *Staphylococcus aureus*, y el símbolo - indica que no se observó una colonia de *Staphylococcus aureus*. En los resultados obtenidos por determinación utilizando el kit, el símbolo + indica que se puede observar visualmente una línea violeta rojiza, y el símbolo - indica que dicha línea no se puede observar visualmente.

[Tabla 4]

No. de muestra	Resultados obtenidos mediante el procedimiento basado en cultivo (bacteria detectada)	Resultados obtenidos mediante el kit
1	-	-
2	-	-
3	-(Estreptococos)	-
4	-(Estreptococos)	-
5	+(<i>Staphylococcus aureus</i>)	+
6	+(<i>Staphylococcus aureus</i>)	+

En las dos muestras de leche en las que no se detectaron bacterias, no apareció ninguna línea. También en las dos muestras para las cuales se detectó estreptococo, no apareció ninguna línea. Por otro lado, en las muestras para las cuales se detectó *Staphylococcus aureus*, aparecieron líneas y, por lo tanto, se pudo detectar *Staphylococcus aureus*.

Tal como se ha descrito anteriormente, la utilización del dispositivo inmunocromatográfico de la presente invención hizo posible revelar una muestra de leche que contiene glóbulos de grasa láctea que no bloquean la membrana, y realizar mediciones precisas.

Ejemplo 3: medida con leche a concentración elevada por procedimiento inmunocromatográfico

Se preparó el dispositivo inmunocromatográfico que se muestra en la figura 1 mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1, y el flujo de líquido se confirmó con la relación variable de la leche en las muestras. Como miembro para la adición de la muestra, se utilizaron los mencionados en la tabla 3. Se mezclaron una muestra de leche fresca y una solución de aditivo en diversas proporciones (la solución de aditivo contenía Tween 20 al 1%, NaCl 0,05 M, MOPSO 0,1 M como concentraciones finales, pH 7,5, el volumen líquido total fue de 250 µl), el dispositivo inmunocromatográfico se sumergió en la mezcla desde el miembro para la adición de la muestra, se llevó a cabo el revelado cromatográfico mediante el procedimiento de flujo lateral, y se examinó si el volumen total de la mezcla se había revelado o no.

Los resultados se muestran en la tabla 5. El símbolo + indica que la solución de revelado fluyó al miembro -5- para su absorción, y el símbolo - indica que la solución de revelado se detuvo en el camino hacia el miembro -5- para su absorción. Cuando la proporción de leche era del 50%, el volumen total de la mezcla fluía al miembro -5- para su absorción con los miembros para la adición de muestras distintos de VF1. Cuando la proporción de leche fue del 70%, para todos los miembros para la adición de muestra, el flujo de la mezcla se detuvo en medio del portador de membrana -2- para revelado cromatográfico, o incluso si la mezcla alcanzó el miembro -5- para absorción, el flujo de la mezcla se detuvo y, por lo tanto, no se pudo realizar una medición correcta.

10

[Tabla 5]

Miembro para la adición de muestras (fabricante)	Resultado (proporción de leche, %)	
	50	70
GF/AVA (GE Healthcare Bioscience)	+	-
MF1 (GE Healthcare Bioscience)	+	-
VF1 (GE Healthcare Bioscience)	-	-
VF2 (GE Healthcare Bioscience)	+	-
GF/DVA (GE Healthcare Bioscience)	+	-

Posteriormente, dos de los miembros para la adición de la muestra se apilaron y se utilizaron para realizar la misma prueba que se ha mencionado anteriormente. Dos de los miembros para la adición de la muestra se apilaron como se muestra en la figura 3. Como miembros para la adición de muestras, se utilizaron GF/AVA y GF/DVA. GF/DVA se dispuso en el lado aguas arriba (miembro -4- para la adición de muestras), y GF/AVA se dispuso en el lado aguas abajo (miembro -7- para la eliminación de glóbulos de grasa), y la prueba se realizó con varias longitudes de los miembros. La proporción de leche fue del 80% y el volumen de la muestra fue de 250 µl. Los resultados se muestran en la tabla 6 (en cuanto a la "longitud" y la "superposición" mencionadas en la tabla, consúltese la figura 3). El símbolo + indica que la solución de revelado fluyó al miembro 5 para su absorción. Incluso cuando la proporción de leche era del 80%, el flujo de líquido no se detenía y se podía realizar una medición correcta. Además, incluso cuando se modificaron las longitudes de dos de los miembros para la adición de muestras, se pudo realizar una medición correcta.

15

20

[Tabla 6]

Miembro para la adición de muestras			Resultado de la prueba
Longitud (mm)		Superposición (mm)	
GF/DVA	GF/AVA		
25	10	5	+
20	15	5	+
15	20	5	+
10	25	5	+
30	25	25	+
21	25	16	+
16	25	11	+
25	10	5	+
25	15	10	+
25	20	15	+

25

Tal como se ha descrito anteriormente, al utilizar dos tipos de miembros para la adición de muestras con diferentes tamaños de retención de partículas en combinación, se pudieron eliminar los glóbulos de grasa láctea, las muestras de leche se pudieron desarrollar sin obstrucción en la membrana y, de este modo, se permitió la medición altamente sensible y correcta, incluso cuando se utilizó leche a concentración elevada.

30

Ejemplo 4: efecto del enzima lítico en la detección de *Staphylococcus aureus* por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

(a) Preparación del anticuerpo monoclonal contra la proteína ribosómica L7/L12

35

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales SA-1 y SA-2 mencionados en el ejemplo 1.

(b) Confirmación del efecto del enzima lítico en ELISA

El efecto del enzima lítico se confirmó de la siguiente manera.

Se trató *Staphylococcus aureus* con cada surfactante y enzimas líticos mostrados en la tabla 7 a 37°C durante 20 minutos en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), y posteriormente se utilizó para ELISA, en el que se midió la absorbancia de la misma manera que en el ejemplo 1, (a). Se ajustó *Staphylococcus aureus* a una concentración final de $2,5 \times 10^5$ (células/ml) con solución salina fisiológica. Como control negativo, se utilizó solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para el control positivo, se utilizó un surfactante no iónico, Triton X-100. La concentración final fue del 1% y el tratamiento se realizó durante la noche a temperatura ambiente.

[Tabla 7]

Surfactante o enzima lítico	Tipo	Fabricante	Concentración (concentración final)
PBS	Tampón	Wako Pure Chemical Industries	-
Triton X-100	Surfactante	SIGMA	1,0%
Lisozima	Enzima lítico	Wako Pure Chemical Industries	5 (µg/ml)
Acromopeptidasa	Enzima lítico	Wako Pure Chemical Industries	5 (µg/ml)
Lisostafina	Enzima lítico	Wako Pure Chemical Industries	5 (µg/ml)

Los resultados se muestran en la figura 4.

En comparación con PBS utilizado como control negativo, se obtuvo una mayor absorbancia con el surfactante y todos los enzimas líticos. En comparación con el surfactante Triton X-100, que es un agente de lisis de utilización común, la acromopeptidasa y la lisostafina, que son autolisinas, dieron valores de absorbancia dos veces más elevados.

Ejemplo 5: efecto del enzima lítico en caso de utilizar leche

Mediante la utilización de acromopeptidasa (Wako Pure Chemical Industries) y lisostafina (Wako Pure Chemical Industries), que mostró un efecto de lisis elevado en el ejemplo 4, se midió *Staphylococcus aureus* añadido a la leche de vaca mediante ELISA. Como leche de vaca, se utilizó leche de vaca comercial para beber en una proporción del 0 al 80% (el resto fue Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)), y se ajustó el *Staphylococcus aureus* a una concentración final de 1×10^5 (células/ml) con solución salina fisiológica. Las concentraciones de acromopeptidasa y lisostafina se ajustaron utilizando Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y se mezclaron con muestras de *Staphylococcus aureus* a una concentración final de 5 µg/ml. La medición por ELISA se realizó de la misma manera que en el ejemplo 4.

Los resultados se muestran en la figura 5. Cuando se utilizó la acromopeptidasa, la absorbancia disminuyó con el aumento de la proporción de leche. Por otro lado, cuando se utilizó lisostafina, independientemente de la proporción de leche, se observó una absorbancia fija. Por lo tanto, los resultados indican que la acromopeptidasa no puede exhibir un efecto suficiente en presencia de leche a concentración elevada.

Ejemplo 6: detección de *Staphylococcus aureus* en leche por procedimiento inmunocromatográfico

(1) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Se preparó un dispositivo inmunocromatográfico de la siguiente manera.

(a) Miembro impregnado de anticuerpo marcado con oro coloidal

Se utilizó el miembro impregnado con anticuerpo marcado con oro coloidal descrito en el ejemplo 1.

(b) Parte para capturar complejo de antígeno y anticuerpo marcado con oro coloidal

Esta parte se preparó de la misma manera que la del ejemplo 1.

(c) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Además del miembro -1- impregnado con anticuerpo marcado mencionado anteriormente y el portador de membrana -2- para el revelado cromatográfico, se preparó GF/DVA (elemento de filtro que comprende fibras de vidrio que tienen un espesor de 776 µm, y un tamaño de retención de partículas de 3,5 µm, GE Healthcare Bioscience) como un miembro que sirve como el miembro -4- para la adición de la muestra y como el miembro -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte), y papel de filtro como el miembro -5- para la absorción.

Después de que estos miembros se adhirieran sobre el sustrato -6- (espesor 254 μm , hecho de poliestireno, que tenía adhesivo para adherir los miembros), el sustrato se cortó a una anchura de 5 mm para preparar el dispositivo inmunocromatográfico cuya vista en sección se muestra en la figura 6.

5 (2) Prueba

La medición de la leche de vaca utilizando el dispositivo inmunocromatográfico se realizó de la siguiente manera.

10 Se colocó una muestra de leche (100 μl) que contenía una cantidad conocida de *Staphylococcus aureus* en un microtubo, se añadió una solución de aditivo (150 μl , Triton X-100 al 1%, 5 $\mu\text{g/ml}$ de lisostafina, MOPSO 0,1 M como concentraciones finales, pH 7,5) a la muestra y se mezcló. Como la leche, se utilizó producto comercial para beber. Para comparación, la prueba también se realizó con la solución de aditivo que no contenía lisostafina (Triton X-100 al 1%, MOPSO 0,1 M como concentraciones finales, pH 7,5). El dispositivo inmunocromatográfico mencionado anteriormente se sumergió en la solución mixta anterior desde el miembro -4- para la adición de la muestra, el dispositivo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para llevar a cabo el revelado cromatográfico mediante el procedimiento de flujo lateral y posteriormente se determinó si el complejo del antígeno de la proteína ribosómica L7/L12 y el anticuerpo marcado con oro coloidal había sido capturado o no por la parte -3- mencionada anteriormente, mediante la cuantificación de una línea violeta rojiza, que se volvió más o menos visible en proporción a la cantidad de captura, utilizando un aparato, FASTKIT Immunochromatographic Lector DiaScan 20-A (Becton Dickinson Japón).

25 Los resultados se muestran en la figura 7. Cuando se utilizó la solución de aditivo que contenía lisostafina, se descubrió que la curva se desplazó al lado de baja concentración de la posición de la curva obtenida con la solución de aditivo que contenía Triton X-100 en lugar de lisostafina, como resultado, y *Staphylococcus aureus* se pudo detectar con una sensibilidad 10 veces mayor.

Ejemplo 7: medida de la muestra de leche por procedimiento inmunocromatográfico

30 Se preparó un dispositivo inmunocromatográfico de la misma manera que el del ejemplo 6.

Una muestra de leche fresca (100 μl) a partir de la cual se detectó *Staphylococcus aureus* se colocó en un microtubo, se añadió una solución de aditivo (150 μl) a la muestra y se mezcló a temperatura ambiente. Como solución de aditivo, se utilizaron dos tipos de soluciones de aditivo descritas en el ejemplo 6. La medición se realizó de la misma manera que en el ejemplo 6, y posteriormente se visualizó una línea violeta rojiza (positiva +, negativa -).

35 Por otro lado, para confirmar el número de *Staphylococcus aureus* en las muestras de leche, la cuantificación se realizó por el procedimiento de cultivo. Cada muestra de leche (100 μl) se inoculó en Trypticase Soy Agar II con sangre de oveja al 5% (Becton Dickinson Japan) o en el medio de selección al *Staphylococcus aureus*, X-SA Agar Medium (Nissui) y posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas y se contaron las colonias que aparecieron.

40 El número de *Staphylococcus aureus* contado por el procedimiento de cultivo y los resultados de determinación obtenidos por el procedimiento inmunocromatográfico se muestran en la tabla 8. Cuando no se añadió lisostafina, no se pudo detectar 1×10^4 (ufc/ml) o menos *Staphylococcus aureus*, pero cuando se añadió lisostafina, se hizo posible detectar hasta 5×10^3 de *Staphylococcus aureus*.

45

[Tabla 8]

Número de muestra	Número de <i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/ml)	Resultados de la medición con el kit	
		Con lisostafina	Sin lisostafina
1	5×10^3	+	-
2	1×10^4	+	-
3	1×10^4	+	-
4	1×10^4	+	-
5	1×10^4	+	-
6	1×10^5	+	+

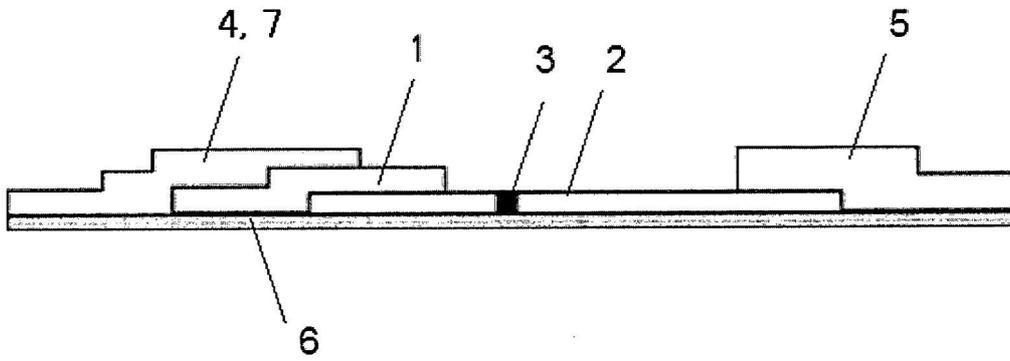
Aplicabilidad industrial

50 La presente invención puede utilizarse para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de animales de ganadería.

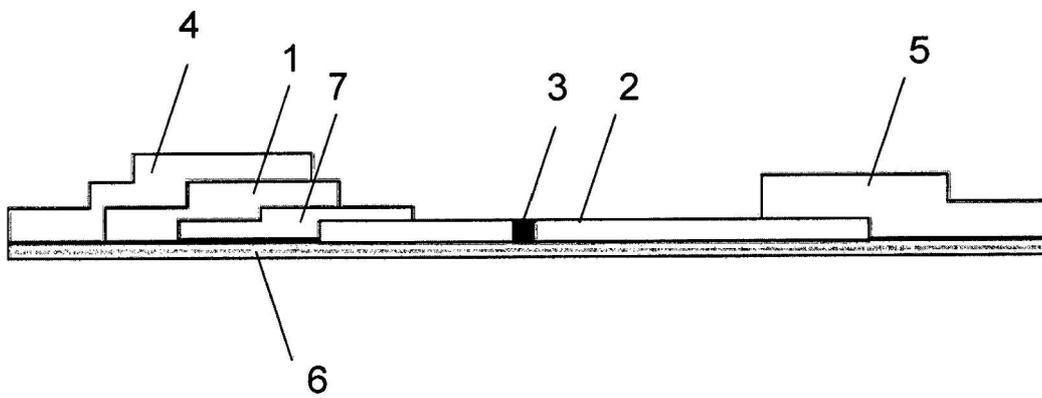
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende:
- 5 (1) la etapa de tratar la leche con un enzima lítico o un surfactante para lisar una bacteria en la leche,
 (2) la etapa de poner en contacto la leche de la etapa (1) con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica,
 una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, sobre la que se inmoviliza un segundo anticuerpo
 10 dirigido contra la sustancia específica, y
 una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en la tercera parte o una parte aguas más arriba, y
 15 (3) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o a una parte aguas más abajo para obtener una señal detectable del marcador en la segunda parte o en una parte aguas más abajo, en el que el procedimiento inmunocromatográfico es un procedimiento de tipo de flujo lateral,
 la sustancia específica es un componente de una bacteria, o una sustancia secretada por una bacteria, y el tamaño de retención de partículas de los huecos de la tercera parte es de 1 a 3,5 µm.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que, como mínimo, uno del primer anticuerpo y el segundo anticuerpo, o ambos, son anticuerpos monoclonales.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo son anticuerpos monoclonales.
- 25 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la tercera parte está constituida por dos o más tipos de miembros que tienen huecos que pueden eliminar glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partícula.
- 30 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la tercera parte está constituida por un primer miembro dispuesto aguas abajo y un segundo miembro dispuesto aguas arriba, y el tamaño de retención de partículas del segundo miembro es mayor que el tamaño de retención de partículas del primer miembro.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el tamaño de retención de partículas del primer miembro es de 35 1,0 a 2,0 µm, y el tamaño de retención de partículas del segundo miembro es de 3,0 a 3,5 µm.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el enzima lítico es una autolisina.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se detecta un estafilococo contenido en la leche utilizando lisostafina como el enzima lítico.
- 40 9. Kit de detección que comprende una solución de aditivo que contiene un enzima lítico o un surfactante, adecuado para la lisis de una bacteria contenida en la leche, y un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche que ha sido tratada con un enzima lítico o un surfactante, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido contra la sustancia específica, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, sobre la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido contra la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en el que
 45 el procedimiento inmunocromatográfico es un procedimiento de tipo de flujo lateral,
 la sustancia específica es un componente de una bacteria, o una sustancia secretada por una bacteria, en la que la detección de la sustancia específica permite que la bacteria se distinga de otras bacterias al nivel de especie o género; y
 50 el tamaño de retención de partículas de los huecos de la tercera parte es de 1 a 3,5 µm.
- 55

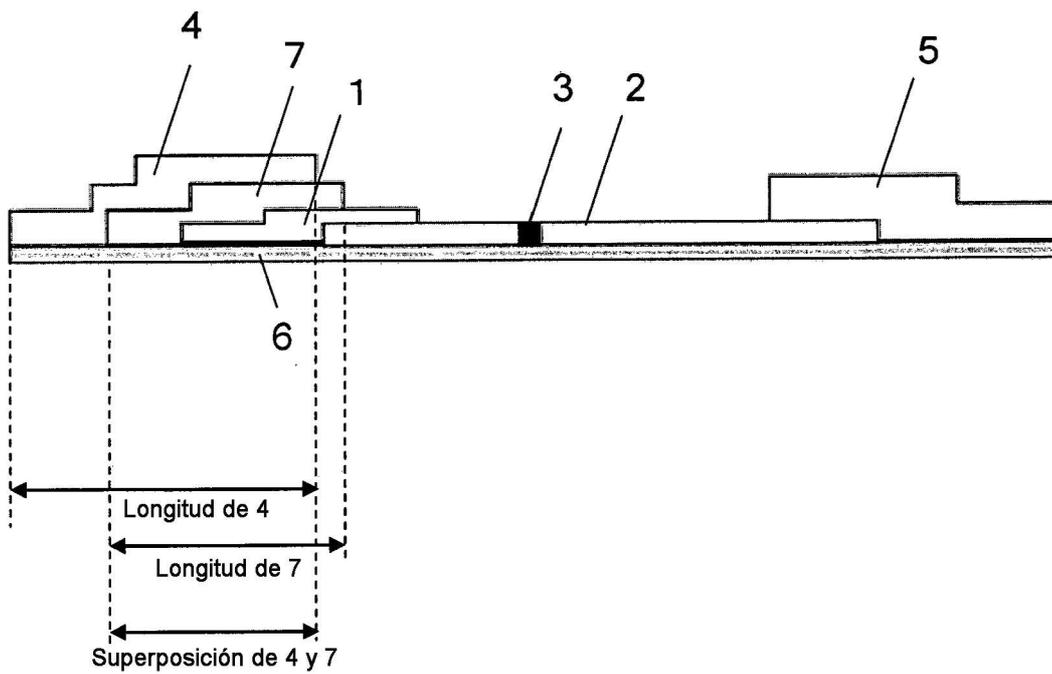
[Fig.1]



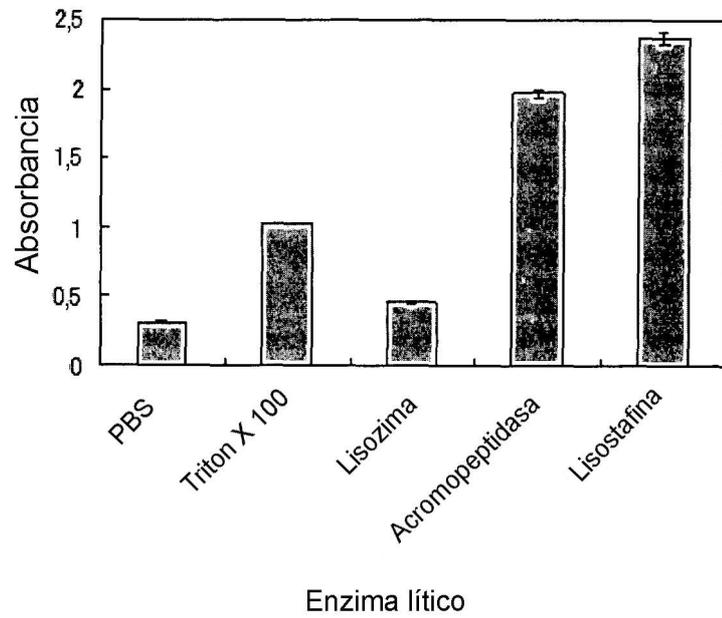
[Fig.2]



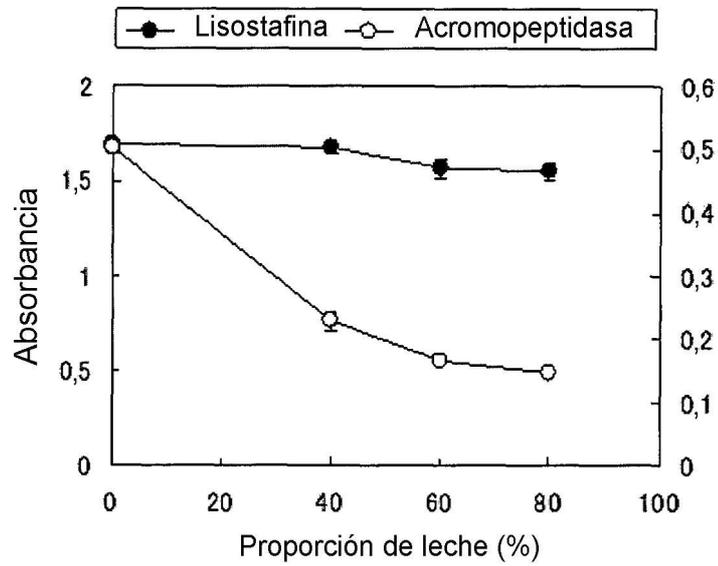
[Fig.3]



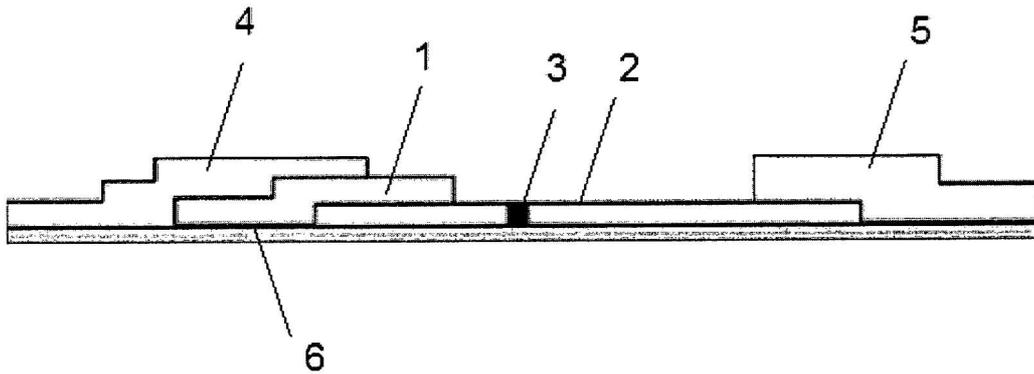
[Fig.4]



[Fig.5]



[Fig.6]



[Fig.7]

