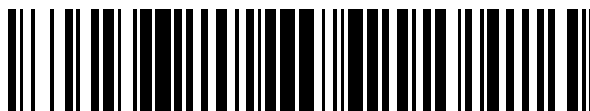


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 886**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014** **PCT/JP2014/083459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15093544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014** **E 14871368 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 3085770**

54 Título: **Procedimiento para la detección de estafilococos contenidos en la leche**

30 Prioridad:

18.12.2013 JP 2013261823

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

13.02.2019

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 2 699 886 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 la detección de estafilococos contenidos en la leche

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de lisis y a un procedimiento de detección para la detección de un estafilococo, que es una bacteria causante de la mastitis, en la leche de ganado.

10 Técnica anterior

La leche de animales de ganado, de los que los ejemplos habituales son la vaca, la oveja y la cabra, puede no ser estéril y puede estar contaminada con ciertos microorganismos debido a enfermedades o al medio ambiente. En particular, es conocido que los animales con una enfermedad causada por una infección de un microorganismo en la ubre a menudo descargan muchos de los microorganismos en la leche. Entre las enfermedades habituales de los animales de ganado causadas por la infección de un microorganismo se incluye la mastitis.

La mastitis es una inflamación del sistema laticífero o tejido de la glándula de la leche y está causada en gran medida por la invasión, colonización y proliferación de un microorganismo en la ubre. Aunque muchos tipos de animales contraen la mastitis, se dice que, especialmente en relación con la mastitis de vaca en vacas lecheras, del 15% al 40% de todas las vacas lecheras contraen la mastitis y, de este modo, es una de las enfermedades extremadamente importantes para los productores de leche. Si una vaca lechera contrae la mastitis, no sólo se inhibe la función de síntesis de la leche para dar lugar a la reducción de la cantidad de lactancia, o incluso detener la lactancia, según sea el caso, sino que también se imponen enormes pérdidas económicas para los productores de leche, tales como el coste del tratamiento médico y el recargo sobre el precio de la leche debido a la degradación de la calidad de la leche. Además, también aumenta el trabajo de los productores de leche, ya que, por ejemplo, el ordeño de los pezones que sufren de mastitis debe realizarse por separado para prevenir la infección.

La mastitis está causada por la infección de varios microorganismos. Entre las bacterias causantes, los estafilococos, en especial *Staphylococcus aureus*, son conocidos como bacterias causantes de la mastitis intratable, y también es conocido que se transmiten a otras vacas lecheras a través de las máquinas de ordeño, y así sucesivamente.

Como procedimiento para la detección de estafilococos en la leche, se utilizan ampliamente los procedimientos basados en cultivo. Dado que los procedimientos basados en cultivo requieren varios días para obtener un resultado, no son adecuados para una rápida identificación de las bacterias causantes. En cambio, los procedimientos de identificación basados en una reacción antígeno-anticuerpo utilizando un anticuerpo dirigido a un ingrediente específico para una bacteria causante, en especial el procedimiento inmunocromatográfico, pueden proporcionar el resultado en varias decenas de minutos y, por lo tanto, se utilizan ampliamente como procedimientos de inspección rápidos y convenientes (por ejemplo, documento de patente 1). Los inventores de la presente invención han examinado la utilización de un procedimiento inmunocromatográfico también como procedimiento para la detección de una sustancia contenida en la leche de animales de ganado (documento de patente 2).

En los procedimientos inmunológicos de medición, tales como el procedimiento inmunocromatográfico, es necesario lisar células bacterianas para liberar antígenos desde el interior de las células hacia el exterior de las células. Como procedimiento para lisar células de *Staphylococcus aureus*, se conoce un procedimiento de utilización de una enzima lítica, la lisostafina (documentos de patente 1 y 3), un procedimiento de utilización de un tratamiento con una enzima lítica y/o una bacteriocina que tiene actividad bacteriolítica, un surfactante y un desnaturalizante de proteínas (documento de patente 4), y un procedimiento de utilización de un tratamiento con un reactivo de lisis que contiene una enzima lítica, un surfactante no iónico y un agente quelante (documento de patente 5). Sin embargo, los documentos de patente mencionados anteriormente describen la utilización de una suspensión de células cultivadas y no describen los efectos de lisis en una solución con un alto contenido en proteína y grasas, tal como la leche.

55 Referencias de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 1-244370

Documento de patente 2: publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 2012-122921

60 Documento de patente 3: publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 11-28099

Documento de patente 4: publicación de patente internacional WO2005/064016

Documento de patente 5: publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 2006-246792

Documentos que no son de patente

Documento que no es de patente 1: Journal of Dairy Research (1997) 64 253-260

5 El documento US 2010/099115 A1 da a conocer sistemas y procedimientos para preparar y analizar muestras, por ejemplo, muestras de mucosa, para un microorganismo de interés, incluyendo la detección de uno o más analitos característicos de un microorganismo de interés mediante un procedimiento inmunocromatográfico que utiliza un dispositivo inmunocromatográfico, tal como se describe en dicho documento.

10 El documento WO 02/075310 A1 da a conocer un procedimiento y un dispositivo inmunoanalítico para la detección rápida y simultánea de múltiples antígenos microbianos en muestras biológicas de animales mastícticos.

Características de la invención

15 Objetivo a conseguir por la invención

La mastitis está causada por la infección de diversos microorganismos y, por lo tanto, los antibióticos que muestran eficacia contra la mastitis pueden diferir dependiendo del tipo de microorganismo causante. Además, ciertos tipos específicos de microorganismos tienen diferentes características, tales como causar la transmisión a otros pezones o individuos o requerir una manipulación diferente después de la infección. Por lo tanto, es extremadamente importante identificar de forma rápida, cómoda y altamente sensible el microorganismo causante existente en la leche. En particular, en cuanto al *Staphylococcus aureus*, que causa la mastitis intratable y es infecciosa, es extremadamente importante descubrirlo en una etapa temprana de la infección para prevenir la expansión del daño de la mastitis. Sin embargo, en una etapa temprana de la infección, el número de bacterias de *Staphylococcus aureus* en la leche puede ser a menudo bajo y, por lo tanto, se desea un procedimiento que permita la detección rápida y altamente sensible del mismo.

Los procedimientos basados en cultivo utilizados ampliamente como procedimientos para la detección de una bacteria tienen el problema de que requieren varios días para obtener un resultado. En cambio, los procedimientos inmunológicos de medición basados en una reacción antígeno-anticuerpo, tales como el procedimiento inmunocromatográfico, tienen la ventaja de que permiten la detección rápida y conveniente de las bacterias causantes y, de este modo, permiten el tratamiento terapéutico temprano con un agente antibacteriano.

A efectos de detectar con alta sensibilidad una sustancia específica en células de una bacteria causante mediante un procedimiento de medición inmunológico, es necesario lisar con alta eficacia las células para liberar el antígeno en el interior de las células al exterior de las células. Sin embargo, cuando se utiliza leche como muestra de ensayo, las técnicas convencionales no pueden proporcionar una lisis suficiente en muchos casos, debido a las influencias de proteínas, tales como la caseína, los glóbulos de grasa de la leche y así sucesivamente, contenidos en la leche en grandes cantidades. También es conocido que las células de *Staphylococcus aureus* se adsorben en glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche (documento que no es de patente 1) y se ha descubierto que la proporción de lisis alcanzable mediante las técnicas habituales fácilmente se reduce adicionalmente mediante dicho fenómeno. Tal como se ha descrito anteriormente, no se conocía ningún procedimiento de lisis eficaz para detectar de manera eficaz estafilococos contenidos en la leche.

45 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento de lisis, un procedimiento de detección que utiliza un dispositivo inmunocromatográfico y un kit de detección que comprende un dispositivo inmunocromatográfico para detectar si la bacteria causante de la mastitis es un estafilococo o no mediante la utilización de leche de un animal de ganado.

50 Medios para conseguir el objetivo

Los inventores de la presente invención consideraron que, a efectos de detectar estafilococos en la leche, es necesario extraer con alta eficacia antígenos diana en las células, descubrieron que utilizando de manera simultánea una enzima lítica y una pluralidad de tipos de surfactantes para lisar con alta eficacia estafilococos contenidos en la leche, se mejora la eficacia de la lisis y los estafilococos contenidos en la leche se pueden detectar con alta sensibilidad y llevaron a cabo la presente invención.

De este modo, la presente invención da a conocer los siguientes elementos.

60 [1] Un procedimiento para lisar un estafilococo existente en la leche, que comprende: la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisostafina, un surfactante anfófilo y un surfactante no iónico con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, en el que en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final del surfactante anfófilo no es inferior al 0,03% y no es superior al 0,2%.

65 [2] El procedimiento de lisis, según el punto [1], en el que el surfactante anfófilo se selecciona entre un

dimetilamoniopropanosulfonato, un dodecildimetilamoniobutirato, lauril betaína y amidopropil betaína; y/o el surfactante no iónico se selecciona entre un polioxietilen alquil fenil éter y un éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano.

- 5 [3] El procedimiento de lisis, según el punto [1] o [2], en el que, en la etapa de mezcla del agente de lisis con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final de lisostafina no es inferior a 0,1 mg/μl y no es superior a 200 mg/μl; y/o
 en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03% y no es superior al 10%.
- 10 [4] Un procedimiento para detectar un estafilococo contenido en la leche, que comprende:
 1. la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisostafina, un surfactante anfófilico y un surfactante no iónico con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, en la que la concentración final del surfactante anfófilico no es inferior al 0,03% y no es superior al 0,2%,
 15 2. la etapa de extraer glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche utilizando un material que tiene huecos que permiten la extracción de los glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche, y
 3. la etapa de detectar una sustancia específica derivada del interior del estafilococo y liberada mediante lisis, y las etapas se realizan en el orden de 1, 2 y 3.
- 20 [5] El procedimiento, según el punto [4], en el que el surfactante anfófilico se selecciona entre un dimetilamoniopropanosulfonato, un dodecildimetilamoniobutirato, lauril betaína y amidopropil betaína; y/o el surfactante no iónico se selecciona entre un polioxietilen alquil fenil éter y un éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano.
- 25 [6] El procedimiento, según el punto [4] o [5], en el que, en la etapa 1, la concentración final de lisostafina no es inferior a 0,1 mg/μl y no es superior a 200 mg/μl; y/o en la etapa 1, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03% y no es superior al 10%.
- 30 [7] El procedimiento de detección, según cualquiera de los puntos [4] – [6], en el que las etapas 2 y 3 se llevan a cabo mediante un procedimiento inmunocromatográfico.
- [8] El procedimiento de detección, según el punto [7], en el que el procedimiento inmunocromatográfico comprende:
 (1) la etapa de poner en contacto la leche que contiene la sustancia específica con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica
 35 que está marcada, una segunda parte dispuesta por debajo de la primera parte, en la que un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica está inmovilizado, y una tercera parte dispuesta por encima de la primera parte o de la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche, en la tercera parte o una parte existente por encima de la misma, y
 (2) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o una parte existente por debajo de la misma para obtener
 40 una señal detectable del marcador en la segunda parte o una parte existente por debajo de la misma.
- [9] El procedimiento de detección, según el punto [8], en el que el primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica es retenido en la primera parte.
- 45 [10] El procedimiento de detección, según el punto [8] o [9], en el que la tercera parte está constituida por dos o más tipos de elementos que tienen huecos que pueden eliminar los glóbulos de grasa de la leche de diferentes tamaños de partículas, respectivamente.
- [11] El procedimiento de detección, según el punto [10], en el que la tercera parte está constituida por un primer elemento dispuesto por debajo y un segundo elemento dispuesto por arriba, y el tamaño de partícula de retención del segundo elemento es más grande que el tamaño de partícula de retención del primer elemento.
- 50 [12] El agente de lisis, tal como se define en cualquiera de los puntos [1] a [3], para la utilización en un procedimiento de lisis de un estafilococo contenido en la leche.
- 55 [13] El agente de lisis para la utilización, según el punto [12], en el que el procedimiento es un procedimiento de diagnóstico de la mastitis de un animal de ganado.
- [14] Un kit para detectar un estafilococo contenido en la leche, que comprende:
 60 el agente de lisis, según el punto [12] o [13], y
 un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta por debajo de la primera parte, en la que un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica está inmovilizado, y una tercera parte dispuesta
 65 por encima de la primera parte o de la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche.

Efecto de la invención

Según la presente invención, un estafilococo contenido en la leche se puede detectar de forma rápida, conveniente y con alta sensibilidad en el lugar de análisis. En particular, en el caso de diagnóstico de la mastitis de vaca, si se utiliza una etiqueta visualmente reconocible, el diagnóstico puede realizarse en una granja lechera sin utilizar ningún aparato etc., de manera que una bacteria causante se puede especificar rápidamente antes del empeoramiento adicional de las condiciones patológicas y se pueden determinar en una etapa temprana políticas de tratamiento apropiadas, tales como la selección de un antibiótico adecuado, y contramedidas para la prevención de la expansión de la infección.

Descripción breve de los dibujos

La figura 1 muestra el efecto de un surfactante anfófilo en presencia de una enzima lítica y un surfactante no iónico en la detección de *Staphylococcus aureus* mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA).

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

La figura 3 muestra el efecto de un surfactante anfófilo en presencia de una enzima lítica y un surfactante no iónico en la detección de *Staphylococcus aureus* mediante un procedimiento inmunocromatográfico.

Modos de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, se explicará la presente invención con más detalle. En la presente invención, cuando un intervalo de valores numéricos se representa como "X a Y", el intervalo incluye los valores X e Y como los valores mínimo y máximo. El símbolo "%" se utiliza para indicar el porcentaje en base másica, a menos que se indique especialmente. La expresión "A y/o B" significa que, como mínimo, uno de A y B, incluyendo los casos de referencia a solamente A, solamente B, y A y B.

Un agente de lisis para lisar bacterias contenidas en la leche contiene una enzima lítica y un surfactante específico.

[Enzima lítica]

Como bacteria causante de la mastitis, a menudo se produce la infección por *Escherichia coli*, bacteria *Klebsiella* o *Staphylococcus aureus*, y, por lo tanto, también es preferente utilizar uno o dos o más tipos de enzimas líticas que pueden mostrar acción bacteriolítica a estos microorganismos en combinación. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o dos o más tipos de enzimas líticas seleccionadas entre lisozima, lisostafina, pepsina, glucosidasa, galactosidasa, acromopeptidasa, β -N-acetilglucosaminidasa y así sucesivamente. Por ejemplo, se ha propuesto un procedimiento de utilización de lisozima como enzima lítica y un agente de lisis de membrana celular (publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 63-167799).

Cuando la presencia de un estafilococo es especialmente sospechosa como la bacteria causante de la mastitis, puede ser preferente utilizar lisostafina, que muestra, de manera específica, una acción bacteriolítica contra estafilococos, sola o en combinación con otra enzima lítica. En la publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 11-28099 se da a conocer un procedimiento para lisar *Staphylococcus aureus* con lisostafina y los expertos en la técnica pueden obtener fácilmente lisostafina como enzima lítica.

La lisostafina de tipo natural es una proteasa de zinc producida por *Staphylococcus simulans* y es conocido que lisa *Staphylococcus aureus* u otras bacterias del mismo género mediante la hidrólisis de enlaces glicilglicina en las cadenas de glicopéptido del peptidoglicano de la pared celular de las mismas. En el presente documento, el término lisostafina también significa, además de la lisostafina de tipo natural mencionada anteriormente, una variante de lisostafina que tiene la secuencia de aminoácidos de la lisostafina de tipo natural, pero que incluye una mutación, tal como la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos hasta tal punto que se mantiene la actividad de hidrólisis mencionada anteriormente. La lisostafina también puede ser una lisostafina modificada que consiste en la lisostafina de tipo natural o la variante de lisostafina a la que se une otro compuesto, tal como sacárido y polietilenglicol, hasta tal punto que se mantiene la actividad de hidrólisis mencionada anteriormente. Estas lisostafinas se pueden obtener mediante el procedimiento de cultivo descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) No. 11-28099, o una técnica de ingeniería genética, o mediante la adquisición de un producto comercializado.

El contenido de la enzima lítica en el agente de lisis (cuando se utilizan dos o más tipos de enzimas líticas, el

contenido es la cantidad total de las enzimas líticas) no está particularmente limitado, siempre que se asegure una proporción de lisis eficaz para la detección. Sin embargo, en cuanto al límite inferior del contenido, cuando se utiliza un agente enzimático (o proteína enzimática) que tiene una actividad de 3.500 unidades/mg o superior, se puede determinar el contenido, de manera que la concentración final del agente enzimático (o proteína enzimática) en la mezcla con leche pasa a ser de 0,03 µg/ml o superior, de manera preferente, 0,15 µg/ml o superior, de manera más preferente, 0,3 µg/ml o superior, de manera más preferente, 1,5 µg/ml o superior, de manera particularmente preferente, 1 µg/ml o superior. En cuanto al límite superior del contenido de la enzima lítica, el contenido se puede determinar desde el punto de vista económico, o similar, según se requiera, e independientemente de cómo se defina el límite inferior, puede ser 200 µg/ml o inferior, de manera preferente, 100 µg/ml o inferior, de manera más preferente, 75 µg/ml o inferior, de manera más preferente, 50 µg/ml o inferior, de manera particularmente preferente, 25 µg/ml o inferior. Con respecto a la actividad enzimática, el límite inferior del contenido, se puede determinar el contenido, de manera que la concentración final del mismo en la mezcla con leche debe ser de 0,105 unidades/ml o superior, de manera preferente, 0,525 unidades/ml o superior, de manera más preferente, 1,05 unidades/ml o superior, de manera más preferente, 5,25 unidades/ml o superior, de manera particularmente preferente, 10,5 unidades/ml o superior. En cuanto al límite superior, se puede determinar que el contenido sea de 700 unidades/ml o inferior, de manera preferente, 350 unidades/ml o inferior, de manera más preferente, 262,5 unidades/ml o inferior, de manera más preferente, 175 unidades/ml o inferior, de manera particularmente preferente, 87,5 unidades/ml o inferior, independientemente de cómo se defina el límite inferior. La actividad enzimática a la que se hace referencia en el presente documento se define de la siguiente manera.

Definición de actividad enzimática: Se define que una unidad es una cantidad de enzima que reduce la turbidez de una suspensión de una bacteria objetivo tratada térmicamente (de manera preferente, *Staphylococcus aureus*, de manera más preferente, *Staphylococcus aureus* 8325-4) como sustrato mediante una DO 0,01 a 600 nm en 1 minuto a 25°C y pH 8,0 (en 1,0 ml de tampón Tris 0,2 mol/l, pH 8,0, 25°C, la turbidez inicial es 1,0).

[Surfactante]

Un surfactante que ioniza y se convierte en un ion, cuando se disuelve en agua, se denomina surfactante iónico y un surfactante que no se convierte en un ion se denomina surfactante no iónico. El surfactante iónico se clasifica, adicionalmente, en surfactante aniónico, surfactante catiónico y surfactante anfólitico.

En la presente invención, junto con la enzima lítica, se utiliza, como mínimo, un tipo de surfactante anfólitico y, como mínimo, un tipo de surfactante no iónico combinado.

Entre los ejemplos del surfactante anfólitico se incluyen los de tipo aminoácido (sales de ácidos alquilaminograsos), tipo betaína (alquil betaínas), tipo de óxido de amina (óxidos de alquilamina) y así sucesivamente, pero no está particularmente limitado. Entre ejemplos más específicos se incluyen dimetilamoniopropanosulfonatos, dodecildimetilamoniobutiratos, lauril betaína y amidopropil betaína. Entre otros ejemplos específicos se incluyen n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato y N-dodecil-N,N-(dimetilamonio)butirato.

El contenido del surfactante anfólitico en el agente de lisis (cuando se utilizan dos o más tipos de surfactantes anfóliticos, el contenido es la cantidad total de los surfactantes anfóliticos) es tal, que la concentración final del mismo en la mezcla con leche pasa a ser del 0,03% o superior, de manera preferente, 0,05% o superior, de manera más preferente, 0,06% o superior, de manera más preferente, 0,07% o superior, de manera particularmente preferente, 0,08% o superior, independientemente del contenido de la enzima lítica, pero, en cualquier caso, del 0,2% o inferior.

En cuanto al surfactante no iónico, de manera preferente, se puede utilizar cualquiera de los de tipo éter de éster, de tipo éster y de tipo éter. De manera más específica, entre los ejemplos se incluyen éteres de polioxietilén alquilo, éteres de polioxietilén alquil fenilo, ésteres de ácido graso de sorbitano, poliglucósidos de alquilo, dietanolamidas de ácidos grasos, éteres de alquil monoglicerilo, polisorbatos (formados mediante la condensación de varias decenas de moléculas de óxido de etileno a un éster de ácidos grasos de sorbitano), y así sucesivamente, pero no está particularmente limitado. Entre los ejemplos especialmente preferentes se incluyen polisorbatos, de manera más específica, monolaurato de polioxietilén (20) sorbitano, monoestearato de polioxietilén (60) sorbitano, triestearato de polioxietilén (65) sorbitano y monooleato de polioxietilén (80) sorbitano, y así sucesivamente, así como polioxietilén alquil fenil éteres, de manera más específica, polioxietilén (10) octil fenil éter y así sucesivamente.

El contenido del surfactante no iónico en el agente de lisis (cuando se utilizan dos o más tipos de surfactantes no iónicos, el contenido es la cantidad total de los surfactantes no iónicos) no está particularmente limitado, siempre que, por ejemplo, cuando se utiliza un procedimiento inmunocromatográfico, se asegure el flujo de una solución de revelado. Sin embargo, en cualquier caso, en cuanto al límite inferior del mismo, se puede determinar el contenido, de manera que la concentración final del surfactante no iónico en la mezcla con leche pasa a ser del 0,03% o superior, de manera preferente, 0,05% o superior, de manera más preferente, 0,075% o superior, de manera más

preferente, 0,1% o superior, de manera particularmente preferente, 0,3% o superior. En cuanto al límite superior del contenido del surfactante no iónico, se puede determinar el contenido, de manera que la reacción catalizada por la enzima lítica y las reacciones de antígeno-anticuerpo no se inhiben significativamente y, en cualquier caso, puede ser del 10% o inferior, de manera preferente, 7,5% o inferior, de manera más preferente, 5,0% o inferior, de manera aún más preferente, 3% o inferior, de manera particularmente preferente, 2% o inferior.

En cuanto al surfactante aniónico, de manera preferente, se puede utilizar cualquiera de las sales de ácidos carboxílicos, sales de ácidos sulfónicos, sales de ésteres de ácido sulfúrico, y así sucesivamente. Entre los ejemplos más específicos se incluyen éter carboxilatos de alquilo, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), α -olefinsulfonatos (AOS), dialquilsulfosuccinatos, condensados con formaldehído de naftalenosulfonato, sales de éster de ácido alquilsulfúrico (AS), sales de ésteres de ácido polioxietilenalquilsulfúrico (AES) obtenidas mediante la adición de óxido de etileno a un alcohol superior y después de sulfatación, sales de éster de ácido fosfórico de un alcohol superior o un aducto con óxido de etileno de los mismos, y así sucesivamente. Entre otros ejemplos específicos se incluyen alquilsulfatos de sodio, tales como dodecilsulfato de sodio y miristilsulfato de sodio, N-acilsarcosinatos de sodio, tales como N-lauroilsarcosinato de sodio y N-miristoilsarcosinato de sodio, dodecylbencenosulfonato de sodio, sulfato monosódico de monoglicérido de ácido graso de coco hidrogenado, laurilsulfoacetato de sodio, N-acilglutamatos, tales como el N-palmitoilglutamato de sodio, N-metil-N-acilalanina de sodio y α -olefinsulfonatos de sodio.

En cuanto al surfactante catiónico, de manera preferente, se puede utilizar cualquiera de los de tipo sal de amina y de tipo de sal de amonio cuaternario. Entre los ejemplos más específicos se incluyen cloruro de diestearildimetilamoniobencilamonio, cloruro de benzalconio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de miristiltrimetilamonio y así sucesivamente.

[Ejemplo de composición]

En una de las realizaciones más preferentes, el agente de lisis comprende lisostafina, un surfactante anfófilo, y un surfactante no iónico. Para el agente de lisis que contiene lisostafina, un surfactante anfófilo, y un surfactante no iónico, el surfactante anfófilo preferente se selecciona entre un dimetilamoniopropanosulfonato, un dodecildimetilamoniobutirato, lauril betaína y amidopropil betaína; el surfactante no iónico preferente es un polioxietilén alquil fenil éter o un éster de ácido graso de polioxietilén sorbitano. Las concentraciones de dichos ingredientes del agente de lisis se puede determinar, de manera que, en la etapa de lisis de las bacterias existentes en la leche mediante la mezcla del agente de lisis con la leche, la concentración final de lisostafina no es inferior a 0,1 mg/ μ l y no superior a 200 mg/ μ l, la concentración final del agente surfactante anfófilo no es inferior al 0,03% y no es superior al 0,2%, y la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03% y no es superior al 10%.

[Otros ingredientes]

El agente de lisis puede contener, además de la enzima lítica y el surfactante, uno o más tipos de otros ingredientes, siempre que el efecto deseado no se degrade notablemente. Entre los ejemplos preferentes de los ingredientes distintos de la enzima lítica y el surfactante se incluyen una sustancia que tiene un efecto de promoción de la lisis. Entre los ejemplos específicos se incluyen glutaraldehído, compuestos de halógeno, clorhexidina, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol), fenol, peróxido de hidrógeno, acrinol, guanidina y sales de los mismos, agentes quelantes, ácidos orgánicos y sales de los mismos, alcoholes polihidroxilados (por ejemplo, etilenglicol, propilenglicol, dietilenglicol y glicerina), y agentes reductores, tales como 2-mercaptoetanol, ditiotretol, cistina y tiofenol, pero no se limitan a éstos.

[Condiciones de lisis y proporción de lisis]

En la presente invención, el agente de lisis se puede utilizar mediante su mezcla con leche. La proporción de mezcla de leche y el agente de lisis no está particularmente limitada, siempre que las concentraciones finales de la enzima lítica etc. se mantengan adecuadamente, y se pueda asegurar una proporción de lisis suficiente. Si el agente de lisis se utiliza en un volumen relativamente pequeño con respecto a la leche, la leche no se diluye. Por lo tanto, se puede esperar que las células se puedan detectar con mayor sensibilidad. Cuando se utiliza el agente de lisis en un volumen relativamente grande con respecto a la leche, se reducen las influencias de los glóbulos de grasa y las proteínas contenidas en la leche y, por lo tanto, se puede esperar que las células se puedan detectar en un tiempo más corto. Desde el punto de vista de que una mayor proporción de leche en la mezcla de leche y el agente de lisis (leche/(leche + agente de lisis) $\times$ 100) puede proporcionar una mayor sensibilidad de detección, la proporción puede ser, por ejemplo, del 5% o superior, de manera preferente, del 10% o superior, de manera más preferente, del 20% o superior, de manera más preferente, del 30% o superior, independientemente de las otras condiciones. En cuanto al límite superior de la proporción, si se utiliza el agente de lisis solidificado mediante secado o similar, la proporción de leche puede conseguirse que sea del 100%, independientemente de las otras condiciones. La proporción de la leche puede ser del 90% o inferior, 80% o inferior, 70% o inferior, 60% o inferior, o 50% o inferior, independientemente de las otras condiciones. En cuanto al límite superior, la proporción se puede determinar tomando en consideración la facilidad de mezclado, la estabilidad del agente de lisis como una solución, y así sucesivamente.

En la presente invención, es suficiente mezclar simplemente la leche con el agente de lisis. La temperatura en el momento de la mezcla y el tiempo de tratamiento para permitir que la enzima actúe después de la mezcla no están particularmente limitados, siempre que la enzima lítica utilizada pueda mostrar la actividad, y la temperatura normalmente puede ser la temperatura ambiente. El tiempo de tratamiento para proceder con la reacción después de la mezcla puede determinarse de manera apropiada por los expertos en la materia al considerar la proporción de lisis. En la presente invención, dado que se utilizan la combinación y las concentraciones de la enzima lítica y surfactante apropiadas para estafilococos, el tiempo de tratamiento se puede acortar notablemente en comparación con un caso en el que sólo se utiliza una enzima lítica. En la presente invención, el tiempo de tratamiento es, en general, de aproximadamente varias decenas de minutos a varias horas y, de manera más específica, puede ser de 120 minutos o más corto, de manera preferente, de 60 minutos o más corto, de manera más preferente, de 45 minutos o más corto, de manera más preferente, de 25 minutos o más corto, de manera aún más preferente, de 20 minutos o más corto, de manera aún incluso más preferente, de 15 minutos o más corto. El tiempo de tratamiento también se puede hacer para que sea sustancialmente 0 (después de mezclar la leche y el agente de lisis, la mezcla se somete inmediatamente a la medición). Según la presente invención, incluso mediante el tratamiento durante un corto tiempo, una proporción de lisis del 90% o superior está asegurado, y el estafilococo se puede detectar con alta sensibilidad.

Según las investigaciones de los inventores de la presente invención, se pudo confirmar que, con las condiciones descritas en los ejemplos del presente documento, se puede conseguir una proporción de lisis del 100% mediante el tratamiento de la leche que contiene aproximadamente 5×10^8 células/ml de *Staphylococcus aureus* con un agente de lisis durante aproximadamente 30 minutos según el procedimiento indicado en la reivindicación 1. En cuanto a la base de la proporción de lisis, la proporción de lisis observada para una suspensión de un estafilococo diana sometida a un tratamiento preliminar con un surfactante no iónico de una concentración apropiada y, a continuación, sometida a ultrasonidos, y un tratamiento enzimático suficiente, según se requiera, puede definirse como el 100%.

[Medios de detección]

Los estafilococos lisados, según la presente invención, se pueden detectar mediante varios tipos de procedimientos inmunológicos utilizando un ingrediente de células bacterianas como antígeno. Entre los ejemplos de procedimiento inmunológico de medición se incluyen, por ejemplo, el procedimiento inmunocromatográfico, el procedimiento de reacción de aglutinación, el inmunoensayo enzimático (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), el fluoroinmunoensayo (FIA), y así sucesivamente, pero no se limitan a éstos. En el momento de realizar los procedimientos inmunológicos, se puede utilizar una sustancia para el bloqueo para evitar la adsorción no específica o una sustancia para prevenir la reacción cruzada con bacterias distintas de la bacteria diana.

Cuando se utiliza un procedimiento inmunocromatográfico, se puede llevar a cabo habitualmente de la siguiente manera.

[Procedimiento inmunocromatográfico y dispositivo inmunocromatográfico]

Se puede detectar una reacción antígeno-anticuerpo mediante un ensayo de tipo sándwich utilizando un "primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica" retenido por una primera parte y un "segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica" inmovilizado en una segunda parte. De manera alternativa, también se puede detectar una reacción antígeno-anticuerpo mediante el procedimiento de competición utilizando una sustancia específica marcada retenida por una primera parte y un anticuerpo dirigido a la sustancia específica inmovilizado en una segunda parte. Sin embargo, en la presente invención, es preferente el procedimiento de ensayo de tipo sándwich, ya que muestra una alta sensibilidad de detección y proporciona una línea que indica la detección del anticuerpo como un resultado positivo.

El dispositivo inmunocromatográfico es un dispositivo para la detección de una sustancia específica contenida en la leche mediante un procedimiento inmunocromatográfico, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta por debajo de la primera parte, en el que un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica está inmovilizado, y una tercera parte dispuesta por encima de la primera parte o de la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche. Como ejemplo específico de la estructura de la tira reactiva, se puede mencionar la tira reactiva cuya vista en sección esquemática se muestra en la figura 2. En la figura 2, un elemento -7- para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte) está dispuesto por debajo de un elemento -4- para la adición de la muestra, y por encima de un elemento impregnado de anticuerpo marcado (primera parte) -1-.

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

El material utilizado para la primera parte no está particularmente limitado, siempre y cuando se elija un material que permita la inmunocromatografía, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen una matriz de fibras de un derivado

de celulosa etc., papel de filtro, fibra de vidrio, tela, algodón y así sucesivamente.

El material utilizado para la segunda parte no está particularmente limitado, siempre y cuando 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, nylon y así sucesivamente.

El material utilizado para la tercera parte tiene, de manera preferente, huecos que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche y que tienen un diámetro de aproximadamente 1 a diez y algo micrómetros. La tercera parte se debe disponer por encima de la segunda parte mencionada anteriormente que consiste en una membrana porosa que tiene un diámetro de poro de varias decenas a varios cientos de nm, y está dispuesta, de manera preferente, por encima de la primera parte mencionada anteriormente, es decir, en una posición en la que una solución de muestra contacta en primer lugar con la tira reactiva y pasa a través de la misma.

Los huecos de la tercera parte pueden tener un tamaño que permite la eliminación de los glóbulos de grasa de la leche y el tamaño de partícula de retención es, de manera preferente, de 0,1 a 10 μm , de manera más preferente, de 1 a 3,5 μm . El material no está particularmente limitado, siempre y cuando se elija un material que tenga huecos que muestran un tamaño de partícula de retención 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 así sucesivamente. El tamaño de partícula de retención significa un tamaño de partícula tal de los glóbulos de grasa de la leche que los glóbulos de grasa de la leche que tienen un tamaño de partícula no inferior al tamaño de partícula de retención no pueden pasar a través de los huecos y son retenidos por la tercera parte, y sustancialmente corresponde al tamaño de poro promedio de los huecos de la tercera parte, y el 50% o más, de manera preferente, el 60% o más, de manera más preferente, el 70% o más, de manera aún más preferente, el 80% o más, de manera particularmente preferente, el 90% o más, de la manera más preferente, el 98% o más, de los glóbulos de grasa de la leche que tienen un tamaño de partícula no inferior al tamaño de partícula de retención no pueden pasar a través de los huecos y son retenidos por la tercera parte. La proporción de glóbulos de grasa de la leche a retener se puede medir mediante un procedimiento bien conocido para los expertos en la materia. Por ejemplo, el catálogo de GF/B proporcionado por GE Healthcare Bioscience describe que el tamaño de partícula de retención (diámetro de partícula para el que la eficacia de retención es del 98%, el término tamaño de partícula de retención utilizado en el presente documento tiene este significado, a menos que se indique en especial) del mismo es de 1,0 μm , y dicho tamaño de partícula, tal como se ha mencionado anteriormente, se puede confirmar mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia.

La tercera parte mencionada anteriormente puede consistir en un solo tipo de material que tiene un tamaño de partícula de retención específico, o puede consistir en un laminado que comprende materiales que tienen diferentes tamaños de partícula de retención y están integralmente adheridos, de manera que el tamaño de partícula de retención se hace cada vez más pequeño etapa tras etapa, a efectos de aumentar la eficacia de separación de los glóbulos de grasa de la leche. Dicha tercera parte, tal como se ha mencionado anteriormente, constituida por dos o más tipos de elementos que pueden eliminar los glóbulos de grasa de la leche de diferentes tamaños de partícula constituyen una realización preferente de la presente invención y, en una realización más preferente de la presente invención, la tercera parte está constituida por un primer elemento dispuesto por debajo y un segundo elemento dispuesto por encima, y el tamaño de partícula de retención del segundo elemento es mayor que el tamaño de partícula de retención del primer elemento. Cuando la tercera parte está constituida por dichos dos tipos de elementos, es preferente que el tamaño de partícula de retención del primer elemento dispuesto por debajo sea de 1,0 a 2,0 μm , y el tamaño de partícula de retención del segundo elemento dispuesto por encima sea de 3,0 a 3,5 μm . A efectos de detectar con alta sensibilidad una sustancia específica de la leche que contiene glóbulos de grasa de la leche de alta concentración y una distribución de tamaños de partícula amplia, en especial la leche no diluida después del ordeño, es preferente que la tercera parte esté constituida por una combinación de un elemento que tiene una tamaño de partícula de retención pequeño y un elemento que tiene un tamaño de partícula de retención grande.

La primera parte mencionada anteriormente retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica, o una sustancia específica marcada. Si la primera parte retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica, la sustancia específica se puede detectar mediante el procedimiento de ensayo de tipo sándwich. Si la primera parte retiene una sustancia específica marcada, la sustancia específica se puede detectar mediante el procedimiento de competición. Dado que el procedimiento de ensayo de tipo sándwich que muestra una alta sensibilidad de detección y proporciona una línea que indica la detección del anticuerpo como un resultado positivo es más preferente para la presente invención, la primera parte retiene, de manera preferente, un primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica.

Cuando se hace que la primera parte retenga un primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica, se utilizan dos tipos de anticuerpos, el primer anticuerpo dirigido a la sustancia específica y un segundo anticuerpo también dirigido a la sustancia específica. A efectos de permitir la detección de la sustancia específica mediante el procedimiento de ensayo de tipo sándwich, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo mencionados anteriormente son anticuerpos que pueden unirse de manera simultánea a la sustancia específica y es preferente que el epítipo de

la sustancia específica a reconocer por el primer anticuerpo mencionado anteriormente sea diferente del epítipo de la sustancia específica a reconocer por el segundo anticuerpo mencionado anteriormente.

En la presente invención, a efectos de obtener una señal detectable, el primer anticuerpo o la sustancia específica retenida por la primera parte están marcados. Entre los ejemplos del marcador utilizado para la presente invención se incluyen una partícula coloreada, enzima, radioisótopo y así sucesivamente, y es preferente utilizar una partícula coloreada que puede detectarse visualmente sin ningún equipo especial. Entre los ejemplos de la partícula coloreada se incluyen micropartículas de metal, tales como las de oro y platino, partículas no metálicas, partículas de látex y así sucesivamente, pero no se limitan a éstas. La partícula coloreada puede tener cualquier tamaño, siempre que la partícula coloreada tenga un tamaño tal que puede transportarse por debajo a través del interior de los huecos de la tira reactiva, pero, de manera preferente, tiene un tamaño de 1 nm a 10 µm, de manera más preferente, de 5 nm a 1 µm, de manera aún más preferente, de 10 a 100 nm, de diámetro.

[Objetivo de la detección]

Según la presente invención, puede detectarse un estafilococo contenido en la leche. El término "estafilococo" utilizado en la presente invención se refiere a una bacteria que pertenece al género *Staphylococcus*, a menos que se indique en especial, y entre las bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus* se incluyen *Staphylococcus aureus*, las otras bacterias del género *Staphylococcus*, y SCN (*Staphylococcus coagulasa-negativa*). Entre las bacterias de SCN se incluyen *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus epidermidis* y así sucesivamente. Según la presente invención, los estafilococos contenidos en la leche obtenida de un animal de granja, tal como una vaca como tal, que contiene glóbulos de grasa y proteínas de alta concentración, pueden detectarse mediante la utilización del agente de lisis que contiene la enzima lítica formulada de manera apropiadamente y surfactante.

La sustancia específica medida en la presente invención puede ser cualquier sustancia, siempre que sea una sustancia que pueda medirse mediante un procedimiento inmunológico, tal como un procedimiento inmunocromatográfico, pero es, de manera preferente, un componente de una bacteria o de una sustancia que es secretada por una bacteria. La sustancia específica es, de manera más preferente, la proteína ribosomal L7/L12 de una bacteria. Puede obtenerse una alta sensibilidad de detección para la proteína ribosomal L7/L12, ya que existe en las células en un número de copias elevado.

[Anticuerpo]

El anticuerpo utilizado en la presente invención se puede preparar mediante el procedimiento dado a conocer en la publicación de patente internacional WO00/06603. Cuando se utiliza la proteína ribosomal bacteriana L7/L12 como antígeno, el anticuerpo puede prepararse mediante la utilización de una proteína de longitud completa o un péptido parcial de la proteína ribosomal bacteriana L7/L12 como antígeno, pero se prepara, de manera preferente, mediante la utilización de la proteína de longitud completa como antígeno. Se puede obtener un antisuero que contiene un anticuerpo (anticuerpo policlonal) que reconoce la proteína ribosomal L7/L12 mediante la inoculación de dicho péptido parcial o proteína de longitud completa, tal como se han mencionado anteriormente, como tales natural o reticulados con una proteína portadora a un animal, junto con un adyuvante, según se requiera, y la recogida del suero del animal. Además, también se puede utilizar el anticuerpo purificado a partir del antisuero. Entre los ejemplos del animal utilizado para la inoculación se incluyen oveja, caballo, cabra, conejo, ratón, rata y así sucesivamente, y son especialmente preferentes oveja, conejo y así sucesivamente, para la preparación de anticuerpos policlonales. Además, es más preferente utilizar, como anticuerpo, un anticuerpo monoclonal obtenido mediante un procedimiento conocido en el que se prepara una célula de hibridoma, y en dicho caso, el ratón es preferente como animal. Si, como dicho anticuerpo monoclonal, se recupera mediante cribado un anticuerpo monoclonal que reacciona con la proteína ribosomal L7/L12 de una bacteria específica que causa mastitis, pero no reacciona con la proteína ribosomal L7/L12 de una bacteria que causa mastitis distinta de la bacteria específica anterior, se puede utilizar para el diagnóstico de si un animal sufre de infección por la bacteria o no.

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

Además, como anticuerpo monoclonal, es preferente utilizar un anticuerpo monoclonal del que la reacción antígeno-anticuerpo no sea inhibida por algún contaminante distinto de la sustancia específica contenida en la leche. Por ejemplo, la leche contiene una gran cantidad de proteínas, tales como caseína, y éstas pueden inhibir la reacción de la sustancia específica y el anticuerpo monoclonal. Cuando se prepara un anticuerpo monoclonal dirigido a la sustancia específica de una manera convencional, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal del que la reacción antígeno-anticuerpo no es inhibida por la caseína o similar, o un anticuerpo monoclonal del que la reacción antígeno-anticuerpo está poco afectada por la caseína o similar, de manera preferente, puede elegirse y utilizarse. Dicho anticuerpo monoclonal se puede obtener fácilmente mediante la preparación de anticuerpos

monoclonales que reaccionan de manera específica con un antígeno de una manera habitual y, a continuación, la selección de un anticuerpo monoclonal del que la reacción antígeno-anticuerpo no es inhibida sustancialmente por un contaminante, tal como caseína, mediante el examen de si la reacción antígeno-anticuerpo se inhibe o no en presencia del contaminante.

[Otros]

En la presente invención, se puede utilizar la tira reactiva descrita anteriormente como tal, como un dispositivo inmunocromatográfico, o la tira reactiva puede almacenarse 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, de manera preferente, 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, de manera preferente, mediante la medición de un volumen predeterminado de la muestra con una pipeta o similar, y dejando caer la muestra a la tira reactiva. En este último caso, el estuche puede tener cualquier forma, siempre que la tira reactiva se puede almacenar. El caso se puede formar con cualquier material y entre los ejemplos preferentes se incluyen polipropileno, policarbonato y así sucesivamente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto del surfactante anfófilo en presencia de enzima lítica y surfactante no iónico en la detección de *Staphylococcus aureus* mediante inmunoensayo enzimático (ELISA)

(a) Preparación de anticuerpo monoclonal dirigido a la proteína ribosomal L7/L12

Como anticuerpo a marcar con oro coloidal, se utilizó anticuerpo monoclonal contra proteína ribosomal L7/L12 de *Staphylococcus aureus*. Según el procedimiento descrito en la publicación de patente internacional WO00/06603, ejemplo 5, se obtuvo la proteína ribosomal L7/L12 de *Staphylococcus aureus* y se prepararon anticuerpos monoclonales mediante la utilización de esta proteína. Entre los anticuerpos monoclonales, se seleccionó una combinación de dos tipos de anticuerpos monoclonales (SA-1 y SA-2) que se pueden unir de forma simultánea a diferentes sitios de la proteína ribosomal L7/L12 mencionada anteriormente.

(b) Confirmación del efecto de la enzima lítica en ELISA

El efecto de la enzima lítica se confirmó de la siguiente manera.

Se pusieron el anticuerpo monoclonal SA-1 (10 µg/ml) y PBS (100 µl) en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (Maxsorp ELISA Plate, Nunc) y se permitió la adsorción del anticuerpo durante la noche a 4°C. Después de extraer el sobrenadante, se añadió una solución de albúmina de suero bovino al 1% (en PBS, 200 µl), y se procedió con la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora para alcanzar el bloqueo. Después de extraer el sobrenadante, cada pocillo se lavó varias veces con una solución de lavado (Tween 20 al 0,02%, PBS). Se trató el *Staphylococcus aureus* suspendido en leche comercializada (aproximadamente 5×10^8 células/ml) con cada una de las soluciones mencionadas en la tabla 1 durante 30 minutos, y se diluyeron 100 veces con la misma leche, se añadió la suspensión diluida (100 µl) a cada pocillo, y se procedió con la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Además, después de extraer el sobrenadante, se añadió el anticuerpo monoclonal SA-2 marcado con peroxidasa y diluido con Tween 20 al 0,02% en PBS hasta una concentración final de 1 µg/ml (100 µl) y se procedió con la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de extraer el sobrenadante, cada pocillo se lavó adicionalmente varias veces con la solución de lavado, a continuación, se añadió una solución de TMB (KPL, 100 µl) a cada pocillo y se procedió con la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadió ácido clorhídrico 1 mol/l (100 µl) para terminar la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm.

Se agitó preliminarmente durante la noche una suspensión de células de *Staphylococcus aureus* mencionado anteriormente que contenía Triton X-100 a una concentración final del 1,0% y se sometió a ultrasonidos (salida 10, 1 minuto x 10 veces). Esta suspensión se sometió a un tratamiento de lisis a 37°C durante 60 minutos con 10 µg/ml (35 unidades/ml) de lisostafina (Wako Pure Chemical Industries, 3.500 unidades/mg, lo mismo se aplicará a los siguientes ejemplos a menos que se indique en especial) y la proporción de lisis observada en esta suspensión se define como el 100%. Para cada condición se calculó la proporción de lisis con respecto a la proporción de lisis anterior.

Los resultados se muestran en la figura 1. Se puso de manifiesto que, en el caso de la condición 1, en la que no se añadió surfactante anfófilo, la proporción de lisis fue del 55%, mientras que cuando se añadió el agente surfactante anfófilo, la proporción de lisis aumentó con todas las condiciones de adición del surfactante anfófilo, en comparación con el caso en el que no se añadió surfactante anfófilo. Además, también se reveló que, en los casos de las condiciones 10 a 12, en la que se utilizó un tipo diferente de surfactante anfófilo, la proporción de lisis aumentó de manera similar.

[Tabla 1]

Condición	Lisostafina, Wako Pure Chemical Industries (concentración final, µg/ml)	Surfactante			
		Surfactante no iónico (nombre comercial)	Concentración final (%)	Surfactante anfólico (nombre comercial)	Concentración final (%)
1	10	Éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano (Tween 20)	1	ninguno	-
2	10		1	n-Tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-8, Calbiochem)	0,1
3	10		1	n-Decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-10, Calbiochem)	0,1
4	10		1	n-Dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-12, Calbiochem)	0,1
5	10		1	n-Tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-14, Calbiochem)	0,1
6	10		1	n-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-16, Calbiochem)	0,1
7	10		1	n-Dodecil-N,N-(dimetilamonio)butirato (DDMAB, Calbiochem)	0,1
8	10		1	Amidopropil betaína (Enagicol L-30B, Lion)	0,1
9	10		1	Lauril betaína (Amphitol 24B, Kao)	0,1
10	10	Polioxietilen alquil fenil éter (Triton X-100)	1	n-Decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-10, Calbiochem)	0,1
11	10		1	n-Dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-12, Calbiochem)	0,1
12	10		1	n-Tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (Zwittergent 3-14, Calbiochem)	0,1

Ejemplo 2: Efecto del surfactante anfólico en presencia de la enzima lítica y el surfactante no iónico en la detección de *Staphylococcus aureus* mediante un procedimiento inmunocromatográfico

(1) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Se preparó un dispositivo inmunocromatográfico de la siguiente manera.

(a) Elemento impregnado de anticuerpo marcado con oro coloidal

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

(b) Parte para la captura de complejos de antígeno y anticuerpo marcado con oro coloidal

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 un 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 partida del revelado de cromatografía y se secó a 50°C durante 30 minutos, y, a continuación, el portador de membrana se sumergió 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 capturar el complejo del antígeno de proteína ribosomal L7/L12 de *Staphylococcus aureus* y el anticuerpo marcado con oro coloidal.

(c) Preparación de un dispositivo inmunocromatográfico

En la figura 2 se muestra una vista en sección de un dispositivo inmunocromatográfico. Además del elemento -1- impregnado de anticuerpo marcado y el portador de membrana -2- mencionados anteriormente para el revelado cromatográfico, se adhirieron entre sí 25 mm de GF/DVA (elemento de filtro -4- que tenía un grosor de 776 µm y que consistía en fibras de vidrio, tamaño de partícula de retención de 3,5 µm, GE Healthcare Bioscience) y 20 mm de GF/AVA (elemento de filtro -7- que tenía un grosor de 299 µm y que consistía en fibras de vidrio, tamaño de partícula de retención de 1,7 µm, GE Healthcare Bioscience) como un elemento que servía como el elemento de adición de la muestra y como el elemento para la eliminación de los glóbulos de grasa (tercera parte), y se preparó adicionalmente papel de filtro como el elemento -5- para la absorción. Después de que estos elementos se adhirieran sobre un sustrato -6- (grosor de 254 µm, fabricado de poliestireno, que tenía adhesivo para adherir los elementos), se cortaron con una anchura de 5 mm para preparar el dispositivo inmunocromatográfico.

(2) Prueba

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

Se puso leche (100 µl) que contenía *Staphylococcus aureus* a una concentración final de 1×10^5 (ufc/ml) en un microtubo, se añadieron 150 µl de una solución de tratamiento de lisis (1% (concentración final) de Tween 20, 10 µg/ml (35 unidades/ml) de lisostafina, MOPSO 0,1 M, pH 7,5, diferentes concentraciones de Zwittergent 3-12 o DDMAB) a la leche y se mezclaron en la misma, y se realizó el tratamiento a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como leche de vaca, se utilizó leche comercializada para el consumo. El dispositivo inmunocromatográfico mencionado anteriormente se sumergió en la solución mezclada anterior desde el elemento -4- para la adición de la muestra, se permitió el revelado cromatográfico dejando reposar el dispositivo a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, para determinar la presencia o ausencia de la captura del complejo del antígeno de proteína ribosomal L7/L12 y el anticuerpo marcado con oro coloidal por la parte 3 mencionada anteriormente para la captura, se midió una línea de color morado rojizo que se volvió más o menos visible en proporción a la cantidad de captura mediante un aparato C10066 (Hamamatsu Photonics). Se añadió el surfactante anfótilico a diferentes concentraciones y se calcularon las proporciones de lisis para las concentraciones como las proporciones relativas a la proporción de lisis de la suspensión celular en la que se realizó el tratamiento de lisis de antemano de la misma manera que en el ejemplo 1, que se tomó como el 100%. Los resultados se muestran en la figura 3. Se reveló que, con cualquiera de los surfactantes anfótilicos, la proporción de lisis mejoró notablemente de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 3: Medición en la muestra de leche mediante un procedimiento inmunocromatográfico

Se realizó un procedimiento inmunocromatográfico para una muestra de leche obtenida de una vaca con mastitis. La

medición se realizó de la misma manera que la del ejemplo 2 (la solución de tratamiento de lisis contenía el 1% (concentración final) de Tween 20, 10 µg/ml (35 unidades/ml) de lisostafina, MOPSO 0,1 M, pH 7,5, 0,1% (concentración final) de Zwittergent 3-12, el tratamiento se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos y el revelado se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos) y se examinó visualmente la línea de color morado rojizo que apareció (positivo +, negativo -). Por separado, a efectos de confirmar el número de *Staphylococcus aureus* en la leche, se realizó la cuantificación mediante el procedimiento basado en el cultivo. Cada muestra de leche (100 µl) se inoculó en agar de tripticasa soja II con el 5% de sangre de oveja (Becton Dickinson Japan), a continuación, se realizó la incubación a 37°C durante 24 horas y se contaron las colonias que aparecieron. El número de *Staphylococcus aureus* calculado mediante el procedimiento basado en el cultivo y los resultados de la determinación obtenidos mediante el procedimiento inmunocromatográfico se muestran en la tabla 2. La adición de Zwittergent 3-12 permitió la detección de las bacterias de orden 10^3 (ufc/ml).

[Tabla 2]

No. de muestra	Número de <i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/ml)	Resultado de la inmunocromatografía	
		Sin Zwittergent 3-12	Con Zwittergent 3-12
1	2x10 ²	-	+
2	3x10 ²	-	+
3	6x10 ²	-	+
4	1x10 ³	-	+
5	1x10 ³	-	+
6	2x10 ³	-	+
7	3x10 ³	+	+

REIVINDICACIONES

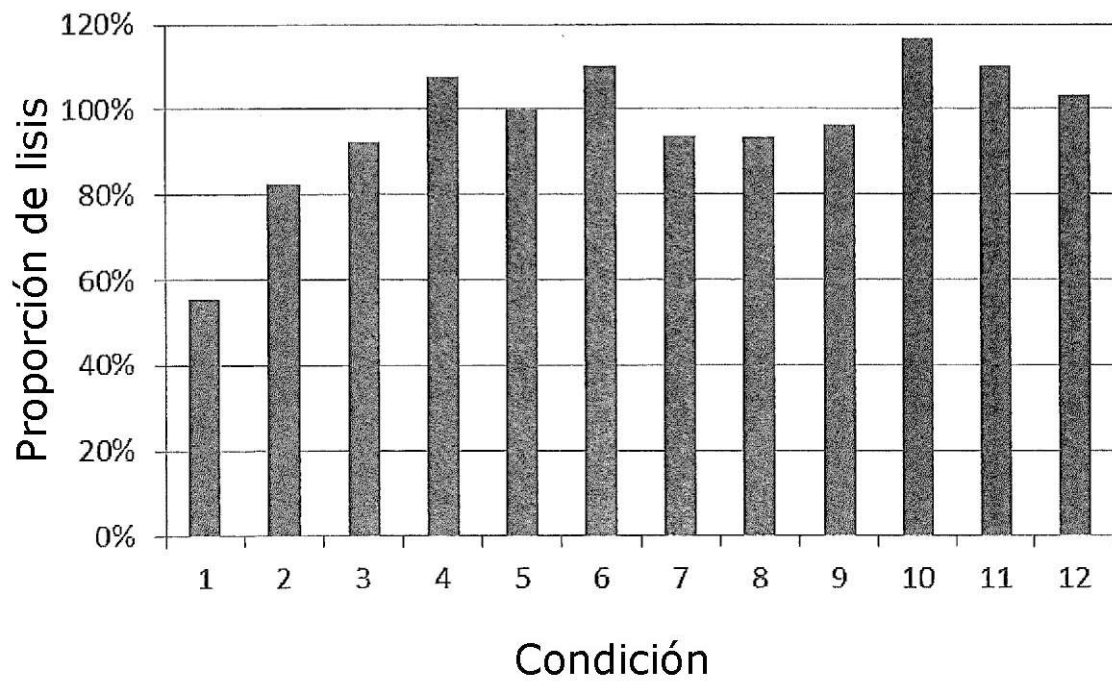
1. Procedimiento para lisar un estafilococo existente en la leche, que comprende:
la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisostafina, un surfactante anfófilico y un surfactante no iónico con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche,
5 en el que en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final del surfactante anfófilico no es inferior al 0,03% y no es superior al 0,2%.
2. Procedimiento de lisis, según la reivindicación 1, en el que el surfactante anfófilico se selecciona entre un dimetilamoniopropanosulfonato, un dodecildimetilamoniobutirato, lauril betaína y amidopropil betaína; y/o
10 el surfactante no iónico se selecciona entre un polioxietilen alquil fenil éter y un éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano.
3. Procedimiento de lisis, según la reivindicación 1 o 2, en el que, en la etapa de mezcla del agente de lisis con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final de lisostafina no es inferior a 0,1 mg/μl y
15 no es superior a 200 mg/μl; y/o
en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03% y no es superior al 10%.
4. Procedimiento para detectar un estafilococo contenido en la leche, que comprende:
1. la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisostafina, un surfactante anfófilico y un surfactante no iónico con la leche para lisar un estafilococo existente en la leche, la concentración final del surfactante anfófilico no es
20 inferior al 0,03% y no es superior al 0,2%,
2. la etapa de extraer glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche utilizando un material que tiene huecos
25 que permiten la extracción de los glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche, y
3. la etapa de detectar una sustancia específica derivada del interior del estafilococo y liberada mediante lisis, y
las etapas se realizan en el orden de 1, 2 y 3.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el surfactante anfófilico se selecciona entre un dimetilamoniopropanosulfonato, un dodecildimetilamoniobutirato, lauril betaína y amidopropil betaína; y/o
30 el surfactante no iónico se selecciona entre un polioxietilen alquil fenil éter y un éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano.
6. Procedimiento, según la reivindicación 4 o 5, en el que, en la etapa 1, la concentración final de lisostafina no es inferior a 0,1 mg/μl y no es superior a 200 mg/μl; y/o
35 en la etapa 1, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03% y no es superior al 10%.
7. Procedimiento de detección, según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que las etapas 2 y 3 se llevan a cabo mediante un procedimiento inmunocromatográfico.
40
8. Procedimiento de detección, según la reivindicación 7, en el que el procedimiento inmunocromatográfico comprende:
(1) la etapa de poner en contacto la leche que contiene la sustancia específica con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica
45 que está marcada, una segunda parte dispuesta por debajo de la primera parte, en la que un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica está inmovilizado, y una tercera parte dispuesta por encima de la primera parte o de la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche, en la tercera parte o una parte existente por encima de la misma, y
(2) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o una parte existente por debajo de la misma para obtener
50 una señal detectable del marcador en la segunda parte o una parte existente por debajo de la misma.
9. Procedimiento de detección, según la reivindicación 8, en el que el primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica es retenido en la primera parte.
10. Procedimiento de detección, según la reivindicación 8 o 9, en el que la tercera parte está constituida por dos o más tipos de elementos que tienen huecos que pueden eliminar los glóbulos de grasa de la leche de diferentes tamaños de partículas, respectivamente.
55
11. Procedimiento de detección, según la reivindicación 10, en el que la tercera parte está constituida por un primer elemento dispuesto por debajo y un segundo elemento dispuesto por arriba, y el tamaño de partícula de retención del segundo elemento es más grande que el tamaño de partícula de retención del primer elemento.
60
12. Agente de lisis, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en un procedimiento de lisis de un estafilococo contenido en la leche.
65
13. Agente de lisis para la utilización, según la reivindicación 12, en el que el procedimiento es un procedimiento de

diagnóstico de la mastitis de un animal de ganado.

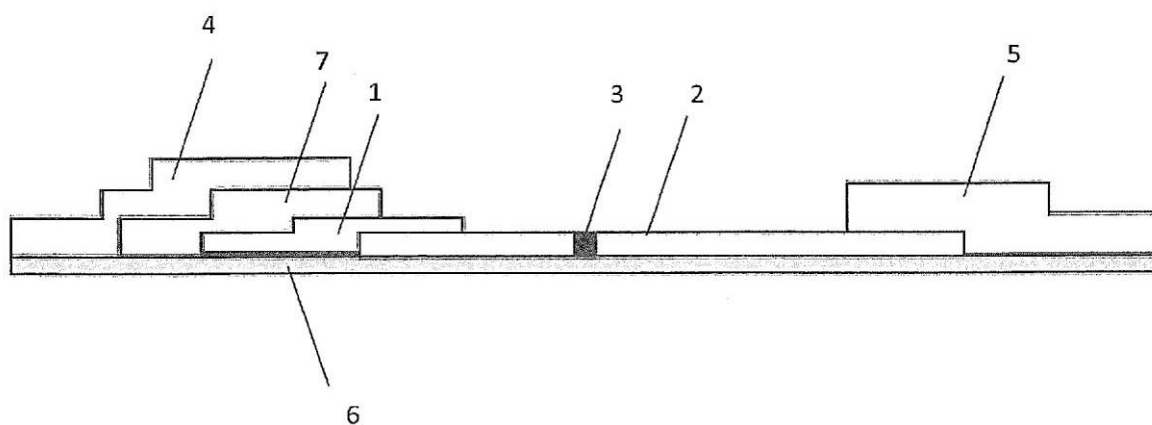
14. Kit para detectar un estafilococo contenido en la leche, que comprende:
el agente de lisis, según la reivindicación 12 o 13, y

- 5 un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta por debajo de la primera parte, en la que un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica está inmovilizado, y una tercera parte dispuesta
10 por encima de la primera parte o de la segunda parte y que tiene huecos que permiten la eliminación de glóbulos de grasa de la leche contenidos en la leche.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig.3]

