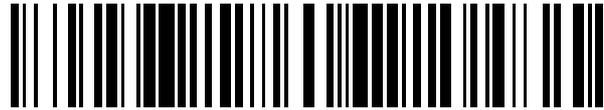


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 598**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/JP2014/083461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14872507 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3085771**

54 Título: **Procedimiento para detectar bacterias del género Streptococcus en la leche**

30 Prioridad:

18.12.2013 JP 2013261825

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

06.07.2020

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
1-105 Kanda Jinbocho Chiyoda-ku
Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

**UTSUMI, TAKAMITSU;
MAEHANA, KOJI y
MATSUYAMA, KENJI**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 771 598 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para detectar bacterias del género *Streptococcus* en la leche

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de lisis y a un procedimiento de detección para detectar una bacteria *Streptococcus*, que es una bacteria causal de la mastitis, en la leche de ganadería.

10 Estado de la técnica anterior

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

15

La mastitis es la inflamación del sistema laticífero o del tejido de la glándula de la leche, y está causada en gran parte por la invasión, colonización y proliferación de un microorganismo en la ubre. Aunque muchos tipos de animales contraen mastitis, se dice que, especialmente con respecto a la mastitis vacuna en vacas lecheras, del 15 al 40 % del total de las vacas lecheras contraen mastitis, por lo que es una de las enfermedades extremadamente importantes para los productores de leche. Si una vaca lechera contrae mastitis, no solo se inhibe la función de síntesis de leche para reducir la cantidad de lactancia, o incluso detener la lactancia, según sea el caso, sino que también se imponen enormes pérdidas económicas a los productores de leche, tales como el coste del tratamiento de atención médica y la penalización del precio de la leche debido a la degradación de la calidad de la leche. Además, también aumenta el trabajo de los productores lecheros, ya que, por ejemplo, el ordeño de las ubres que padecen mastitis debe realizarse por separado para prevenir la infección.

20

La mastitis está causada por la infección de diversos microorganismos. Entre las bacterias causales, se conocen las bacterias *Streptococcus* (también conocidas como estreptococos) como bacterias causales descubiertas con frecuencia.

30

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

35

En los procedimientos de medición inmunológica, tales como el procedimiento inmunocromatográfico, cuando un antígeno como diana de detección es un ingrediente contenido en células bacterianas, es necesario lisar las células bacterianas para liberar antígenos desde el interior de las células hacia el exterior de las células. Se sabe que la labiasa exhibe actividad bacteriolítica contra las bacterias *Streptococcus* (documento no de patente 1). Sin embargo, el documento no de patente 1 no describe el efecto de lisis en una solución con alto contenido de proteínas y grasas, tales como la leche.

45

50 Referencias del estado de la técnica anterior

Documentos de patente

55 Documento de patente 1: Publicación no examinada de patente japonesa (KOKAI) No. 1-244370
Documento de patente 2: Publicación no examinada de patente japonesa (KOKAI) No. 2012-122921

Documentos no de patente

60 Documento no de patente 1: Microbiol. Immunol., 2009, 53: 45-48

Ongol MP et al, Food Research International, 42 (8), páginas 893 - 898 (2009) dan a conocer un procedimiento de PCR en tiempo real dirigido a una secuencia génica que codifica la proteína rimM, procesadora de ARNr 16S, para la detección y enumeración específicas de *Streptococcus thermophilus* en productos lácteos, que incluye, entre otros aspectos, la extracción de ADN utilizando un cóctel enzimático que contiene lisozima, labiasa y N-acetilmuramidasa.

65

Sentitula et al, Indian Journal of Microbiology, 52 (2), páginas 153 - 159 (2012), analizaron muestras de leche de animales mastíticos para detectar la presencia de estafilococos y estreptococos utilizando ensayos bioquímicos y basados en PCR; y se utilizó, entre otros aspectos, un agente de lisis que contenía lisozima para el aislamiento del ADN.

5 Características de la invención
Objetivo a conseguir por la invención

10 La mastitis está causada por la infección de diversos microorganismos y, por lo tanto, los antibióticos que exhiben eficacia en el tratamiento terapéutico de la misma pueden diferir según el tipo de microorganismo causal. Por lo tanto, el diagnóstico temprano y el tratamiento terapéutico de la mastitis son muy importantes. Además, cuando ciertos tipos específicos de microorganismos han causado mastitis, pueden transmitirse a otras mamas del individuo u otros individuos y, por lo tanto, es extremadamente importante identificar rápida y convenientemente las bacterias causales existentes en la leche.

15 Los procedimientos basados en el cultivo utilizados ampliamente como procedimientos para detectar una bacteria tienen el problema de que requieren varios días para obtener un resultado. Por el contrario, los procedimientos de medición inmunológica basados en una reacción antígeno-anticuerpo, tales como el procedimiento
20 inmunocromatográfico, tienen la ventaja de que permiten la detección rápida y conveniente de bacterias causales y, por lo tanto, permiten un tratamiento terapéutico temprano con un agente antibacteriano. Para detectar de manera altamente sensible una sustancia específica en las células de una bacteria causal, mediante un procedimiento de medición inmunológica, cuando la sustancia específica (antígeno) es un ingrediente intracelular, es necesario lisar de manera altamente eficaz las células para liberar el antígeno en el interior de las células hacia el exterior de las
25 células. Sin embargo, cuando se utiliza leche como muestra de ensayo, las técnicas convencionales no pueden proporcionar una lisis suficiente en muchos casos, debido a las influencias de proteínas, tales como la caseína, los glóbulos de grasa láctea y demás, contenidos en la leche en grandes cantidades. Según las investigaciones de los inventores de la presente invención, se ha descubierto que las actividades de las enzimas líticas comunes se reducen notablemente en un sistema que contiene leche. Tal como se ha descrito anteriormente, no se conoce entre
30 las técnicas convencionales ningún procedimiento eficaz de lisis para detectar una bacteria *Streptococcus* contenida en la leche.

35 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento de lisis y una solución de tratamiento de lisis para lisar de manera eficaz diversas bacterias *Streptococcus* en la leche de un animal de ganadería, para liberar una sustancia antigénica específica contenida en las células para detectar si la bacteria causal de la mastitis es una bacteria *Streptococcus* o no utilizando la leche, así como un procedimiento de detección utilizando un dispositivo inmunocromatográfico.

40 Medios para lograr el objetivo
Los inventores de la presente invención han descubierto que el *Streptococcus uberis* contenido en la leche se puede lisar de manera eficaz mediante la utilización de un agente de lisis que contiene, como mínimo, lisozima o labiasa, y que el *Streptococcus agalactiae* se puede lisar de manera eficaz mediante la utilización de un agente de lisis que contiene una enzima lítica seleccionada de lisozima, labiasa y β -N-acetilglucosaminidasa. Descubrieron además
45 que, para realizar de manera eficaz un tratamiento de lisis de bacterias *Streptococcus* contenidas en la leche, las células pueden lisarse de manera muy eficaz utilizando la enzima labiasa, que se sabe que tiene una actividad de lisis junto con lisozima añadida en una cantidad específica, de modo que se puede liberar la proteína L7/L12 contenida en las células, y dicha lisis se puede utilizar para la detección altamente sensible de bacterias *Streptococcus*, y se consiguió la presente invención.

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

[1] Un procedimiento para lisar una bacteria *Streptococcus* contenida en la leche, que comprende
55 la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico con la leche para lisar la bacteria existente en la leche,

en el que la bacteria es *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae*.
[2] El procedimiento de lisis, según el punto [1], en el que el surfactante no iónico comprende un alquilfenil éter polioxietileno y/o un éster de ácido graso de sorbitán polioxietileno.

[3] El procedimiento de lisis, según el punto [2], en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para
60 lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final de lisozima no es inferior a 0,5 mg/ml ni superior a 200 mg/ml; y/o

en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final de labiasa no es inferior a 0,05 mg/ml ni superior a 20 mg/ml.

[4] Un procedimiento para detectar una bacteria de *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae* contenida en la
65 leche, que comprende:

la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, definido en cualquiera de los puntos [1] a [3],

5 la etapa de eliminar los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche utilizando material que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche,

y que comprende, además:

la etapa de detectar una sustancia específica derivada del interior de la célula bacteriana y liberada mediante la lisis.

10 [5] El procedimiento de detección, según el punto [4], que se realiza mediante un procedimiento inmunocromatográfico.

[6] El procedimiento de detección, según el punto [5], en el que el procedimiento inmunocromatográfico comprende (1) la etapa de poner en contacto la leche que contiene la sustancia específica con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, en la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en la tercera parte o una parte existente aguas arriba de la misma, y (2) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o una parte existente aguas abajo de la misma para obtener una señal detectable del marcador en la segunda parte o una parte existente aguas abajo de la misma.

20 [7] El procedimiento de detección, según el punto [6], en el que el primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica es retenido en la primera parte.

[8] El procedimiento de detección, según los puntos [6] o [7], en el que la tercera parte está constituida por dos o más tipos de miembros que tienen poros que pueden eliminar glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partículas, respectivamente.

25 [9] El procedimiento de detección, según el punto [8], en el que la tercera parte está constituida por un primer miembro dispuesto aguas abajo y un segundo miembro dispuesto aguas arriba, y el tamaño de retención de partícula del segundo miembro es mayor que el tamaño de retención de partícula del primer miembro.

[10] Utilización de un agente de lisis, definido en cualquiera de los puntos [1] a [3], para lisar una bacteria de *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae* contenida en la leche.

30 [11] Utilización de un agente de lisis, según el punto [10], que se utiliza en un procedimiento de diagnóstico de mastitis de un animal de ganadería.

También se describe en la presente memoria descriptiva:

35 [12] Un kit para detectar una bacteria *Streptococcus* contenida en la leche, que comprende:

el agente de lisis, definido anteriormente, y

40 un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, en la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche.

45 Efecto de la invención

Se ha descubierto que, en cuanto a la lisis de *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae*, se pueden lisar de manera muy eficaz mediante la utilización de una enzima lítica específica para cada especie bacteriana, y en cuanto a la lisis de bacterias *Streptococcus*, se pueden lisar de manera muy eficaz utilizando como enzimas líticas en combinación labiasa y una cantidad específica de lisozima.

Descripción breve de los dibujos

55 [Figura 1] La figura 1 muestra el efecto de una enzima lítica en la detección de una bacteria *Streptococcus* por inmunoensayo enzimático (ELISA, de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

[Figura 2] La figura 2 muestra una vista en sección esquemática de la tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico preparado en el ejemplo 3, que comprende un miembro 1 impregnado con anticuerpo marcado (primera parte), un soporte de membrana 2 para el revelado cromatográfico (segunda parte), una parte 3 para la captura, un miembro 4 que sirve como miembro para la adición de muestra y miembro para la eliminación de glóbulos de grasa (tercera parte), un miembro 5 para la absorción, un sustrato 6 y un miembro 7 para la eliminación de glóbulos de grasa (tercera parte). Maneras para llevar a cabo la invención

65 A continuación, la presente invención se explicará con más detalle. En la presente invención, cuando un intervalo de valores numéricos se representa como "X a Y", el intervalo incluye los valores X e Y como los valores mínimo y

máximo. El símbolo "%" se utiliza para indicar el porcentaje en masa, a menos que se indique especialmente. La expresión "A y/o B" significa, como mínimo, uno de A y B, incluidos los casos de referirse solo a A, solo B, y a A y B.

5 La presente invención proporciona un agente de lisis para lisar las bacterias *Streptococcus* contenidas en la leche. El agente de lisis de la presente invención contiene una enzima lítica.

[Enzima lítica]

10 El tipo de enzima lítica utilizada no está particularmente limitado, y también se pueden utilizar dos o más tipos arbitrarios de enzimas líticas en combinación, según se requiera. Por ejemplo, es preferente utilizar, como mínimo, uno seleccionado entre el grupo que consiste en lisozima, labiasa y β -N-acetilglucosaminidasa. Cuando la bacteria *Streptococcus* es *Streptococcus uberis*, el agente de lisis contiene, preferentemente, como mínimo, uno de lisozima y labiasa, y cuando la bacteria *Streptococcus* es *Streptococcus agalactiae*, el agente de lisis contiene, preferentemente, como mínimo, uno seleccionado del grupo que consiste en lisozima, labiasa y β -N-acetilglucosaminidasa.

15 La labiasa se prepara a partir del sobrenadante de cultivo de la cepa *Streptomyces fulvissimus* TU-6, y es una enzima compleja que consiste principalmente en β -N-acetil-D-glucosaminidasa y muramidasa. La labiasa se puede preparar a partir de sobrenadante de cultivo de la cepa mencionada anteriormente, o también se puede obtener comprando un producto comercializado.

20 Cuando se utiliza labiasa, especialmente cuando se utiliza lo descrito en los ejemplos mencionados en la presente memoria descriptiva, desde el punto de vista de realizar una lisis de manera eficaz, la concentración final de la misma puede ser, preferentemente, de 0,05 mg/ml o superior, más preferentemente, 0,1 mg/ml o superior, aún más preferentemente, 0,5 mg/ml o superior y, en cualquier caso, puede ser 20 mg/ml o inferior, preferentemente, 10 mg/ml o inferior, más preferentemente, 5 mg/ml o inferior. Alternativamente, la concentración final de la misma puede ser de 0,0005 unidades/ml o superior, preferentemente, 0,001 unidades/ml o superior, más preferentemente, 0,005 unidades/ml o superior y, en cualquier caso, puede ser de 0,2 unidades/ml o inferior, preferentemente, 0,1 unidades/ml o inferior, más preferentemente, 0,05 unidades/ml o inferior. En la presente memoria descriptiva, cuando se menciona el término unidad enzimática (unidad) para la labiasa, se refiere a un valor de la actividad β -N-acetil-D-glucosaminidasa y se define como 1 unidad, a menos que se indique especialmente, la actividad enzimática que libera 1 μ mol de p-nitrofenol en 1 minuto cuando se permite que la enzima actúe sobre p-nitrofenil- β -N-acetil-D-glucosamina como un sustrato.

30 La lisozima es una proteína que consiste en un péptido único de 14,6 kDa, y puede lisar las células de las bacterias mediante la escisión del enlace glucosídico β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina en la capa de peptidoglucano. La lisozima se puede obtener comprando un producto comercializado.

35 Cuando se utiliza lisozima, especialmente cuando se utiliza la descrita en los ejemplos mencionados en la presente memoria descriptiva, desde el punto de vista de realizar una lisis de manera eficaz, la concentración final de la misma puede ser, preferentemente, de 0,5 mg/ml o superior, más preferentemente, 1 mg/ml o superior, aún más preferentemente, 5 mg/ml o superior y, en cualquier caso, puede ser de 200 mg/ml o inferior, preferentemente, 100 mg/ml o inferior, más preferentemente, 50 mg/ml o inferior. Alternativamente, la concentración final de lisozima puede ser, preferentemente, de 0,4 mg/ml o superior, más preferentemente, 0,8 mg/ml o superior, aún más preferentemente, 4 mg/ml o superior y, en cualquier caso, puede ser de 160 mg/ml o inferior, preferentemente, 80 mg/ml o inferior, más preferentemente, 40 mg/ml o inferior. En la presente memoria descriptiva, cuando para la lisozima se hace referencia a la cantidad de lisozima, es un valor determinado en función de la disminución de la absorbancia (640 nm) observada cuando se permite actuar sobre una suspensión de células secas de *Micrococcus lysodeikticus* en un tampón fosfato como sustrato, a menos que esté especialmente indicado.

40 La β -N-acetilglucosaminidasa también se denomina β -N-acetilhexosaminidasa, y es una enzima que libera N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina terminal con enlace tipo β de diversos sustratos. La β -N-acetilglucosaminidasa se puede obtener comprando un producto comercializado.

45 Cuando se utiliza la β -N-acetilglucosaminidasa, especialmente cuando se utiliza la descrita en los ejemplos mencionados en la presente memoria descriptiva, desde el punto de vista de realizar una lisis de manera eficaz, la concentración final de la misma puede ser, preferentemente, de 0,5 mg/ml o superior, más preferentemente, 1 mg/ml o superior, aún más preferentemente, 5 mg/ml o superior y, en cualquier caso, puede ser de 200 mg/ml o inferior, preferentemente, 100 mg/ml o inferior, más preferentemente, 50 mg/ml o inferior. Alternativamente, la concentración final de la misma puede ser, preferentemente, de 0,05 unidades/ml o superior, más preferentemente, 0,1 unidades/ml o superior, aún más preferentemente, 0,5 unidades/ml o superior y, en cualquier caso, puede ser de 200 unidades/ml o inferior, preferentemente, 100 unidades/ml o inferior, más preferentemente, 50 unidades/ml o inferior. En la presente memoria descriptiva, cuando se menciona el término unidad enzimática (unidad) para la β -N-acetilglucosaminidasa, se define como 1 unidad, a menos que se indique especialmente, la actividad enzimática

que libera 1 μmol de p-nitrofenol en 1 minuto cuando la enzima puede actuar sobre la p-nitrofenil- β -N-acetil-D-glucosamina como sustrato.

Según la presente invención, al añadir adicionalmente la enzima lisozima a la leche que contiene bacterias *Streptococcus* además de la enzima labiasa, se puede conseguir un efecto de lisis altamente eficaz, que se puede aplicar a una amplia gama de bacterias *Streptococcus*. Cuando se utilizan la lisozima y la labiasa descritas en la sección de ejemplos de la presente memoria descriptiva, desde el punto de vista de realizar una lisis de manera eficaz, la cantidad de lisozima que se añade adicionalmente es, preferentemente, de 3 mg/ml o superior, más preferentemente, 5 mg/ml o superior, más preferentemente, 7 mg/ml o superior, aún más preferentemente, 9 mg/ml o superior y, preferentemente, 100 mg/ml o inferior, más preferentemente, 50 mg/ml o inferior, más preferentemente, 20 mg/ml o inferior, por 1 mg/ml de labiasa. Alternativamente, la cantidad de lisozima que se añadirá de forma complementaria es, preferentemente, de 2,4 mg/ml o superior, más preferentemente, 4 mg/ml o superior, más preferentemente, 5,6 mg/ml o superior, aún más preferentemente, 7,2 mg/ml o superior y, en cualquier caso, preferentemente, 80 mg/ml o inferior, más preferentemente, 40 mg/ml o inferior, más preferentemente, 16 mg/ml o inferior, por 0,1 unidad/ml de labiasa.

[Surfactante]

Un surfactante que se ioniza y se convierte en un ion, cuando se disuelve en agua, se conoce como surfactante iónico, y un surfactante que no se convierte en un ion se denomina surfactante no iónico (no iónico). El surfactante iónico se clasifica además en surfactante aniónico, surfactante catiónico y surfactante anfótilico.

Se puede esperar que, al añadir un agente surfactante al agente de lisis además de la enzima lítica, se pueda mejorar el efecto de lisis del mismo. Como surfactante, se pueden utilizar independientemente cualquiera de los surfactantes no iónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes aniónicos y surfactantes anfótilicos, o cualquiera de estos se puede utilizar en combinación.

El agente de lisis descrito en la presente memoria descriptiva puede contener un surfactante no iónico. Se considera que la coexistencia de un surfactante no iónico es particularmente preferente, cuando el lisado celular obtenido se utiliza en un procedimiento inmunocromatográfico. Se considera que, como surfactante no iónico, se puede utilizar, preferentemente, cualquiera de los de tipo éster éter, tipo éster y tipo éter. Más específicamente, entre los ejemplos se incluyen alquil éteres polioxietilenados, alquilfenil éteres polioxietilenados, ésteres de sorbitán de ácidos grasos, alquilpoliglucósidos, dietanolamidas de ácidos grasos, alquilmonogliceril éteres, polisorbatos (formados por condensación de varias decenas de moléculas de óxido de etileno en un éster de sorbitán de ácido graso), etc., pero no está particularmente limitado. Entre los ejemplos especialmente preferentes se incluyen polisorbatos, más específicamente, monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20), monoestearato de sorbitán polioxietilenado (60), triestearato de sorbitán polioxietilenado (65) y monooleato de sorbitán polioxietilenado (80), etc., así como alquilfenil éteres polioxietilenados, más específicamente, octilfenil éter polioxietilenado (10), etc.

El contenido del surfactante no iónico en el agente de lisis (cuando se utilizan dos o más tipos de surfactantes no iónicos, es el contenido como la cantidad total de surfactantes no iónicos) no está particularmente limitado siempre y cuando, por ejemplo, cuando se utiliza un procedimiento inmunocromatográfico, esté asegurado el flujo de una solución de revelado. Sin embargo, en cualquier caso, en cuanto al límite inferior del mismo, el contenido puede determinarse de modo que la concentración final del surfactante no iónico en la mezcla con leche sea del 0,03 % o superior, preferentemente, 0,05 % o superior, más preferentemente, 0,075 % o superior, más preferentemente, 0,1 % o superior, de manera particularmente preferente, 0,3 % o superior. En cuanto al límite superior del contenido del surfactante no iónico, el contenido se puede determinar de modo que la reacción catalizada por la enzima lítica y las reacciones antígeno-anticuerpo no se inhiban significativamente y, en cualquier caso, puede ser del 10 % o inferior, preferentemente, 7,5 % o inferior, más preferentemente, 5,0 % o inferior, aún más preferentemente, 3 % o inferior, de manera particularmente preferente, 2 % o inferior.

Como surfactante aniónico, se puede utilizar, preferentemente, cualquiera de las sales de ácido carboxílico, sales de ácido sulfónico, sales de éster de ácido sulfúrico, etc. Entre los ejemplos más específicos se incluyen carboxilatos de alquiléter, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), α -olefinosulfonatos (AOS), dialquilsulfosuccinatos, condensados de formaldehído de naftalenosulfonato, sales de éster de ácido alquilsulfúrico (AS), sales de éster de ácido alquilsulfúrico polioxietilenado (AES) obtenidas por adición de óxido de etileno a un alcohol superior y después sulfatación, sales de éster de ácido fosfórico de un alcohol superior o aducto de óxido de etileno del mismo, etc. Entre otros ejemplos específicos se incluyen alquilsulfatos de sodio, tales como dodecilsulfato de sodio y miristilsulfato de sodio, N-acilsarcosinatos de sodio, tales como N-lauroilsarcosinato de sodio y N-miristoilsulfonato de sodio, dodecilsulfonato de sodio, sulfato monosódico de monoglicérido de ácido graso de coco hidrogenado, laurilsulfoacetato de sodio, N-acilglutamatos, tales como N-palmitoilglutamato de sodio, N-metil-N-acilalanina sódica y α -olefinsulfonatos de sodio.

Como surfactante catiónico, se puede utilizar, preferentemente, cualquiera del tipo de sal de amina y del tipo de sal de amonio cuaternario. Entre los ejemplos más específicos se incluyen cloruro de diestearildimetilbencilamonio,

cloruro de benzalconio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de miristiltrimetilamonio, etc.

5 Entre los ejemplos del surfactante anfóptico se incluyen los del tipo de aminoácido (sales de alquilaminoácido graso), del tipo betaína (alquil betaínas), del tipo óxido de amina (óxidos de alquilamina), etc., pero no está particularmente limitado. Entre los ejemplos más específicos se incluyen propanosulfonatos de dimetilamonio, butiratos de dodecildimetilamonio, lauril betaína y amidopropil betaína. Entre otros ejemplos específicos se incluyen 1-propanosulfonato de n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio, 1-propanosulfonato de n-decil-N,N-dimetil-3-amonio, 10 1-propanosulfonato de n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio, 1-propanosulfonato de n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio, 1-propanosulfonato de n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio y butirato de N-dodecil-N,N-(dimetilamonio).

[Ejemplo de composición]

15 En una realización particularmente preferente, el agente de lisis comprende lisozima, labiasa y un surfactante no iónico. Este agente de lisis es eficaz frente a diversas bacterias *Streptococcus*, y es especialmente eficaz frente a *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae*. Para el agente de lisis que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico, entre los ejemplos particularmente preferentes del surfactante no iónico se incluyen un alquilfenil éter polioxietileno y/o un éster de ácido graso de sorbitano polioxietileno, y entre los ejemplos más preferentes se incluyen un alquilfenil éter polioxietileno y un éster de ácido graso de sorbitano polioxietileno. Las 20 concentraciones de estos ingredientes del agente de lisis se pueden determinar de modo que, en la etapa de lisar las bacterias existentes en la leche mezclando el agente de lisis con la leche, la concentración final de lisozima no sea inferior a 0,6 mg/ml ni superior a 50 mg/ml, la concentración final de labiasa no sea inferior a 0,05 mg/ml ni superior a 20 mg/ml, y la concentración final del surfactante no iónico no sea inferior al 0,03 % ni superior al 3 %. Con una realización más preferente del agente de lisis que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico, en 25 la etapa de lisar las bacterias existentes en la leche mezclando el agente de lisis con la leche, la concentración final de lisozima no es inferior a 0,5 mg/ml ni superior a 50 mg/ml, la concentración final de labiasa no es inferior a 0,1 mg/ml ni superior a 10 mg/ml, y la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,10 % ni superior al 2,6 %.

30 [Otros ingredientes]

El agente de lisis descrito en la presente memoria descriptiva puede contener, además de la enzima lítica y el surfactante, uno o más tipos de otros ingredientes, siempre que el efecto deseado no se degrade notablemente. Entre los ejemplos preferentes de los ingredientes distintos de la enzima lítica y el surfactante se incluyen una 35 sustancia que tiene el efecto de promover la lisis. Entre los ejemplos específicos se incluyen glutaraldehído, compuestos halógenos, clorhexidina, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol), fenol, peróxido de hidrógeno, acrinol, guanidina y sus sales, agentes quelantes, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido decanoico) y sus sales, alcoholes polihídricos (por ejemplo, etilenglicol, propilenglicol, dietilenglicol, glicerina y monocaprilina), y agentes reductores, tales como 40 2-mercaptoetanol, ditiotretol, cistina y tiofenol, pero sin que constituyan limitación.

Por ejemplo, cuando se utiliza una de guanidina y una sal de la misma (por ejemplo, tiocianato de guanidina), en cuanto al límite inferior de la concentración final de la misma en el momento de mezclar con la leche, la 45 concentración (cuando se utilizan dos o más tipos de sustancias, es la concentración como la concentración total de las mismas) puede ser 0,1 mM o superior, preferentemente, 1 mM o superior, más preferentemente, 1 mM o superior. En cualquier caso, en cuanto al límite superior de la concentración final en el momento de la mezcla con la leche, la concentración puede ser 500 mM o inferior, preferentemente, 200 mM o inferior, más preferentemente, 100 mM o inferior.

50 Entre los ejemplos del agente quelante se incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y una sal del mismo, glicol éter-ácido diaminotetraacético (EGTA) y una sal del mismo, ácido polifosfórico y una sal del mismo, así como ácido metafosfórico y una sal del mismo. En cuanto al límite inferior de la concentración final del mismo en el momento de la mezcla con la leche, la concentración (cuando se utilizan dos o más tipos de agentes quelantes, es la 55 concentración como la concentración total de los mismos) puede ser 0,001 mM o superior, preferentemente, 0,01 mM o superior, más preferentemente, 0,1 mM o superior. En cualquier caso, en cuanto al límite superior de la concentración final en el momento de la mezcla con la leche, la concentración puede ser 100 mM o inferior, preferentemente, 10 mM o inferior, más preferentemente, 5 mM o inferior, desde el punto de vista de suprimir la inhibición de una reacción antígeno-anticuerpo.

60 [Condiciones de lisis y proporción de lisis]

En la presente invención, se puede utilizar el agente de lisis mezclándolo con leche. La proporción de mezcla de la leche y el agente de lisis no está particularmente limitada, siempre que las concentraciones finales de la enzima 65 lítica, etc., se mantengan adecuadamente y se pueda asegurar una proporción de lisis suficiente. Si el agente de lisis se utiliza en un volumen relativamente pequeño con respecto a la leche, la leche no se diluye. Por lo tanto, se puede esperar que las células se puedan detectar con mayor sensibilidad. Cuando el agente de lisis se utiliza en un

volumen relativamente grande con respecto a la leche, las influencias de los glóbulos de grasa y las proteínas contenidas en la leche se reducen y, por lo tanto, se puede esperar que las células se puedan detectar en un tiempo más corto. Desde el punto de vista de que una proporción más elevada de leche en la mezcla de leche y el agente de lisis (leche/(leche + agente de lisis) x 100) puede proporcionar una mayor sensibilidad de detección, la proporción puede ser, por ejemplo, el 5 % o superior, preferentemente, el 10 % o superior, más preferentemente, el 20 % o superior, más preferentemente, el 30 % o superior, independientemente de las otras condiciones. En cuanto al límite superior de la proporción, si se utiliza el agente de lisis solidificado por secado o similar, se puede hacer que la proporción de leche sea del 100 %, independientemente de las otras condiciones. La proporción de la leche puede ser el 90 % o inferior, el 80 % o inferior, el 70 % o inferior, el 60 % o inferior, o el 50 % o inferior, independientemente de las otras condiciones. En cuanto al límite superior, la proporción se puede determinar teniendo en cuenta la facilidad de mezcla, la estabilidad del agente de lisis como solución, etc.

En la presente invención, es suficiente mezclar simplemente la leche con el agente de lisis. La temperatura en el momento de la mezcla y el tiempo de tratamiento para permitir que la enzima actúe después de la mezcla no están particularmente limitados, siempre que la enzima lítica utilizada pueda exhibir la actividad, y la temperatura generalmente puede ser la temperatura ambiente. Los expertos en la materia pueden determinar adecuadamente el tiempo de tratamiento para permitir la reacción después de la mezcla, teniendo en cuenta la proporción de lisis. En la presente invención, dado que se utilizan combinaciones y concentraciones de enzimas líticas apropiadas para bacterias *Streptococcus*, el tiempo de tratamiento se puede acortar en comparación con el que se puede obtener mediante la utilización de un procedimiento de lisis habitual. En la presente invención, en cualquier caso, el tiempo de tratamiento es generalmente de varias decenas de minutos a varias horas y, más específicamente, puede ser 240 minutos o inferior, preferentemente, 150 minutos o inferior, más preferentemente, 90 minutos o inferior, aún más preferentemente, 60 minutos o inferior, aún más preferentemente, 45 minutos o inferior, aún más preferentemente, 25 minutos o inferior, aún más preferentemente, 20 minutos o inferior, de manera particularmente preferente, 15 minutos o inferior. También se puede hacer que el tiempo de tratamiento sea sustancialmente 0 (después de mezclar la leche y el agente de lisis, la mezcla se somete inmediatamente a la medición). La temperatura puede ser, en cualquier caso, de 2 a 50 °C, por ejemplo, de 35 a 40 °C, y se puede determinar, según sea necesario, teniendo en cuenta el tipo de enzima y el tiempo de tratamiento a utilizar. El tratamiento se puede realizar en un estado estacionario, o con agitación. Según la presente invención, incluso con un período de tiempo tan corto, puede lograrse la lisis requerida y se puede habilitar la detección de bacterias *Streptococcus*. En la presente invención, también se puede utilizar un surfactante en combinación con la enzima lítica. En tal caso, el tiempo de tratamiento se puede acortar en comparación con el caso de utilizar solo una enzima lítica, o la proporción de lisis puede aumentarse incluso con el mismo tiempo de tratamiento. El tiempo de tratamiento es generalmente de varias decenas de minutos a varias horas, y más específicamente, puede ser 240 minutos o inferior, preferentemente, 150 minutos o inferior, más preferentemente, 90 minutos o inferior, aún más preferentemente, 60 minutos o inferior, más preferentemente, 45 minutos o inferior, aún más preferentemente, 25 minutos o inferior, aún más preferentemente, 20 minutos o inferior, de manera particularmente preferente, 15 minutos o inferior. También se puede hacer que el tiempo de tratamiento sea sustancialmente 0 (después de mezclar la leche y el agente de lisis, la mezcla se somete inmediatamente a la medición). Además, cuando se utiliza un surfactante en combinación, la temperatura puede ser, en cualquier caso, de 2 a 50 °C, por ejemplo, de 35 a 40 °C, y se puede determinar, según sea necesario, teniendo en cuenta el tipo de enzima y el tiempo de tratamiento a utilizar. También en este caso, el tratamiento se puede realizar en un estado estacionario, o con agitación.

En cuanto a la proporción de lisis a la que se hace referencia en la presente invención, la proporción de lisis observada para una suspensión de una bacteria *Streptococcus* diana sometida a un tratamiento preliminar con un surfactante no iónico de una concentración adecuada, sometida posteriormente a ultrasonidos y a un tratamiento enzimático suficiente, según sea necesario, se puede definir como el 100 %, a menos que se indique especialmente.

[Medios de detección]

Las bacterias *Streptococcus* lisadas, según la presente invención, se pueden detectar mediante diversos tipos de procedimientos inmunológicos utilizando un ingrediente de células bacterianas como antígeno. Por ejemplo, se puede detectar un antígeno que consiste en la proteína ribosómica L7/L12 de una bacteria *Streptococcus* mediante un procedimiento inmunocromatográfico, o el antígeno mencionado también se puede detectar mediante otro procedimiento de medición inmunológica en lugar del procedimiento inmunocromatográfico. Entre los ejemplos de procedimientos de medición inmunológica distintos al procedimiento inmunocromatográfico se incluyen, por ejemplo, procedimiento de reacción de aglutinación, inmunoensayo enzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA, de *Radioimmunoassay*), fluoroinmunoensayo (FIA, de *Fluoroimmunoassay*), etc., sin que constituyan limitación.

En el momento de realizar los procedimientos inmunológicos, se puede utilizar una sustancia para bloquear para prevenir la adsorción no específica, o una sustancia para prevenir la reacción cruzada con bacterias distintas a la bacteria diana. En particular, para evitar la reacción del anticuerpo utilizado y la proteína A de *Staphylococcus aureus*, se puede añadir globulina que no participa en la reacción con el antígeno. Cuando se utiliza globulina, se puede añadir en una cantidad de 0,01 µg/ml o superior, preferentemente, 0,1 µg/ml o superior, más preferentemente, 1 µg/ml o superior, como la concentración final en el momento de la reacción, desde el punto de vista de la supresión de resultados falsos positivos. Además, en cualquier caso, desde el punto de vista de no inhibir la

reacción antígeno-anticuerpo objetivo, se puede utilizar en una cantidad de 10 mg/ml o menor, preferentemente, 5 mg/ml o menor, más preferentemente, 1 mg/ml o menor. Estas condiciones relativas a la concentración final son especialmente adecuadas para el procedimiento inmunocromatográfico.

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

[Procedimiento inmunocromatográfico y dispositivo inmunocromatográfico]

- 10 Se puede detectar una reacción antígeno-anticuerpo mediante el ensayo sándwich utilizando un "primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica" retenido por una primera parte, y un "segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica" inmovilizado en una segunda parte.

- 15 Alternativamente, una reacción antígeno-anticuerpo se puede detectar también mediante el procedimiento de competencia utilizando una sustancia específica marcada retenida por una primera parte, y un anticuerpo dirigido a la sustancia específica inmovilizada en una segunda parte. Sin embargo, en la presente invención, es preferente el procedimiento de ensayo sándwich, dado que muestra una alta sensibilidad de detección y proporciona una línea que indica la detección de anticuerpos como resultado positivo.

- 20 El dispositivo inmunocromatográfico es un dispositivo para detectar una sustancia específica contenida en la leche mediante un procedimiento inmunocromatográfico, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, en la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que
25 tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche. Como un ejemplo específico de la estructura de la tira reactiva, se puede mencionar la de la tira reactiva cuya vista en sección esquemática se muestra en la figura 2. En la figura 2, un miembro 7 para la eliminación de glóbulos de grasa (tercera parte) está dispuesto aguas abajo de un miembro 4 para la adición de la muestra, y aguas arriba de un miembro 1 impregnado de anticuerpo marcado (primera parte).

- 30 El dispositivo inmunocromatográfico se puede producir de manera conocida utilizando materiales comercializados.

- El material utilizado para la primera parte no está particularmente limitado, siempre que se elija un material que permita la inmunocromatografía, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen una matriz de fibras de un derivado de celulosa, etc., papel de filtro, fibra de vidrio, tela, algodón, etc.
35

- El material utilizado para la segunda parte no está particularmente limitado, siempre que se elija un material que permita la inmunocromatografía, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen nitrato de celulosa, éster mixto de nitrato de celulosa, fluoruro de polivinilideno, nylon, etc.
40

- El material utilizado para la tercera parte tiene, preferentemente, poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche y que tienen un diámetro de, aproximadamente, 1 a diez y varios micrómetros. La tercera parte debe estar dispuesta aguas arriba de la segunda parte mencionada anteriormente que consiste en una membrana porosa que tiene un diámetro de poro de varias decenas a varios cientos de nm y, preferentemente, está dispuesta aguas arriba de la primera parte mencionada anteriormente, es decir, en una posición en la que una solución de muestra contacta en primer lugar con la tira reactiva y pasa a través de la misma.
45

- Los poros de la tercera parte pueden tener un tamaño que permita la eliminación de los glóbulos de grasa láctea, y el tamaño de retención de partícula es, preferentemente, de 0,1 a 10 μm , más preferentemente, de 1 a 3,5 μm . El material no está particularmente limitado, siempre que se elija un material que tenga poros que muestren un tamaño de retención de partícula dentro del intervalo mencionado anteriormente, pero entre los ejemplos preferentes se incluyen una matriz de fibras tales como derivados de celulosa, papel de filtro, fibra de vidrio, tela, algodón, etc. El tamaño de retención de partícula significa un tamaño de partícula tal de glóbulos de grasa láctea que los glóbulos de grasa láctea que tienen un tamaño de partícula no menor que el tamaño de retención de partícula no pueden pasar a través de los poros y son retenidos por la tercera parte, y corresponde sustancialmente al tamaño de poro promedio de los poros de la tercera parte, y el 50 % o superior, preferentemente, el 60 % o superior, más preferentemente, el 70 % o superior, aún más preferentemente, el 80 % o superior, de manera particularmente preferente, el 90 % o superior, de la manera más preferente, el 98 % o superior, de los glóbulos de grasa láctea que tienen un tamaño de partícula no menor que el tamaño de retención de partícula no pueden pasar a través de los poros y son retenidos por la tercera parte. La proporción de glóbulos de grasa láctea a retener se puede medir mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, el catálogo de GF/B proporcionado por GE Healthcare Bioscience describe que el tamaño de retención de partícula (diámetro de partícula para el cual la eficiencia de retención es del 98 %, el término tamaño de retención de partícula utilizado en la presente memoria descriptiva tiene este significado, a menos que se indique especialmente) del mismo es 1,0 μm , y el tamaño de partícula, tal como se ha mencionado anteriormente se puede confirmar mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia.
50
55
60
65

La tercera parte mencionada anteriormente puede consistir en un solo tipo de material que tiene un tamaño de retención de partícula específico, o puede consistir en un laminado que comprende materiales que tienen diferentes tamaños de retención de partícula y adherido integralmente para que el tamaño de retención de partícula se reduzca gradualmente, para aumentar la eficiencia de separación de los glóbulos de grasa láctea. Esta tercera parte, tal como se ha mencionado anteriormente, constituida por dos o más tipos de miembros que pueden eliminar glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partículas constituye una realización preferente de la presente invención, y en una realización más preferente de la presente invención, la tercera parte está constituida con un primer miembro dispuesto aguas abajo y un segundo miembro dispuesto aguas arriba, y el tamaño de retención de partícula del segundo miembro es mayor que el tamaño de retención de partícula del primer miembro. Cuando la tercera parte está constituida con estos dos tipos de miembros, es preferente que el tamaño de retención de partícula del primer miembro dispuesto aguas abajo sea de 1,0 a 2,0 μm , y el tamaño de retención de partícula del segundo miembro dispuesto aguas arriba sea de 3,0 a 3,5 μm . Para detectar de manera altamente sensible una sustancia específica de la leche que contiene glóbulos de grasa láctea de alta concentración y distribución amplia de tamaños de partícula, especialmente leche del tipo no diluida después del ordeño, es preferente que la tercera parte esté constituida con una combinación de un miembro que tenga un tamaño de retención de partícula pequeño y un miembro que tenga un tamaño de retención de partícula grande.

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

Cuando se hace que la primera parte retenga un primer anticuerpo marcado dirigido a una sustancia específica, se utilizan dos tipos de anticuerpos, el primer anticuerpo dirigido a la sustancia específica y un segundo anticuerpo también dirigido a la sustancia específica. Para permitir la detección de la sustancia específica por el procedimiento de ensayo sándwich, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo mencionados anteriormente son anticuerpos que se pueden unir simultáneamente a la sustancia específica, y es preferente que el epítipo de la sustancia específica a reconocer por el primer anticuerpo mencionado anteriormente sea diferente del epítipo de la sustancia específica a reconocer por el segundo anticuerpo mencionado anteriormente.

En la presente invención, para obtener una señal detectable, se marca el primer anticuerpo o la sustancia específica retenida por la primera parte. Entre los ejemplos del marcador utilizado para la presente invención se incluyen una partícula coloreada, un enzima, un radioisótopo, etc., y es preferente utilizar una partícula coloreada que se pueda detectar visualmente sin ningún equipo especial. Entre los ejemplos de partículas coloreadas se incluyen micropartículas metálicas, tales como las de oro y platino, partículas no metálicas, partículas de látex, etc., pero sin que constituyan limitación. La partícula coloreada puede tener cualquier tamaño, siempre que la partícula coloreada tenga un tamaño tal que se pueda transportar aguas abajo a través del interior de los poros de la tira reactiva, pero, preferentemente, tiene un tamaño desde 1 nm hasta 10 μm , más preferentemente, desde 5 nm hasta 1 μm , aún más preferentemente, desde 10 hasta 100 nm, de diámetro.

[Objetivo de detección]

Según la presente invención, se puede detectar una bacteria *Streptococcus* contenida en la leche. La "bacteria *Streptococcus*" mencionada en la presente invención puede ser *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pluranimalium*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus acidominimus*, o similar, a menos que se indique especialmente. Según la presente invención, las bacterias *Streptococcus* contenidas en la leche obtenida de un animal de ganadería, tal como la vaca, como tal, que contiene alta concentración de glóbulos de grasa y proteínas, se pueden detectar utilizando el agente de lisis que contiene la enzima lítica y el surfactante adecuadamente formulados.

La sustancia específica medida en la presente invención puede ser cualquier sustancia, siempre que sea una sustancia que se pueda medir mediante un procedimiento inmunológico, tal como un procedimiento inmunocromatográfico, pero, preferentemente, es un componente de una bacteria o una sustancia que es secretada por una bacteria. Más preferentemente, la sustancia específica es la proteína ribosómica L7/L12 de una bacteria. Se puede obtener una alta sensibilidad de detección para la proteína ribosómica L7/L12, ya que existe en las células en un gran número de copias.

[Anticuerpo]

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

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

Además, como anticuerpo monoclonal, es preferente utilizar un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo no esté inhibida por ningún contaminante que no sea la sustancia específica contenida en la leche. Por ejemplo, la leche contiene una gran cantidad de proteínas, tales como la caseína, y pueden inhibir la reacción de la sustancia específica y el anticuerpo monoclonal. Cuando un anticuerpo monoclonal dirigido a la sustancia específica se prepara de manera convencional, se pueden elegir y utilizar preferentemente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo no esté inhibida por la caseína o similar, o un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo apenas se vea afectada por caseína o similares. Este anticuerpo monoclonal se puede obtener fácilmente preparando anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con un antígeno de una manera habitual, y posteriormente seleccionando un anticuerpo monoclonal cuya reacción antígeno-anticuerpo no esté inhibida sustancialmente por un contaminante, tal como la caseína, al examinar si la reacción antígeno-anticuerpo se inhibe o no en presencia del contaminante.

Ejemplos

Ejemplo 1:

(1) Preparación del anticuerpo para la proteína ribosómica L7/L12

Según el procedimiento descrito en los ejemplos de la Patente WO00/06603, se obtuvo la proteína ribosómica L7/L12, y se prepararon anticuerpos monoclonales utilizando esta proteína. Entre los anticuerpos monoclonales, se seleccionó una combinación de dos tipos de anticuerpos monoclonales que pueden unirse simultáneamente a diferentes sitios de la proteína ribosómica L7/L12 mencionada anteriormente.

(2) Evaluación de la actividad lítica mediante ELISA

Se ajustó el recuento de células *S. uberis* o *S. agalactiae* a 1×10^9 (células/ml) con solución salina fisiológica para preparar una suspensión celular. Además, se diluyeron cada uno de los 6 tipos de enzimas mostrados en la tabla 1 con una mezcla de leche 1:1 (v/v) y cada tampón a una concentración de 1 mg/ml o 10 mg/ml para preparar soluciones enzimáticas.

[Tabla 1]

Enzima lítica	Productor	Tampón	Concentración de solución de enzima (concentración final después de mezclar con la suspensión celular)
Labiasa (lote, BDBAC12) *1	Ozeki	Citrato/fosfato Na, pH 4	1 mg/ml (0,5 mg/ml)
Lisozima *2	Wako Pure Chemical Industries	Citrato/fosfato Na, pH 4	10 mg/ml (5 mg/ml)
Lisostafina	Wako Pure Chemical Industries	Tris-HCl, pH 8	10 mg/ml (5 mg/ml)

Enzima lítica	Productor	Tampón	Concentración de solución de enzima (concentración final después de mezclar con la suspensión celular)
Acromopeptidasa	Wako Pure Chemical Industries	Tris-HCl, pH 8	10 mg/ml (5 mg/ml)
β -N-Acetilglucosaminidasa *3	Sigma-Aldrich	Citrato/fosfato Na, pH 4	10 mg/ml (5 mg/ml)
Proteinasa K	Sigma-Aldrich	Tris-HCl, pH 8	0,1 mg/ml (0,05 mg/ml)

*1: actividad de β -N-acetil-D-glucosaminidasa, 19,13 U/g de polvo; Proteína, 24,00 mg de proteína/g de polvo;
Lisis de células bacterianas de ácido láctico con el 0,5 % (p/v) de labiasa
*2: título, 0,8 mg de lisozima/mg o más (producto estándar de Wako Pure Chemical Industries)
*3:> 80 unidades/mg de proteína

Como control positivo, se utilizó una suspensión celular homogeneizada obtenida al agitar células *S. uberis* o *S. agalactiae* durante toda la noche en el tampón MOPSO (0,1 M) que contiene el 1 % de surfactante no iónico Triton X-100, y posteriormente someter a ultrasonidos la suspensión celular (potencia 10 %, 1 minuto x 10 veces).

5

Se colocó el anticuerpo monoclonal 1 (10 μ g/ml) en NaN_3 al 0,05 %/PBS (50 μ l) en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (placa Maxsorp ELISA, Nunc), y se permitió la adsorción del anticuerpo durante toda la noche a 4 °C. Después de eliminar el sobrenadante, se añadió una solución de albúmina de suero bovino al 1 % (en PBS, 200 μ l), y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para conseguir el bloqueo. Después de eliminar el sobrenadante, cada pocillo se lavó varias veces con una solución de lavado (Tween 20 al 0,05 %, PBS).

10

La suspensión de células bacterianas y la solución enzimática preparada anteriormente se mezclaron en una proporción en volumen de 1:1, se trataron durante 1 hora en una incubadora a 37 °C y se diluyeron 100 veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS, la suspensión diluida (50 μ l) se añadió a cada pocillo de la placa, y la reacción se dejó a 37 °C durante 1 hora. Después de eliminar el sobrenadante, los pocillos se lavaron varias veces con la solución de lavado, se añadieron 50 μ l del anticuerpo monoclonal-2 (1 μ g/ml, Tween 20 al 0,05 % en PBS) marcado con peroxidasa, y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar el sobrenadante, los pocillos se lavaron adicionalmente varias veces con la solución de lavado, posteriormente se añadió una solución TMB (100 μ l, KPL) a cada pocillo, y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió 1 mol/l de ácido clorhídrico (100 μ l) para terminar la reacción, y se midió la absorbancia a 450 nm.

15

20

Se calculó la proporción de lisis para cada enzima a partir de una proporción de la absorbancia respecto a la del control positivo, de la cual la proporción de lisis se tomó como el 100 %. Una proporción de lisis del 5 % o superior se indica con +, y una menor del 5 % se indica con -. Los resultados se muestran en la tabla 2.

25

[Tabla 2]

Enzima lítica	<i>S. uberis</i>	<i>S. agalactiae</i>
Lisozima	+	+
Labiasa	+	+
Lisostafina	-	-
Acromopeptidasa	-	-
β -N-Acetilglucosaminidasa	-	+
Proteinasa K	-	-

Cada una de lisozima y labiasa provocó el efecto por sí mismo en ambas bacterias. La β -N-acetilglucosaminidasa provocó el efecto por sí misma sobre *S. agalactiae*.

30

Ejemplo 2:

Las bacterias se trataron de la misma manera que se ha descrito anteriormente con labiasa y lisozima a concentraciones finales de 0,5 mg/ml y 4,5 mg/ml, respectivamente, ajustadas con una mezcla de un tampón de citrato-fosfato Na y leche (la proporción de mezcla en volumen fue 1:1). Los resultados para la proporción de lisis calculados a partir de los resultados de ELISA se muestran en la figura 1. Se reveló que, cuando la lisozima o la labiasa se utilizaban solas, la actividad bacteriolítica era insuficiente para las bacterias *S. uberis* o *S. agalactiae*, pero si se utilizan en combinación como una mezcla en ciertos intervalos de concentración de las mismas, ambas bacterias pueden ser altamente lisadas de manera eficaz.

40

Ejemplo 3: preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Se preparó un dispositivo inmunocromatográfico tal como sigue.

(a) Miembro impregnado de anticuerpo marcado con oro coloidal

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

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

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

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

30 (c) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

Se muestra en la figura 2 una vista en sección del dispositivo inmunocromatográfico. Además del miembro 1 impregnado de anticuerpo marcado mencionado anteriormente y el soporte de membrana 2 para el revelado cromatográfico, se adhirieron entre sí GF/DVA de 25 mm (miembro de filtro 4 que tiene un espesor de 776 µm y que consiste en fibras de vidrio, tamaño de retención de partícula de 3,5 µm, GE Healthcare Bioscience) y GF/AVA de 20 mm (miembro de filtro 7 que tiene un espesor de 299 µm y que consiste en fibras de vidrio, tamaño de retención de partícula 1,7 µm, GE Healthcare Bioscience) como un miembro que sirve tanto de miembro para la adición de la muestra como de miembro para la eliminación de glóbulos de grasa (tercera parte), y se preparó adicionalmente papel de filtro como el miembro 5 para absorción. Después de que estos miembros se adhirieran a un sustrato 6 (espesor de 254 µm, fabricado de poliestireno, con adhesivo para adherir los miembros), se cortaron con una anchura de 5 mm para preparar el dispositivo inmunocromatográfico.

45 Ejemplo 4: evaluación de la actividad bacteriolítica mediante inmunocromatografía 1

La medición de la leche de vaca utilizando el dispositivo inmunocromatográfico se realizó de la siguiente manera. Se colocó leche (300 µl) que contenía *Streptococcus uberis* a una concentración final de 1×10^5 (UFC/ml) en un microtubo, se añadieron 500 µl de una solución de tratamiento de lisis a la leche y el tratamiento se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como leche de vaca, se utilizó la leche comercializada para beber. El dispositivo inmunocromatográfico mencionado anteriormente se sumergió en la solución mixta anterior desde el miembro 4 para la adición de muestra, se permitió el revelado cromatográfico dejando el dispositivo en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, y posteriormente para determinar la presencia o ausencia de captura del complejo de antígeno de la proteína ribosómica L7/L12 y el anticuerpo marcado con oro coloidal por la parte 3 mencionada anteriormente para la captura, se midió la intensidad de una línea púrpura rojiza que se volvió más o menos visible en proporción a la cantidad de captura. Las proporciones de lisis observadas en diversas condiciones se muestran en la tabla 3.

[Tabla 3]

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Ejemplo comparativo 3
Enzima 1	Labiase 0,25 mg/ml	Labiase 0,25 mg/ml	Labiase 0,25 mg/ml	Lisozima 5 mg/ml
Enzima 2	Ninguna	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Acromopeptidasa 4 mg/ml

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Ejemplo comparativo 3
Surfactante 1 (concentración final, % p/p)	0,6 % de Triton X-100	0,6 % de Triton X-100	0,6 % de Triton X-100	0,2 % de N-lauroil sarcosinato de sodio
Surfactante 2 (concentración final, % p/p)	Ninguno	Ninguno	0,6 % de Tween 20	0,2 % de Brij 58
Proporción de lisis para <i>S. uberis</i>	35,0	48,0	56,1	1,5

Se reveló que, en comparación con la condición 1, en la que solo se utilizó labiasa, la proporción de lisis mejoró con la condición 2, en la que se utilizó lisozima en combinación, y la condición 3, en la que se añadió además Tween 20 (éster de ácido graso de sorbitán polioxietilenado) como surfactante. Además, cuando se volvió a poner a prueba la condición descrita en el documento no de patente 1 (ejemplo comparativo 3), se observó una baja proporción de lisis.

Ejemplo 5: evaluación de la actividad bacteriolítica mediante inmunocromatografía 2

- 10 Se evaluó la cantidad de adición de lisozima utilizada en combinación con labiasa, utilizando el mismo procedimiento que el utilizado en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 4. Se confirmó que la adición de la cantidad apropiada de lisozima mejora la proporción de lisis.

[Tabla 4]

	Condición 3	Condición 4	Condición 5	Ejemplo comparativo 9
Enzima 1	Labiasa 0,25 mg/ml			
Enzima 2	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 1,25 mg/ml	Lisozima 3 mg/ml	Lisozima 6,25 mg/ml
Surfactante 1 (concentración final, %p/p)	1 % de Triton X-100			
Surfactante 2 (concentración final, %p/p)	1,3 % de Tween 20			
Proporción de lisis para <i>S. uberis</i>	56,1	62,2	67,3	15 (flujo deficiente del líquido de ensayo)

- 15 Ejemplo 6: evaluación de la concentración de surfactante mediante inmunocromatografía.

Se evaluó la concentración de surfactantes utilizando el mismo procedimiento que el utilizado en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 5. Se reveló que, si las cantidades de adición de Triton X-100 y Tween 20 son apropiadas, la proporción de lisis se mejora aún más.

[Tabla 5]

	Condición 3	Condición 6	Condición 7	Condición 8	Condición 9	Condición 10	Ejemplo comparativo 7	Ejemplo comparativo 8
Enzima 1	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml	Labiasa 0,25 mg/ml
Enzima 2	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml	Lisozima 0,75 mg/ml
Surfactante 1 (concentración final, % p/p)	0,6 % de Triton X-100			1 % de Triton X-100		1,3 % de Triton X-100	1 % de Triton X-100	2,5 % de Triton X-100
Surfactante 2 (concentración final, % p/p)	0,6 % de Tween 20	1 % de Tween 20	1,3 % de Tween 20	1 % de Tween 20	1,3 % de Tween 20	1,3 % de Tween 20	2,5 % de Tween 20	2,5 % de Tween 20
Proporción de lisis de <i>S. uberis</i>	56,1	70,4	69,8	60,9	62,6	83,5	44,6	38,4

Ejemplo 7: Sensibilidad de detección para células vivas contenidas en la leche

- 25 Las muestras preparadas mediante la adición de *Streptococcus uberis* a diversas concentraciones a la leche se trataron con los agentes de lisis de las condiciones 1 y 10, y la medición se realizó por inmunocromatografía. Se examinó visualmente una línea violeta rojiza (fuertemente positiva ++, positiva +, negativa -).

[Tabla 6]

Número de bacterias UFC/ml	Condición 1	Condición 10
1 x 10 ⁴	-	+
2 x 10 ⁴	-	+
5 x 10 ⁴	+	+
1 x 10 ⁵	+	++

Ejemplo 8: mejora de la proporción de lisis con aditivos

- 5 Se evaluaron las proporciones de lisis obtenibles con los agentes de lisis de la condición 9 mencionada en el ejemplo 6 y que contienen además diversos aditivos. Los resultados se muestran en la tabla 7.

[Tabla 7]

	Condición 9	Condición 11	Condición 12	Condición 13	Condición 14	Condición 15	Condición 16
Enzima	Labiase 0,25 mg/ml, Liozima 0,75 mg/ml						
Surfactante	1 % de Triton X-100, 1,3 % de Tween 20						
Aditivo	Ninguno	NaCl 50 mM	Tiocianato de guanidina 50 mM	Ácido decanoico 10 mM	Monocaprilina 0,1 mM	EDTA 1 mM	EGTA 1 mM
Proporción de lisis	62,6 %	71,7 %	85,4 %	89,2 %	91,2 %	91,1 %	92,4 %
* Monocaprilina: 1-monooctanoilglicerol, Tokyo Chemical Industry							

- 10 Aplicabilidad industrial

La presente invención se puede utilizar para el diagnóstico rápido de mastitis de animales de ganadería basándose en el procedimiento inmunocromatográfico, o similares.

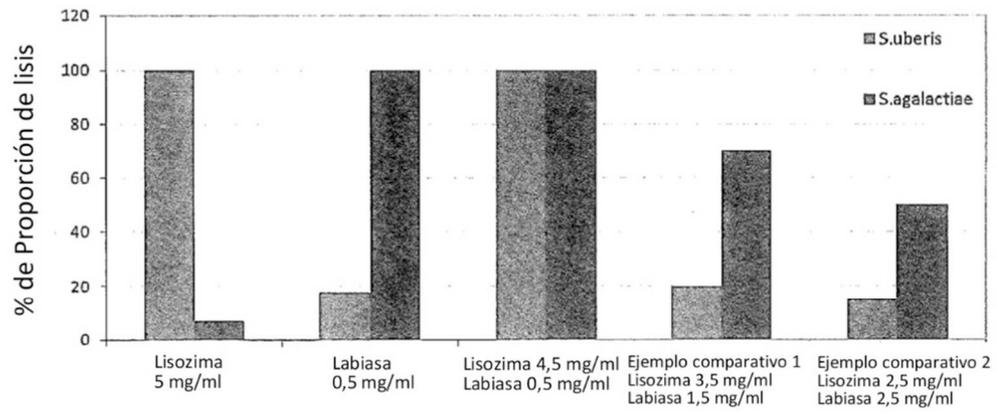
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para lisar una bacteria *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae* contenida en la leche, que comprende
- 5 la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico con la leche para lisar la bacteria existente en la leche,
2. Procedimiento de lisis, según la reivindicación 1, en el que el surfactante no iónico comprende un alquilfenil éter polioxietileno y/o un éster de ácido graso de sorbitán polioxietileno.
- 10 3. Procedimiento de lisis, según la reivindicación 1 o 2, en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final de lisozima no es inferior a 0,5 mg/ml ni superior a 200 mg/ml; y/o
- 15 en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final de labiasa no es inferior a 0,05 mg/ml ni superior a 20 mg/ml.
4. Procedimiento para detectar una bacteria de *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae* contenida en la leche, que comprende:
- 20 1. la etapa de mezclar el agente de lisis que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico con la leche para lisar la bacteria existente en la leche,
2. la etapa de eliminar los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche utilizando material que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, y
- 25 3. la etapa de detectar una sustancia específica derivada del interior de la célula bacteriana y liberada por la lisis; en el que
- las etapas se realizan en el orden de 1, 2 y 3; y las etapas 2 y 3 se realizan mediante un procedimiento inmunocromatográfico.
- 30 5. Procedimiento de detección, según la reivindicación 4, en el que el surfactante no iónico comprende un alquilfenil éter polioxietileno y/o un éster de ácido graso de sorbitán polioxietileno.
6. Procedimiento de detección, según la reivindicación 4 o 5, en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03 % ni superior al 3 %.
- 35 7. Procedimiento de detección, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final de la lisozima no es inferior a 0,5 mg/ml ni superior a 200 mg/ml; y/o
- 40 en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar la bacteria existente en la leche, la concentración final de labiasa no es inferior a 0,05 mg/ml ni superior a 20 mg/ml;
8. Procedimiento de detección, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el procedimiento inmunocromatográfico comprende (1) la etapa de poner en contacto la leche que contiene la sustancia específica con una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta aguas abajo de la primera parte, en la que se inmoviliza un segundo anticuerpo dirigido a la sustancia específica, y una tercera parte dispuesta aguas arriba de la primera parte o la segunda parte y que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, en la tercera parte o una parte existente aguas arriba de la misma, y (2) la etapa de hacer fluir la leche hasta la segunda parte o una parte existente aguas abajo de la misma para obtener una señal detectable del marcador en la segunda parte o una parte existente aguas abajo de la misma.
- 45 9. Procedimiento de detección, según la reivindicación 8, en el que el primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica es retenido en la primera parte.
- 55 10. Procedimiento de detección, según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que la tercera parte está constituida por dos o más tipos de miembros que tienen poros que pueden eliminar glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partículas, respectivamente.
- 60 11. Procedimiento de detección, según la reivindicación 10, en el que la tercera parte está constituida por un primer miembro dispuesto aguas abajo y un segundo miembro dispuesto aguas arriba, y el tamaño de retención de partícula del segundo miembro es mayor que el tamaño de retención de partícula del primer miembro.
- 65 12. Utilización de un agente de lisis que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico, para lisar una bacteria de *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae* contenida en la leche.

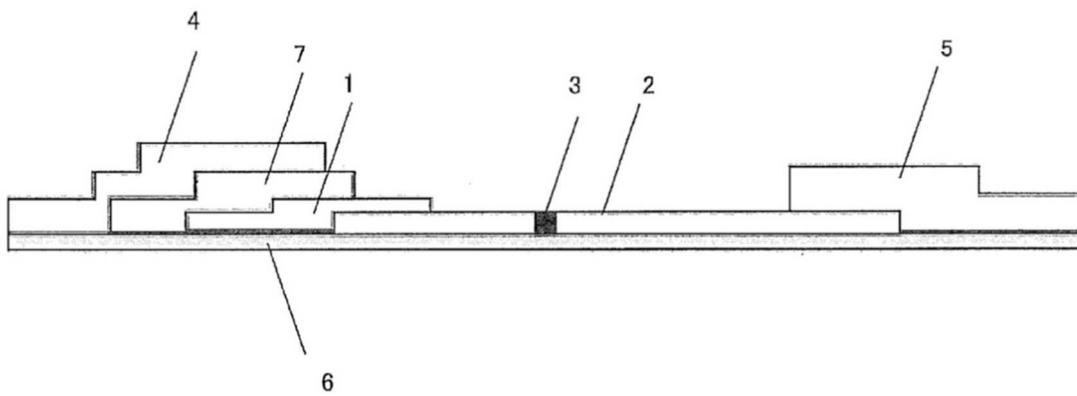
13. Utilización de un agente de lisis, que contiene lisozima, labiasa y un surfactante no iónico, en un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de mastitis en un animal de ganadería mediante la detección de *Streptococcus uberis* o *Streptococcus agalactiae* contenidos en la leche.

5

[Fig. 1]



[Fig. 2]



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10
- JP 1244370 A
 - JP 2012122921 A
 - WO 0006603 A

Literatura no patente citada en la descripción

- *Microbiol. Immunol.*, 2009, vol. 53, 45-48
- **ONGOL MP et al.** *Food Research International*, 2009, vol. 42 (8), 893-898
- **SENTITULA et al.** *Indian Journal of Microbiology*, 2012, vol. 52 (2), 153-159