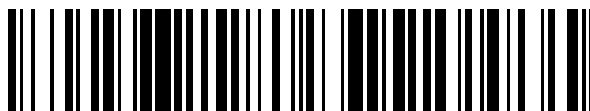


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 690**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2016 PCT/EP2016/077918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085153**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2016 E 16797886 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3368681**

54 Título: **Ensayo para determinar antibióticos en residuos**

30 Prioridad:

**20.11.2015 EP 15195669**  
**21.01.2016 EP 16152287**

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

**24.01.2020**

73 Titular/es:

**CENTRIENT PHARMACEUTICALS**  
**NETHERLANDS B.V. (100.0%)**  
**Alexander Fleminglaan 1**  
**2613 AX Delft, NL**

72 Inventor/es:

**HANEMAAIJER, LEENDERT MARINUS y**  
**JAGESAR, DHIREDJ CHANDRE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 738 690 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

Ensayo para determinar antibióticos en residuos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento sencillo y fácil de usar para la rápida determinación de la presencia de un antibiótico en un residuo como, por ejemplo, corrientes de residuos líquidos o sólidos de instalaciones. La presente invención se refiere también a un kit que comprende un ensayo y un manual para la rápida determinación de la presencia de un antibiótico en un residuo.

Antecedentes de la invención

10 La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas mundiales que ya no es una predicción de cara al futuro, sino que está pasando ahora mismo en todas las regiones del mundo y tiene el potencial de afectar a cualquier persona, de cualquier edad, en cualquier país. La resistencia a los antimicrobianos, cuando las bacterias cambian de manera que los antibióticos ya no funcionan en las personas cuando los necesitan para el tratamiento de las infecciones, es ahora una gran amenaza para la salud pública. Ha habido cada vez más llamamientos públicos a una acción colectiva mundial para hacer frente a la amenaza, incluida una propuesta de un tratado internacional sobre la resistencia a los antimicrobianos. La resistencia a los antibióticos no se ha definido adecuadamente a escala mundial, pero los países más afectados son los países más pobres con sistemas sanitarios más débiles. Hay tres formas principales por las cuales puede aparecer la resistencia a los antimicrobianos: resistencia natural a ciertos tipos de bacterias, mutación genética, o por el desarrollo de resistencia de otra bacteria.

20 La resistencia a los antimicrobianos puede darse espontáneamente debido a mutaciones de los propios microbios, desarrollar resistencia a lo largo del tiempo o al abuso de antibióticos. Los microbios resistentes se vuelven cada vez más difíciles de tratar, ya que requieren medicamentos alternativos o dosis más altas, que pueden ser más costosos o más tóxicos para el individuo. Algunas infecciones ya se están volviendo incurables debido a la resistencia a los antimicrobianos.

25 La resistencia a los antimicrobianos es un asunto cada vez más problemático que provoca millones de muertes cada año. La tendencia creciente de la resistencia a los medicamentos puede atribuirse a cuatro áreas principales: uso de antibióticos en la población humana, uso de antibióticos en la población animal, la propagación de cepas resistentes entre fuentes humana y/o no humana, y la liberación de antibióticos al medio ambiente.

30 Esta última causa de resistencia a los antimicrobianos, liberación de antibióticos al medio ambiente, es un problema creciente en varios segmentos de la agricultura y la industria. En este sentido, la propagación y contaminación del medio ambiente, especialmente a través de "puntos calientes" tal como aguas residuales de hospitales e industriales y las aguas residuales urbanas no depuradas, presenta un problema de salud pública que va en aumento. Los antibióticos han estado contaminando el medio ambiente desde su introducción a través de varias fuentes tal como los residuos humanos (medicamentos, producción agraria), el tratamiento de animales y la industria farmacéutica. Los residuos de antibióticos pueden contener, o pueden ser una fuente para el desarrollo de bacterias resistentes. Como resultado, los residuos antibióticos pueden dar como resultado la introducción de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente. Como las bacterias se replican rápidamente, las bacterias resistentes que entran en el medio ambiente replican sus genes resistentes mientras continúan dividiéndose. Además, las bacterias portadoras de genes resistentes (es decir, bacterias resistentes) tienen la capacidad de propagar esos genes a otras especies a través de la transferencia horizontal de genes. Por lo tanto, incluso si el antibiótico específico ya no se introduce en el medio ambiente, los genes resistentes a los antibióticos persistirán a través de las bacterias que han sido replicadas desde entonces sin exposición continua.

45 Como una de las consecuencias, los productores de antibióticos tendrán que garantizar que se apliquen los procedimientos más limpios, más rigurosos y sostenibles para minimizar el impacto medioambiental de la producción de medicamentos que salvan vidas y un primer paso en esta dirección es medir el contenido antibiótico en las corrientes de residuos (industriales).

50 Técnicamente, con los procedimientos analíticos del estado de la técnica, esto es posible. La cantidad de antibióticos en las corrientes acuosas se puede medir mediante varios procedimientos, incluyendo fotometría, electroquímica, cromatografía de gases y cromatografía directa de líquidos (Petts y Karayannis (2004), Anal. Chim. Acta 522, 275-280). Un inconveniente es que estas técnicas son laboriosas y prolongadas y a menudo necesitan dispositivos costosos y personal muy capacitado. Como consecuencia, estos procedimientos son difíciles, si no imposibles, de implementar a alta frecuencia y/o en muchas ubicaciones por personal sin, especialmente, gran experiencia técnica.

55 Así, existe la necesidad de procedimientos simples, económicos y fáciles de usar para determinar la presencia y/o concentración de antibióticos en las corrientes de residuos. La presente divulgación proporciona un procedimiento de este tipo.

Los ensayos microbiológicos para la determinación de antibióticos se conocen desde hace bastante tiempo. Ejemplos de tales ensayos se describen en los documentos CA 2056581, DE 3613794, EP 0005891, EP 0285792, EP 2226389, GB 1467439, WO 94/18343 y WO 2005/118837. En su mayoría, estos ensayos están diseñados para su uso en la industria láctea, en particular para el análisis de la leche. Estos ensayos microbiológicos incluyen un ensayo listo para usar que hace uso de un microorganismo y da un resultado por un cambio indicado por un indicador, tal como una molécula indicadora, que puede dar una señal indicadora, añadida al medio de ensayo. El principio es que cuando el antibiótico está presente en la muestra en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento del microorganismo el color del indicador se mantendrá igual, mientras que, cuando no se produce ninguna inhibición, el crecimiento del microorganismo va acompañado de la formación de metabolitos ácidos y/o reducidos u otros fenómenos que inducirán un cambio en la señal indicadora del indicador.

Desafortunadamente, cuando estos ensayos se aplican en sustratos que son más complejos que la leche, como las corrientes de aguas residuales que comprenden muchos otros componentes o incluso residuos (semi)sólidos como tortas filtrantes, micelios o residuos concentrados de los procedimientos de fermentación, los resultados son difíciles de interpretar y, por lo tanto, poco fiables. Si el cambio del indicador es un cambio de color de la molécula indicadora, dicho cambio es a menudo difícil de observar o interpretar. Otro posible inconveniente es que los componentes adicionales, no antimicrobianos, en muestras complejas influyen en el buen funcionamiento del microorganismo de ensayo.

#### Sumario de la invención

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos de 0,01% (p/p) de lactosa que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto dicha muestra sin lactosa con un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar el crecimiento o la inhibición del microorganismo para obtener un conjunto de la muestra sin lactosa y el medio de ensayo;
- (b) incubar el conjunto obtenido en la etapa (a) durante un período de tiempo suficiente para cultivar el microorganismo en caso de que no haya antibióticos en dicha muestra sin lactosa; y
- (c) detectar el crecimiento o la inhibición del microorganismo con el indicador, caracterizado por que la leche y/o la leche en polvo se añaden en la etapa (a).

La divulgación se refiere además a un kit que comprende:

- (a) un recipiente con medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar el crecimiento o inhibición del microorganismo para obtener una mezcla;
- (b) un manual que comprende instrucciones para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa.
- (c) un contenedor que incluye leche en polvo.

La divulgación se refiere además al uso de Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa, en donde a dicha muestra sin lactosa se añade leche y/o leche en polvo. La divulgación se refiere además al uso de un compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa, en donde a dicha muestra sin lactosa se añade leche y/o leche en polvo.

#### Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento simple, económico y fácil de usar para determinar antibióticos en residuos. También se proporciona un kit de piezas que comprende un ensayo microbiológico fácil de usar e instrucciones para su aplicación en residuos, incluidas matrices complejas como las corrientes de aguas residuales que comprenden muchos otros componentes o incluso residuos (semi)sólidos como tortas filtrantes, micelios o residuos concentrados de procesos de fermentación.

La presente divulgación proporciona un único protocolo de ensayo versátil fiable y simple.

En el contexto de la presente invención, los términos y las abreviaturas se definen de la siguiente manera.

El término "antibiótico" se refiere a compuestos tales como, por ejemplo,  $\beta$ -lactamas, tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas y sus derivados; y cualquiera de sus combinaciones. Ejemplos de antibióticos, cuya presencia puede ser detectada con el procedimiento o kit de la presente invención, son, entre otros, aminoglucósidos (como amikacina, dibekacina, gentamicina, kanamicina A, neomicinas B, C y E, netilmicina, sisomicina, estreptomina, tobramicina y similares), cefalosporinas (como ácido 7-aminocefalosporánico, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazolina, cefbuperazona, cefcapeno, cefdinir, cefditoreno, cefepima, cefetamet, cefixima, cefmenoxima, cefmetazol, cefminox, cefodizima, cefonicida, cefoperazona, ceforanida, cefoselis, cefotaxima, cefotiam, cefotetano, cefovecina, cefoxitina, cefozopran,

5 cefpiramida, cefpiroma, cefpodoxima, cefprozilo, cefquinoma, cefroxadina, cefsulodina, ceftarolina, ceftazidima, cefteteramo, ceftibuteno, ceftiofur, ceftizoxima, ceftobiprol, ceftolozano, ceftriaxona, cefuroxima, cefalexina, cefalosporina C, cefradina y similares), penicilinas (tal como ácido 6-aminopenicilánico, amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, flucloxacilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y similares), quinolonas de primera generación (tal como cinoxacina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, ácido piromídico, rosoxacina), quinolonas de segunda generación (tal como ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina, lomefloxacina, nadifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, rufloxacina), quinolonas de tercera generación (tal como balofloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, pazufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina), quinolonas de cuarta generación (tal como clinafloxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, sitafloxacina, trovafloxacina, prulifloxacina), sulfonamidas y tetraciclinas (tal como clortetraciclina, demeclociclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, rolitetraciclina, tetraciclina y similares). Mayormente, también se incluyen los productos de degradación y/o derivados reorganizados de los compuestos anteriores que todavía poseen actividad antimicrobiana.

15 La expresión "medio de ensayo" se refiere a una composición en forma de una solución, un sólido o, preferiblemente, en la forma de una matriz similar al gel como un sol o un gel. Si el medio de ensayo tiene la forma de una matriz similar al gel, puede comprender un agente gelificante. La persona experta en la técnica comprenderá que un medio de ensayo de sólidos puede basarse en materiales portadores como cerámica, algodón, vidrio, partículas metálicas, papel, polímeros en cualquier clase o forma, silicatos, esponjas, lana y similares. Por lo general, un medio de ensayo comprende uno o más indicadores. El medio de ensayo puede comprender uno o más tipos de microorganismos o enzimas como agentes de detección y al menos un nutriente. El medio de ensayo puede tener la forma de un comprimido, disco o filtro de papel que comprende microorganismo, indicador y nutriente. Estos tres componentes pueden estar presentes en un solo comprimido, pero también en dos o más comprimidos. Por supuesto, también se pueden utilizar ensayos que combinan medios de ensayo en forma sólida, líquida y/o de un gel. En una forma de realización, microorganismo, indicador y nutriente se introducen en una solución de agar. La solución de agar se deja solidificar para formar el medio de ensayo de manera que el microorganismo permanezca vivo, pero no pueda multiplicarse debido, por ejemplo, a la baja temperatura. En una forma de realización, la cantidad de agente gelificante en el medio de ensayo está entre 2 y 100 g·l<sup>-1</sup>, preferiblemente entre 5 y 50 g·l<sup>-1</sup>, más preferiblemente entre 10 y 20 g·l<sup>-1</sup>, más preferiblemente entre 12 y 15 g·l<sup>-1</sup>. En una forma de realización preferida, el agente gelificante es agar. Opcionalmente, el medio de ensayo también puede contener uno o más tampones, estabilizantes, tensioactivos, sales, sustancias que cambian la sensibilidad a ciertos compuestos antimicrobianos de manera positiva (aumentando la sensibilidad) o negativa (disminuyendo la sensibilidad), agentes que incrementan la viscosidad o cualquiera de sus combinaciones. Cuando hay un tampón presente en el medio, puede añadirse durante la mezcla de los componentes del medio o los componentes pueden ser disueltos y/o suspendidos en el tampón. Agentes tampón adecuados incluyen, entre otros, alanina, fosfato potásico y fosfato sódico. Ejemplos de sustancias que cambian la sensibilidad a ciertos compuestos antimicrobianos son antifolatos como ormetoprima, tetroxoprima y trimetoprima que mejoran la sensibilidad del microorganismo hacia sulfa-compuestos o sales de ácido oxálico o ácido hidrofúrico o agentes quelantes de calcio que mejoran la sensibilidad a la tetraciclina. Cisteína y la proteína de unión a la penicilina son compuestos que se sabe que disminuyen la sensibilidad a ciertos compuestos antimicrobianos. Ejemplos de agentes que incrementan la viscosidad incluyen, entre otros, metilsilanolpectinato de ascorbilo, carbómero, carboximetilcelulosa, alcohol cetearílico, alcohol cetílico, ésteres de cetilo, cocoamida DEA, cera emulsionante, glucosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lauramida DEA, linoleamida DEA, silicato de aluminio y magnesio, maltodextrinas, diestearato de PEG-8, poli(acrilamida y poli(alcohol vinílico), copolímero PVP/hexadeceno, cloruro de sodio, sulfato de sodio, soyamidopropilbetaína, goma de xantano, y similares. Un estabilizante adecuado es, por ejemplo, sílice coloidal. Alternativamente, los ingredientes opcionales del medio de ensayo mencionado anteriormente también pueden añadirse de forma exógena. El medio de ensayo puede estar contenido dentro de cualquier tipo de contenedor; contenedores de uso frecuente son tubos, placas de microtitulación y placas petri. Los contenedores pueden tener cualquier forma y tamaño y ser de cualquier material disponible, siempre que sea posible la observación de los cambios del indicador. La observación de los cambios del indicador se puede realizar visualmente, pero también se puede realizar utilizando un dispositivo de lectura de muestras, como un escáner. Opcionalmente, los medios para el sellado de dichos contenedores llenos de medio de ensayo durante la incubación y/o un inserto con instrucciones de uso y/o un medio para ajustar el tiempo necesario para la incubación son parte del sistema de ensayo. Opcionalmente, el medio de ensayo está esterilizado. Por lo general, el pH se ajusta al valor requerido. El procedimiento de la presente invención puede incluir mezclar muestras (por ejemplo, con otras muestras, pero también, por ejemplo, con sales, compuestos tampón, estabilizantes, compuestos etiquetados con isótopos, compuestos etiquetados con fluorescencia, y similares), concentrar y/o diluir posteriormente (por ejemplo, con líquidos diluyentes como el agua) las muestras antes de la adición al medio de ensayo.

60 El término "UFC" es una abreviatura de Unidades Formadoras de Colonias y se refiere al número de microorganismos, esporas de microorganismos, esporas parcialmente germinadas de microorganismos y/o células vegetativas capaces de producir colonias de microorganismos. La concentración de dichas UFC se expresa como Unidades Formadoras de Colonias por ml de medio de ensayo (UFC·ml<sup>-1</sup>) y suele estar en el intervalo de 1×10<sup>5</sup> a 1×10<sup>12</sup> UFC·ml<sup>-1</sup>, preferiblemente 1×10<sup>6</sup> a 1×10<sup>10</sup> UFC·ml<sup>-1</sup>, más preferiblemente 2×10<sup>6</sup> a 1×10<sup>9</sup> UFC·ml<sup>-1</sup>, lo más preferiblemente 5×10<sup>6</sup> a 1×10<sup>8</sup> UFC·ml<sup>-1</sup>, o aún más preferiblemente 5×10<sup>6</sup> a 2×10<sup>7</sup> UFC·ml<sup>-1</sup>.

La expresión "agente gelificante" se refiere a un compuesto o sustancia que ayuda a cambiar una mezcla o tomar la forma de un gel. Ejemplos adecuados de agentes gelificantes son agar, ácido alginico, y sus sales, carragenano, gelatina, hidroxipropil-guar y sus derivados, goma de garrofín (goma de algarrobo), alga Eucheuma procesada y similares.

5 En el contexto de la presente invención, el término "indicador" se refiere a una sustancia utilizada para medir (por ejemplo, por cambio de color o fluorescencia) la condición de un medio de ensayo con respecto a la presencia de un componente particular (por ejemplo, un ácido, una base, agentes oxidantes o reductores). El indicador, al cambiar de un estado a otro, proporciona una señal detectable como un cambio de color o fluorescencia. El indicador puede ser un indicador de pH, un indicador redox o una de sus combinaciones. El término indicador, en este documento, también puede referirse a dos o más indicadores. Ejemplos de indicadores adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica (véase el manual H.J. Conn's Biological Stains, R.D. Lillie ed., Baltimore, 1969). Particularmente útiles son los indicadores que, al cambiar de un estado a otro, proporcionan una señal visualmente detectable como un cambio de color o fluorescencia. La cantidad de indicador en el medio de ensayo está entre 0,01 y 50 g·l<sup>-1</sup> de medio de ensayo, preferiblemente entre 0,1 y 10 g·l<sup>-1</sup>, más preferiblemente entre 0,5 y 5 g·l<sup>-1</sup>, lo más preferiblemente entre 1 y 3 g·l<sup>-1</sup>. Tales indicadores pueden ser fácilmente seleccionados de manuales como "H.J. Conn's Biological Stains", R.D. Lillie ed., Baltimore, 1969. Los indicadores preferidos son indicadores de pH y/o indicadores redox. Ejemplos de indicadores adecuados son Acid Blue 120, Acid Orange 51, Acid Yellow 38, Alizarin acid, Alizarin Blue, Azure A, Azure B, Basic Blue 3, Brilliant Black, Azul de Cresilo Brillante, Croceína Brillante MOO, Amarillo Brillante, Verde de Bromocresol, Púrpura de Bromocresol, Azul de Bromofenol, Rojo de Bromofenol, Azul de Bromotimol, Verde de Clorocresol, Rojo Congo, Púrpura de m-Cresol, Gallocianina, Índigo Carmin, Verde Janus B, Tornasol, Azul de Metileno, Rojo de Metilo, Azul Nilo A, Amarillo Nitrazol (también conocido como Amarillo Nitrazina), o-Nitrofenol, p-Nitrofenol, 1,10-fenantrolina, Fenoltaleína, Rojo de Fenol, Safranina O, Tionina, Azul de Timol, Azul Toluidina y Azul Xilenol. Los indicadores preferidos son indicadores que cambian de color en el intervalo de pH de 4,5 a 8,0, preferiblemente de 5,0 a 7,5, más preferiblemente de 5,5 a 7,0, preferiblemente estos son Verde de Bromocresol, Púrpura de Bromocresol, Azul de Bromotimol, Rojo de Metilo o Rojo de Fenol, más preferiblemente Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol.

La expresión "muestra sin lactosa" se refiere a una muestra que no es leche ni otros productos lácteos que comprendan lactosa. La muestra sin lactosa se refiere a una muestra en la que es necesario determinar la presencia o ausencia de antibióticos y que debe diferenciarse de las muestras de leche para las que los ensayos antibióticos de la técnica anterior son generalmente aplicados y aceptados. Sin lactosa también abarca prácticamente exento de lactosa. Normalmente, una muestra sin lactosa contiene menos de 0,01% (p/p) de lactosa, por ejemplo, de 0,0001% (p/p) a 0,01% (p/p) de lactosa, preferiblemente de 0,00001% (p/p) a 0,005% (p/p) de lactosa. El contenido de lactosa puede determinarse según procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, el contenido de lactosa se determina según ISO 22662:2007. Ejemplos de muestras sin lactosa en el contexto de la presente invención incluyen muestras de corrientes de residuos de instalaciones, incluidas las corrientes de residuos acuosos y sólidos, muestras de efluentes y aguas superficiales como ríos, lagos, arroyos y similares, y muestras de orina o estiércol veterinarios. Las muestras sin lactosa para uso en la presente invención pueden ser de un fluido como agua, aguas residuales, agua de proceso, agua de alcantarillado, agua potable, agua empleada en, por ejemplo, piscinas, saunas e invernaderos y agua de refrigeración. Puede ser agua de origen agrícola, industria pesquera, lastre de embarcaciones, torres de refrigeración, plantas de tratamiento de aguas residuales, centrales eléctricas, industrias químicas como la industria textil, del papel y de la pasta papelera, industria de la impresión, industria del hierro y del acero, industria del coque, industria del petróleo, industria de pesticidas, industria de pinturas, industria médica y dental, industria de disolventes, industria farmacéutica, industria de productos químicos de protección de la madera e industria alimentaria. El fluido puede ser un efluente y/o corriente entrante, un efluente y/o una corriente saliente, o un efluente y/o corriente intermedia de cualquiera de las anteriores fuentes.

El término "microorganismo" se refiere a un microorganismo que es sensible al antibiótico, cuya presencia o ausencia debe determinarse por medio de su crecimiento.

El término "nutriente" tal como se utiliza en este documento se refiere a una sustancia o ingrediente nutritivo que promueve y/o se requiere para el crecimiento del microorganismo. Los nutrientes adecuados dependen del microorganismo utilizado en el medio de ensayo. El medio de ensayo puede comprender dos o más nutrientes diferentes. Se incluyen, entre otros, fuentes de carbono asimilables como hidratos de carbono como, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y dextrosa; fuentes de nitrógeno asimilables como aminoácidos como, por ejemplo, peptona o triptona; fuentes de vitaminas y factores de crecimiento como el extracto de carne de vacuno o de levadura; y fuentes de minerales como sales metálicas alcalinotérreas como sales de, por ejemplo, bario o calcio.

55 Las expresiones "leche en polvo" o "leche deshidratada" se refieren a un producto lácteo fabricado por evaporación de la leche hasta sequedad. Una finalidad de deshidratar la leche es preservarla; la leche en polvo tiene una vida útil mucho más larga que la leche líquida y no necesita ser refrigerada, debido a su bajo contenido de humedad. Otro propósito es reducir su volumen para economía de transporte. La leche en polvo y los productos lácteos incluyen productos como leche entera seca, leche deshidratada sin grasa (desnatada), suero de leche deshidratado, productos de suero deshidratados y mezclas de lácteos deshidratados.

En el contexto de la presente invención, el término "espora" se refiere a un cuerpo inactivo o reproductivo primitivo generalmente unicelular a menudo resistente al medio ambiente producido por microorganismos y capaz de desarrollarse en un nuevo microorganismo individual.

5 En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos de 0,01% (p/p) de lactosa, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto dicha muestra sin lactosa con un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar el crecimiento o inhibición del microorganismo para obtener un conjunto de la muestra sin lactosa y el medio de ensayo;
- 10 (b) incubar el conjunto obtenido en la etapa (a) durante un período de tiempo suficiente para cultivar el microorganismo en caso de que no haya antibióticos en dicha muestra sin lactosa; y
- (c) detectar el crecimiento o la inhibición del crecimiento del microorganismo con el indicador, caracterizado por que la leche y/o la leche en polvo se añade en la etapa (a).

15 El documento WO 2005/118837 A, que se considera el estado de la técnica más cercano al objeto del procedimiento de la invención, divulga un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un antibiótico en una muestra que comprende las etapas (a) poner en contacto dicha muestra con un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar el crecimiento o la inhibición del microorganismo para obtener un conjunto de la muestra y el medio de ensayo; y (b) incubar el conjunto obtenido en la etapa (a) durante un período de tiempo suficiente para cultivar el microorganismo en caso de que no haya antibióticos en dicha muestra. Véase el resumen, los ejemplos, así como las reivindicaciones 1, 6-8, 11.

En comparación con dicha divulgación de la técnica anterior, el objeto de la invención se diferencia por la adición de leche y/o leche en polvo. Sorprendentemente, se encontró que la adición de leche o leche en polvo a una muestra sin lactosa que debe ser ensayada en cuanto a la presencia o ausencia de un antibiótico conduce a una mayor precisión y facilidad de detección en comparación con realizar el ensayo similar en ausencia de leche (en polvo).

25 La realización de ensayos microbiológicos para la determinación de antibióticos en la leche, como se describe en los antecedentes de la invención, es bien conocida. También se ha notificado el uso de ensayos microbiológicos para determinar antibióticos en muestras que no provienen de la industria láctea; por lo general, se trata de fluidos acuosos sin lactosa. Sin embargo, no hay ninguna sugerencia en la técnica anterior para llevar a cabo, y mucho menos mejorar, la determinación de antibióticos en muestras sin lactosa mediante la adición de leche (en polvo) a dichas muestras sin lactosa. El mecanismo detrás de esta observación aún no se entiende completamente. Si está relacionado con la influencia de la leche sobre el medio de ensayo, el (crecimiento del) microorganismo, un efecto colorante sobre los indicadores o una interacción química o física con la muestra sin lactosa que se analizará es actualmente especulativo y sin respaldo en la técnica anterior.

35 En una primera forma de realización, el microorganismo es una cepa de *Bacillus*, *Escherichia coli* o *Streptococcus*. En una forma de realización adicional, el microorganismo es un microorganismo termófilo como *Bacillus stearothermophilus* o *Streptococcus thermophilus*. El medio de ensayo puede comprender uno o más tipos de microorganismos como agentes de detección. El microorganismo puede introducirse en el medio de ensayo como unidades capaces de producir colonias, o UFC. El crecimiento del microorganismo en la etapa de incubación (b) va a tener lugar durante un período predeterminado, preferiblemente dentro de un período de tiempo de 0,5 a 4 horas, más preferiblemente entre 1 y 3,5 horas, lo más preferiblemente entre 2,0 y 3,25 horas. Preferiblemente, el crecimiento del microorganismo se lleva a cabo a una temperatura predeterminada, preferiblemente la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Cuando, por ejemplo, se utilizan microorganismos termófilos, dicha temperatura está, preferiblemente, entre 40 y 70 °C, más preferiblemente entre 50 y 65 °C, lo más preferiblemente entre 60 y 64 °C. Opcionalmente, dicha reacción se puede llevar a cabo con la ayuda de un dispositivo termostático. Con la ayuda del dispositivo termostático, las muestras se pueden mantener a una temperatura prefijada, como la temperatura a la que el microorganismo muestra un crecimiento suficiente. Preferiblemente, dicho dispositivo termostático está diseñado de tal manera que puede albergar contenedores llenos de medio de ensayo. Opcionalmente, el dispositivo termostático está acoplado a un medio para ajustar el tiempo necesario para la incubación, de modo que la calefacción y/o la refrigeración se detengan después del lapso de un período prefijado. Alternativamente, el tiempo requerido para el crecimiento del microorganismo es igual al tiempo que se requiere para una muestra de calibración sin ningún desinfectante que induzca un cambio en el indicador.

55 En una segunda forma de realización, se eliminan los sólidos de dicha muestra sin lactosa antes de la etapa (a). Dicha eliminación puede realizarse utilizando operaciones disponibles para el experto en la técnica, tales como centrifugación, decantación, filtración y similares. Opcionalmente, cuando dicha muestra sin lactosa contiene muchos sólidos o incluso cuando es un sólido, la muestra se mezcla primero, ventajosamente, con una solución acuosa antes de la eliminación de sólidos. Dicha solución acuosa puede ser leche o leche en polvo mezclada con agua.

En una tercera forma de realización, la cantidad de lactosa presente en el combinado de la muestra sin lactosa más la leche o leche en polvo añadida es de 1 a 10% (p/p), preferiblemente de 2 a 5% (p/p).

En una cuarta forma de realización, se lleva a cabo un ensayo de control en el que en la etapa (a) se añade una cantidad conocida de un antibiótico. Dicho antibiótico puede ser cualquier antibiótico y, preferiblemente, es penicilina G K.

5 En una quinta forma de realización, se lleva a cabo un ensayo de control en el que, en la etapa (a), se añade una cantidad conocida de un compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama. Dicho compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama puede ser cualquier compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama y, preferiblemente, es una  $\beta$ -lactamasa.

Aunque los ensayos de control no son obligatorios para el buen funcionamiento del procedimiento de la presente invención, el experto en la técnica comprende que la fiabilidad de los resultados mejora cuando los ensayos de control de la cuarta y quinta formas de realización se llevan a cabo junto con el procedimiento del primer aspecto.

10 En una sexta forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa que comprende las etapas de:

- (a) preparar un intervalo de dilución de dicha muestra sin lactosa mediante la adición de leche;
- (b) poner en contacto cada dilución obtenida en la etapa (a) con un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un nutriente y un indicador;
- 15 (c) incubar cada mezcla obtenida en la etapa (b) durante un período de tiempo para cultivar el microorganismo en caso de que no haya antibióticos en la muestra;
- (d) detectar el crecimiento o la inhibición del crecimiento del microorganismo con el indicador;
- (e) determinar la dilución con el factor de dilución más alto capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo;
- (f) determinar la concentración del antibiótico en la dilución determinada en la etapa (e), y
- 20 (g) determinar la concentración del antibiótico en dicha muestra sin lactosa multiplicando la concentración determinada en la etapa (f) con el factor de dilución determinado en la etapa (e) utilizado para realizar la dilución.

El crecimiento o la inhibición del crecimiento del microorganismo se detecta observando la presencia o ausencia de un cambio del indicador. Preferiblemente, esto se hace para cada dilución del intervalo de dilución. Cuando, por ejemplo, el cambio del indicador es un cambio de color, el cambio de color se puede observar visualmente. Sin embargo, en una forma de realización de la invención, el cambio de color se determina mediante una disposición que genera datos de imágenes digitales o una disposición que genera datos de imágenes analógicas y transforma dichos datos de imagen analógica en datos de imagen digital seguidos de interpretación de dichos datos de imagen digital por un procesador informático. Una disposición de este tipo, que puede ser, por ejemplo, un dispositivo de lectura de muestras, como un escáner acoplado a un ordenador personal, se describe en el documento WO 03/033728. Con tal disposición es posible escanear la parte inferior de cada una de las muestras en una placa de ensayo. El color y el brillo de la luz reflejada se registran en tres variables, describiendo cada una un componente de color, por ejemplo, el llamado modelo  $L^*a^*b^*$ . En el modelo  $L^*a^*b^*$ , el espectro de colores está dividido en una matriz bidimensional. La posición de un color en esta matriz se registra por medio de las dos variables "a" y "b". La variable L indica la intensidad (por ejemplo, de azul claro a azul oscuro). Es posible hacer un criterio que comprenda el valor a, el valor b y el valor L para realizar una función compuesta de la siguiente manera:

$$Z = w_L \cdot L + w_a \cdot a + w_b \cdot b$$

donde  $w_L$ ,  $w_a$  y  $w_b$  son factores de ponderación para el valor L, el valor a y el valor b, respectivamente. Los valores de estos factores de ponderación se pueden calcular mediante "análisis discriminante", de tal manera que los medios del grupo muestran una distancia máxima en relación con la dispersión. Combinando dos o más de los componentes de color en el modelo  $L^*a^*b^*$  de una manera predeterminada que depende del tipo de desinfectante y la muestra, es posible una detección precisa. En la práctica, un cierto valor de Z al que un ensayo debe cambiar entre el resultado positivo y negativo está predeterminado experimentalmente para cada desinfectante. Si se desea, los equipos de lectura e informáticos descritos anteriormente se pueden combinar con equipos de calefacción, por ejemplo, un dispositivo termostático como se describe en el documento WO 2007/090683.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit para llevar a cabo el procedimiento del primer aspecto de la presente invención, dicho kit comprendiendo (a) un contenedor con medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar crecimiento o inhibición del microorganismo para obtener una mezcla, y (b) un manual para llevar a cabo el procedimiento del primer aspecto de la invención, como un manual que comprende instrucciones para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos de 0,01% (p/p) de lactosa, y (c) un contenedor que comprende leche en polvo.

El documento EP 2 226 389 A1 divulga un kit que comprende un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un nutriente y un indicador (véanse los párrafos [0013]-[0017] y [0019]). El documento GB 1 467 439 A divulga un recipiente de ensayo que contiene púrpura de bromocresol, cultivo de esporas y un medio agar (véase el ejemplo 1, así como las reivindicaciones 34-38 y 41-42). El documento WO 2005/118837 A1 divulga un kit adecuado para la determinación de la presencia o ausencia de un antibiótico en un líquido comprendiendo: (a) un contenedor con un medio de ensayo que comprende un organismo de ensayo, al menos una sustancia que

proporciona un estado sólido, nutrientes y un indicador (véase el resumen, así como la reivindicación 11). Sin embargo, ninguno de estos documentos divulga un contenedor que comprende leche en polvo.

5 Un kit de este tipo comprende uno o más contenedores que comprenden el medio de ensayo descrito anteriormente. Los contenedores pueden ser tubos de ensayo de cualquier forma y tamaño, y de cualquier material disponible, siempre que sea posible la observación de los cambios del indicador. Además, los contenedores pueden ser pocillos como los incorporados en placas de micro-titulación.

El manual para llevar a cabo el procedimiento del primer aspecto de la presente invención debe contener al menos instrucciones para el tratamiento de muestras, incluida la eliminación opcional de sólidos mediante filtración o centrifugación y adición de leche o leche en polvo como se describe en el primer aspecto de la invención.

10 En una forma de realización adicional, el kit comprende un dispositivo de muestreo que es un dispositivo con la ayuda del cual se puede añadir líquido a dicho medio de ensayo. Preferiblemente, un dispositivo de este tipo es un contenedor, opcionalmente con marcas de volumen. Más preferiblemente, un dispositivo de este tipo es una jeringa, una pipeta o un sistema automatizado de pipeteo. Dicha jeringa o pipeta puede diseñarse de tal manera que con un solo modo de funcionamiento se puede extraer un volumen predeterminado del fluido que se va a analizar.

15 Opcionalmente, se pueden aplicar en la técnica sistemas conocidos con los que se puede utilizar más de una jeringa o pipeta con una sola manipulación. El objeto del segundo aspecto de la presente invención es proporcionar un kit que permita la simple adición de las cantidades de líquido que se añadirán según el primer aspecto de la invención.

En una forma de realización adicional, el kit comprende medios para sellar dichos contenedores que comprenden el medio de ensayo durante la incubación.

20 En una forma de realización adicional, el kit consta de uno o más contenedores con cantidades conocidas de un antibiótico que se utilizará para llevar a cabo un ensayo de control. Dicho antibiótico puede ser cualquier antibiótico y, preferiblemente, es penicilina G K.

25 En una forma de realización adicional, el kit consta de uno o más contenedores con cantidades conocidas de un compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama que se utilizará para llevar a cabo un ensayo de control. Dicho compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama puede ser cualquier compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama y, preferiblemente, es una  $\beta$ -lactamasa.

30 En una forma de realización adicional del segundo aspecto de la presente invención, el kit comprende un dispositivo termostático, con la ayuda del cual las muestras se pueden conservar a una temperatura prefijada, como la temperatura a la que el microorganismo muestra un crecimiento suficiente. Preferiblemente, dicho dispositivo termostático está diseñado de tal manera que puede albergar dichos contenedores llenos de medio de ensayo. Opcionalmente, el dispositivo termostático está acoplado a un medio para ajustar el tiempo necesario para la incubación, de modo que la calefacción y/o la refrigeración se detengan después del lapso de un período prefijado.

35 En una forma de realización adicional, el kit comprende un portador de datos cargado con un programa informático adecuado para dar instrucciones a un ordenador para que analice los datos digitales obtenidos de un dispositivo de lectura de muestras. Dicho portador de datos puede ser cualquier portador adecuado para almacenar información digital como un CD-ROM, un disquete, un DVD, un lápiz de memoria, una cinta magnética o similar. Ventajosamente, dicho portador de datos cargado con un programa informático proporciona un fácil acceso a los últimos programas informáticos disponibles adecuados para su uso en el procedimiento de la presente invención.

40 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una muestra sin lactosa que contiene menos del 0,01% p/p de lactosa, un microorganismo, un agente gelificante, un indicador y uno de entre leche y leche en polvo, en donde se selecciona dicha muestra sin lactosa de muestras de corrientes de residuos industriales de instalaciones, incluidas corrientes de residuos acuosos y sólidos, muestras de efluentes y aguas superficiales y muestras de orina o estiércol veterinarios. Dicha composición es el resultado cuando el procedimiento del primer aspecto de la invención se aplica sobre una muestra sin lactosa, como las muestras de corrientes de residuos industriales de instalaciones, incluidas las corrientes de residuos acuosos y sólidos, muestras de efluentes y aguas superficiales como ríos, lagos, arroyos y similares, y muestras de orina o estiércol veterinarios.

45

50 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona el uso de Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol o un compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa, en donde a dicha muestra sin lactosa se añade leche y/o leche en polvo. El documento GB 1 467 439 A divulga el uso de Púrpura de Bromocresol para la determinación de penicilina (página 2, columna izquierda, líneas 58-63, y el ejemplo 1). El documento WO 2005/118837 A1 divulga el uso de Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol (página 8, líneas 5-6, y la reivindicación 9) divulga el uso de Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol. El documento US 5 591 599 A divulga el uso de una  $\beta$ -lactamasa (véase página 2, columna izquierda, líneas 15-19, y la reivindicación 7).

55 Ninguno de estos documentos divulga la adición de leche y/o leche en polvo.

## Ejemplos



### Ejemplo 1

Manual para determinar antibióticos en aguas residuales

A continuación, se muestra un ejemplo no limitante de lo que puede estar incluido como manual en un kit de la presente invención.

5 Ambiente:

Asegúrese de que el ambiente donde se ejecutará la determinación de antibióticos está exento de  $\beta$ -lactama. Si eso no se puede garantizar, en la propia sala puede utilizarse, como alternativa, una cabina de flujo laminar.

Equipos/accesorios:

- 10 – Centrífuga para tubos de centrífuga de 2 ml (velocidad de rotación 15.000 rpm)
- Baño de agua que pueda ajustarse a temperaturas de 37 °C y 65 °C
- Medidor de pH
- Congelador con compartimento separado para almacenar muestras; una caja cerrada en el congelador se puede utilizar como alternativa
- 15 – Pipeta Eppendorf de 10-100  $\mu$ l y 100-1.000  $\mu$ l
- Puntas de pipeta Eppendorf de 100  $\mu$ l y 1.000  $\mu$ l
- Tubos de centrífuga de 2,0 ml
- Tubos de centrífuga de 10 ml con tapa de tornillo
- Tubos Greiner de centrífuga de 50 ml con tapón de rosca
- Sistema de agua Milli Q
- 20 – Ampollas Delvotest SP NT (o ensayos antibióticos microbianos comparables)
- Matraces volumétricos (100 ml y 200 ml, esterilizados y purgados 4 veces con agua Millipore)

Productos químicos:

- Hidróxido de sodio 1N (sin  $\beta$ -lactama)
- Ácido hidroclicórico 1N (sin  $\beta$ -lactama)
- 25 –  $\beta$ -lactamasa BS (por ejemplo, proveedor AG número de producto científico L-2467)
- Leche entera (sin  $\beta$ -lactama); como alternativa, puede utilizarse leche en polvo, 1 gramo de leche en polvo en 10 ml de agua Milli Q. La leche se puede almacenar en el congelador (período de conservación 3 meses). Descongelar la leche congelada lentamente a temperatura ambiente antes de su uso. Para todas las fuentes de leche es importante demostrar que la leche no da una reacción positiva en el ensayo.
- 30 – Penicilina G K

Preparación de la solución:

- Agua de dilución: Añadir 40 ml de agua Milli Q en un nuevo tubo Greiner de centrífuga de 50 ml
- Solución de  $\beta$ -lactamasa: pesar 50 mg en un tubo de centrífuga de 2 ml y añadir 2 ml de agua Milli Q. Ajustar la cantidad si se necesita menos o más durante el ensayo
- 35 – Hidróxido de sodio 1N: pesar 1 gramo de NaOH en un nuevo tubo Greiner de centrífuga de 50 ml y disolver en 25 ml de agua Milli Q y mezclar
- Ácido hidroclicórico 1N: Añadir 24 gramos de agua Milli Q en un nuevo tubo Greiner de centrífuga de 50 ml y añadir 0,9 ml de HCl concentrado y mezclar
- Solución patrón de 4 ppb de penicilina G K: pesar exactamente 44 mg de penicilina G K (90% de pureza) en un matraz volumétrico de 100 ml y disolver y rellenar con agua Milli Q y mezclar (solución A). Añadir 1,0 ml de solución A en un matraz volumétrico de 100 ml y rellenar con agua Milli Q y mezclar (solución B). Añadir 1,0 ml de solución B en un matraz volumétrico de 100 ml y rellenar con agua Milli Q y mezclar (solución C). Pesar 5,0 gramos de solución C en un tubo Greiner de centrífuga de 50 ml y añadir 45,0 gramos de leche y mezclar (solución patrón de 4 ppb). Dividir esta solución en varios tubos de centrífuga de 10 ml, etiquetar cada tubo independiente y congelar a -18 °C (4 ml por tubo y período de conservación de 3 meses)
- 40
- 45 – Solución de ensayo de 2 ppb de penicilina G K: Sacar un tubo de penicilina G K patrón del congelador y descongelar lentamente a temperatura ambiente. Mezclar 600  $\mu$ l de solución patrón de penicilina G K con 600  $\mu$ l de leche entera y mezclar.

Proceso de toma de muestras:

50 Durante la toma de muestras, el almacenamiento y el transporte es crucial garantizar que no se introduce  $\beta$ -lactama. Para minimizar la posibilidad de contaminación, son necesarios las siguientes etapas:

1. Ponerse guantes y una bata de laboratorio limpia para evitar la contaminación
2. Rellenar dos tubos Greiner de centrífuga de 50 ml con 40 ml de muestra y cerrar el tapón de rosca inmediatamente después de añadir

3. Etiquetar los tubos de muestra y asegurarse de que el texto de la etiqueta sea legible
4. Colocar los dos tubos inmediatamente en una bolsa de plástico no usada anteriormente y cerrarla con una brida para cables
5. Etiquetar también la bolsa de plástico con la misma información indicada en los propios tubos de muestra
6. Almacenar los dos tubos de muestra en la bolsa de plástico a -18 °C si el ensayo no se ejecuta inmediatamente. El almacenamiento a -18 °C debe hacerse dentro de los 15 minutos posteriores a la toma de muestras

Pretratamiento:

Si las muestras están congeladas, descongelar la muestra colocando la muestra en frigorífico un día antes de ejecutar los análisis (3-10 °C).

1. Pesar 2 gramos en un tubo Greiner de centrífuga de 50 ml y añadir 25 ml de agua Milli Q y mezclar hasta una suspensión homogénea; asegurarse de que ambas fases se mezclan a fondo, especialmente en el caso de muestras deshidratadas o desecadas
  2. Agitar las muestras al menos 10 minutos a temperatura ambiente
  3. Ajustar el pH a 6,2-6,8 con NaOH 1N o HCl 1N
  4. Rellenar dos tubos de centrífuga de 2 ml
  5. Centrifugar 10 min a 14.000 rpm
- La parte superior transparente se utilizará para análisis posteriores.

Manipulación previa de los ensayos:

Hay tres diferentes manipulaciones previas de las muestras para los tres diferentes ensayos; dependiendo de los requisitos, se pueden realizar cualquiera o todos estos ensayos:

1. Ensayo normal
2. Ensayo de adición estándar
3. Ensayo de degradación de enzimas

Para la planificación de la ejecución de estas diferentes actividades de manipulación previa, debe tenerse en cuenta que en la manipulación previa de enzimas se tarda un margen de tiempo de al menos 2 horas.

1. Manipulación previa del ensayo normal:

Añadir una solución de muestra transparente de 600 µl en un tubo de centrífuga de 2,0 ml y añadir 600 µl de leche y cerrar inmediatamente la tapa y mezclar; esta mezcla se puede analizar directamente.

2. Manipulación previa del ensayo de adición estándar:

Añadir una solución de muestra de 600 µl en un tubo de centrífuga de 2 ml y añadir 600 µl de una solución de ensayo de 2 ppb de penicilina G K, cerrar el tapón y mezclar; esta mezcla se puede analizar directamente.

3. Manipulación previa del ensayo de degradación de enzimas:

Añadir una solución de muestra transparente de 700 µl en un tubo de centrífuga de 2,0 ml y añadir una solución de 100 µl de β-lactamasa y cerrar inmediatamente el tapón y mezclar. Colocar el tubo de centrífuga durante 2 horas en un baño de agua a 37 °C, enfriar después de dos horas y añadir 700 µl de leche y mezclar; esta mezcla se puede analizar directamente.

Ejecución de determinación de antibióticos:

Observe la descripción general incluida con Ampollas Delvotest SP NT (o equiparable). En la tabla siguiente se da un ejemplo de un relleno hipotético en tabla de muestras. En la fila uno, una muestra en blanco (leche) y se añade la solución de ensayo de 2 ppb de penicilina G K. En este ejemplo se aplican los siguientes códigos para los diferentes ensayos: N para el ensayo normal; S para el ensayo de adición estándar; E para el ensayo de degradación enzimática.

**Tabla: Ejemplo de una tabla de muestras:**

Tabla de muestras Delvotest					
A	B	C	D	E	fila
muestra en blanco		2 ppb		Muestra en blanco	1
N1	N2				2
S1	S2				3
E1	E2				4
					5

De todas las soluciones de muestras se llevan 100 µl en la Ampolla Delvotest SP NT con una pipeta Eppendorf de 100 µl. Con la punta de la pipeta se penetrará la parte superior de la tapa del tubo de la ampolla y se añadirán los 100 µl a la ampolla. Colocar las ampollas durante 2,5 h en un baño de agua a 65 °C. Sellar la ampolla con cinta. Después de 2,5 h las ampollas se retiran del baño de agua. Comprobar si las muestras en blanco son de color amarillo, si no, alargar en 30 min el tiempo en el baño de agua.

Interpretación de los resultados:

El amarillo es negativo y el púrpura es positivo. Positivo significa que hay actividad antimicrobiana presente en la muestra que es superior a 2 ppb (calculado como penicilina G K).

*Resultados del ensayo normal:*

- Púrpura significa que la actividad antimicrobiana es >2 ppb y amarillo <2 ppb.

*Resultados del ensayo de adición estándar:*

- Si la muestra es amarilla en el ensayo normal y púrpura en el ensayo de adición estándar: El nivel de actividad antimicrobiana es <2 ppb
- Si la muestra es púrpura en el ensayo normal y amarilla en el ensayo de adición estándar: Hay un efecto de matriz, no se puede confiar en los resultados. Es necesaria la dilución de la muestra.
- Si la muestra es púrpura en el ensayo normal, no se puede utilizar el ensayo de adición estándar.

*Ensayo de degradación de enzimas:*

- Si la muestra es púrpura en el ensayo normal y púrpura en el ensayo de degradación de enzimas. No se puede confiar en los resultados. La muestra debe ser reanalizada con una mayor cantidad de enzima.
- Si la muestra es púrpura en el ensayo normal y amarilla en el ensayo de degradación de enzimas: El nivel de actividad antimicrobiana es >2 ppb.
- Si la muestra es amarilla en el ensayo normal, el ensayo de degradación de enzimas no proporciona ninguna información adicional que pueda usarse.

Cálculo de la actividad antimicrobiana:

Los resultados se pueden calcular de la siguiente manera (el límite del procedimiento es de 2 ppb, 2 ppb son 2 µg·l<sup>-1</sup>):

- Muestra: 2 g/25 ml que son 80 g·l<sup>-1</sup>
- Diluido 2 veces con leche → 40 g·l<sup>-1</sup>
- Si la muestra se colorea púrpura significa >2 µg de actividad antimicrobiana presente en 40 gramos.
- 2 µg/40 g<sup>-1</sup> → 50 µg·kg<sup>-1</sup> → >50 ppb de actividad antimicrobiana.
- Si es de color amarillo <50 ppb de actividad antimicrobiana.

## Ejemplo 2

Determinación de antibióticos en una muestra con y sin leche añadida

Se analizaron dos muestras, una muestra en blanco (agua) y una solución de ensayo de 2 ppb de penicilina G K utilizando Delvotest SP NT disponible comercialmente (DSM Food Specialties B.V., Delft, Países Bajos) análogo al manual del proveedor. Dos ampollas se llenaron con muestra en blanco. A una se añadió leche (en el presente ejemplo, se añadió leche regular baja en grasa de un supermercado holandés) según las instrucciones descritas en el ejemplo 1 y a la otra se añadió la misma cantidad de agua. Además, se llenaron dos ampollas con una solución de ensayo de 2 ppb de penicilina G K y de nuevo a una se añadió leche según las instrucciones descritas en el Ejemplo 1 y a la otra se añadió la misma cantidad de agua. Las ampollas rellenas con muestra se incubaron a 64 °C ± 2 °C) y se registró visualmente el color del agar en las ampollas en varios momentos determinados. El experimento anterior se realizó por quintuplicado y las observaciones promedio fueron como se resumen en la siguiente Tabla.

Tiempo (min)	Muestra en Blanco		Solución de ensayo de penicilina G K	
	Leche añadida	Agua añadida	Leche añadida	Agua añadida
60	---	---	---	---
120	--+	---	---	---
150	+++	---	---	---
165	+++	---	---	---
180	+++	--+	---	---

Tiempo (min)	Muestra en Blanco		Solución de ensayo de penicilina G K	
	Leche añadida	Agua añadida	Leche añadida	Agua añadida
195	+++	---	---	---
210	+++	+++	---	---

5 Como puede apreciarse en la Tabla, las muestras en blanco sin antibiótico presente conducirán al crecimiento del microorganismo en la capa de agar, lo que a su vez conduce a un cambio en el pH y a un cambio de color del indicador del púrpura al amarillo (símbolos ---, - ++ y +++ en la tabla indican un cambio de color de parcial a total del púrpura al amarillo, respectivamente). Mientras que las muestras de la solución de ensayo de penicilina G K no muestran ningún cambio de color debido al efecto inhibitor de la penicilina G K en el crecimiento del microorganismo en la muestra en blanco, el comienzo del cambio de color puede observarse ya después de 120 minutos en presencia de leche mientras que esta observación sólo se puede hacer después de 180 minutos en ausencia de leche añadida. Además, el cambio de color total también se produce más rápidamente en presencia de leche.

10 **Ejemplo 3**

Determinación de antibióticos en una muestra con y sin leche añadida

15 El Ejemplo 2 se repitió con varias otras muestras, tal como corrientes de residuos de procesos y extractos de tortas filtrantes de micelio de fermentación y en aquellos casos en los que no había antibióticos en la muestra, se confirmó el efecto observado en el Ejemplo 2 (cambio más rápido del color del indicador en la capa de agar de las ampollas de ensayo Delvotest SP NT en presencia de leche en comparación con la misma en ausencia de leche)

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos de 0,01% (p/p) de lactosa que comprende las etapas de:
  - 5 (a) poner en contacto dicha muestra sin lactosa con un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar el crecimiento o inhibición del microorganismo para obtener un conjunto de muestra sin lactosa y medio de ensayo;
  - (b) incubar el conjunto obtenido en la etapa (a) durante un período de tiempo suficiente para cultivar el microorganismo en caso de que no haya antibióticos en dicha muestra sin lactosa; y
  - 10 (c) detectar el crecimiento o inhibición del crecimiento del microorganismo con el indicador, caracterizado por que la leche y/o la leche en polvo se añade en la etapa (a).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicho medio de ensayo comprende además nutrientes.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho indicador es Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho microorganismo es termófilo.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en donde dicho microorganismo es *Bacillus stearothermophilus*.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho agente gelificante es agar.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los sólidos se eliminan de dicha muestra sin lactosa antes de la etapa (a).
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cantidad de lactosa en dicha muestra sin lactosa más dicha leche o leche en polvo añadida es del 2 al 5% (p/p).
- 20 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un ensayo de control seleccionado de:
  - (i) una cantidad conocida de un antibiótico se añade en la etapa (a), o
  - (ii) una cantidad conocida de un compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama se añade en la etapa (a), o
  - 25 (iii) una combinación de (i) y (ii).
10. Un procedimiento para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa que comprende las etapas de:
  - (a) preparar un intervalo de dilución de dicha muestra sin lactosa mediante la adición de leche;
  - 30 (b) poner en contacto cada dilución obtenida en la etapa (a) con un medio de ensayo que comprende un microorganismo, un nutriente y un indicador capaz de detectar el crecimiento o inhibición del microorganismo para obtener una mezcla;
  - (c) incubar cada mezcla obtenida en la etapa (b) durante un período de tiempo suficiente para cultivar el microorganismo en caso de que no haya antibióticos presentes en la muestra;
  - (d) detectar el crecimiento o inhibición del crecimiento del microorganismo con el indicador;
  - 35 (e) determinar la dilución con el factor de dilución más alto capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo;
  - (f) determinar la concentración del antibiótico en la dilución determinada en la etapa (e), y
  - (g) determinar la concentración del antibiótico en dicha muestra sin lactosa multiplicando la concentración determinada en la etapa (f) con el factor de dilución determinado en la etapa (e) utilizado para realizar la dilución.
- 40 11. Un kit que comprende:
  - (a) un contenedor con medio de ensayo que comprende un microorganismo, un agente gelificante y un indicador capaz de detectar el crecimiento o inhibición del microorganismo para obtener una mezcla;
  - (b) un manual que comprende instrucciones para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa;
  - 45 (c) un contenedor que comprende leche en polvo.
12. Kit según la reivindicación 11, en donde en la etapa (b) el manual comprende instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Una composición que comprende una muestra sin lactosa que contiene menos del 0,01% p/p de lactosa, un microorganismo, un agente gelificante, un indicador y uno de entre leche y leche en polvo, en donde dicha muestra sin lactosa se selecciona de muestras de corrientes de residuos industriales de instalaciones, incluidas corrientes de residuos acuosos y sólidos, muestras de efluentes y aguas superficiales y muestras de orina o estiércol veterinarios.
- 50 14. El uso de Púrpura de Bromocresol o Azul de Bromotimol para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa, donde a dicha muestra sin lactosa se añade leche y/o leche en polvo.

15. El uso de un compuesto de degradación de  $\beta$ -lactama para determinar la concentración de un antibiótico en una muestra sin lactosa, que está prácticamente exenta de lactosa y/o contiene menos del 0,01% (p/p) de lactosa, donde a dicha muestra sin lactosa se añade leche y/o leche en polvo.