

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 174**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/06** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/JP2014/083460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093545**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14870998 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3085769**

54 Título: **Procedimiento para detectar bacterias coliformes contenidas en la leche**

30 Prioridad:

**18.12.2013 JP 2013261824**

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

**15.10.2020**

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
1-1-2 Yurakucho, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-0006 , JP**

72 Inventor/es:

**MAEHANA, KOJI y  
MATSUYAMA, KENJI**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 787 174 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 coliformes contenidas en la leche

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de lisis y un procedimiento de detección para detectar bacterias coliformes, que son bacterias causales de 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 de leche, 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, las bacterias coliformes, cuyos ejemplos típicos son *Escherichia coli* y *Klebsiella*, causan síntomas sistémicos tales como pirexia y síntomas locales tales como sensación de calor, hinchazón e induración de la ubre.

30

Como procedimiento para detectar bacterias coliformes 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 cuanto a la detección de bacterias basada en una reacción antígeno-anticuerpo, cuando un ingrediente contenido en las células bacterianas es una diana de la detección, también se han examinado procedimientos para lisar células bacterianas y detectar un ingrediente de las mismas. Por ejemplo, se da a conocer un procedimiento para medir el recuento de células microbianas, permitiendo que una enzima de un microorganismo actúe sobre una sustancia no fluorescente para generar una sustancia fluorescente, y midiendo esta sustancia fluorescente, en el que se añade un agente para lisar las membranas celulares del microorganismo solo, o lisozima y el agente de lisis de la membrana celular (documento de patente 3). Además, como procedimiento para detectar múltiples tipos de microorganismos, se da a conocer un procedimiento para utilizar un tratamiento con una enzima lítica y/o una bacteriocina que tiene una actividad bacteriolítica, un surfactante y un desnaturalizante de proteínas (documento de patente 4). El documento de patente 3 describe la utilización de un sobrenadante obtenido por centrifugación de una muestra homogeneizada de alimento. El documento de patente 4 describe la utilización de la suspensión celular cultivada, pero no describe que los efectos de la lisis se puedan obtener en una solución con alto contenido de proteínas y grasas, tal como la leche.

50

Referencias del estado de la técnica anterior

60 Documentos de patente

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

Documento de patente 3: Publicación no examinada de patente japonesa (KOKAI) No. 63-167799

65 Documento de patente 4: Publicación de Patente Internacional WO2005/064016 (Patente Japonesa No. 4621919)

Documento de Patente 5: Publicación no examinada de patente japonesa (KOKAI) No. 7-196463

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Comp. Immun. Microbiol Infect. Dis., Vol. 6, No. 3, págs. 235-245, 1983

La Patente US 2010/099115 A1 enseña sistemas y procedimientos para preparar y analizar muestras, por ejemplo, muestras de mucosa, para un microorganismo de interés, incluida la detección de uno o más analitos característicos de un microorganismo de interés mediante un procedimiento inmunocromatográfico que utiliza un dispositivo inmunocromatográfico, tal como el que se da a conocer en la misma.

La Patente JP 2010-154851 A da a conocer un agente de extracción de proteínas que es un agente lítico para extraer una proteína a partir de un microorganismo y que contiene un surfactante catiónico (A) cuyo contraión es un anión carboxilato (a) y un surfactante no iónico (B) que tiene un HLB de 9-13,5, y su utilización en un procedimiento de producción de la proteína.

La Patente JP 2012-122921 A da a conocer un procedimiento inmunocromatográfico y un aparato de inmunocromatografía para detectar una sustancia en la leche de un animal doméstico, mediante la utilización de una reacción antígeno-anticuerpo.

La Patente WO 01/07599 A1 da a conocer un proceso para purificar ADN plasmídico de células procariotas.

Características de la invención

Objetivo a conseguir por la invención

La mastitis está causada por la infección de diversos microorganismos y, por lo tanto, los antibióticos que exhiben eficacia contra la mastitis pueden diferir según el tipo de microorganismo causal. Además, cuando la mastitis está causada por ciertos tipos específicos de bacterias, se pueden transmitir a otras mamas del individuo o a otros individuos y, por lo tanto, es extremadamente importante identificar de manera rápida, conveniente y altamente sensible las bacterias causales existentes en la leche. Especialmente, en cuanto a las bacterias coliformes, que muestran una mayor tasa de proliferación en comparación con las bacterias grampositivas y por lo tanto desarrollan fácilmente una infección más grave, causan mastitis muy aguda y a menudo provocan incluso la muerte, es extremadamente importante descubrirlas y realizar el tratamiento en una etapa temprana de infección para prevenir el daño de la mastitis.

Los procedimientos basados en cultivo, ampliamente utilizados, tales como los 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 inmunocromatográfico, tienen la ventaja de que permiten una detección más rápida y conveniente de bacterias causales en comparación con los procedimientos basados en cultivo.

Para detectar de manera altamente sensible una sustancia específica contenida en las células de una bacteria causal mediante un procedimiento de medición inmunológica, es necesario lisar las células de manera muy eficiente para liberar antígenos en el interior de las células hacia el exterior de las células. Sin embargo, se ha revelado que cuando se utiliza leche como muestra de ensayo, las técnicas convencionales no pueden proporcionar una lisis suficiente, debido a la influencia de proteínas, tales como la caseína, los glóbulos de grasa láctea y demás contenidos en la leche en grandes cantidades. Por lo tanto, se ha deseado un procedimiento para lisar de manera altamente eficiente las bacterias coliformes en la leche para la detección altamente sensible de bacterias causales de mastitis. Sin embargo, no se conoce ningún procedimiento eficaz de lisis para detectar bacterias coliformes contenidas en la leche.

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento de lisis, un procedimiento de detección que utiliza un dispositivo inmunocromatográfico y una utilización in vitro de un kit de detección que comprende un dispositivo inmunocromatográfico para detectar si las bacterias causales de mastitis son bacterias coliformes o no, mediante la utilización de leche de un animal de ganadería.

Medios para conseguir el objetivo

Los inventores de la presente invención consideraron que, para detectar con gran sensibilidad las bacterias coliformes en la leche, que tiene un alto contenido de proteínas y grasas, y muestra diferencias individuales, es necesario extraer de manera muy eficiente los antígenos diana contenidos en las células, y descubrieron que al utilizar simultáneamente una enzima lítica y una pluralidad de tipos de surfactantes para lisar bacterias coliformes contenidas en la leche de manera muy eficiente, se mejora la eficacia de la lisis, y se pueden detectar las bacterias coliformes contenidas en la leche de manera muy sensible. En particular, se sabe que, si se utiliza la lisozima como enzima lítica en combinación con un surfactante aniónico, especialmente laurilsulfato de sodio (dodecilsulfato de sodio), la lisozima pierde su actividad enzimática (documento de patente 5, mencionado anteriormente). Sin

embargo, como resultado de las investigaciones de los inventores de la presente invención, se descubrió que, si se utiliza un surfactante aniónico a una concentración dentro de un intervalo apropiado, por el contrario, la proporción de lisis mejora notablemente, y se pueden detectar las bacterias coliformes contenidas en la leche de manera muy sensible, y llevaron a cabo la presente invención.

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

10 [1] Un procedimiento para lisar bacterias coliformes contenidas en la leche, que comprende la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico con la leche para lisar las bacterias coliformes existentes en la leche,

en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar las bacterias existentes en la leche, la concentración final del surfactante aniónico no es inferior al 0,01 % ni superior al 0,15 %.

[2] El procedimiento de lisis, según el punto [1], en el que el surfactante aniónico comprende un sulfato de alquilo; y/o el surfactante no iónico comprende un alquilfeniléter polioxietilenado.

15 [3] El procedimiento de lisis, según el punto [1] o [2], en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar las bacterias existentes en la leche, la concentración final de lisozima no es inferior a 0,1 mg/ml ni superior a 200 mg/ml; y/o en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar las bacterias existentes en la leche, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03 % ni superior al 10 %.

20 [4] Un procedimiento para detectar bacterias coliformes contenidas en la leche, que comprende:

1. la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico con la leche para lisar las bacterias coliformes existentes en la leche, la concentración final del surfactante aniónico no es inferior al 0,01 % ni superior al 0,15 %.

25 2. la etapa de eliminar los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche utilizando un material que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, y

3. la etapa de detectar una sustancia específica derivada del interior de las bacterias coliformes y liberada mediante la lisis;

en el que

30 las etapas se llevan a cabo en el orden de 1, 2 y 3; y las etapas 2 y 3 se llevan a cabo mediante un procedimiento inmunocromatográfico.

[5] El procedimiento, según el punto [4], en el que el surfactante aniónico comprende un sulfato de alquilo, y/o el surfactante no iónico comprende un alquilfeniléter polioxietilenado.

35 [6] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [4] a [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 hasta 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.

40 [7] El procedimiento, según el punto [6], en el que el primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica es retenida en la primera parte.

[8] El procedimiento, según el punto [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 partícula, respectivamente.

50 [9] El procedimiento, 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 in vitro de un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico para el diagnóstico de la mastitis en un animal de ganadería.

55 [11] Utilización in vitro de un kit, que comprende :

un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico, y un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta 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, para el diagnóstico de la mastitis en un animal de ganadería.

## Efecto de la invención

Según la presente invención, las bacterias coliformes contenidas en la leche se pueden detectar de manera rápida, conveniente y altamente sensible en el acto. En particular, en el caso del diagnóstico de mastitis de vaca, si se utiliza un marcador reconocible visualmente, el diagnóstico se puede realizar en una granja lechera sin utilizar ningún aparato, etc., de modo que se pueda especificar rápidamente una bacteria causal antes de un mayor empeoramiento de las condiciones de la patología, y se pueden determinar las políticas de tratamiento apropiadas, tales como la selección de antibióticos adecuados, y las contramedidas para prevenir la expansión de la infección en una etapa temprana.

## Descripción breve de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra una vista, en sección esquemática, de la tira reactiva del dispositivo inmunocromatográfico utilizado en el ejemplo 2, 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).

[Figura 2] La figura 2 muestra el efecto del dodecilsulfato de sodio (SDS, de *Sodium Dodecyl Sulfate*) en presencia de lisozima y un surfactante no iónico en la detección de *Escherichia coli* mediante un procedimiento inmunocromatográfico.

[Figura 3] La figura 3 muestra el efecto del dodecilsulfato de sodio (SDS) en presencia de una enzima lítica y un surfactante no iónico en la detección de *Escherichia coli* mediante un procedimiento inmunocromatográfico.

## Modos para llevar a cabo la invención

A continuación, la presente invención se explicará con más detalle. En la presente invención, cuando un intervalo de valores numéricos se representa como "de 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.

Un agente de lisis para lisar bacterias coliformes contenidas en la leche contiene una enzima lítica y surfactantes específicos.

## [Enzima lítica]

En cuanto a la bacteria causal de la mastitis, la infección por *Escherichia coli*, bacteria *Klebsiella* o *Staphylococcus aureus* ocurre con frecuencia y, por lo tanto, es preferente también utilizar uno o dos o más tipos de enzimas líticas que puedan mostrar una acción bacteriolítica en combinación con estos microorganismos. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o dos o más tipos de enzimas líticas seleccionadas entre lisozima, lisostafina, pepsina, glucosidasa, galactosidasa, acromopeptidasa,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, etc.

Cuando se sospecha especialmente la presencia de bacterias coliformes como las bacterias causales de la mastitis, puede ser preferente utilizar una enzima lítica que exhiba específicamente una acción bacteriolítica contra las bacterias coliformes, sola o en combinación con otra enzima lítica. Por ejemplo, se ha propuesto un procedimiento para utilizar la lisozima como enzima lítica y un agente de lisis de la membrana celular (Publicación de patente japonesa no examinada (KOKAI) N° 63-167799).

La lisozima es una proteína que consiste en un péptido único de 14,6 kDa, y puede lisar las células de las bacterias al escindir el enlace glucosídico  $\beta(1-4)$  entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina en la capa de peptidoglucano. La lisozima se puede obtener comprando un producto comercial.

El contenido de la enzima lítica en el agente de lisis (cuando se utilizan dos o más tipos de enzimas líticas, es el contenido como la cantidad total de enzimas líticas) no está particularmente limitado, siempre que se asegure una proporción de lisis eficaz para la detección. Sin embargo, el contenido se puede determinar de modo que la concentración final de la enzima lítica en la mezcla con la leche sea de 0,1 mg/ml o superior, preferentemente, 0,2 mg/ml o superior, más preferentemente, 0,5 mg/ml o superior, más preferentemente, 1,0 mg/ml o superior, de manera particularmente preferente, 2,0 mg/ml o superior, en términos de lisozima. En cuanto al límite superior del contenido de la enzima lítica, el contenido se puede determinar, según sea necesario, desde el punto de vista económico, o similar e, independientemente de cómo se defina el límite inferior, puede ser de 200 mg/ml o inferior, preferentemente, 100 mg/ml o inferior, más preferentemente, 75 mg/ml o inferior, más preferentemente, 50 mg/ml o inferior, de manera particularmente preferente, 25 mg/ml o inferior.

## [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 anfóptico.

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

Los tipos de surfactantes a utilizar no están particularmente limitados. Como el surfactante no iónico, preferentemente, se puede utilizar cualquiera de los de tipo éster éter, tipo éster y tipo éter. Más específicamente, entre los ejemplos se incluyen alquileteres polioxietilenados, alquilfeniléteres polioxietilenados, ésteres de sorbitán de ácidos grasos, alquilpoliglucósidos, dietanolamidas de ácidos grasos, alquilmonogliceriléteres, etc. Entre los ejemplos especialmente preferentes se incluyen alquilfeniléteres polioxietilenados, más específicamente octilfeniléter polioxietilenado (10), etcétera. Se ha confirmado que los alquilfeniléteres polioxietilenados, tales como el octilfeniléter polioxietilenado (10), se pueden utilizar eficazmente también en el procedimiento inmunocromatográfico.

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 se puede determinar de modo que la concentración final del surfactante no iónico en la mezcla con leche sea del 0,03 % o superior, preferentemente, del 0,05 % o superior, más preferentemente, del 0,075 % o superior, más preferentemente, del 0,1 % o superior, de manera particularmente preferente, del 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, del 7,5 % o inferior, más preferentemente, del 5 % o inferior, aún más preferentemente, del 3 % o inferior, de manera particularmente preferente, del 2 % o inferior.

Entre los ejemplos del surfactante aniónico se incluyen alquilsulfatos de sodio, tales como dodecilsulfato de sodio y miristilsulfato de sodio, N-acilsarcosinatos de sodio, tales como N-lauroilsarcosinato de sodio y N-miristoilsarcosinato de sodio, dodecylbencenosulfonato de sodio, sulfato monosódico de monoglicérido de ácidos grasos de coco hidrogenados, y N-acilglutamatos de sodio, tales como N-palmitoilglutamato de sodio, N-metil-N-acilalanina de sodio y  $\alpha$ -olefinsulfonatos de sodio, etc., pero el surfactante aniónico no está particularmente limitado.

El contenido del surfactante aniónico en el agente de lisis (cuando se utilizan dos o más tipos de surfactantes aniónicos, es el contenido como la cantidad total de surfactantes aniónicos) es del 0,01 % o superior, pero en cualquier caso, del 0,15 % o inferior.

Entre los ejemplos del surfactante anfóptico se incluyen los del tipo aminoácido (sales alquiloamónicas de ácido graso), del tipo de betaína (alquilbetaínas), del tipo de 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, laurilbetaína y amidopropilbetaína. 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, 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).

Como surfactante catiónico, se puede utilizar, preferentemente, cualquiera de los tipos de sal de amina y 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.

## [Ejemplo de composición]

En una de las realizaciones más preferentes, el agente de lisis comprende lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico. Para el agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico, entre los ejemplos preferentes del surfactante no iónico se incluyen alquilfeniléteres polioxietilenados. Las 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 0,1 mg/ml ni superior a 200 mg/ml, la concentración final del surfactante aniónico no sea inferior al 0,01 % ni superior al 0,15 %, y la concentración final del surfactante no iónico no sea inferior al 0,03 % ni superior al 10 %.

## [Otros ingredientes]

El agente de lisis de la presente invención puede contener, además de la enzima lítica y el surfactante, uno o más tipos de otros ingredientes, siempre que el efecto pretendido no se degrade notablemente. Entre los ejemplos preferentes de los ingredientes distintos de la enzima lítica y el surfactante se incluyen una sustancia que tenga el efecto de promover la lisis. Entre los ejemplos específicos se incluyen glutaraldehído, compuestos halogenados, 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 y sus sales, alcoholes polihídricos (por ejemplo, etilenglicol, propilenglicol, dietilenglicol y glicerina) y agentes reductores, tales como 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, cistina y tiofenol, pero sin que constituyan limitación.

## [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 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, se reducen las influencias de los glóbulos de grasa y las proteínas contenidas en la leche y, por lo tanto, se puede esperar que las células se puedan detectar en un tiempo más corto. Desde el punto de vista de que una 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, del 5 % o superior, preferentemente, del 10 % o superior, más preferentemente, del 20 % o superior, más preferentemente, del 30 % o superior, independientemente de las otras condiciones. En cuanto al límite superior de la proporción, si se utiliza el agente de lisis solidificado 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 del 90 % o inferior, del 80 % o inferior, del 70 % o inferior, del 60 % o inferior, o del 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 una 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, generalmente, la temperatura 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 enzima lítica y surfactante apropiados para bacterias coliformes, el tiempo de tratamiento puede acortarse notablemente en comparación con un caso en el que solo se utiliza una enzima lítica. En la presente invención, el tiempo de tratamiento es generalmente de varias decenas de minutos a varias horas, y más específicamente, puede ser 120 minutos o inferior, preferentemente, 60 minutos o inferior, más preferentemente, 45 minutos o inferior, más preferentemente, 25 minutos o inferior, aún más preferentemente, 20 minutos o inferior, aún más preferentemente, 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). Según la presente invención, incluso mediante el tratamiento durante un tiempo tan corto, se asegura una proporción de lisis del 90 % o superior, y se pueden detectar bacterias coliformes con elevada sensibilidad.

Según las investigaciones de los inventores de la presente invención, se podría confirmar que, con las condiciones descritas en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, se puede conseguir una proporción de lisis del 100 % tratando la leche que contiene, aproximadamente,  $1 \times 10^5$  células/ml de *Escherichia coli* con un agente de lisis durante, aproximadamente, 10 minutos según el procedimiento de la reivindicación 1. En cuanto a la base de la proporción de lisis, la proporción de lisis observada para una suspensión de una bacteria diana sometida a un tratamiento preliminar con un surfactante no iónico de una concentración adecuada, y posteriormente sometida a ultrasonidos, y un tratamiento enzimático suficiente, según sea necesario, se puede definir como del 100 %.

## [Medios de detección]

Las bacterias coliformes lisadas, según la presente invención, se pueden detectar mediante diversos tipos de procedimientos inmunológicos utilizando un ingrediente de células bacterianas como antígeno. Entre los ejemplos del procedimiento de medición inmunológica se incluyen, por ejemplo, procedimiento inmunocromatográfico, procedimiento de reacción de aglutinación, inmunoensayo enzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), fluoroinmunoensayo (FIA), etc., pero sin que constituyan limitación.

En el momento de realizar los procedimientos inmunológicos, se puede utilizar una sustancia de bloqueo, para prevenir la adsorción no específica, o una sustancia para prevenir la reacción cruzada con bacterias distintas de 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

5 puede añadir en una cantidad de 0,01 µg/ml o mayor, preferentemente, 0,1 µg/ml o mayor, más preferentemente, 1 µg/ml o mayor, 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.

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

10 [Procedimiento inmunocromatográfico y dispositivo inmunocromatográfico]

15 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.

20 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.

25 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 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).

35 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.

40 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.

45 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.

50 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  $\mu\text{m}$ , 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.

5 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 adheridos 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  
10 glóbulos de grasa láctea de diferentes tamaños de partícula constituye una realización preferente de la presente invención, y en una realización más preferente de la presente invención, 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  $\mu\text{m}$ , y el tamaño de retención de partícula del segundo miembro dispuesto aguas arriba sea de 3,0 a 3,5  $\mu\text{m}$ . 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.  
25 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.

30 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.

40 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  $\mu\text{m}$ , más preferentemente, desde 5 nm hasta 1  $\mu\text{m}$ , aún más preferentemente, desde 10 nm hasta 100 nm, de diámetro.

#### [Objetivo de detección]

50 Según la presente invención, se pueden detectar bacterias coliformes contenidas en la leche. El término "bacterias coliformes" utilizado en la presente invención, se refiere a bacterias que incluyen *Escherichia coli*, bacterias *Klebsiella*, bacterias *Citrobacter*, bacterias *Enterobacter* y bacterias *Proteus*, a menos que se indique especialmente. Entre las bacterias *Klebsiella* se incluyen *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Según la presente invención, se pueden detectar las bacterias coliformes contenidas en la leche obtenida de un animal de ganadería, tal como la vaca, tal como está, conteniendo una concentración elevada de glóbulos de grasa y proteínas, utilizando el agente de lisis que contiene la enzima lítica y el surfactante formulados adecuadamente.

60 La sustancia específica medida en la presente invención 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. Tal como se describe en los ejemplos mencionados más adelante, un anticuerpo que puede reconocer una bacteria en particular que causa mastitis al distinguirla de otras bacterias a nivel de especie o género en realidad puede obtenerse mediante el procedimiento conocido que se describe a continuación. Los tipos de bacterias son bacterias coliformes, y entre los ejemplos se incluyen *Escherichia coli*, bacterias que pertenecen al género *Klebsiella*, etc.

## [Anticuerpo]

El anticuerpo mencionado anteriormente 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.

## [Otros]

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

El dispositivo inmunocromatográfico de la presente invención también se puede proporcionar como un kit que comprende un recipiente tal como un microtubo y una solución aditiva, por ejemplo, una solución aditiva que contiene una enzima lítica o un surfactante para lisar la bacteria para eluir la proteína ribosómica L7/L12 en la solución.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: efecto del dodecilsulfato de sodio (SDS) en presencia de lisozima y surfactante no iónico en la detección de *Escherichia coli* mediante el procedimiento inmunocromatográfico

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

Como el anticuerpo a marcar con oro coloidal, se utilizó el anticuerpo monoclonal para la proteína ribosómica L7/L12 de *Escherichia coli*. Según el procedimiento descrito en la Publicación de Patente internacional WO00/06603, ejemplo 5, se obtuvo la proteína ribosómica L7/L12 de *Escherichia coli*, y se prepararon anticuerpos monoclonales utilizando esta proteína. Entre los anticuerpos monoclonales, se seleccionó una combinación de dos tipos de

anticuerpos monoclonales (EC-1 y EC-2) que pueden unirse simultáneamente a diferentes sitios de la proteína ribosómica L7/L12 de la bacteria mencionada u otras bacterias coliformes.

(2) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico.

5 Se preparó un dispositivo inmunocromatográfico como sigue.  
(a) Miembro impregnado de anticuerpo marcado con oro coloidal

10 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 el anticuerpo monoclonal EC-2 (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 EC-2 marcado con oro coloidal (en adelante denominado "anticuerpo marcado con oro coloidal"). Esta solución se centrifugó (a 15.000 rpm durante 5 minutos) para precipitar el anticuerpo marcado con oro coloidal y 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).

25 (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).

30 Se aplicó una solución que contenía el anticuerpo monoclonal EC-1 (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 en el lado del punto de partida del revelado de la cromatografía, 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 toda la noche a temperatura ambiente para obtener una parte 3 para la captura del complejo del antígeno de la proteína ribosómica L7/L12 de *Escherichia coli* y el anticuerpo marcado con oro coloidal.

35 (c) Preparación del dispositivo inmunocromatográfico

40 En la figura 1 se muestra 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.

50 (3) Ensayo

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

55 La leche (100 µl) que contenía *Escherichia coli* (cepa ATCC 25922) o *Klebsiella pneumoniae* (cepa ATCC 13883), que es un tipo de especie de bacteria coliforme, a una concentración final de  $1 \times 10^5$  (ufc/ml) se colocó en un microtubo, se añadieron a la leche 150 µl de una solución de tratamiento de lisis (1 % (concentración final) de Triton X, 2,2 mg/ml de lisozima (título 0,8 mg de lisozima/mg de peso seco, Wako Pure Chemical Industries), MOPSO 0,1 M, pH 7,5) y se mezclaron en la misma a temperatura ambiente, y la mezcla resultante se dejó en reposo durante 10 minutos.

60 Como la leche de vaca, se utilizó la leche comercial para el consumo. 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 del 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 una línea púrpura rojiza que se volvió más o menos visible en proporción a la cantidad de captura mediante un aparato C10066 (Hamamatsu Photonics). La proporción de lisis para cada condición se calculó como una proporción relativa a la proporción de lisis observada en una suspensión celular que contenía Triton X-100 a una concentración final del 1,0 % que se había agitado de manera preliminar durante toda la noche, sometida a ultrasonidos (intensidad 10, 1 minuto x 10 veces) y posteriormente se sometió a un tratamiento de lisis a 37 °C durante 60 minutos con 2,2 mg/ml de lisozima, MOPSO 0,1 M, pH 7,5, cuya proporción de lisis se tomó como el 100 %. Se compararon los resultados de un caso en el que se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS) a una concentración final del 0,01 % a la solución de tratamiento de lisis mencionada anteriormente (condición 2) y un caso en el que no se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS) (condición 1).

Los resultados se muestran en la figura 2. Se reveló que la adición de dodecilsulfato de sodio (SDS) mejoró notablemente la proporción de lisis.

Ejemplo 2: efecto del dodecilsulfato de sodio (SDS) en presencia de enzima lítica y surfactante no iónico en la detección de *Escherichia coli* mediante procedimiento inmunocromatográfico

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

Se colocó leche (100 µl) que contenía *Escherichia coli* a una concentración final de  $1 \times 10^5$  (ufc/ml) en un microtubo, se añadieron 150 µl de una solución de tratamiento de lisis (1 % (concentración final) de Triton X-100, 2,2 mg/ml de lisozima, MOPSO 0,1 M, pH 7,5) a la leche y se mezclaron en la misma a temperatura ambiente, y la mezcla resultante se dejó en reposo durante 10 minutos. Como leche de vaca, se utilizó la leche comercial para beber. El dispositivo inmunocromatográfico mencionado anteriormente se sumergió en la solución mixta anterior desde el miembro 4 para la adición de la muestra, el revelado cromatográfico se realizó dejando el dispositivo en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, y posteriormente para determinar la presencia o ausencia de captura del complejo del 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 una línea púrpura rojiza que se volvió más o menos visible en proporción a la cantidad de captura mediante un aparato C10066 (Hamamatsu Photonics). Se añadió SDS a la solución de tratamiento de lisis a diversas concentraciones, y se calculó la proporción de lisis para cada concentración de SDS (del 0,01 al 0,15 % como la concentración final) como una proporción de lisis relativa a la proporción de lisis observada para la suspensión celular para la cual el tratamiento de lisis se realizó de antemano, de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1, que se tomó como el 100 %.

Los resultados se muestran en la figura 3. Se reveló que, dentro de un intervalo de concentración específico, la proporción de lisis mejoró notablemente con el aumento de la concentración de SDS.

Ejemplo 3: medición en muestra de leche mediante el procedimiento inmunocromatográfico.

Se realizó un procedimiento inmunocromatográfico para una muestra de leche obtenida de una vaca con mastitis. La medición se realizó de la misma manera que en el ejemplo 2, y se examinó visualmente la línea violeta rojiza que aparecía (positivo +, negativo -). Se compararon los resultados obtenidos con soluciones de tratamiento de lisis que contenían el 1 % (concentración final) de Triton X, MOPSO 0,1 M, pH 7,5 y 2,2 mg/ml de lisozima, y contenían SDS al 0,01 %, o no contenían el mismo (concentración final para ambos). Por separado, para confirmar el recuento de *Escherichia coli* en la leche, la cuantificación se realizó por PCR cuantitativa. El ADN genómico se extrajo de la leche (100 µl) utilizando el Mini Kit de ADN (Qiagen), y posteriormente se realizó la PCR utilizando la cuantificación de *Escherichia coli* (todas las cepas) (PrimerDesign) para cuantificar la cantidad de *Escherichia coli* contenida en la leche.

Los recuentos de *Escherichia coli* calculados por PCR y los resultados de determinación obtenidos mediante el procedimiento inmunocromatográfico se muestran en la tabla 1. La utilización de la solución de tratamiento de lisis que contenía lisozima y SDS permitió la detección de *Escherichia coli* en una cantidad que no se había podido medir hasta ahora. Dado que la cantidad de *Escherichia coli* contenida en la leche es  $10^6$  (células/ml) o superior en la mayoría de los casos, se reveló que la utilización de esta solución de tratamiento de lisis mejora notablemente la sensibilidad del diagnóstico.

[Tabla 1]

Número de muestra	Recuento de <i>Escherichia coli</i> (células/ml)	Resultado de la inmunocromatografía	
		Lisozima sin SDS	Lisozima con SDS
2	$3 \times 10^5$	-	+
13	$5 \times 10^5$	-	+
24	$1 \times 10^6$	-	+
35	$3 \times 10^6$	-	+
46	$4 \times 10^6$	-	+
57	$5 \times 10^6$	+	+

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para lisar bacterias coliformes contenidas en la leche, que comprende la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico con la leche para lisar las bacterias coliformes existentes en la leche,
- en el que, en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar las bacterias existentes en la leche, la concentración final del surfactante aniónico no es inferior al 0,01 % ni superior al 0,15 %.
- 10 2. Procedimiento de lisis, según la reivindicación 1, en el que el surfactante aniónico comprende un sulfato de alquilo; y/o
- el surfactante no iónico comprende un alquilfeniléter polioxietileno.
- 15 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 las bacterias existentes en la leche, la concentración final de lisozima no es inferior a 0,1 mg/ml ni superior a 200 mg/ml; y/o
- 20 en la etapa de mezclar el agente de lisis con la leche para lisar las bacterias existentes en la leche, la concentración final del surfactante no iónico no es inferior al 0,03 % ni superior al 10 %.
4. Procedimiento para detectar bacterias coliformes contenidas en la leche, que comprende:
- 25 1. la etapa de mezclar un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico con la leche para lisar las bacterias coliformes existentes en la leche, la concentración final del surfactante aniónico no es inferior al 0,01 % ni superior al 0,15 %.
2. la etapa de eliminar los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche utilizando un material que tiene poros que permiten la eliminación de los glóbulos de grasa láctea contenidos en la leche, y
- 30 3. la etapa de detectar una sustancia específica derivada del interior de las bacterias coliformes y liberada mediante la lisis;
- en el que
- 35 las etapas se llevan a cabo en el orden de 1, 2 y 3; y las etapas 2 y 3 se llevan a cabo mediante un procedimiento inmunocromatográfico.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el surfactante aniónico comprende un sulfato de alquilo, y/o
- 40 el surfactante no iónico comprende un alquilfeniléter polioxietileno.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 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 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 hasta 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 50 7. Procedimiento, según la reivindicación 6,
- en el que el primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica retiene retenida en la primera parte.
- 55 8. Procedimiento, según la reivindicación 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 partícula, respectivamente.
- 60 9. Procedimiento, según la reivindicación 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.
- 65 10. Utilización in vitro de un agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico para el diagnóstico de la mastitis en un animal de ganadería.

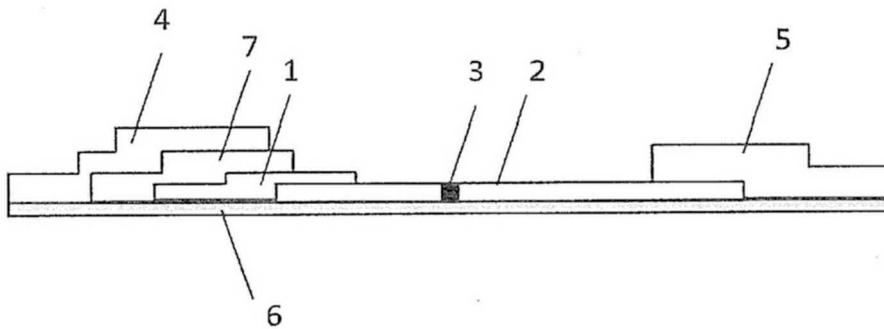
11. Utilización in vitro de un kit, que comprende :

un agente de lisis agente de lisis que contiene lisozima, un surfactante aniónico y un surfactante no iónico, y

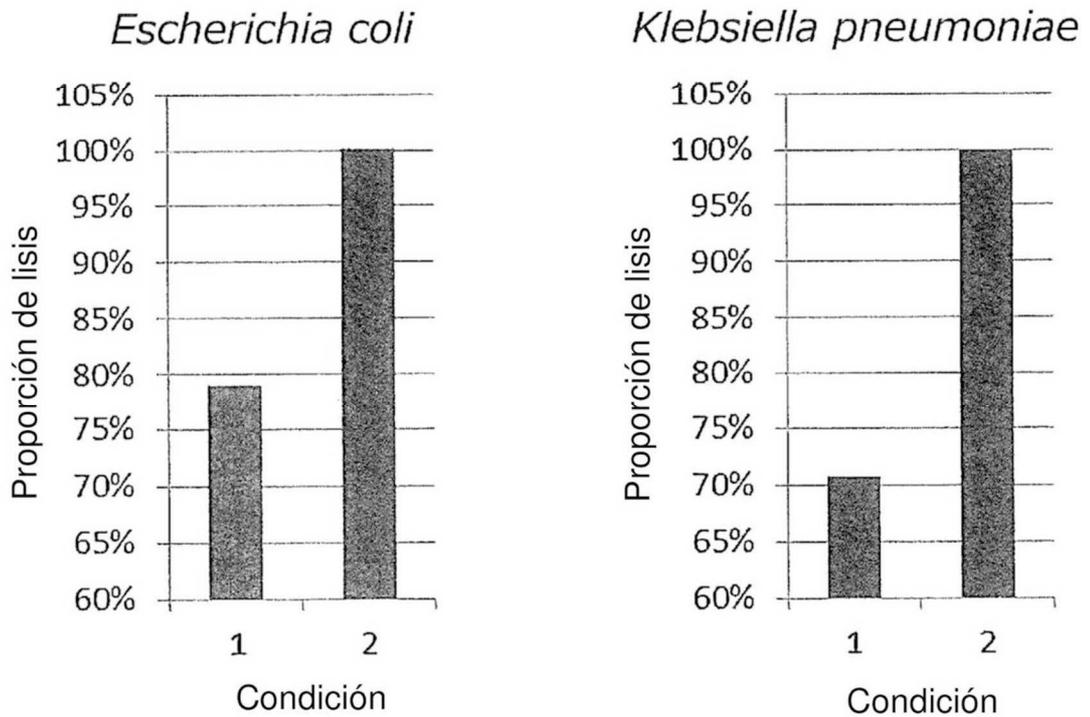
- 5 un dispositivo inmunocromatográfico para detectar una sustancia específica contenida en la leche, que comprende una tira reactiva que tiene una primera parte que retiene un primer anticuerpo marcado dirigido a la sustancia específica, o la sustancia específica que está marcada, una segunda parte dispuesta 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
- 10 grasa láctea contenidos en la leche,

para el diagnóstico de la mastitis en un animal de ganadería.

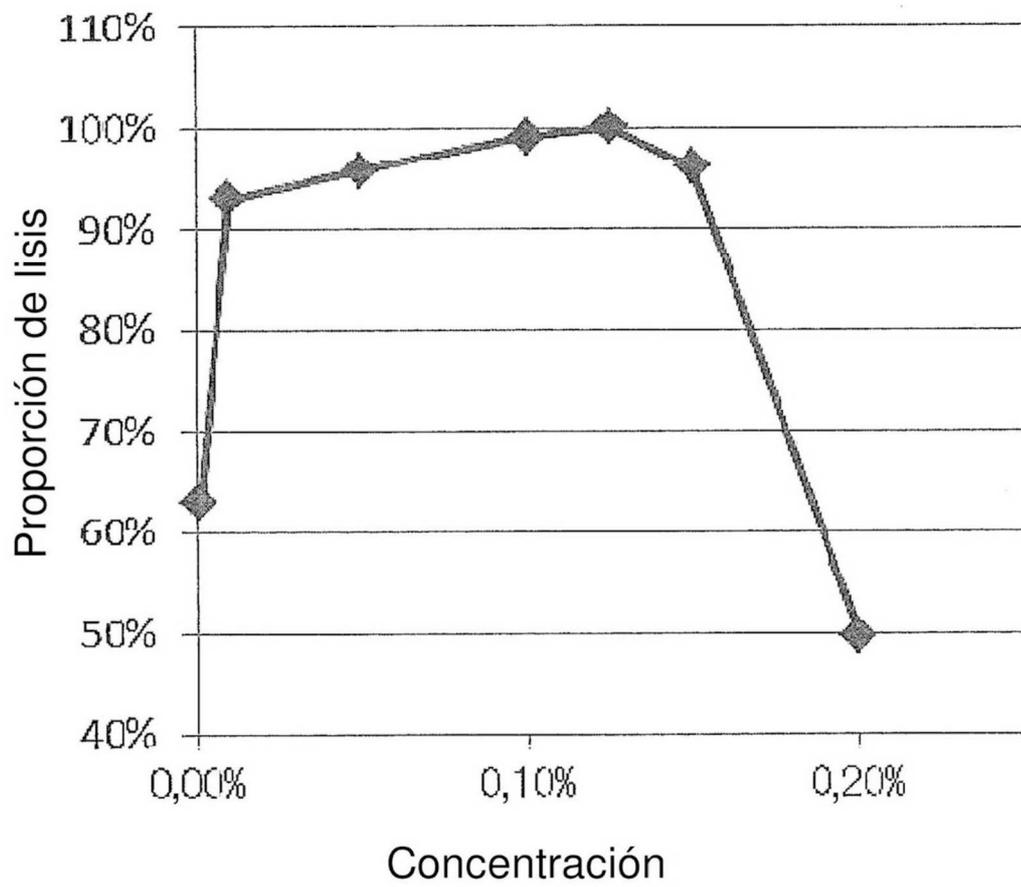
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



**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.*

10 **Documentos de patentes citados en la descripción**

- JP 1244370 A
- JP 2012122921 A
- JP 63167799 A
- WO 2005064016 A
- JP 4621919 B
- JP 7196463 A
- US 2010099115 A1
- JP 2010154851 A
- WO 0107599 A1
- WO 0006603 A

15 **Literatura no patente citada en la descripción**

- *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 1983, vol. 6 (3), 235-245