

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 833**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/EP2012/067944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13037885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12758490 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2756306**

54 Título: **Inmunoensayo para detectar antibióticos**

30 Prioridad:

16.09.2011 EP 11181581
18.07.2012 EP 12176912

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CAUSSETTE, MYLÈNE PATRICE DOMINIQUE;
HENNART, STÉPHEN L. A. y
FRANSE, MAARTJE MARIA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 748 833 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

Inmunoensayo para detectar antibióticos

Campo de la invención

La presente invención describe un dispositivo y un método para detectar analitos en una muestra.

5 Antecedentes de la invención

Los antibióticos se utilizan para combatir enfermedades infecciosas, tanto en seres humanos como en animales. Se sabe que el uso incorrecto de los antibióticos, tal como la administración de antibióticos cuando no son necesarios desde el punto de vista médico, o los cursos incompletos de tratamiento son la causa más importante de desarrollo de resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, los métodos para detectar la presencia de antibióticos en muestras tales como p. ej., leche, sangre, pescado, pienso, carne, suero, orina, agua y similares son de extrema importancia en la prevención del uso indeseado de antibióticos. En muchas áreas, este proceso de detección solamente se puede realizar adecuadamente si existe disponible una prueba rápida y sencilla.

En general, hay dos tipos de ensayos adecuados para controlar de manera habitual la presencia de antibióticos en muestras. En primer lugar, existen ensayos de inhibición microbiana, en donde un microorganismo de ensayo se pone en contacto con la muestra que se ha de ensayar y se observa el desarrollo (o la inhibición del desarrollo) del microorganismo, por ejemplo con el uso de un indicador. Un ejemplo de dicho ensayo se describe en el documento EP 0 755 456 B1. La principal desventaja de los ensayos de inhibición microbiana es que lleva relativamente mucho tiempo obtener los resultados.

En segundo lugar, existen inmunoensayos competitivos, en donde el antibiótico a ensayar y un antibiótico de referencia presente en el ensayo compiten para la unión con proteínas de unión y/o anticuerpos con afinidad hacia los antibióticos. La visualización usualmente se lleva a cabo mediante etiquetado. Uno de los muchos ejemplos de dicho ensayo se describe en el documento EP 0 593 112 B1. Si bien estos tipos de ensayos en general son más rápidos que los ensayos de inhibición microbiana, incluso requieren el manipuleo extenso del usuario final y por lo tanto no son prácticos.

En vista de lo antedicho, está claro que existe un espacio importante para mejorar en el ámbito de los ensayos de antibióticos, particularmente en lo que respecta a facilidad de uso, velocidad y practicidad.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es una vista lateral de una realización del dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente invención. El dispositivo de ensayo comprende un soporte sólido (e) que comprende una región receptora de una muestra (a), una región de detección (b), una región absorbente (c) y una región de manipuleo (d).

Descripción de la invención

Existe una amplia gama de aplicaciones para los métodos, dispositivos de ensayo y kits de acuerdo con la presente invención en todo el campo de diagnóstico y análisis. Se pueden utilizar para detectar cualquier tipo de analito en una muestra, incluidos antibióticos, carbohidratos, sustancias dietarias, microorganismos, (poli)nucleótidos, (poli)péptidos, esteroides, hormonas, toxinas, (agro)químicos como fungicidas, herbicidas y pesticidas, vitamina, fármacos, metabolitos, receptores, anticuerpos, alérgenos, etc. En una realización preferida, los métodos, dispositivos de ensayo y kits de acuerdo con la presente invención se usan para detectar antibióticos en una muestra.

El término 'antibiótico' tal como se emplea en la presente memoria se refiere a una o más sustancias o constituyentes químicos (o metabolitos de dichas sustancias o compuestos químicos) de una muestra que exhibe actividad contra bacterias. En una realización de la invención, el antibiótico que se ha de detectar por el método, dispositivo de ensayo y/o kit según la presente invención se selecciona del grupo que consiste en la familia de antibióticos beta-lactama, la familia de antibióticos de tetraciclina, la familia de antibióticos de sulfonamida, la familia de antibióticos de aminoglucósido y la familia de antibióticos de quinolona. En una realización preferida de la invención, el antibiótico que se ha de detectar por el método, el dispositivo de ensayo y/o el kit según la presente invención es un antibiótico de beta-lactama. La expresión 'antibiótico de beta-lactama' se refiere a compuestos (o sus metabolitos) que comprenden una subestructura de beta-lactama dentro de su estructura química y exhiben actividad antibacteriana. Dos subclases importantes de antibióticos de beta-lactama son los antibióticos derivados de cefalosporina y los antibióticos derivados de penicilina. Los ejemplos de antibióticos derivados de cefalosporina son cefaclor, cefadroxil, ceftiofur, cefalexina, cefapirina y cefradina. Los ejemplos de antibióticos derivados de penicilina son amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V y ticarcilina.

La presente invención se refiere a un método para detectar un antibiótico en una muestra, en donde dicho método comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una muestra de líquido con una proteína de unión a antibióticos etiquetada y un reactivo control etiquetado para formar una composición líquida,
- b) proporcionar un dispositivo de ensayo que tiene un extremo proximal y un extremo distal, en donde dicho dispositivo de ensayo está configurado para permitir el flujo lateral desde el extremo proximal al distal, en donde dicho dispositivo de ensayo comprende un soporte sólido que comprende las siguientes regiones en secuencia desde el extremo proximal al distal:
- i. una región receptora de la muestra,
 - ii. una región de detección, en donde dicha región de detección comprende por lo menos dos zonas:
 - A. una zona de detección que comprende un antibiótico inmovilizado capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos etiquetada cuando dicha proteína de unión a antibióticos etiquetada no está unida por el antibiótico de la muestra, y
 - B. una zona control que comprende un agente de unión inmovilizado capaz de unirse al reactivo control etiquetado,
 - iii. una región absorbente, y
 - iv. opcionalmente, una región de manipuleo,
- c) poner en contacto la composición líquida con la región receptora de la muestra del dispositivo de ensayo,
- d) permitir que la composición líquida se desplace desde la región receptora de la muestra por la región de detección hacia la región absorbente, como para permitir que la composición líquida que comprende la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se ponga en contacto con la zona de detección y la zona de control,
- e) detectar una señal en la zona de detección y una señal en la zona de control, en donde
- i. la ausencia de antibiótico en la muestra se indica con la presencia de una señal en la zona de detección que es más intensa que la señal en la zona de control, y
 - ii. la presencia de antibiótico en la muestra se indica con la ausencia de una señal en la zona de detección o la presencia de una señal en la zona de detección que es menos intensa que la señal en la zona de control.
- En una primera etapa, la muestra se pone en contacto con por lo menos una proteína de unión a antibióticos etiquetada y por lo menos un reactivo control etiquetado. En una realización, la muestra se pone en contacto con más de una proteína de unión a antibióticos etiquetada y/o más de un reactivo control etiquetado. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado pueden estar presentes en forma líquida o sólida antes de ponerse en contacto con la muestra. Ambos agentes pueden estar en forma líquida, o ambos agentes pueden estar en forma sólida, o un agente puede estar en forma sólida y el otro agente puede estar en forma líquida. Preferiblemente, ambos agentes están presentes en forma sólida, preferiblemente en forma de polvo. La forma sólida se puede preparar secando o liofilizando los compuestos. El polvo se puede resuspender en la muestra. Si es necesario, la composición líquida obtenida se puede mezclar (aplicando vórtices) para mejorar y/o acelerar la resuspensión del polvo en la muestra. Si se desea, se pueden añadir compuestos que facilitan la resuspensión y/o disolución y/o mezclado de la proteína de unión a antibióticos etiquetada, el reactivo control etiquetado y la muestra. En una realización preferida, estos compuestos están presentes con la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado antes de ponerse en contacto con la muestra. Preferiblemente, estos compuestos también están en forma sólida, p. ej., en forma de polvo. Los compuestos adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, un tampón, p. ej., un tampón orgánico tal como un tampón Tris, un tensioactivo tal como Triton X-100, una proteína tal como albúmina de suero bovino, un poliol tal como glicerina y un azúcar, p. ej., un disacárido tal como sacarosa. En una realización, la cantidad de la muestra líquida añadida a la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado oscila entre 50 y 1000 µl, preferiblemente entre 75 y 7500 µl, más preferiblemente entre 100 y 500 µl, en particular entre 125 y 250 µl. Después de poner en contacto la muestra con por lo menos una proteína de unión a antibióticos etiquetada y por lo menos un reactivo control etiquetado, la composición líquida obtenida se puede agitar. La agitación en general se realiza durante 1 a 20 segundos, preferiblemente 5 a 15 segundos, prefiriéndose aproximadamente 10 segundos.
- En una realización la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado están presentes en un recipiente. Preferiblemente, los compuestos antes mencionados también están presentes en el recipiente. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado pueden estar presentes en diferentes recipientes, pero preferiblemente están presentes en el mismo recipiente. Los recipientes que se pueden utilizar en la presente invención pueden ser tubos de cualquier forma y tamaño y de cualquier material adecuado disponible. Los recipientes pueden además ser los pocillos tales como aquellos incorporados en placas de microtitulación. En una realización preferida, el recipiente comprende la proteína de unión a antibióticos etiquetada, el reactivo control etiquetado, un tampón tal como p. ej., un tampón orgánico como tampón Tris, un tensioactivo tal como Triton X-100

(preferiblemente en una concentración entre 0 y 0,1% p/v), una proteína tal como albúmina de suero bovino, un poliol tal como glicerina y un azúcar, p. ej., un disacárido tal como sacarosa.

Alternativamente, la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado son parte del dispositivo de ensayo, por ejemplo pueden estar presentes en forma líquida o sólida en la región receptora de la muestra o en una región separada ubicada delante de la región receptora de la muestra o entre la región receptora de la muestra y la región de detección. En esta realización, más que añadir un volumen pre-medido al recipiente, el dispositivo de ensayo podría disponerse para ser sumergido en la muestra de fluido para absorber la cantidad seleccionada de muestra.

En una realización, la muestra podría ser sólida y líquida y comprender el antibiótico(s) que debe extraerse de la muestra. Los métodos para extraer líquidos de muestras dependen del tipo de muestra. El experto en la técnica conoce los métodos de extracción adecuados para los distintos tipos de muestras e incluyen desintegración de la muestra sólida por homogeneización, agitación en vórtex con perlas, trituración o sonicación y/o extracción de disolvente. En una realización preferida, la muestra se pone en contacto con la proteína de unión a antibióticos etiquetada, y el reactivo control etiquetado es líquido. En una realización de la invención, la muestra deriva de un líquido corporal, un órgano, carne o huevos. Los antibióticos podrían también estar presentes en productos alimentarios en donde estos productos animales se añaden como ingrediente. Los ejemplos de productos alimentarios son leche; miel; carne vacuna, de cerdo, aves y pescados; mariscos tales como camarones; carnes procesadas tales como salchichas; comidas listas para servir; pienso; y alimento para bebés. Los antibióticos también podrían estar presentes en líquidos corporales o tejidos animales, que son adecuados para examen de autoridades de inspección de alimentos, por ejemplo. Los ejemplos son sangre, tejido hepático, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido renal o pre-orina que se obtiene del riñón y la orina. La orina y la sangre son adecuadas para examinar antes de la matanza de un animal. Los antibióticos también pueden estar presentes en agua tal como agua de desecho. En una realización preferida, la muestra es leche. La leche se puede obtener de ganado (p. ej., vacas), caballos, ovejas, cabras, yaks, búfalo de agua, seres humanos, burros, renos, bisontes y camellos. Los antibióticos también pueden estar presentes en alimentos semiprocados o procesados como productos pasteurizados, productos UHT, leche desnatada o parcialmente desnatada, suero, queso fresco o estacionado, yogur, crema, mantequilla, crema ácida, suero de mantequilla, etc.

En una realización, la composición líquida (es decir, la composición líquida obtenida en la etapa a) se incuba durante 30 segundos a 5 minutos, preferiblemente 45 segundos a 4 minutos, más preferiblemente 50 segundos a 3 minutos, lo más preferiblemente 55 segundos a 2,5 minutos y en particular 1 a 2 minutos antes de que la composición líquida se ponga en contacto con el dispositivo de ensayo. La composición líquida se incuba a temperatura entre 40 y 70°C, preferiblemente una temperatura entre 50 y 65°C, más preferiblemente una temperatura entre 60 y 64°C. En una realización, la composición líquida obtenida en la etapa a se incuba después de agitar. En otra realización, la agitación se realiza después de incubar la composición líquida obtenida en la etapa a. Incluso en otra realización, la agitación se realiza antes y después de la incubación. El tiempo de agitación antes y después de la incubación puede ser igual, pero también puede diferir.

En una realización preferida, la incubación continúa después de que la composición líquida se pone en contacto con el dispositivo de ensayo. En una realización, el dispositivo de ensayo se pone en contacto con la composición líquida durante 1 a 5 minutos, preferiblemente 1,5 a 4 minutos, más preferiblemente 2 a 3 minutos a una temperatura de 40 a 70°C, preferiblemente a una temperatura entre 50 y 65°C, más preferiblemente una temperatura entre 60 y 64°C. La incubación se puede realizar con la ayuda de un dispositivo termostático tal como en un baño de agua o una incubadora. En una realización preferida, la temperatura antes y después de poner en contacto la composición líquida con el dispositivo de ensayo es idéntica. La incubación puede cesar ni bien se detecta una señal en la zona de detección y/o la zona de control.

La proteína de unión a antibióticos etiquetada puede ser cualquier proteína capaz de unirse al antibiótico que se ha de detectar. La proteína de unión se puede unir a una familia de antibióticos que tiene sitios de unión estructurales similares. Las proteínas de unión adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, anticuerpos (monoclonales, policlonales o recombinantes), fragmentos de anticuerpos, enzimas, aptámeros y receptores tales como la proteína de unión a penicilina. Preferiblemente, la proteína de unión a antibióticos es una proteína obtenida de un microorganismo. En una realización, el microorganismo es un microorganismo sensible a los antibióticos. En una realización de la invención, el organismo se selecciona del grupo que consiste en una especie de *Bacillus*, una especie de *Escherichia* y una especie de *Streptococcus*. En una realización preferida de la invención, el organismo es termófilo. Los ejemplos son *Bacillus stearothermophilus* o *Streptococcus thermophilus*, en donde se prefiere *Bacillus stearothermophilus*.

Las etiquetas de la proteína de unión a antibióticos y el reactivo control pueden ser diferentes, pero en una realización preferida son idénticas. Se pueden usar etiquetas visibles y no visibles. Las etiquetas adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, compuestos fluorescentes, compuestos cromogénicos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos radiactivos, compuestos colorimétricos, compuestos magnéticos (p. ej., esferas o partículas), enzimas, compuestos catalíticos, sustratos, vesículas con etiquetas y partículas tales como partículas de tinte, partículas de látex coloreadas, partículas de carbono, partículas metálicas, partículas no metálicas, partículas metálicas coloidales. En una realización preferida las etiquetas son etiquetas visibles en donde se prefieren las

partículas metálicas coloidales y las partículas de oro, p. ej., en donde las más preferidas son las partículas de oro coloidales. La etiqueta puede estar unida a la proteína de unión a antibióticos y/o al reactivo de control a través de cualquier medio adecuado, incluida conjugación, unión covalente o unión no covalente. La etiqueta puede estar directamente unida a la proteína de unión a antibióticos y/o al reactivo control, o la etiqueta puede estar unida a través de un conjugado tal como un conjugado biotina-estreptavidina o un conjugado biotina-avidina

En una realización, el reactivo control es incapaz de unirse al antibiótico en la muestra. En una realización, el agente control forma un par de unión específico con el agente de unión inmovilizado en la zona de control de la región de detección del dispositivo de ensayo. La expresión 'par de unión específico', tal como se emplea en esta memoria, se refiere a dos sustancias que se unen específicamente entre sí.

En una realización, el dispositivo de ensayo es una tira reactiva. En vista de los pequeños volúmenes de la muestra de líquido añadida a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, se recomienda que el dispositivo de ensayo se disponga de manera tal que descansa en el ángulo entre la parte inferior y la pared.

En el método de la presente invención, cuando la densidad de la etiqueta (es decir, la señal) en la zona de detección es mayor que en la zona de control, la muestra no contiene antibiótico, contiene antibiótico en una concentración inferior a un umbral determinado (en otros términos, el antibiótico no está presente en una cantidad suficiente y el ensayo se considera 'negativo'). Por lo tanto, cuando en la presente solicitud se hace referencia a "ausencia de antibiótico en la muestra", se entiende que la muestra no contiene antibiótico o contiene antibiótico en una concentración inferior a un umbral determinado. No obstante, cuando la densidad de la etiqueta en la zona de detección es menor que la densidad de la etiqueta en la zona de control, el antibiótico está presente en la muestra a una concentración encima de un umbral determinado (en otras palabras, el antibiótico está presente en una cantidad en exceso de los niveles permisibles y el ensayo se considera 'positivo'). Por lo tanto, cuando en la presente solicitud se hace referencia a "la presencia de antibiótico en la muestra", se entiende que la muestra contiene antibiótico en una concentración encima de un umbral determinado. Cuando la densidad de la etiqueta (es decir, la señal) en la zona de detección es igual de intensa que la densidad de la etiqueta (es decir, la señal) en la zona de control, el antibiótico está presente en la muestra a una concentración por encima, al mismo nivel o debajo de un umbral determinado. Esto depende del umbral seleccionado. 'Umbral', tal como se emplea en este documento, se refiere al valor de concentración encima del cual un antibiótico determinado se considerará presente y debajo del cual dicho antibiótico se considerará ausente. En general, las autoridades locales, regionales o inter-regionales asignan un valor umbral para antibióticos particulares en muestras particulares, pero también puede estar predeterminado para ciertos propósitos de investigación. Las señales se pueden detectar visualmente a ojo, pero también mediante un dispositivo de lectura de señales tal como, p. ej., un espectrofotómetro, un lector de reflectancia, un fluorímetro, una cámara, un detector magnético, un contador de centelleos, etc.

La intensidad de la etiqueta detectable en la zona de detección se puede medir para determinar el resultado del método de la presente invención. El método de la presente invención puede proveer un resultado positivo o negativo (es decir, antibiótico presente o ausente) o se puede determinar la presencia o ausencia de un antibiótico por encima o debajo de un valor umbral determinado (que es de hecho un resultado positivo o negativo). La intensidad de la señal se puede relacionar inversamente con la concentración de antibiótico en la muestra. Asimismo, la intensidad de la señal en la zona de detección se puede comparar con la intensidad de la señal en la zona de control para determinar un resultado del método de la presente invención. La diferencia entre las intensidades de las distintas zonas puede incluso analizarse mediante un dispositivo de lectura de señales y usarse para calcular la concentración de antibiótico en la muestra, por ejemplo comparando el resultado con un valor predeterminado.

La descripción se refiere además a un dispositivo de ensayo para detectar un antibiótico en una muestra, en donde dicho dispositivo de ensayo tiene un extremo proximal y distal, dicho dispositivo de ensayo está configurado para permitir el flujo lateral de una composición líquida que comprende una muestra de líquido, una proteína de unión a antibióticos etiquetada y un reactivo control etiquetado del extremo proximal al distal, en donde dicho dispositivo comprende un soporte sólido que comprende las siguientes regiones en secuencia desde el extremo proximal al distal:

- una región receptora de la muestra,
- una región de detección, en donde dicha región de detección comprende por lo menos dos zonas:
 - i. una región de detección que comprende un antibiótico inmovilizado capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, cuando dicha proteína de unión a antibióticos no está unida por el antibiótico de la muestra, y
 - ii. una zona de control que comprende un agente de unión inmovilizado capaz de unirse al reactivo control etiquetado,
 - una región absorbente, y
 - opcionalmente, una región de manipuleo.

"Soporte sólido", tal como se emplea en este documento, se refiere a material que se usa para proporcionar soporte para las distintas regiones del dispositivo de ensayo. Cuando se usa para un dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente descripción, un soporte sólido usualmente está hecho de material que es inerte con respecto a la aplicación para la cual se va a utilizar el dispositivo de ensayo. Los materiales adecuados son vidrio, metales y distintos tipos de plásticos tales como por ejemplo poliestireno. El soporte sólido puede tener un espesor entre 0,1 y 1 mm. En una realización, el dispositivo de ensayo se puede alojar dentro de una cubierta no absorbente o laminada. En otros términos, el dispositivo de ensayo incluye una carcasa que define una cavidad estirada para recibir y albergar el dispositivo de ensayo. El experto en la técnica conoce las carcasas adecuadas.

La sujeción de las regiones al apoyo se puede llevar a cabo siguiendo técnicas conocidas tales como encolado, termocompresión y similares.

Los dispositivos de ensayo de la presente invención usualmente tienen una longitud que oscila entre 10 y 200 mm, preferiblemente entre 20 y 150 mm, más preferiblemente entre 30 y 100 mm, y en particular entre 50 y 75 mm, un ancho que oscila entre 1 y 20 mm, preferiblemente entre 2 y 15 mm, más preferiblemente entre 3 y 10 mm, y un espesor que oscila entre 0,05 y 2 mm, preferiblemente entre 0,075 y 1,5 mm, más preferiblemente entre 0,1 y 1 mm.

Los dispositivos de ensayo de la presente invención tienen una semivida de por lo menos 6 meses, preferiblemente de por lo menos 9 meses cuando se almacenan a 4°C. En otra realización, los dispositivos de ensayo de la presente invención tienen una semivida de hasta 10 días, preferiblemente hasta 20 días y más preferiblemente hasta 28 días cuando se almacenan a -20°C. Incluso en otra realización, los dispositivos de ensayo de la presente invención tienen una semivida de hasta 1 día, preferiblemente hasta 4 días y más preferiblemente hasta 7 días cuando se almacenan a 30°C. "Semivida", tal como se emplea en esta memoria, significa que la sensibilidad del dispositivo de ensayo almacenado no se reduce. Por consiguiente, la sensibilidad de un dispositivo de ensayo almacenado es igual a la sensibilidad de un dispositivo de ensayo recién preparado.

En una realización, el dispositivo de ensayo se puede almacenar a una temperatura entre -20°C y 30°C. Preferiblemente, el dispositivo de ensayo se almacena a una temperatura entre 4°C y 8°C.

'Región receptora de la muestra', tal como se emplea en este documento, se refiere a la porción del dispositivo de ensayo que se pone en contacto directo con la composición líquida. En otros términos, la región receptora de la muestra es la porción del dispositivo de ensayo que se pone en contacto directo con la muestra de líquido después de que la muestra de líquido se ha puesto en contacto con la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado. Si se desea, la región receptora de la muestra puede comprender un reactivo de etiquetado capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos y/o al reactivo control, particularmente en el caso en que la proteína de unión a antibióticos y/o el reactivo control estén presentes en forma no etiquetada cuando estén en contacto con la muestra de líquido. La sección receptora de la muestra está hecha de material poroso. En una realización preferida, la región receptora de la muestra está hecha de un material que tiene un tamaño de poro de 3-8 µm. Preferiblemente, la región receptora de la muestra es una membrana de fibra de vidrio unida a alcohol polivinílico tal como una membrana VF2.

'Región de detección', tal como se usa en la presente invención, se refiere a la porción del dispositivo de ensayo que está en contacto de flujo lateral con la región receptora de la muestra y la región absorbente. El contacto puede ser una conexión de extremo a extremo, pero preferiblemente hay una superposición entre la región de detección y la región receptora de la muestra y entre la región de detección y la región absorbente. La superposición puede estar entre 1 y 2 mm. La región de detección está hecha de material poroso. Preferiblemente, la región de detección es una membrana HF90. La región de detección usualmente comprende una o más zonas, por ejemplo, una zona de detección para detectar la presencia o ausencia del antibiótico y una zona de control que funciona como sitio de control. La región de detección puede también tener dos o más zonas de detección y/o dos o más zonas de control. Las zonas de detección pueden tener la misma funcionalidad o pueden tener funcionalidades diferentes (es decir, los reactivos de captura en diferentes zonas de detección pueden ser capaces de unirse al mismo compuesto o pueden ser capaces de unirse a compuestos distintos). Lo mismo rige para las zonas de control. Una o más de las zonas pueden estar hechas de un material poroso distinto de aquel de la región de detección. Las zonas separadas pueden estar hechas de un material poroso diferente. Preferiblemente, están hechas, no obstante, del mismo material. Preferiblemente, la zona o zonas están hechas del mismo material que la región de detección. Cuando la composición líquida se desplaza por la región de detección, puede ponerse en contacto primero con la zona de detección y luego ponerse en contacto con la zona de control o viceversa. En caso de que la región de detección tenga varias zonas de detección y/o zonas de control, se puede proporcionar cualquier zona y/o zona de control, cualquier secuencia de zonas. Las zonas pueden tener una diversidad de configuraciones, incluidas líneas, puntos u otras configuraciones. En una realización preferida, las zonas son líneas.

'Flujo lateral', tal como se emplea en este documento, se refiere a flujo líquido de una muestra en un material en el que todos los componentes disueltos y/o dispersados de la muestra se transportan esencialmente a velocidades iguales y con flujo relativamente intacto lateralmente por el material.

La zona de detección y la zona de control pueden comprender cada una por lo menos un reactivo de captura. Preferiblemente, la zona de detección y la zona de control se preparan aplicando el reactivo de captura apropiado o

la mezcla de reactivos de captura a la región de detección, o bien mediante enlaces covalentes u otros procedimientos de ligadura. 'Reactivo de captura', tal como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier reactivo que se pueda utilizar para crear la funcionalidad requerida en la zona de detección y/o control. La aplicación del reactivo de captura a la región de detección se puede preparar por cualquier método conocido como pulverización, dispensación, pintura, dibujo, impresión, rayado y similares. Las zonas son capaces de generar una señal, por ejemplo una señal de color visual, tras la presencia o ausencia del complejo entre el reactivo de captura y la pareja de unión.

Un reactivo de captura puede ser cualquier compuesto natural o no natural. Los ejemplos de reactivos de captura adecuados son antibióticos, anticuerpos, antígenos, ligandos, proteínas, etc. En una realización preferida, el reactivo de captura en la zona de detección del dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente invención es un antibiótico o un análogo de este. En una realización preferida, el antibiótico se inmoviliza en la zona de detección a una concentración de 1-3 mg/mm. Preferiblemente, el antibiótico está presente en un tampón Tris cuando se inmoviliza a la zona de detección. Los ejemplos de antibióticos adecuados o análogos de estos son antibióticos de beta-lactama, p. ej., cefalosporinas tales como por ejemplo ácido 7-amino-cefalosporánico (7ACA). Preferiblemente, el antibiótico se inmoviliza en el dispositivo de ensayo y es capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos etiquetada cuando dicha proteína de unión a antibióticos etiquetada no está unida por el antibiótico de la muestra. Cuando la proteína de unión a antibióticos etiquetada está unida por el antibiótico de la muestra, el antibiótico inmovilizado no es capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos etiquetada.

En una realización preferida, el reactivo de captura en la zona de control del dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente invención es miembro de un par de unión, p. ej., un par de unión específico tal como un par antígeno/anticuerpo. No obstante, puede ser también una proteína de unión a anticuerpos tal como p. ej., la proteína A. El agente de captura puede estar presente en una disolución que comprende una proteína adicional, p. ej., albúmina de suero bovino, un azúcar, p. ej., un disacárido tal como sacarosa y una sal tal como NaCl cuando se aplica a la zona de control. En una realización preferida, el agente de captura en la zona de control es incapaz de unirse al antibiótico en la muestra y/o a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, más allá de si la proteína se une al antibiótico o no.

La inmovilización del reactivo de captura a la región de detección se puede llevar a cabo en un modo conocido per se, por ejemplo por adsorción covalente o no covalente a la región de detección. El reactivo de captura puede también conjugarse en forma covalente a la región de detección a través de un vehículo tal como por ejemplo albúmina de suero bovino (BSA). Opcionalmente, el reactivo de captura se puede acoplar al vehículo mediante un espaciador. Muchos compuestos bifuncionales son adecuados como espaciadores. Podrían aplicarse todos los métodos disponibles para construir enlaces, p. ej., técnicas de acoplamiento, por ejemplo aquellas conocidas a partir de la química de péptidos, a menos que sea perjudicial para el reactivo de captura. El experto en la materia conoce los espaciadores, vehículos y técnicas de acoplamiento adecuados.

La zona de control produce una señal más allá de si está presente o no un antibiótico en la muestra y produce un indicio de que el dispositivo de ensayo funciona como es necesario. La zona de control proporciona una señal consistente que no varía con la concentración de antibiótico en la muestra. La zona de control se puede usar también para informar al usuario de que la composición líquida ha fluido por el dispositivo de ensayo. En ese sentido, la zona de control se puede usar como control de flujo. Asimismo, la zona de control se puede usar para comparación con la zona de detección.

'Región absorbente', tal como se emplea en este documento, se refiere a la parte del dispositivo de ensayo, que está en contacto de flujo lateral con la región de detección y funciona para promover el flujo lateral por la región de detección y es capaz de absorber el exceso de muestra de líquido. El contacto puede ser en una conexión de extremo a extremo, pero preferiblemente es una superposición entre la región de detección y la región absorbente. La superposición puede tener entre 1 y 2 mm. La región absorbente puede estar hecha de material poroso. En una realización preferida, la región absorbente tiene por lo menos 1 cm.

'Región de manipuleo', tal como se emplea en esta memoria, se refiere a una región del dispositivo de ensayo que se puede usar para sostener y manipular el dispositivo de ensayo sin interferir con el resultado del ensayo. La región de manipuleo puede ser una región separada conectada al soporte sólido, pero la región de manipuleo también puede ser parte del soporte sólido propiamente dicho. La región de manipuleo y la región absorbente pueden además combinarse en una misma región, si se desea.

Incluso en otra realización de la presente invención, el dispositivo de ensayo comprende un miembro que cubre una o más de la región receptora de la muestra, la región de detección y la región absorbente. Dicho miembro, que puede estar hecho de cualquier material, preferiblemente un material plástico transparente, ventajosamente brinda protección a dichas regiones con respecto a huellas dactilares y/o destrucción mecánica y/o gases, y similares. Una o más regiones pueden estar cubiertas con un solo miembro, no obstante también se pueden usar múltiples miembros opcionalmente de distintos materiales.

'Material poroso', tal como se emplea en este documento, se refiere a cualquier material capaz de proporcionar flujo lateral. Los ejemplos de materiales porosos adecuados son materiales poliméricos tales como polivinilo o poliéster,

algodón, fibra de vidrio, nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con materiales poliméricos, nylon, papel, rayón y similares.

En una realización, el dispositivo de ensayo comprende una región de detección que es más larga que la región absorbente, una región absorbente que es más larga que la región de manipuleo, y una región de manipuleo que es más larga que la región receptora de la muestra.

Los dispositivos de ensayo de acuerdo con la presente invención se fabrican con métodos conocidos en la técnica. Los soportes sólidos pueden tener la forma de tarjetas. Se pueden preparar, por ejemplo, usando laminadores existentes en el mercado. Las tarjetas pueden estar laminadas. Se pueden conectar distintas regiones a las tarjetas. Los reactivos de captura utilizados se depositan en la región de detección en la forma de disoluciones, antes o después de unir las tarjetas. Estas disoluciones se pueden depositar muy precisamente usando aparatos comercialmente disponibles tales como dispensadores de BioDot, Inc. Antes y/o después de la aplicación de la zona de detección y/o control, la región de detección se puede bloquear por ejemplo por pulverización de una disolución bloqueante. Las disoluciones bloqueantes preferidas comprenden un tampón, p. ej., un tampón orgánico tal como tampón Tris, un tensioactivo, p. ej., Tween tal como Tween-20, y una proteína, tal como albúmina de suero bovino. Preferiblemente, la disolución bloqueante no se pulveriza directamente en la zona de detección y/o la zona de control. Las disoluciones depositadas se pueden evaporar inmediatamente, por ejemplo, disponiendo la tarjeta debajo de una corriente de aire caliente. Después de que se han aplicado todas las regiones y zonas, las tarjetas preferiblemente se secan en una atmósfera seca, es decir, una atmósfera que tiene una humedad relativa de < 50%, < 40%, < 30%, < 20%, < 10%, preferiblemente 0%. Para producción a gran escala, es también posible preparar rollos. Posteriormente, las tarjetas y los rollos que portan los reactivos de captura deseados se pueden cortar en tiras, cada una de estas tiras constituye un dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención. Alternativamente, los reactivos de captura también se pueden depositar en la región de detección antes de la unión de las tarjetas o los rollos, simplemente sumergiendo la región de detección en una disolución que contiene los reactivos de captura.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende una proteína de unión a antibióticos, un reactivo control etiquetado y un dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente invención. El dispositivo de ensayo preferiblemente se almacena en un envase que comprende un secante. Preferiblemente, la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado están presentes en un recipiente, preferiblemente un recipiente individual. Preferiblemente, el kit comprende más de un recipiente y más de un dispositivo de ensayo, p. ej., 10, 20, 30, 40, 50 o incluso 100 recipientes y/o dispositivos de ensayo. El kit según la presente invención puede además comprender un dispositivo de muestreo. Este es un dispositivo con la ayuda del cual la muestra, p. ej., muestra de líquido, se puede añadir a la proteína de unión a antibióticos etiquetada y al reactivo control etiquetado. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitarse a ello, un recipiente (opcionalmente con marcas de volumen), una jeringa, una pipeta o un sistema de pipetas automático. Dicha jeringa o pipeta se puede diseñar en un modo tal como para que con solamente uno modo de operación se pueda extraer un volumen predeterminado de muestra de líquido a analizar. Opcionalmente, se pueden aplicar sistemas conocidos en la técnica con los cuales se puede operar más de una jeringa o pipeta con un solo manipuleo. En ese caso, el kit comprende un dispositivo de muestreo tal como una pipeta, y puede además comprender puntas de pipeta. Preferiblemente, la cantidad de puntas de pipeta es igual a la cantidad de recipientes (es decir, los recipientes en los cuales están presentes la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado) y los dispositivos de ensayo. De esta forma, con solamente una pipeta se pueden aplicar distintas muestras a distintos recipientes. En tal caso, el kit comprende pipetas desechables como dispositivo de muestreo, la cantidad de pipetas desechables es igual a la cantidad de recipientes (es decir, los recipientes en donde están presentes la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado) y los dispositivos de ensayo.

Opcionalmente, el kit puede además comprender un prospecto con instrucciones de uso y/o medios para establecer el tiempo necesario para la incubación. Opcionalmente, el kit comprende además un dispositivo termostático tal como una incubadora o un baño de agua, con la ayuda de lo cual las muestras se mantienen a una temperatura pre-establecida, como la temperatura a la cual deben incubarse la muestra de líquido, la proteína de unión a antibióticos etiquetada, el reactivo control etiquetado y opcionalmente el dispositivo de ensayo. Preferiblemente, dicho dispositivo termostático está diseñado en un modo tal como para mantener los recipientes llenos con la proteína de unión a antibióticos etiquetada, el reactivo control etiquetado, la muestra de líquido y opcionalmente el dispositivo de ensayo. Opcionalmente, el dispositivo termostático se acopla a un medio para establecer el tiempo necesario de incubación de modo tal de que el calor cese después de un periodo de tiempo pre-establecido. Opcionalmente, el kit puede además comprender un dispositivo de lectura de muestras, un vehículo de datos cargado con un programa de ordenador adecuado para instruir a un ordenador a analizar datos digitales obtenidos del dispositivo de lectura de placas.

Las realizaciones y funciones descritas anteriormente para el método de la presente invención también se refieren al dispositivo de ensayo y el kit de acuerdo con la presente invención. Las realizaciones y funciones descritas anteriormente para el dispositivo de ensayo de la presente invención también se refieren al método y kit de acuerdo con la presente invención. Las realizaciones y funciones descritas anteriormente para el kit de la presente invención también se refieren al dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación del dispositivo de ensayo

5 Se usó una membrana de nitrocelulosa HF90 (Millipore; longitud 25 mm) como región de detección. La membrana se adhirió a una tarjeta laminada de poliestireno (0,254 mm de espesor) 8 mm desde el extremo proximal de la tarjeta. Luego se aplicaron la zona de detección y la zona de control a la membrana de nitrocelulosa. La zona de detección se aplicó dispensando 1 mg/ml de un conjugado de 7ACA-espaciador-BSA en tampón KPO_4 -20 mM (pH 7,5) con una estación de trabajo Biodot Dispense XYZ 3050 con línea frontal a 0,2 $\mu\text{l}/\text{cm}$. La zona de control se aplicó dispensando 0,15 mg/ml de un anticuerpo anti-IgY en tampón KPO_4 20 mM (pH 7,5) que comprendía 0,675 mg/ml BSA, 5% p/v sacarosa y NaCl 20 mM con una estación de trabajo Biodot Dispense XYZ 3050 con línea frontal a 0,8 $\mu\text{l}/\text{cm}$. Después de secar las zonas, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó pulverizando una disolución que comprendía tampón Tris 10 mM (pH 8) que comprendía 2% p/v BSA y 0,05% p/v Tween-20 usando una estación de trabajo Biodot Dispense XYZ 3050 con chorro de aire 3x. La disolución se pulverizó en la membrana a una distancia de 2 mm debajo de la zona de detección. De allí en más, la región receptora de la muestra (membrana VF2 de Millipore; longitud 1 cm) se adhirió al extremo proximal de la tarjeta superponiendo 2 mm con la membrana de nitrocelulosa. La región absorbente (membrana 10038 de Millipore; longitud 20 mm) se adhirió al extremo distal de la tarjeta con una superposición de 2 mm en la membrana de nitrocelulosa. Las tarjetas obtenidas se secaron a 37°C en una atmósfera de secado (0% humedad relativa). La tarjeta se cortó en tiras de 5,2 mm de ancho y se mantuvo en una atmósfera seca (0% humedad relativa).

20 Ejemplo 2

Preparación de la proteína de unión a antibióticos etiquetada y del reactivo control etiquetado

25 Se sintetizaron partículas de oro recubiertas con estreptavidina sometiendo a reacción oro coloidal (40 nm de diámetro; 1 OD/ml) con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptavidina. Después, la disolución obtenida se concentró por filtración de flujo tangencial, se lavó y se conservó en un tampón Tris (pH 8) que incluía NaCN. Se biotiniló la proteína de unión a penicilina purificada de *Bacillus stearothermophilus* (1:4) con D-biotinil-epsilon-ácido aminocaproico-N-hidroxisuccinimida éster. Luego se sintetizó el conjugado de proteína de unión a penicilina-oro sometiendo a reacción 1,5 μg de proteína de unión a penicilina biotinilada con 1 OD partículas de oro cubiertas con estreptavidina durante 1 hora, seguido de centrifugación a 10.000 xg durante 5 minutos y resuspensión del sedimento obtenido en tampón de bicarbonato 45 mM que comprendía 0,1% p/v Triton X-100 (pH 9,6).

30 Se sintetizaron partículas de oro recubiertas con IgY sometiendo a reacción oro coloidal (40 nm de diámetro; 1 OD/ml con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgY. Después, la disolución obtenida se centrifugó a 7.500xg durante 10 minutos y el sedimento obtenido se resuspendió en tampón Tris (pH 8), se lavó con otra tanda de centrifugación y se resuspendió el sedimento obtenido en un tampón Tris (pH 8) y se conservó en un tampón Tris (pH 8) que incluía NaCN.

35 De allí en más, se solubilizaron 140-200 mOD del conjugado de proteína de unión a penicilina-oro y 5-20 mOD del conjugado IgY-oro en 100 μl de tampón (tampón Tris 80 mM que comprendía 0,01% p/v Triton-X-100, 0,4% p/v BSA, 5% v/v glicerina y 2% p/v sacarosa (pH 8,5)) y 0,75 μl de la disolución se dispensó por tubo y se secó durante 12 horas a 40°C. Los tubos obtenidos se sellaron.

Ejemplo 3

Detección de antibióticos con el dispositivo de ensayo

40 Se añadieron 150 μl de leche con antibiótico por tubo que contenía los conjugados secos. La concentración de penicilina G en la leche añadida varió de 0 a 4 ng/g (tubo 1: 0 ng/g; tubo 1: 1 ng/g; tubo 2: 2 ng/g; tubo 3: 3 ng/g; y tubo 4: 4 ng/g). La composición líquida obtenida se incubó durante 2 minutos a 64°C en una incubadora. Se dispuso un dispositivo de ensayo en el tubo y se incubó durante 3 minutos a 64°C en la incubadora. El resultado se leyó a simple vista.

45 Los resultados se exponen en la Tabla 1. Los resultados demuestran que la intensidad de la zona de control permaneció estable para cualquier concentración de penicilina G en la leche. La señal de la zona de detección fue claramente menos intensa cuando la concentración de penicilina G en la leche fue de 2 ng/g o más. A concentraciones de 0 ng/g y 1 ng/g la intensidad de la zona de detección fue claramente superior que la intensidad de la zona de control. A concentraciones de 2 ng/g y 3 ng/g, la intensidad de la señal de la zona de detección fue similar a la intensidad de la señal de la zona de control. A una concentración de 4 ng/g, la intensidad de la zona de detección fue significativamente inferior que la intensidad de la zona de control.

Ejemplo 4

Influencia de la temperatura de incubación sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describió en el Ejemplo 1 con la salvedad que los dispositivos de ensayo no contenían una zona de control. La proteína de unión a antibióticos etiquetada se preparó como se describe en el Ejemplo 2.

5 En un primer experimento, la proteína de unión a antibióticos etiquetada se diluyó en 200 µl de leche natural (25 nM concentración final) y se incubó a 64°C durante 5 minutos. En un segundo experimento, la proteína de unión a antibióticos etiquetada se diluyó en 200 µl de leche natural (concentración final 25 nM) y se incubó a 47,5°C durante 5 minutos. Después de la incubación, se introdujo un dispositivo de ensayo verticalmente en cada disolución de leche y se siguió incubando durante otros 10 minutos. Después de la incubación, se evaluaron a simple vista la intensidad de la señal de la zona de detección y la cantidad de oro remanente en la región receptora de la muestra.

10 Hubo una diferencia importante en la cantidad de proteínas de unión etiquetadas remanentes en la región receptora de la muestra. La región receptora de la muestra con le leche incubada a 47,5°C exhibió más proteína de unión etiquetada que la región receptora de la muestra con leche incubada a 64°C. Por ende, hay un mejor flujo de leche a 64°C que a 47,5°C. No hubo una diferencia significativa en la intensidad de la proteína de unión etiquetada en la zona de detección.

15 **Ejemplo 5**

Influencia de la longitud de la región absorbente sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 4. Se prepararon dispositivos de ensayo que tenían 2 cm de longitud, 2,5 cm de longitud y 5 cm de longitud. Se preparó proteína de unión a antibióticos etiquetada como se describe en el Ejemplo 2.

20 Se diluyó proteína de unión a antibióticos etiquetada en 200 µl de leche natural (25 nM concentración final) y se incubó a 47,5°C durante 5 minutos. Luego se introdujeron verticalmente en la leche un dispositivo de ensayo que tenía una región absorbente de 2 cm de largo, una región absorbente de 2,5 cm de largo o una región absorbente de 5 cm de largo y se incubó durante 10 minutos a 47,5°C. Después de la incubación, la intensidad de la señal de la zona de detección y la cantidad de oro remanente en la muestra en la región receptora de la muestra se detectaron a simple vista.

Los resultados demuestran que ni la cantidad de oro remanente en la región receptora de la muestra ni la intensidad de la zona de detección difirieron al cambiar la región absorbente y que la longitud de la región absorbente se puede reducir hasta 2 cm sin pérdida de intensidad en la zona de detección.

30 A su vez, los dispositivos de ensayo se preparan como se describe en el Ejemplo 1. Se preparan dispositivos de ensayo que tienen una región absorbente de 0,5 cm de longitud, 1 cm de longitud y 2 cm de longitud. Se prepara proteína de unión a antibióticos etiquetada como se describe en el Ejemplo 2.

35 Se diluye proteína de unión a antibióticos etiquetada en 150 µl de leche natural y se incuba a 64°C durante 2 minutos. Luego se introducen verticalmente en la leche dispositivos de ensayo que tienen una región absorbente de 0,5 cm de largo, una región absorbente de 1 cm de largo o una región absorbente de 2 cm de largo y se incuba durante 3 minutos a 64°C. Después de incubar, se detectan a simple vista la intensidad de la señal de la zona de detección y la cantidad de oro remanente en la muestra.

40 Los resultados demuestran que la cantidad de oro remanente en la región receptora de la muestra es igual entre los dispositivos de ensayo que tienen una región absorbente que tiene una longitud de 1 cm y los dispositivos de ensayo que tienen una región absorbente que tiene una longitud de 2 cm. Asimismo, los resultados demuestran que la intensidad del control y la zona de detección de los dispositivos de ensayo que tienen una región absorbente que tiene una longitud de 1 cm o 2 cm es fuerte. Cuando la longitud de la región absorbente del dispositivo de ensayo se reduce a 0,5 cm, la intensidad de la señal del control y la zona de detección se reduce significativamente. La longitud de la región absorbente del dispositivo de ensayo debe ser por lo tanto por lo menos 1 cm para tener una buena señal en la zona de control y detección.

45 **Ejemplo 6**

Influencia del tipo de membrana de la región receptora de la muestra sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

50 Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. La región receptora de la muestra se preparó a partir de una membrana con un tamaño de poro de 1 µm, un tamaño de poro que oscilaba entre 3 y 8 µm o un tamaño de poro de 50 µm. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche.

Los resultados demuestran que no hay señal en la zona de control y detección cuando el tamaño del poro de la región receptora de la muestra es 1 µm o 50 µm. Se detectó una señal intensa en la zona de control y detección cuando el tamaño del poro de la región receptora de la muestra fue entre 3 y 8 µm. Una región receptora de la

muestra con un tamaño de poro entre 3 y 8 μm es capaz de eliminar las partículas de la leche que influyen negativamente en el resultado del ensayo. Las regiones receptoras de muestras que tienen un tamaño de poro de 1 μm son atascadas por las partículas en la leche, mientras que las regiones receptoras de muestras que tienen un tamaño de poro de 50 μm permiten que las partículas de la leche fluyan hacia la región de detección y bloqueen la región de detección.

Ejemplo 7

Influencia del tipo de membrana de la región receptora de la muestra sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Se preparó la región receptora de la muestra a partir de una membrana de fibra de vidrio unida a alcohol de polivinilo (una membrana VF2), una membrana de fibra de vidrio (una membrana GBF-R4 o una membrana GBF-R7L), una membrana de celulosa (una membrana AP045) o una membrana de poliéster (una membrana PT-R5). La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche. Después de realizar el ensayo, se midió la intensidad de la señal de la zona de detección con mediciones de absorción a 535 nm con una lectora ESE-Quant Lateral Flow (Qiagen).

Los resultados se exponen en la Tabla 2. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección fue más fuerte cuando se usó una membrana de fibra de vidrio unida a alcohol de polivinilo (una membrana VF2) en comparación con cuando se usaron otras membranas. Se prefiere la membrana de fibra de vidrio unida a alcohol de polivinilo, ya que permite una mejor detección de la señal en la zona de detección.

Ejemplo 8

Influencia del tipo de membrana de la región de detección sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. La región de detección se preparó a partir de una membrana HF75, HF90 o HF120. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche.

Los resultados se exponen en la Tabla 3. Demuestran que la membrana HF90 es la membrana preferida para la región de detección del dispositivo de ensayo, puesto que la zona de detección en una membrana HF90 produce una intensidad de señal más fuerte que la zona de detección en una membrana HF75 o HF120.

Ejemplo 9

Influencia de la concentración del antibiótico inmovilizado sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 con la salvedad que varió la concentración de antibiótico (conjugado de 7ACA-espaciador-BSA) localizado en la zona de detección. La concentración de antibiótico se calculó como la cantidad de antibiótico (en mg) por unidad de longitud (en mm) de la zona de detección. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche. Se analizaron la intensidad de la señal y la forma de la zona de detección.

Los resultados se exponen en la Tabla 4. Demuestran que la señal en la zona de detección es difícil de detectar cuando el dispositivo de ensayo comprende 0,1 mg/mm o 4 mg/mm de antibiótico inmovilizado en la zona de detección. Lo primero proporciona una línea nítida pero tiene una baja intensidad de la señal, mientras que lo segundo tiene una fuerte intensidad de la señal pero proporciona una línea difusa (es decir, la señal se desvanece en dirección al flujo de leche), lo que hace que la señal sea difícil de detectar. En contraste, cuando el dispositivo de ensayo comprende 2 mg/mm de antibiótico inmovilizado en la zona de detección, la línea es nítida y la intensidad de la señal es fuerte. Esto resulta en una muy buena detectabilidad de la señal en la zona de detección.

Ejemplo 10

Influencia del tipo de tampón del antibiótico inmovilizado sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Se prepararon los dispositivos de ensayo como se describe en el Ejemplo 1 con la salvedad que el antibiótico localizado en la zona de detección estuvo presente en un tampón KPO_4 20 mM (pH 7,5) o en un tampón Tris 10 mM (pH 8,0). Luego, los dispositivos de ensayo se almacenaron a 37°C por dos semanas. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. Después de almacenar los dispositivos de ensayo, se efectuó el ensayo como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche. Se analizó la intensidad de la señal de la zona de detección antes y después del almacenamiento.

Los resultados demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección disminuye después de almacenar durante dos semanas a 37°C (en comparación con antes del almacenamiento) para dispositivos de ensayo en los que el antibiótico localizado en la zona de detección estuvo presente en un tampón de fosfato. La intensidad de la señal de la zona de detección permanece constante después del almacenamiento durante dos semanas a 37°C (en comparación con antes del almacenamiento) para dispositivos de ensayo en los que el antibiótico localizado en la zona de detección estuvo presente en un tampón Tris. A partir de esto, se concluyó que el antibiótico localizado en la zona de detección debería estar preferiblemente presente en un tampón orgánico tal como un tampón Tris y no en un tampón inorgánico tal como un fosfato como tampón KPO₄.

Ejemplo 11

10 Influencia del tipo de disolución bloqueante de la región de detección sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 con la salvedad que después de secar las zonas, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó pulverizando:

a) sin bloquear,

b) con una disolución que comprendía 2% p/v BSA, 0,05% p/v Tween-20 en Tris 10 mM (pH 8), o

15 c) una disolución que comprendía 2% p/v BSA, 0,05% p/v Tween-20 en tampón KPO₄ 2 mM (pH 7,5). Después los dispositivos de ensayo se usaron o bien directamente en el ensayo (para analizar la intensidad de señal antes del almacenamiento) o los dispositivos de ensayo se almacenaron a 37°C durante dos semanas (para analizar la intensidad de la señal después del almacenamiento) y luego se usaron en el ensayo. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche. Se analizó la intensidad de la señal de la zona de detección antes y después del almacenamiento.

20 Los resultados demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección de los dispositivos de ensayo bloqueados con disolución b y c fue similar antes del almacenamiento, mientras que los dispositivos de ensayo no bloqueados exhibieron una intensidad de señal inferior. La intensidad de la señal de la zona de detección de los dispositivos de ensayo bloqueados con disolución c se tornó más débil cuando los dispositivos de ensayo se almacenaron a 37°C. La intensidad de la señal de la zona de detección de los dispositivos de ensayo bloqueados con disolución b fue similar antes y después del almacenamiento de los dispositivos de ensayo a 37°C. El bloqueo con un tampón orgánico tal como Tris proporciona una intensidad estable de la zona de detección por un largo periodo de tiempo. El bloqueo con tampón orgánico tal como Tris proporciona entonces dispositivos de ensayo que tienen una semivida más prolongada.

Ejemplo 12

Influencia de la posición de la aplicación de la disolución de bloqueo sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

35 Los dispositivos de ensayo se prepararon o bien como se describe en el Ejemplo 1 o como se describe en el Ejemplo 1, con la salvedad que la disolución bloqueante aplicada a la membrana de nitrocelulosa después de secar se pulverizó directamente sobre la zona de detección. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche.

40 Los resultados demuestran que la intensidad de la señal de las zonas de detección y control fue menos intensa (41% y 52%, respectivamente), cuando la disolución bloqueante se pulverizó directamente sobre la zona de detección, en comparación con cuando la disolución bloqueante no se pulverizó directamente sobre la zona de detección. Se puede concluir que la disolución bloqueante no debe pulverizarse directamente sobre la zona de detección para intensidad de señal óptima de la zona de detección.

Ejemplo 13

45 Influencia del tipo de disolución utilizada para aplicar a la zona de control sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, con la salvedad que la disolución utilizada para aplicar a la zona de control comprendía:

a) 0,15 mg/ml anticuerpo anti-IgY, tampón KPO₄ 20 mM (pH 7,5)

b) 0,15 mg/ml anticuerpo anti-IgY, 0,6 mg/ml BSA, 5,0% p/v sacarosa, NaCl 20 mM, tampón KPO₄ 20 mM (pH 7,5)

50 c) 0,075 mg/ml anticuerpo anti-IgY, 0,6 mg/ml BSA, 5,0% p/v sacarosa, NaCl 20 mM, tampón KPO₄ 20 mM (pH 7,5)

d) 0,04 mg/ml anticuerpo anti-IgY, 0,7 mg/ml BSA, 5,0% p/v sacarosa, NaCl 20 mM, tampón KPO₄ 20 mM (pH 7,5).

La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche. Se analizó la intensidad de la señal de la zona de control.

5 Los resultados se exponen en la Tabla 5. Demuestran que se puede detectar bien la señal en la zona de control cuando la disolución utilizada para aplicar la zona de control comprende IgY combinado con por lo menos una proteína adicional tal como BSA, por lo menos un azúcar (preferiblemente un disacárido tal como sacarosa) y por lo menos una sal tal como NaCl.

10 Asimismo, se investigó si la velocidad de dispensación de la zona de control a la región de detección fue de importancia en el desempeño del dispositivo de ensayo. Los resultados demuestran que cuando se dispensa la zona de control a una velocidad de 0,2 µl/cm o una velocidad de 0,8 µl/cm, la zona de control obtenida es demasiado delgada y no detectable. Cuando la zona de control se dispensó a una velocidad de 1,5 µl/cm, la detectabilidad de la zona de control fue buena.

Ejemplo 14

Influencia de la humedad durante el secado de las tarjetas sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

15 Los dispositivos de ensayo o bien se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 o como se describe en el Ejemplo 1 con la salvedad que las tarjetas obtenidas se secaron a 37°C en una atmósfera semi-seca (aproximadamente 50% humedad relativa). Después de la preparación, los dispositivos de ensayo se almacenaron a 37°C durante dos semanas. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad de que a la leche no se le añadieron antibióticos.

20 Los resultados demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es menos intensa cuando las tarjetas obtenidas se secan a 37°C en una atmósfera semi-seca (aproximadamente 50% humedad relativa) que cuando las tarjetas obtenidas se secan a 37°C en una atmósfera seca (0% humedad relativa). Esto demuestra que la semivida de los dispositivos de ensayo es mejor cuando los dispositivos de ensayo se secan a muy baja humedad relativa que cuando los dispositivos de ensayo se secan a una humedad relativa superior.

Ejemplo 15

Influencia de la presencia de secante en los dispositivos de ensayo envasados sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

30 Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se dividieron en dos partes. La primera parte se conserva durante 1 año a 4°C en un recipiente cerrado sin secante, mientras que la segunda parte se conserva durante 1 año a 4°C en el recipiente cerrado con secante. Después de almacenar, los dispositivos de ensayo se utilizan en el ensayo. La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se preparan como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo se realiza como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que a la leche no se le añaden antibióticos.

35 Los resultados demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es más fuerte para los dispositivos de ensayo almacenados en un recipiente con secante que para los dispositivos de ensayo almacenados en un recipiente sin secante.

Ejemplo 16

Influencia del tipo de tampón de solubilización sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

40 La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon o bien como se describe en el Ejemplo 2 o como se describe en el Ejemplo 2 con la salvedad que se usó un tampón MOPS 70 mM en lugar de un tampón Tris 100 mM como tampón de solubilización. Todos los tampones utilizados comprendían 0,0025% p/v Triton-X-100, 0,4% p/v BSA, 5% v/v glicerina y 2% p/v sacarosa y tenían un pH de 8,5 y se dispensó 0,75 µl de la disolución por tubo y se secó durante 12 horas a 40°C. Los tubos obtenidos se sellaron. Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y el ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad de que no se añadieron antibióticos a la leche.

45 Los resultados se exponen en la Tabla 6. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es más fuerte cuando la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se solubilizan en un tampón Tris que cuando se solubilizan en un tampón MOPS. A partir de esto, se puede concluir que la inclusión de tampones orgánicos tales como tampones Tris en lugar de tampones inorgánicos, p. ej., tampones que contienen fosfato como tampones MOPS debería realizarse en los recipientes (es decir, los tubos de ensayo) que comprenden la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado.

Ejemplo 17

Influencia de la concentración de Triton X-100 del tampón de solubilización sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

- 5 La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2, con la salvedad que se usaron tampones con distintas concentraciones de Triton X-100. Todos los tampones empleados comprendían Tris 80 mM, 0,4% p/v BSA, 5% v/v glicerina, 2% p/v sacarosa, y tenían un pH de 8,5, y se dispensó 0,75 µl de la disolución por tubo y se secó durante 12 horas a 40°C. Los tubos obtenidos se sellaron. Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y el ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche.
- 10 Los resultados se exponen en la Tabla 7. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección está ausente en ausencia de Triton X-100. Se puede concluir a partir de este experimento que la concentración de Triton X-100 en el tampón de solubilización debería estar por encima de 0. A partir de este ejemplo, se puede concluir también que un tensioactivo, p. ej., un tensioactivo no iónico tal como Triton X-100 debería incluirse en los recipientes (es decir, tubos de ensayo) que comprenden la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado.
- 15 Preferiblemente, debería incluirse Triton X-100 en una concentración encima de 0,0025% p/v, p. ej., aproximadamente 0,01% p/v, en los recipientes (es decir, tubos de ensayo) que comprenden la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado.

Ejemplo 18

Influencia de la concentración de BSA del tampón de solubilización sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

- 20 La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describió en el Ejemplo 2, con la salvedad que se usaron tampones con diferentes cantidades de BSA. Todos los tampones utilizados comprendían Tris 80 mM, 0,01% p/v Triton X-100, 5% v/v glicerina, 2% p/v sacarosa, y tenían un pH de 8,5, y se dispensaron 0,75 µl de la disolución por tubo y se secaron durante 12 horas a 40°C. Los tubos obtenidos se sellaron. Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y el ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche.
- 25 Los resultados se exponen en la Tabla 8. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es media cuando se emplean tampones con cantidades reducidas de BSA, p. ej., 0,2 % p/v. Cuando se emplean tampones con cantidades superiores de BSA, p. ej., 0,4% o 0,8% p/v, la intensidad de la señal es más fuerte. A partir de esto, se puede concluir que debería incluirse una proteína, p. ej., una albúmina tal como albúmina de suero bovino (BSA) en cantidades por encima de 0,2% p/v en los recipientes (es decir, los tubos de ensayo) que comprenden la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado.
- 30

Ejemplo 19

Influencia de la concentración de glicerina del tampón de solubilización sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

- 35 La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2, con la salvedad que se utilizaron tampones con distintas cantidades de glicerina. Todos los tampones utilizados comprendían Tris 80 mM, 0,01% p/v Triton X-100, 0,4% p/v BSA, 2% p/v sacarosa, y tenían un pH de 8,5, y se dispensó 0,75 µl de la disolución por tubo y se secó durante 12 horas a 40°C. Los tubos obtenidos se sellaron. Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y el ensayo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche.
- 40 Los resultados se exponen en la Tabla 9. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es débil en ausencia de glicerina, mientras que en presencia de glicerina, la intensidad de la señal es media a fuerte. Los resultados demuestran además que la concentración óptima de glicerina es 5% v/v. A partir de este ejemplo, se puede concluir que debería incluirse un poliol tal como glicerina en los recipientes (es decir, los tubos de ensayo) que comprenden la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado. Preferiblemente, la cantidad de glicerina es aproximadamente 5% v/v.
- 45

Ejemplo 20

Influencia de la concentración de sacarosa del tampón de solubilización sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

- 50 La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2, con la salvedad que se emplearon tampones con distintas cantidades de sacarosa. Todos los tampones utilizados comprendían Tris 80 mM, 0,01% p/v Triton X-100, 0,4% p/v BSA, 5% v/v glicerina, y tenían un pH de 8,5, y se dispensó 0,75 µl de la disolución por tubo y se secó durante 12 horas a 40°C. Los tubos obtenidos se sellaron.

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, y el ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad de que no se añadieron antibióticos a la leche.

5 Los resultados se exponen en la Tabla 10. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es débil cuando se usan pocas cantidades de sacarosa. Los resultados demuestran también que la concentración óptima de sacarosa es 2% p/v. A partir de este ejemplo, se puede concluir que debería incluirse un azúcar, p. ej., un disacárido tal como sacarosa, en los recipientes (es decir, los tubos de ensayo) que comprenden la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado. Preferiblemente, la cantidad de sacarosa es aproximadamente 2% p/v.

Ejemplo 21

10 Influencia del tipo de secado del tampón de solubilización sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

La proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2 con la primera salvedad de que el tampón de solubilización en los tubos o bien se secó durante 24 horas a 40°C o se congeló en nitrógeno líquido (-80°C) durante 1 hora y luego se secó al vacío (0,42 mbar) a una temperatura de 10°C durante 20 horas, y la segunda salvedad que se usaron tampones con diferentes cantidades de sacarosa. Los tubos obtenidos se sellaron. Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, y el ensayo se efectuó como se describe en el Ejemplo 3 con la salvedad que no se añadieron antibióticos a la leche. Después de realizar el ensayo, se midió la intensidad de la señal de la zona de detección con mediciones de absorción a 535 nm con una lectora ESE-Quant Lateral Flow (Qiagen).

20 Los resultados se exponen en la Tabla 11. Demuestran que la intensidad de la señal de la zona de detección es idéntica para los tampones de solubilización secados durante 12 horas a 40°C y los tampones de solubilización que se liofilizan, cuando los tampones de solubilización comprenden 2% p/v sacarosa. A concentraciones de sacarosa superiores a 2% p/v, la liofilización proporciona intensidades de señal superiores, mientras que a concentraciones de sacarosa inferiores a 2% p/v el secado al aire proporciona intensidades de señal superiores.

Ejemplo 22

25 Influencia de la concentración de proteína etiquetada sobre el desempeño del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. En este ejemplo, se evaluó la influencia de la concentración de proteína de unión a antibióticos etiquetada en la leche. La proteína de unión a antibióticos etiquetada se diluyó en 150 µl de leche natural a una concentración final de 25 nM, 50 nM o 100 nM y se incubó a 64°C por 2 minutos. Luego se introdujo verticalmente un dispositivo de ensayo en cada una de las disoluciones de leche y se incubó durante 3 minutos a 64°C. Después de incubar, se detectaron visualmente la intensidad de señal de la zona de detección y la cantidad de oro remanente en la región receptora de la muestra.

35 Los resultados exhiben un incremento significativo en la intensidad de la señal de la zona de detección con una concentración en aumento de la proteína de unión a antibióticos en la leche. La proteína de unión a antibióticos restante en la región receptora de la muestra también aumenta con el aumento de concentración.

Ejemplo 23

Sensibilidad del dispositivo de ensayo para diferentes antibióticos

El ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que se ensayaron distintos antibióticos a distintas concentraciones.

40 Los resultados se exponen en la Tabla 12. Los resultados demuestran que se pueden detectar distintos antibióticos de beta-lactama con el dispositivo de ensayo de la presente invención.

Ejemplo 24

Detección de antibióticos con el dispositivo de ensayo en diferentes productos

45 El ensayo se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. En lugar de leche natural, se ensayaron diferentes matrices lácteas. Todas las matrices líquidas se midieron como tales y todos los polvos se dispersaron primero en agua. Para leche en polvo, se dispersaron 20 g en 250 g de agua destilada y para polvo de suero se dispersaron 7,1 g en 100 g de agua destilada.

Los resultados se exponen en la Tabla 13. Los resultados demuestran que el dispositivo de ensayo se puede usar para detectar antibióticos en diferentes matrices lácteas con la excepción de suero a pH 4,5.

50

Ejemplo 25

Semivida del dispositivo de ensayo

5 Los dispositivos de ensayo se produjeron como se describió anteriormente en los Ejemplos 1 y 2 y se conservaron a 4°C. En diferentes periodos de tiempo después de la producción, se usó el dispositivo de ensayo para medir la penicilina G. El ensayo se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

Los resultados se exponen en la Tabla 14. Los resultados demuestran que el almacenamiento durante hasta aproximadamente 9 meses a 4°C no influye en el desempeño de los dispositivos de ensayo. Los dispositivos de ensayo de acuerdo con la presente invención tienen una semivida de por lo menos 9 meses.

Ejemplo 26

10 Influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la semivida del dispositivo de ensayo

Los dispositivos de ensayo se produjeron como se describió anteriormente en los Ejemplos 1 y 2 y se conservaron a distintas temperaturas (-20°C y 30°C). En diferentes periodos de tiempo después de la producción, se usó el dispositivo de ensayo para detectar penicilina G. El ensayo se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

15 Los resultados se exponen en la Tabla 15. Los resultados demuestran que no hay influencia sobre el desempeño del dispositivo de ensayo después de almacenar a -20°C por hasta 28 días. Además, no hay influencia sobre el desempeño del dispositivo de ensayo después de almacenar a 30°C por hasta 7 días. Después de almacenar 28 días a 30°C, se observa una pequeña reducción en la intensidad de la señal de la zona de detección.

Ejemplo 27

20 Influencia de la composición de la leche sobre el dispositivo de ensayo

Se recogieron distintas muestras de leche de productores individuales de Bélgica y se declararon libres de antibiótico. El pH, el recuento celular somático y el contenido de grasa y proteína se analizaron usando un aparato Fossomatic 5000 (Foss, Dinamarca). Cada muestra se dividió en tres subconjuntos. A cada subconjunto se le añadieron 0, 3 o 4 ng/g de penicilina G. De allí en más, el ensayo se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3.

25 Los resultados (no se muestran los datos) demuestran que la composición de la leche (las muestras de leche varían en pH de 6,57 a 7,15; en el recuento celular de 20.000 a 6.993.000; en contenido graso de 0,26% (p/p) a 8,32% (p/p); y en contenido de proteína de 3,11% (p/p) a 4,53% (p/p)) no influye en el desempeño del dispositivo de ensayo. Ninguna de las muestras con 0 ng/g penicilina G se halló positiva.

30 **Ejemplo 28**

Influencia de la etapa de agitación sobre el dispositivo de ensayo

El ensayo se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que se aplicaron diferentes etapas de agitación. Las etapas de agitación se realizaron de acuerdo con los siguientes métodos:

Método a) ninguna etapa de agitación,

35 Método b) una etapa de agitación (10 segundos) después de la adición de la leche a la proteína de unión a antibióticos etiquetada y subsiguiente incubación de la composición líquida obtenida, pero antes de poner en contacto el dispositivo de ensayo con la composición líquida obtenida,

Método c) una etapa de agitación (10 segundos) después de la adición de la leche a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, pero antes de la subsiguiente incubación de la composición líquida obtenida,

40 Método d) una primera etapa de agitación (5 segundos) después de la adición de la leche a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, pero antes de la subsiguiente incubación de la composición líquida obtenida, y una segunda etapa de agitación (10 segundos) después de la subsiguiente incubación de la composición líquida obtenida, pero antes de poner en contacto el dispositivo de ensayo con la composición líquida obtenida,

45 Método e) una primera etapa de agitación (10 segundos) después de la adición de la leche a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, pero antes de la subsiguiente incubación de la composición líquida obtenida, y una segunda etapa de agitación (10 segundos) después de la subsiguiente incubación de la composición líquida obtenida, pero antes de poner en contacto el dispositivo de ensayo con la composición líquida obtenida.

Los resultados se exponen en la Tabla 16. Los resultados demuestran que la ausencia de agitación influye negativamente sobre intensidad de la señal de la zona de control y detección. Además, los resultados demuestran

que no hay diferencia cuando se efectúan una o dos etapas de agitación. Una, así como también dos, etapas de agitación producen una intensidad de la señal de la zona de control y de detección.

Ejemplo 29

Influencia de la temperatura sobre el ensayo

- 5 El ensayo se efectuó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que se efectuó a diferentes temperaturas (4°C, 20°C o 31,5°C).

Los resultados se exponen en la Tabla 17. Los resultados demuestran que la temperatura a la cual se realiza el ensayo no influye en las intensidades de las zonas de detección y control.

Ejemplo 30

- 10 Influencia de la temperatura inicial de la leche sobre el ensayo

El ensayo se efectuó esencialmente como se describe en el Ejemplo 3, con la salvedad que se efectuó con leche que tenía una temperatura inicial diferente (0°C, 4°C, 20°C o 45°C). Se dejó que la leche alcanzara temperatura ambiente poco antes de realizar el ensayo.

- 15 Los resultados se exponen en la Tabla 18. Los resultados demuestran que la temperatura inicial de la leche no influye en las intensidades de las zonas de detección y control.

Tabla 1: Detección de antibióticos con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención.

Concentración de Penicilina G (ng/g)	0	1	2	3	4
Intensidad de la zona de control *	2	2	2	2	2
Intensidad de la zona de detección *	3	3	2	2	1
*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.					

Tabla 2: Intensidad de la señal de la zona de detección para distintas membranas de la región receptora de la muestra medida por absorción.

Tipo de membrana de la región receptora de la muestra	Intensidad de la señal (medida por absorción a 535 nm)
VF2	683
GFB-R4	472
GFB-R7L	325
PT-R5	629
AP045	370

20

Tabla 3: Intensidad de la señal de la zona de detección y tiempo de ensayo total para distintos tipos de membrana de la región de detección.

Tipo de membrana	Intensidad de la señal *	Tiempo de ensayo total (minutos)
HF 75	1	4
HF 90	4	5

ES 2 748 833 T3

Tipo de membrana	Intensidad de la señal *	Tiempo de ensayo total (minutos)
HF 120	0	>20

* 0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte

Tabla 4: Intensidad de la señal y forma de la zona de detección para distintas concentraciones de antibiótico inmovilizado en la zona de detección.

Concentración de antibiótico (mg/mm)	Intensidad de la señal del frente de la zona de detección ¹	Forma de la zona de detección	Detectabilidad de la señal de la zona de detección ²
0,1	1	Línea nítida	2
2	4	Línea nítida	5
4	5	Línea difusa	3

¹0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte
²0: no detectable; 1: muy mala; 2: mala; 3: media; 4: buena; 5: muy buena

5 Tabla 5: Intensidad de la señal y forma de la zona de control para distintas disoluciones aplicadas a la zona de control

Disolución	Detectabilidad de la señal de la zona de control ¹
a	1
b	3
c	4
d	3

¹0: no detectable; 1: muy mala; 2: mala; 3: media; 4: buena; 5: muy buena

Tabla 6: Intensidad de la señal de la zona de detección para distintos tampones de solubilización.

Tipo de tampón	Intensidad de la señal *
Tris/HCl	4
MOPS	3

* 0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte

10 Tabla 7: Intensidad de la señal de la zona de detección para tampones con distintas concentraciones de Triton X-100.

Concentración de Triton X-100 (p/v)	Intensidad de la señal*
-------------------------------------	-------------------------

Concentración de Triton X-100 (p/v)	Intensidad de la señal*
0	0
0,0025	3
0,01	4

* 0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte

Tabla 8: Intensidad de la señal de la zona de detección para tampones con distintas concentraciones de BSA.

Concentración de BSA (p/v)	Intensidad de la señal*
0,2	3
0,4	5
0,8	4

* 0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte

Tabla 9: Intensidad de la señal de la zona de detección para tampones con distintas concentraciones de glicerina.

Concentración de glicerina (v/v)	Intensidad de la señal*
0	2
3	3
5	4
7	3
10	3

* 0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte

5

Tabla 10: Intensidad de la señal de la zona de detección para tampones con distintas concentraciones de sacarosa.

Concentración de sacarosa (p/v)	Intensidad de la señal*
0,1	2
0,2	2
0,5	2
1	2

ES 2 748 833 T3

Concentración de sacarosa (p/v)	Intensidad de la señal*
2	4
4	2

* 0: no visible; 1: señal muy débil; 2: señal débil; 3: señal media; 4: señal fuerte; 5: señal muy fuerte

Tabla 11: Intensidad de la señal de la zona de detección para diferentes métodos de secado en distintas concentraciones de sacarosa por absorción.

Concentración de sacarosa (% p/v)	Secado al aire	Liofilización
	Intensidad de la señal (medida por absorción a 535 nm)	
0,5	0,160	0,116
1	0,149	0,128
2	0,156	0,157
4	0,149	0,160
8	0,065	0,157

5 Tabla 12: Detección de varios antibióticos con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención.

Antibiótico							
Amoxicilina	Concentración (ng/g)	0,0	3,3	4,3	5,3	6,3	7,3
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	1	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Ampicilina	Concentración (ng/g)	0,0	5,3	6,9	8,5	10,1	11,7
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Cefalonio	Concentración (ng/g)	0,0	3,2	4,0	4,8	5,6	6,4
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Cefquinoma	Concentración (ng/g)	0,0	12,5	15,8	19,1	22,4	25,7
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2

ES 2 748 833 T3

Antibiótico							
Ceftiofur	Concentración (ng/g)	0,0	4,0	5,1	6,2	7,3	8,4
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Cloxacilina	Concentración (ng/g)	0,0	32,5	43,2	53,9	64,6	75,3
	Intensidad de la zona de detección	3	1	0	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Cefalexina	Concentración (ng/g)	0,0	34,0	43,0	52,0	61,0	70,0
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Cefazolin	Concentración (ng/g)	0,0	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
	Intensidad de la zona de detección	3	2	1	0	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Cefoperazona	Concentración (ng/g)	0,0	4,0	4,9	5,8	6,7	7,6
	Intensidad de la zona de detección	3	2	2	1	1	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Dicloxacilina	Concentración (ng/g)	0,0	15,0	20,0	25,0	30,0	35,0
	Intensidad de la zona de detección	3	3	2	2	1	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Nafcilina	Concentración (ng/g)	0,0	40,0	50,5	61,0	71,5	82,0
	Intensidad de la zona de detección	3	3	2	1	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
Oxacilina	Concentración (ng/g)	0,0	27,0	34,8	42,6	50,4	58,2
	Intensidad de la zona de detección	3	2	2	1	0	0
	Intensidad de la zona de control	2	2	2	2	2	2
*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.							

Tabla 13: Detección de Penicilina G con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención en diferentes matrices lácteas.

	Intensidad de la zona de detección	Intensidad de la zona de control				
		0	3	4	0	3
Concentración de Pen G (ppb)	0	3	4	0	3	4
Matriz						
Leche natural congelada	3	2	1	2	2	2
Leche en polvo	3	2	1	2	2	2
Leche procesada con bajo contenido graso	3	2	1	2	2	2
Leche pasteurizada	3	2	1	2	2	2
Leche UHT	3	2	1	2	2	2
Leche UHT con bajo contenido graso	3	2	1	2	2	2
Leche de cabra natural congelada	1	1	0	2	2	2
Leche de búfalo natural congelada	1	1	0	2	2	2
Leche de oveja natural congelada	1	1	0	2	2	2
Suero pH 4,5	0	0	0	0	0	0
Suero en polvo	3	2	1	2	2	2
Crema 10%	3	2	1	2	2	2
Cacao	3	2	1	2	2	2
Crema 40%	3	2	2	2	2	2
*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.						

5 Tabla 14: Detección de Penicilina G con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención después de almacenar el dispositivo de ensayo a 4°C.

	Intensidad de la zona de detección			Intensidad de la zona de control		
	0	3	4	0	3	4
Concentración Pen G (ppb)	0	3	4	0	3	4
Tiempo de almacenamiento (semanas)						
0	3	2	1	2	2	2
4	3	2	1	2	2	2

ES 2 748 833 T3

Concentración Pen G (ppb)	Intensidad de la zona de detección			Intensidad de la zona de control		
	0	3	4	0	3	4
Tiempo de almacenamiento (semanas)						
7	3	2	1	2	2	2
15	3	2	1	2	2	2
18	3	2	1	2	2	2
26	3	2	1	2	2	2
*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.						

Tabla 15: Detección de Penicilina G con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención después de almacenar el dispositivo de ensayo a -20°C o 30°C.

Tiempo de almacenamiento (días)	Concentración Pen G (ppb)	Intensidad de la zona de detección				Intensidad de la zona de control	
		0	3	4	0	3	4
Temperatura de almacenamiento -20°C							
0		3	2	1	2	2	2
3		3	2	1	2	2	2
7		3	2	1	2	2	2
28		3	2	1	2	2	2
Temperatura de almacenamiento 30°C							
0		3	2	1	2	2	2
3		3	2	1	2	2	2
7		3	2	1	2	2	2
28		3	1	0	2	2	2
*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.							

5 Tabla 16: Detección de Penicilina G con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención después de las distintas etapas de agitación.

		Intensidad de la zona de detección			Intensidad de la zona de control	

ES 2 748 833 T3

	Concentración de Pen G (ppb)	0	3	4	0	3	4
Método a		2	1	1	1	1	1
Método b		3	2	1	2	2	2
Método c		3	2	1	2	2	2
Método d		3	2	1	2	2	2
Método e		3	2	1	2	2	2

*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.

Tabla 17: Detección de Penicilina G con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Concentración de Pen G (ppb)	Intensidad de la zona de detección			Intensidad de la zona de control		
		0	3	4	0	3	4
4		3	2	1	2	2	2
20		3	2	1	2	2	2
31,5		3	2	1	2	2	2

*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.

5 Tabla 18: Detección de Penicilina G con el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención con leche que tiene una temperatura inicial diferente.

Temperatura inicial de la leche (°C)	Concentración de Pen G (ppb)	Intensidad de la zona de detección			Intensidad de la zona de control		
		0	3	4	0	3	4
0		3	2	1	2	2	2
4		3	2	1	2	2	2
20		3	2	1	2	2	2
45		3	2	1	2	2	2

*0: ninguna intensidad; 1: intensidad baja; 2: intensidad media; 3: intensidad alta.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar antibióticos derivados de cefalosporina en una muestra, en donde dicho método comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto una muestra de líquido con una proteína de unión a antibióticos etiquetada de *Bacillus stearothermophilus* y un reactivo control etiquetado, en donde la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado están presentes en un recipiente, para formar una composición líquida en el recipiente,
- b) proporcionar un dispositivo de ensayo, que es una tira reactiva, que tiene un extremo proximal y un extremo distal, en donde dicho dispositivo de ensayo está configurado para permitir el flujo lateral desde el extremo proximal al distal, en donde dicho dispositivo de ensayo comprende un soporte sólido que comprende las siguientes regiones en secuencia desde el extremo proximal al distal:
- 10 i. una región receptora de la muestra,
- ii. una región de detección, en donde dicha región de detección comprende por lo menos dos zonas:
- A. una zona de detección que comprende un antibiótico inmovilizado capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos etiquetada, cuando dicha proteína de unión a antibióticos etiquetada no está unida por el antibiótico de la muestra, y
- 15 B. una zona de control que comprende un agente de unión inmovilizado capaz de unirse al reactivo control etiquetado,
- iii. una región absorbente, y
- iv. opcionalmente, una región de manipuleo,
- 20 c) poner en contacto la composición líquida con la región receptora de la muestra del dispositivo de ensayo,
- d) permitir que la composición líquida se desplace por la región receptora de la muestra en la región de detección hacia la región absorbente, como para permitir que la composición líquida que comprende la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado se pongan en contacto con la zona de detección y la zona de control,
- 25 e) detectar una señal en la zona de detección y una señal en la zona de control, en donde
- i. la ausencia de antibiótico en la muestra se indica con la presencia de una señal en la zona de detección que es más intensa que la señal en la zona de control, y
- ii. la presencia de antibiótico en la muestra se indica con la ausencia de una señal en la zona de detección o la presencia de una señal en la zona de detección que es menos intensa que la señal en la zona de control.
- 30 2. Un método según la reivindicación 1, en donde la composición líquida se incuba durante 30 segundos a 5 minutos antes de ponerse en contacto con el dispositivo de ensayo.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición líquida se incuba a 40 a 70°C antes de ponerse en contacto con el dispositivo de ensayo.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína de unión a antibióticos etiquetada y el reactivo control etiquetado están presentes en forma de polvo antes de ponerse en contacto con la muestra de líquido.
- 35 5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína de unión a antibióticos etiquetada se obtiene de un microorganismo sensible a antibióticos.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etiqueta de la proteína de unión a antibióticos y el reactivo control son idénticas.
- 40 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proteína de unión a antibióticos y el reactivo control se etiquetan con una partícula de oro.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el reactivo control es incapaz de unirse al antibiótico en la muestra.
- 45 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el antibiótico inmovilizado está unido al soporte sólido por un conjugado espaciador-proteína.

10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el dispositivo de ensayo se pone en contacto con la composición líquida durante 1 a 5 minutos a una temperatura de 40 a 70°C.

11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la muestra es leche.

12. Un kit que comprende:

- 5 - un recipiente que comprende una proteína de unión a antibióticos etiquetada de *Bacillus stearothermophilus* y un reactivo control etiquetado, y
 - 10 - un dispositivo de ensayo para detectar un antibiótico en una muestra, en donde dicho dispositivo de ensayo tiene un extremo proximal y un extremo distal, en donde dicho dispositivo de ensayo está configurado para permitir el flujo lateral de una composición líquida que comprende una muestra de líquido, una proteína de unión a antibióticos etiquetada y un reactivo control etiquetado desde el extremo proximal al extremo distal, en donde dicho dispositivo comprende un soporte sólido que comprende las siguientes regiones en secuencia desde el extremo proximal al extremo distal:
 - una región receptora de la muestra,
 - una región de detección, en donde dicha región de detección comprende por lo menos dos zonas:
 - 15 i. una zona de detección que comprende un antibiótico inmovilizado capaz de unirse a la proteína de unión a antibióticos etiquetada cuando dicha proteína de unión a antibióticos etiquetada no está unida por el antibiótico de la muestra, y
 - ii. una zona de control que comprende un agente de unión inmovilizado capaz de unirse al reactivo control etiquetado,
 - 20 - una región absorbente, y
 - opcionalmente, una región de manipuleo.
13. El kit según la reivindicación 12, en donde el dispositivo de ensayo es una tira.

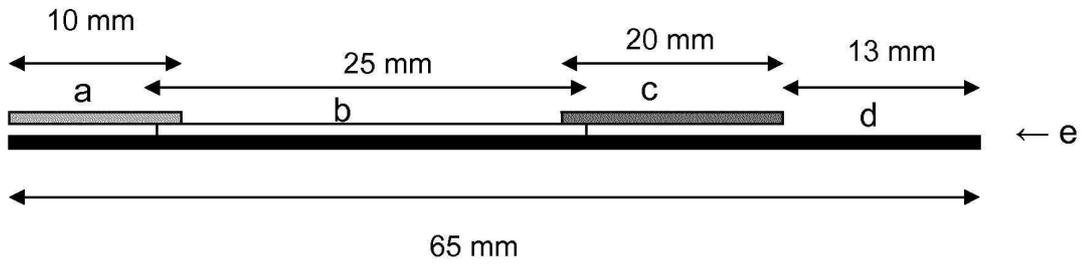


Fig. 1