



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 306 626**

② Número de solicitud: 200801537

⑤ Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **23.05.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.11.2008

⑦ Solicitante/s: **Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación (CTC)**
c/ de la Concordia, s/n
30500 Molina de Segura, Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Gabaldón Hernández, José Antonio;**
Guillén Guillén, Isabel;
Beñat Morais Ezquerro, Sergio;
Maquieira Catalá, Ángel y
Puchades Plá, Rosa

⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Sistema para la detección de antibióticos en alimentos.**

⑦ Resumen:

Sistema para la detección de antibióticos en alimentos. La presente invención hace referencia a un sistema para la detección de antibióticos en alimentos que comprende una carcasa (1) que a su vez comprende al menos 1 hendidura para la adición de la muestra a analizar (3) y al menos 1 ventana de visualización de resultados (4) y una tira reactiva (2). Además la invención se refiere a un procedimiento para la detección de antibióticos en alimentos mediante el sistema anterior, que comprende las etapas de preparación del sistema de detección de antibióticos en alimentos, preparación de la muestra a analizar y detección de antibióticos.

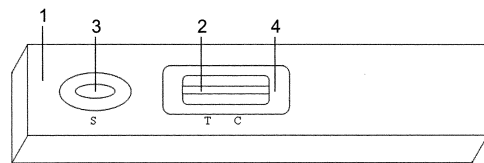


FIG. 1

ES 2 306 626 A1

DESCRIPCIÓN

Sistema para la detección de antibióticos en alimentos.

5 Campo de la invención

La presente invención hace referencia a un nuevo sistema para la detección de antibióticos en alimentos y al procedimiento para poder llevar a cabo dicha detección. Particularmente la detección se lleva a cabo en alimentos tales como la miel.

10

Antecedentes de la invención

En los últimos años, la confianza de los consumidores europeos en los sistemas de vigilancia alimentaria se ha visto seriamente dañada, suscitando una inquietud general en relación a la calidad y seguridad de los alimentos destinados al consumo. La situación se agrava para algunos productos como la miel y derivados, para los que no se han fijado los límites máximos de residuos (LMRs), porque se trata de productos con la etiqueta de “natural” y no pueden contener residuos, o porque su consumo es en volumen más reducido que otros alimentos, pero muy frecuente y apreciado en la dieta.

15

20

El aseguramiento de la calidad de los alimentos de origen animal, requiere un análisis pormenorizado de los riesgos asociados a la presencia de residuos de sustancias con actividad farmacológica y, el establecimiento de directrices que regulen adecuadamente el empleo de estos compuestos en zootecnia. Además, se evidencia la necesidad de evaluar las repercusiones medioambientales de estos fármacos, incluyendo en las directrices mencionadas, criterios de evaluación del riesgo medioambiental.

25

30

En el curso de los últimos años, la problemática de los residuos de antibióticos de uso veterinario en los alimentos ha ido evolucionando. En un principio se tenía el concepto de “residuo cero” pero, gracias al perfeccionamiento de los métodos de análisis, la Comisión Europea (Directiva 96/23/CE), basándose en datos toxicológicos, estableció la lista de sustancias autorizadas y prohibidas que deben detectarse en alimentos, fijando los límites máximos de residuos (LMRs) para alguna de ellas y los provisionales para otras. Los residuos que deben controlarse en animales vivos y en sus productos alimenticios se pueden clasificar, de acuerdo con la directiva 96/23/CE, en dos grandes grupos:

35

Grupo A: Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas (e.g. estilbenos, agentes antitiroideos, esteroides, zeranol, β -agonistas,...).

40

Grupo B: Medicamentos veterinarios (incluidas las sustancias no registradas que podrían utilizarse a efectos veterinarios) y contaminantes. En este grupo se encuentran las sustancias antibacterianas y otras sustancias y contaminantes medioambientales como los compuestos organoclorados, las micotoxinas y los elementos químicos, como son los metales pesados.

45

La producción animal en cría intensiva requiere el control de potenciales enfermedades mediante la utilización de medicamentos veterinarios de uso metafiláctico, profiláctico y terapéutico (antimicrobianos, antiparasitarios), así como también la utilización de aditivos para la alimentación animal (antibióticos, coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas y factores de crecimiento) con fines de mejora del rendimiento.

50

Dentro de este grupo de sustancias se, incluyen los antibióticos, agentes antimicrobianos que desde su introducción en el campo de la medicina veterinaria en los años 40 se han empleado extensamente en el tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan tanto a los animales de compañía como a los destinados al consumo humano. En los animales productores de alimentos, los antibióticos comenzaron a utilizarse como agentes promotores del crecimiento, añadiéndolos al pienso en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo prolongados. Esta práctica está muy extendida desde que en 1950 Stokstad y Jukes observaron que la administración de pequeñas dosis de clortetraciclina aumentaba el ritmo de crecimiento animal.

55

60

Tras la administración de antibióticos en veterinaria es necesario respetar un plazo de espera o periodo de supresión antes de utilizar la carne, leche, huevos, o cualquier producto animal, a fin de que el antibiótico haya sido eliminado totalmente y no queden residuos, o que éstos se encuentren por debajo del LMR fijado en cada caso. Sin embargo, los tiempos de espera no se han armonizado en los países de la Unión Europea y no es raro que una misma especialidad farmacéutica tenga tiempos de espera diferentes de unos países a otros. Existe además la posibilidad de que los residuos de estos compuestos o sus metabolitos, persistan en el animal y, por tanto, pasen a la cadena de alimentación humana. Además, estos compuestos antimicrobianos pueden ser vertidos incontroladamente como sustancias de desecho, pudiendo ocasionar problemas de contaminación.

65

La situación se agrava para algunos productos (mieles, huevos, especies menores) para los que no se han fijado LMRs por ejemplo, porque se trata de productos con la etiqueta de “natural” y no pueden contener residuos, o porque su consumo es reducido.

ES 2 306 626 A1

La miel es un producto natural cuyo consumo se ha extendido desde la antigüedad hasta nuestros días. De hecho, ya se utilizaba en el Antiguo Egipto (2.000 a.c.) para el tratamiento de heridas, quemaduras y úlceras. Presenta excelentes propiedades nutritivas, ya que contiene tiamina, riboflavina, niacina, Fe, Mg, Mn, P y Na, además de un número de enzimas y antioxidantes considerable. Estudios recientes han revelado sus propiedades antibacterianas y antimicrobianas, lo que aconseja su empleo como conservante y cosmético. No obstante, y al igual que ocurre con otros muchos alimentos, los casos de contaminación en miel por residuos químicos de compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, antibióticos y quimioterápicos, entre otros, son bastante frecuentes y representan un riesgo evidente para la salud de los consumidores.

La contaminación de la miel por residuos de antibióticos es debida a: *i*) los tratamientos realizados para combatir enfermedades bacterianas en las colmenas tales como la toque americana y la Toque europea, causadas por la bacteria *Melissococcus pluton* *ii*) aplicaciones para combatir infecciones bacterianas en frutales y hortalizas tales como la *Erwinia amylovora*, que ha causado importantes pérdidas en ciertas regiones de Alemania dedicadas a la producción de manzanas y peras, o el tratamiento dado a las pseudomonas durante el período de floración, lo que ocasiona una elevada contaminación de las flores con agentes antimicrobianos implicando la aparición de residuos de estos compuestos en la miel; *iii*) para el tratamiento de la noseemiasis (enfermedad causada por protozoos), un número significativo de apicultores argentinos utiliza un producto veterinario cuyo principio activo es la Fumagilina, antibiótico autorizado en Argentina y prohibido en Europa.

El sector de la miel es la principal actividad y fuente de ingresos de un gran número de ciudadanos europeos -existen 460.071 apicultores censados-. Las cifras aportadas se incrementan considerablemente si consideramos los envasadores y distribuidores de miel y derivados.

En 1999, la UE fue el tercer productor mundial de miel -con 116.000 toneladas- ocupando la primera posición del ranking en el número de importaciones, absorbiendo el 47% del total, ya que consume 270.000 toneladas, aproximadamente el doble de su producción.

A pesar de que la mayoría de compuestos no están autorizados para su empleo en productos destinados a la alimentación humana, generación de superbacterias, están apareciendo diferentes compuestos -nitrofuranos, estreptomina, cloranfenicol, sulfamidas o tetraciclinas, entre otros-, dependiendo de la procedencia ya que Europa importa la mitad de la miel que consume.

Con el fin de satisfacer las necesidades del mercado europeo es necesario importar miel de otros países. En este sentido, los envasadores de miel están verdaderamente preocupados ya que en la mayoría de miel importada se detectan residuos de antibióticos (a diferentes concentraciones), hecho que repercute directamente en su calidad y precio, ya que esa miel no es apta para su puesta en el mercado.

Para hacerse una idea de la problemática, en el año 2002 (7 de Febrero), el comité científico veterinario de la UE recomienda suspender la importación de productos procedentes de China ya que detectaron estreptomina en siete muestras de miel y cloranfenicol en gambas. Desde el 2003 hasta la fecha, la red de alertas alimentarias de la UE (*Food Alert System*) con periodicidad semanal, informa de la aparición de diferentes antibióticos en miel y derivados, metabolitos de nitrofurano, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas, tetraciclinas y otros, no detectados con anterioridad como tilosina, dapson o eritromicina en mieles de distinto origen.

Si nos acogemos a la legislación vigente, el anexo IV del Reglamento 2377/90/EC incluye al cloranfenicol, estableciendo tolerancia cero para este analito en alimentos destinados al consumo, ya que su ingesta puede estimular el desarrollo de anemia aplásica en humanos. A pesar de ello, en la práctica la acción correctora no sería tomada a no ser que el nivel encontrado en miel excediese, en una cantidad suficiente, el límite de detección del método de análisis empleado.

El empleo de tetraciclinas y sulfonamidas (mayoritariamente sulfatiazol sódico, STZ) para combatir enfermedades bacterianas en las colmenas está generalizado y de hecho se vienen utilizando desde hace más de treinta años. Por ello, es conveniente la determinación de estos compuestos, sobre todo en el caso de materia prima de diferente localización geográfica, para su posterior envasado, ya que presentan gran heterogeneidad en cuanto a composición, tipo y número de residuos.

En el caso de estreptomina, si bien la Unión Europea ha establecido límites máximos de residuos (LMRs) en carne y leche, no existe legislación al respecto para miel, a pesar de que la, exposición continuada a niveles residuales de este compuesto puede provocar alergias, alteraciones de la flora intestinal y aparición de resistencias en microorganismos patógenos.

En Europa, la administración de nitrofuranos para el tratamiento de animales destinados al consumo no está autorizada, debido a sus efectos carcinogénicos y mutagénicos. Los metabolitos de nitrofurano aparecen tras el empleo de furazolidona (AOZ), furaltadona (AMOZ), nitrofurantoina (AHD) y nitrofurazona (SEM), mostrando mayor incidencia el AOZ.

ES 2 306 626 A1

Como se puede observar, la situación es verdaderamente preocupante, ya que:

1. Dado que el consumo en los países europeos es superior a su producción, es necesario importar alimentos de países en los que los controles sanitarios no son tan estrictos, e incluso se utilizan sustancias ya prohibidas en la UE.
2. Ciertos apicultores no siguen unas buenas prácticas de producción, recurriendo a la picaresca (utilización de antibióticos no buscados como tilosina, fumagilina, dapson o eritromicina).
3. Se introducen mieles en Europa por países terceros ya que, cuando se prohibieron las importaciones de miel china, las importaciones de miel turca pasaron del 15% al 55% (obviamente, la miel procedía de China, ya que los antibióticos encontrados así lo confirmaban).
4. Así, se generan distintos problemas sanitarios, tecnológicos, analíticos, y medioambientales que pueden originar un grave perjuicio a los consumidores, productores y a la administración y que deben evitarse en la medida de lo posible.
5. En las pequeñas y medianas empresas (PYMES), empresas familiares y/o tradicionales, como es el caso del colectivo de la miel y derivados, las dificultades para implantar sus propios programas de seguridad y control son enormes, ya que la mayoría carece de los recursos técnicos y económicos necesarios para llevarlos a cabo. A pesar de ello, consideran que en el sistema actual de mercado invertir en calidad es absolutamente necesario y consideran prioritario poder garantizar la inocuidad de la miel.
6. Es necesario desarrollar Programas de Vigilancia que garanticen la calidad de los alimentos. Para ello se requiere un incremento del número de controles a lo largo de todo el proceso productivo que aseguren la trazabilidad. Esto implicaría, entre otros aspectos, un aumento del número de análisis, lo que repercute significativamente en el precio del producto acabado.

Tradicionalmente, para la determinación de antibióticos en miel o en otras sustancias alimenticias como la leche, se utilizan técnicas microbiológicas y cromatográficas como la descrita en J. Food Protect., 62:632-636 o M. EAAP Publ. (1999), 95 (Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats), 164-167, o Analyst 123, 2759-2762, o J. AOAC Int. 75, 786-789, o Journal of Apicultural Research, 1990, 29, 2, 112-117 o J. Agric. Food. Chem. 43, 931-934. Los métodos microbiológicos o de inhibición bacteriana se han desarrollado y utilizado tradicionalmente para la detección de residuos de antibióticos o sustancias antimicrobianas en productos alimenticios, especialmente en leche y tejidos animales. Estos métodos se basan en el grado de inhibición del crecimiento microbiano producido por los fluidos o extractos tisulares, incubados en un medio inoculado. Pueden resultar útiles para el screening previo pero su sensibilidad es baja, la precisión variable y son poco específicos. Además, la presencia de sustancias inhibitoras puede afectar a la exactitud del análisis, por lo que la etapa de preparación de muestra puede ser problemática, especialmente en la miel, ya que este tipo de matriz presenta propiedades antimicrobianas y antibacterianas *per se*. Esto, encarecería sin duda el coste del análisis y demoraría la presentación de resultados. Por su parte, los métodos físico-químicos requieren, por lo general, personal cualificado, la presentación de resultados es lenta (7 días a un mes), caros (300 Euros/análisis, aproximadamente) y su utilización en programas de vigilancia es limitada, ya que requieren en general, una etapa previa de preconcentración y limpieza de muestra, seguido de identificación y cuantificación de los analitos mediante herramientas sofisticadas tales como cromatografía y espectrometría. De ahí que su empleo en análisis de rutina para garantizar la calidad y seguridad de la miel durante la producción y procesado sea limitado. D'Haese, E., Nelis, H.J., Reybroeck, W., and De Ruyck, H. 1999. Evaluation of a modified enzymatic test for the detection of tetracyclines in milk.

Así, se hace necesario el desarrollo de métodos inmunoquímicos, en formato de tira reactiva, como herramientas analíticas de alerta, agilizando tiempos de ensayo (15 minutos) y reduciendo costes (4 Euros/ensayo). La portabilidad, simplicidad de manejo e interpretación de resultados permitirá a los usuarios llevar a cabo análisis de antibióticos en tiempo real y en el sitio donde pueda presentarse el problema, pudiendo tomar acciones correctoras con agilidad y fiabilidad.

Los riesgos asociados al consumo de alimentos contaminados con antibióticos; la importancia de un control riguroso para cumplir con los objetivos reguladores y proteccionistas “no residuos”; y los inconvenientes (personal entrenado, equipamiento sofisticado y caro) para el análisis de antibióticos por métodos cromatográficos, hacen necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles, fiables, económicos (< 6 Euros/ensayo) y rápidos (15 minutos).

Además los sistemas actualmente desarrollados como el “Honey Tetrasensor Kit” de la empresa Unisensor, conllevan un tiempo de resolución alto y el proceso es laborioso.

El desarrollo de sistemas de *screening* (tiras reactivas, preferentemente) permitirá a los empresarios realizar sus propios controles de antibióticos “*in situ*” y a tiempo real. Así, podrán tomar medidas correctoras cuando sea necesario -aceptación o rechazo de la mercancía, en función de la concentración de antibiótico encontrada-, lo que agilizará la toma de decisiones, asegurando la inocuidad del producto.

ES 2 306 626 A1

El desarrollo de nuevos métodos analíticos, especialmente rápidos, para el control de sustancias tóxicas en alimentos, que respalden el cumplimiento de la legislación vigente, conllevará a la consecución de alimentos saludables, seguros y de alta calidad, con objeto de satisfacer las necesidades del consumidor y potenciar la competitividad de la industria alimentaria española. Además, aumentará el grado de confianza de los consumidores hacia los productos comercializados puesto que éstos habrán sido objeto de un control exhaustivo a lo largo de todo el proceso productivo (trazabilidad), garantizando de este modo la inocuidad de la miel.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de detección de antibióticos en alimentos y el procedimiento para la determinación de los mismos.

Mediante el sistema y procedimiento descritos a continuación, se consigue que el proceso de detección sea más higiénico, con menor contaminación, más rápido, más sensible y más barato que con los sistemas y procedimientos conocidos hasta la actualidad.

Por lo tanto según un primer aspecto de la presente invención se refiere a un sistema para la detección de antibióticos en alimentos (figura 1) que comprende las siguientes partes:

- Carcasa (1) que es el medio en el cual se encuentran en el interior los componentes de detección de antibióticos en alimentos.
- Tira reactiva (2) que es el medio por el cual la muestra a analizar fluye y reacciona hasta determinar si el ensayo es positivo o negativo. Se encuentra dentro de la carcasa (1). Ver figura 3.

La carcasa (1) es preferentemente de plástico y comprende al menos una hendidura (3) para añadir la muestra a estudiar y al menos una ventana (4) por la que se puede visualizar el resultado para la detección de antibióticos. En ese mismo sentido la ventana (4) muestra en su interior parte de la tira reactiva (2) de tal manera que cuando el resultado de la detección de antibióticos en alimentos es negativo, se pueden visualizar dos bandas, una control (C) y otra banda de ensayo (T). Si por el contrario, el ensayo es positivo se podrá visualizar en el interior de la ventana (4) la aparición de una sola banda correspondiente al control (C).

La tira reactiva (2) comprende al menos los siguientes elementos:

- Capa de muestra (5) en la cual se deposita la muestra. Actúa como prefiltro, reteniendo partículas de la muestra que pueden inhibir el flujo o provocar interferencias en el ensayo.
- Capa para el anticuerpo primario específico (6), cuya función es la de reaccionar con la muestra si contiene sustancias específicas frente a ese anticuerpo, uniéndose por los sitios de reconocimiento (fracción variable) de dicho anticuerpo.
- Membrana (7) en la cual aparecen la banda de control (C) y la banda de ensayo (T), pudiéndose visualizar las mismas a través de la ventana (4) incorporada en la carcasa. En la membrana (7) se encuentran inmovilizados un conjugado análogo a la sustancia a determinar (8) y un control o anticuerpo secundario (9) el cual se unirá al anticuerpo específico por su fracción constante.
- Capa de absorbente o de parada (10), la cual impide que la muestra siga fluyendo. Además tiene la función de actuar como bomba/depósito, facilitando el flujo del reactivo o muestra y asegurando el movimiento completo de la muestra a través de la membrana.
- Soporte (11) sobre el cual se superponen el resto de las zonas anteriormente descritas, como se muestra en la Figura 1. El material es preferentemente de poliestireno, impregnado con una sustancia adhesiva donde se colocan la membrana y las diferentes capas. El adhesivo empleado debe ser compatible con la membrana, ya que éste puede migrar dentro de los poros causando problemas de flujo. El soporte tiene un espesor entre 5 a 30 mm, preferentemente entre 10-15 mm y una longitud de 10 a 50 cm, preferentemente de 25 a 35 cm.

La capa de muestra (5) o zona donde se deposita la muestra a analizar, a través de la hendidura (3), debe ser de un material que no interfiera con el analito, seleccionado del grupo formado por fibra de vidrio y algodón.

La capa para el anticuerpo específico (6) se selecciona entre los materiales del grupo formado por poliéster, vidrio, material sintético y de nitrato de celulosa y tiene inmovilizado dicho anticuerpo de tal manera que es liberado, solubilizándose al entrar en contacto con la muestra a analizar. Dicho anticuerpo específico tiene acoplado un trazador o lo que es lo mismo, una sustancia que se introduce en el sistema con el fin de estudiar la evolución temporal y/o espacial del proceso a través de su detección o medición. Dichos trazadores pueden ser coloides metálicos, preferentemente de oro, plata, selenio, cobre, platino o hierro y más preferentemente de oro, o también pueden ser de partículas de latex derivatizadas con diferentes reactivos coloreados, trazadores fluorescentes o enzimas de la familia de la fosfatasa o de las peroxidasas. Además dichos trazadores presentan alta capacidad de tinción, aumentando la visualización con el tamaño de partícula, usualmente entre 10-60 nm.

ES 2 306 626 A1

La membrana (7) es preferentemente de nitrocelulosa y en ella se encuentran inmovilizados una sustancia conjugada (8) o conjugado hapteno-proteína [un hapteno es una sustancia química de pequeño peso molecular (menos de 10.000 Da) que no induce por sí misma la formación de anticuerpos, pero al unirse a una proteína (proteína transportadora) estimula una respuesta inmunitaria en el organismo productor de anticuerpos, o lo que es lo mismo, sería una proteína unida a un compuesto de poco peso molecular el cual es similar al compuesto a detectar (antibiótico)] y la sustancia control o anticuerpo secundario específico (9), el cual reaccionará siempre con el anticuerpo primario específico uniéndose por la fracción constante.

La capa absorbente o de parada (10) es preferentemente de algodón.

Los antibióticos a detectar en alimentos son preferentemente el sulfatiazol y la oxitetraciclina, y el alimento sobre el cual se mide la presencia de antibióticos es la miel.

Un segundo aspecto fundamental de la presente invención sería un procedimiento para la detección de antibióticos en alimentos mediante el sistema, anteriormente descrito.

Dicho procedimiento-constaría de las siguientes etapas:

1) Preparación del sistema de detección de antibióticos en alimentos

Sobre un soporte (11) preferentemente de poliestireno se superpone una membrana (7) de nitrocelulosa que contiene inmovilizados un conjugado de la muestra a analizar que está en una concentración desde 0,05 a 2 microlitros por centímetro, preferentemente a una concentración desde 0,5 a 1,5 microlitros por centímetro y más preferentemente a 1 microlitro por centímetro y un anticuerpo secundario específico, frente a la fracción constante del anticuerpo primario, el cual está a una concentración desde 0,05 a 2 microlitros por centímetro, preferentemente a una concentración desde 0,5 a 1,5 microlitros por centímetro y más preferentemente a 1 microlitro y sobre el mismo soporte se superpone una capa de poliéster que equivale a la zona donde se encuentra depositado el anticuerpo primario específico contra el antibiótico presente en la muestra a analizar (6) el cual se encuentra en una concentración desde 0,1 a 2,5 miligramos por mililitro, preferentemente desde 0,25 a 1,5 miligramos por mililitro y más preferentemente a 0,50 miligramo por mililitro. A continuación sobre el soporte de poliestireno, se deposita una capa de fibra de vidrio o zona de depósito de muestra (5). Por el extremo libre del soporte (7) se superpone la capa de absorbente o de parada (10), de algodón.

Los inmunorreactivos (suero/conjugado) a utilizar son: suero S12-II/conjugado OVA-S8 y el suero OTC3-I/conjugado OVA-OTC3, teniendo cada uno de ellos una sensibilidad entre 10 y 20 ng/g. La combinación S12-II/OVA-S8 se usará preferentemente para cuando se quiera detectar el antibiótico sulfatiazol y el par OTC3-I/OVA-OTC3 para cuando se quiera detectar la oxitetraciclina.

El anticuerpo secundario a utilizar será un anticuerpo de cabra anti-conejo, que reconoce a la fracción constante de cualquier anticuerpo de conejo.

Una vez montada la tira reactiva (2), se encaja la misma sobre la carcasa (1) tal cual se puede observar en la figura 2.

2) Preparación de la muestra a analizar para la detección de antibióticos

Se disuelve la muestra a analizar en un disolvente apropiado en función del antibiótico a detectar (sulfatiazol u oxitetraciclina). Dicha disolución comprende las etapas de:

- Tomar una muestra del alimento, de una cantidad dentro del rango desde 0,5 a 3 gramos, preferentemente desde 1 a 2 gramos y más preferentemente de 1,25 gramos.
- Añadir preferentemente entre 5 y 20 mL, preferentemente entre 10 y 15 mL, y más preferentemente 12,5 mL, de una solución salina, preferentemente de tampón fosfato o de tampón acetato sódico. Siendo preferente la solución salina de acetato sódico 0.1 M en el rango de pH 2 a 7, preferentemente a pH 5 para la detección del sulfatiazol y 100 mM, en el rango de pH 4 a 9, preferentemente a pH 7,5 para la detección del oxitetraciclina.
- Agitar durante 5 minutos para que se disuelva la muestra a analizar.
- Tomar una cantidad de disolución dentro del rango desde 80 a 150 microlitros, preferentemente tomando una cantidad del extracto de 100 microlitros.

3) Detección de antibióticos en la muestra preparada

Añadir la disolución resultante de la etapa 2 al sistema descrito en la etapa 1 mediante la hendidura (3). Preferentemente se añaden desde 80 a 150 microlitros y más preferentemente se añaden 100 microlitros.

Esperar 5 minutos para que fluya el extracto a lo largo del sistema.

ES 2 306 626 A1

Visualizar si el ensayo es positivo o negativo, mediante la aparición de 1 o 2 bandas.

De tal manera que el sistema y procedimiento descritos anteriormente funcionarían de la siguiente manera:

5 A) Si el resultado del ensayo fuese positivo frente al antibiótico, tal cual se muestra en la figura 4:

Al añadir la disolución del alimento (miel) a analizar disuelto previamente, se deposita dejando que fluya a lo largo de las distintas partes del sistema, de tal manera que en un primer momento la muestra reacciona con el anticuerpo primario que está marcado con el trazador, de tal manera que el anticuerpo primario es liberado y solubilizado. Durante la migración, en función de la concentración de analito presente en el extracto, éste se une en mayor o menor extensión al anticuerpo primario específico. De tal manera que si la concentración de analito es elevada, los centros de reconocimiento del anticuerpo (molécula bifuncional), estarán bloqueados y cuando el frente pase por la zona en la cual se encuentra inmovilizado el conjugado, éste no será reconocido y por lo tanto no se producirá la aparición de una banda en ese punto. Sin embargo el anticuerpo primario específico sigue fluyendo y reacciona con el anticuerpo secundario específico uniéndose por la fracción constante, de tal manera que se visualiza una banda debida a esa unión.

B) Si el resultado del ensayo fuese negativo frente al antibiótico, tal cual se muestra en la figura 5:

20 La disolución añadida no reaccionaría con el anticuerpo primario, o lo haría si la concentración de antibiótico es baja, de tal manera que los centros de unión –o gran parte de ellos- quedarían libres y al solubilizarse y fluir hasta la zona donde se encuentra el conjugado se uniría al mismo, dando como resultado la aparición de una banda, mientras que el anticuerpo primario específico, al igual que en caso anterior reaccionaría con el anticuerpo secundario específico por la fracción constante, dando como resultado global la aparición de dos bandas, una debida al control y la otra debida a la zona de ensayo, y por lo tanto, siendo el ensayo negativo frente al antibiótico a detectar.

Un tercer aspecto esencial de la presente invención se refiere al uso del sistema descrito anteriormente para la detección de antibióticos en alimentos, preferentemente en alimentos tales como miel, productos lácteos, carnes, y piensos, más preferentemente sobre la miel y para detectar antibióticos tales como sulfatiazol u oxitetraciclina.

Breve descripción de las figuras

1) La figura 1 muestra la carcasa (1) del sistema la cual consta de una hendidura (3) por la cual se adiciona la muestra o disolución a analizar para detectar la presencia de antibióticos y una ventana (4) por la que se puede visualizar el resultado de la detección de antibióticos. Además se puede visualizar parte una tira reactiva (2) en la cual están todos los componentes que hacen que el sistema pueda detectar la presencia de antibióticos. Las zonas S, T y C corresponden a la zona de adición de muestra, zona de test o zona en la que puede aparecer la banda correspondiente a la unión de un anticuerpo primario con un conjugado y zona de control.

2) La figura 2 muestra la carcasa (1) abierta, mostrando en su interior la tira reactiva (2), en la, cual se producirían las reacciones pertinentes para observar si el ensayo es o no positivo frente a un determinado tipo de antibiótico.

3) La figura 3 muestra la tira reactiva (2), con cada uno de sus elementos superpuestos, unos encima de otros, estando en primer lugar el soporte (11), sobre el cual se encuentra la membrana (7) y sobre esta última se superponen parcialmente, la capa de absorbente o de parada (10), y la capa para el anticuerpo primario específico (6) y sobre esta última capa se acopla la capa de muestra (5). Las zonas T y C corresponden a la zona de test o zona en la que puede aparecer la banda correspondiente a la unión de un anticuerpo primario con un conjugado y zona de control.

4) La figura 4 muestra el resultado obtenido cuando una muestra de miel a analizar contiene antibióticos y por lo tanto el ensayo sería positivo para ese antibiótico.

5) La figura 5 muestra el resultado obtenido cuando una muestra de miel a analizar no contiene antibióticos y por lo tanto el ensayo sería negativo para ese antibiótico.

6) La figura 6 muestra un esquema de la etapa 3) del procedimiento anteriormente descrito, cuando la muestra y el sistema ya están preparados y se dispone a la adición del extracto al sistema.

Los siguientes ejemplos de realización tienen principalmente carácter ilustrativo para poder entender mejor la presente invención, pero no tendrán en ningún caso carácter limitativo.

Ejemplos de realización

1) Determinación de Sulfatiazol en 10 muestras distintas de miel

65 Se prepararon 1000 tiras reactivas (100 de cada combinación de concentraciones de inmunorreactivos, como aparecen en la tabla 1) para la detección del antibiótico sulfatiazol tal cual viene descrito en la presente invención. Para ello se añadieron concentraciones crecientes de anticuerpo primario, secundario y conjugado (ver tabla 1). De la misma manera el anticuerpo primario específico S12-II tiene acoplado un trazador de oro. La capa de muestra es de fibra de

ES 2 306 626 A1

vidrio, la de anticuerpo primario es de poliéster, la membrana es de nitrocelulosa y la de absorbente o parada es de algodón. En la membrana el anticuerpo secundario es de cabra anti-conejo (GAR) y el conjugado es OVA-S8.

TABLA 1

	Tira reactiva									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Ac 1° Específico mg/ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0	1,5	2	2,5
Conjugado μl/cm	0,05	0,1	0,4	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2
Ac 2° Específico μl/cm	0,05	0,1	0,4	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2

Una vez preparadas las distintas tiras reactivas (2) a las distintas concentraciones de elementos reactivos (inmunorreactivos), se procedió a la toma de 10 muestras de miel para su identificación, como positivas o negativas, frente al anticuerpo específico contra sulfatiazol. Las cantidades de muestras que se tomaron, en gramos, fueron tal cual se recogen en la tabla 2, de tal manera que cada muestra se ensayó con cada una de las tiras (T1 a T10).

TABLA 2

Muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
gr de miel	0,5	0,75	0,80	1,0	1,25	1,50	2,0	2,25	2,50	3,0

A esas 10 muestras de miel, elegidas al azar, y de diferente procedencia apicultora, se les añadió 12,5 mL de tampón acetato sódico 0.1 M, a pH 5. A partir de ese momento se agita durante 5 minutos, de tal manera que se observa como cada una de las muestras empiezan a solubilizarse, dependiendo la cantidad de miel tomada. Esos 5 minutos, son suficientes para solubilizar completamente las muestras de miel.

A continuación, para cada una de las muestras de miel, se toman 10 volúmenes distintos, desde 80 hasta 150 microlitros, como aparece en la tabla 3.

TABLA 3

Alícuota	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
μl	80	85	90	95	100	110	120	130	140	150

ES 2 306 626 A1

Para cada muestra de miel, se ensayaron diez volúmenes distintos (A1-A10) con cada una de las tiras (T1-T10) como aparece en la tabla 4. Es decir, que para la muestra (M1), se toman en primer lugar 80 μl de la solución y se depositan en la tira (T1) y así sucesivamente, se van depositando 80 μl hasta la tira (T10). A continuación, y siguiendo con (M1), pasaríamos al siguiente volumen 85 μl (A2), probando en las diez tiras, así hasta probar todos los volúmenes de todas las muestras (M1-M10).

TABLA 4

Muestra	Combinación ensayada									
M1	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M2	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M3	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M4	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M5	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M6	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M7	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M8	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M9	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
M10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10	T1-T10
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10

Tras cinco minutos, tiempo en el cual la alícuota fluye por el sistema reaccionando con las distintos elementos reactivos (anticuerpos o conjugados), se observa la aparición de distintas bandas coloreadas y dependiendo del número de bandas observadas, se determinó si la muestra de miel tomada al azar era o no positiva al antibiótico sulfatiazol. Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la tabla 5. En cualquier caso se observó que los mejores resultados, en cuanto a sensibilidad visual se refiere, son los acaecidos para las tiras 4, 5 y 6 con A4, A5 y A6; aunque en todos los casos se pudo ver -sin equívoco-, la positividad o negatividad de la muestra.

ES 2 306 626 A1

TABLA 5

Tira	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Alícuota	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Resultado	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)

Las muestras 1, 5, 7, 8 y 9 resultaron positivas (aparición de la banda control) a dicho antibiótico por lo tanto deben ser rechazadas.

Las muestras 2, 3, 4, 6 y 10 resultaron ser negativas (aparición de dos bandas, test y control) a dicho antibiótico por lo tanto son aptas para consumo humano

2) *Determinación de Oxitetraciclina en 10 muestras distintas de miel*

De la misma manera que se procedió en el ejemplo anterior se llevó a cabo la preparación de las tiras reactivas, con la salvedad de que el anticuerpo primario específico es OTC3-I el secundario es el mismo (GAR) y el conjugado es OVA-OTC3, en las mismas concentraciones que en el caso anterior. Los mismos pasos del procedimiento se llevaron a cabo para este estudio.

Un resumen de los resultados se reflejan en la tabla 6:

Tira	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Muestra	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Alícuota	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Resultado	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)

En este estudio las muestras 4, 6 y 9, resultaron ser positivas (aparición de solo la banda control) y por lo tanto rechazadas para consumo humano.

Sin embargo las muestras 1 a 3, 5, 7 a 8 y 10, resultaron ser negativas (aparición de la banda control y test) y por lo tanto aptas para consumo humano.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema para la detección de antibióticos en alimentos que comprende los siguientes elementos:
- a. una carcasa (1); y
 - b. tira reactiva (2).
- 10 2. Sistema según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la carcasa comprende los siguientes elementos:
- a. hendidura (3) para añadir la muestra a estudiar; y
 - b. ventana (4) para la visualización del resultado obtenido del análisis.
- 15 3. Sistema según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la ventana (4) comprende los siguientes elementos:
- a. zona de control (C); y
 - b. zona de ensayo o test (T).
- 20 4. Sistema según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la tira reactiva comprende los siguientes elementos:
- a. capa de muestra (5) en la cual se deposita la muestra;
 - 25 b. capa para el anticuerpo primario específico (6);
 - c. membrana (7) en la cual se aprecian los resultados;
 - 30 d. capa de absorbente o de parada (10); y
 - e. soporte (11) sobre el cual se superponen el resto de los componentes.
- 35 5. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la membrana (7), comprende los siguientes elementos:
- a. sustancia conjugada (8) que coincide con la zona de ensayo (T) de la carcasa (1); y
 - b. control o anticuerpo secundario específico (9) que coincide con la zona control (C) de la carcasa (1).
- 40 6. Sistema según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la sustancia conjugada (8) y el control (9) están inmovilizados.
7. Sistema según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la sustancia conjugada se selecciona del grupo formado por OVA-S8 u OVA-OTC3.
- 45 8. Sistema según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el control se selecciona del grupo formado por un anticuerpo de cabra anti-conejo (GAR).
9. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la membrana (7) es de nitrocelulosa.
- 50 10. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la capa de muestra (5) es de fibra de vidrio.
11. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la capa de anticuerpo primario específico (6), es de poliéster o nitrato de celulosa.
- 55 12. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la capa de anticuerpo primario específico (6) comprende anticuerpos primarios específicos frente al antibiótico en estudio.
- 60 13. Sistema según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el anticuerpo primario específico se selecciona del grupo formado por S12-II u OTC3-I.
14. Sistema según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el anticuerpo primario específico lleva acoplado un trazador.
- 65 15. Sistema según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el trazador se selecciona del grupo formado por coloides metálicos, partículas de látex derivatizadas, trazadores fluorescentes o enzimas.

ES 2 306 626 A1

16. Sistema según la reivindicación 15, **caracterizado** porque los coloides metálicos se seleccionan del grupo formado por oro, plata, selenio, cobre, platino o hierro.

5 17. Sistema según la reivindicación 15, **caracterizado** porque las enzimas se seleccionan del grupo formado por fosfatasa o peroxidasas.

18. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la capa de absorbente o de parada (10) es de algodón.

10 19. Sistema según la reivindicación 4, **caracterizada** porque el soporte (11) es de poliestireno, impregnado con una sustancia adhesiva donde se colocan la membrana y las diferentes capas.

20. Procedimiento para la detección de antibióticos en alimentos **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

15 a. preparación del sistema de detección de antibióticos en alimentos de las reivindicaciones 1 a 19;

b. preparación de la muestra a analizar; y

20 c. detección de antibióticos.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado** porque la preparación del sistema de detección comprende las etapas de:

25 a. inmovilizar una sustancia conjugada y un control sobre una membrana (7);

b. adherir a un soporte (11) la membrana (7);

c. adicionar un anticuerpo primario específico a la capa (6);

30 d. adherir la capa (6) por encima de la membrana (7) y por encima del soporte (11);

e. adherir una capa de muestra (5) sobre la capa de anticuerpo primario específico (6);

35 f. adherir a la membrana (7) y al soporte (11) una capa de absorbente o de parada (10);

g. encajar la tira reactiva (2) en la capa interna de una de las dos capas de la carcasa (1); y

h. sellar las dos capas de la carcasa (1) con la tira reactiva (2) en su interior.

40 22. Procedimiento según la reivindicación 21, **caracterizado** porque el conjugado y el control están a concentración desde 0,05 a 2 $\mu\text{l}/\text{cm}$, preferentemente desde 0,5 a 1,5 $\mu\text{l}/\text{cm}$ y más preferentemente a una concentración de 1 $\mu\text{l}/\text{cm}$.

45 23. Procedimiento según la reivindicación 21, **caracterizado** porque el anticuerpo primario está a una concentración desde 0,1 a 2,5 mg/ml, preferentemente desde 0,25 a 1,5 mg/ml y más preferentemente a 0,5 mg/ml.

24. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado** porque la etapa de preparación de la muestra a analizar comprende las etapas de:

50 a. disolver la muestra en un disolvente;

b. agitar; y

55 c. extraer alícuota.

25. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** porque el disolvente es una solución salina.

60 26. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado** porque la solución salina es de acetato sódico o de tampón fosfato.

65 27. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado** porque se añaden entre 5 y 20 mL, preferentemente entre 10 y 15 mL, y más preferentemente 12,5 mL de solución salina de concentración 0.1 M en el rango de pH 2 a 7, preferentemente a pH 5 para la detección del sulfatiazol y 100 mM, en el rango de pH 4 a 9, preferentemente a pH 7,5 para la detección del oxitetraciclina.

28. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** porque la muestra es de miel.

ES 2 306 626 A1

29. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** porque se disuelven desde 0,5 a 3 gramos de muestra, preferentemente desde 1 a 2 gramos y más preferentemente 1,25 gramos.

5 30. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** porque se extraen desde 80 a 150 μ l de extracto, preferentemente 100 μ l.

31. Procedimiento según la reivindicación 20, **caracterizado** porque comprende las etapas de:

- 10
- a. adicionar el extracto de muestra por la hendidura (3);
 - b. reaccionar durante 5 minutos; y
 - c. visualizar el resultado a través de la ventana (4).

15 32. Procedimiento según la reivindicación 31, **caracterizado** porque se adicionan desde 80 a 150 μ l de extracto, preferentemente 100 μ l.

33. Uso del sistema descrito en las reivindicaciones 1 a 19, para detectar antibióticos en la miel.

20 34. Uso del sistema según la reivindicación 33, para detectar oxitetraciclina o sulfatiazol en miel.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

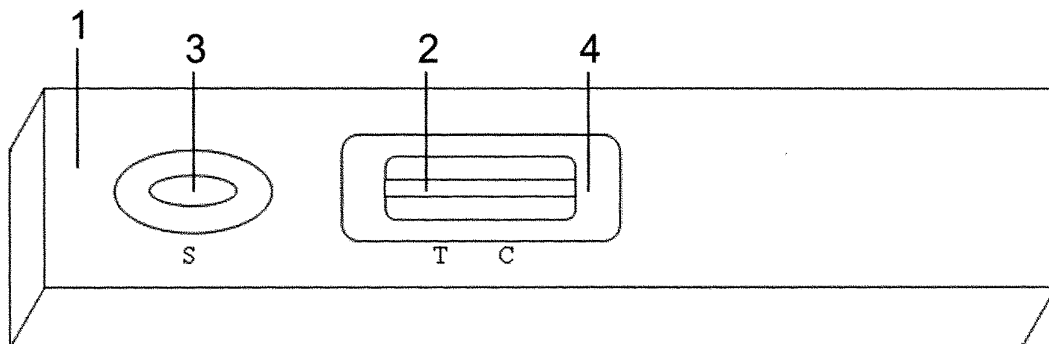


FIG. 1

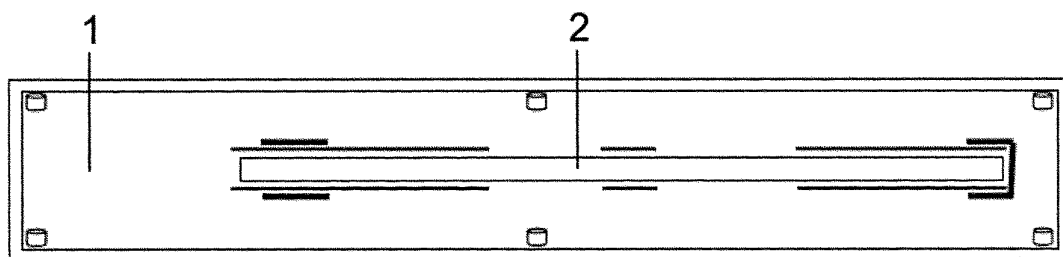


FIG. 2

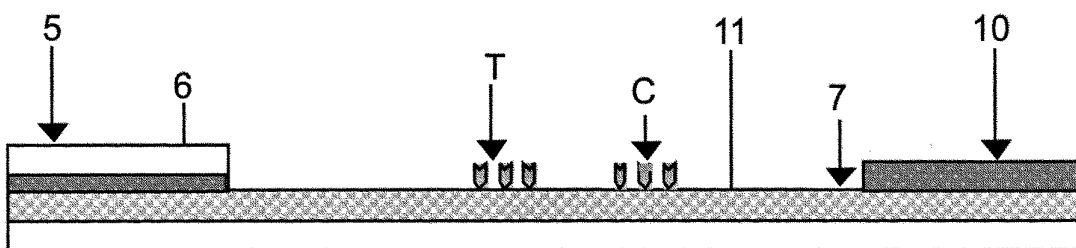


FIG. 3

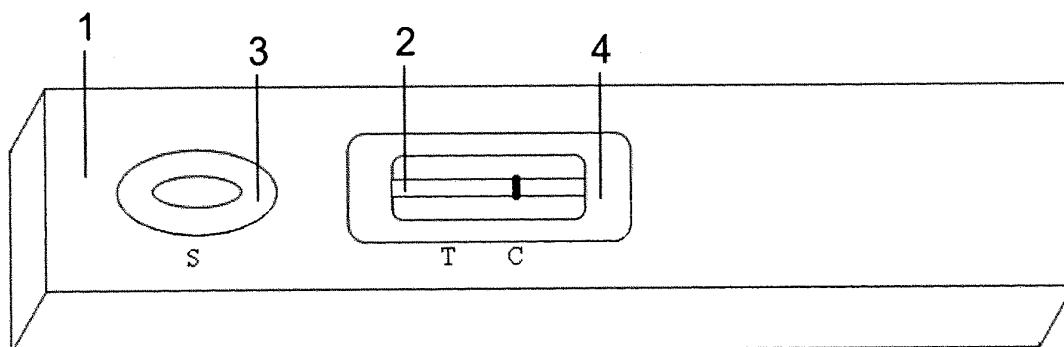


FIG. 4

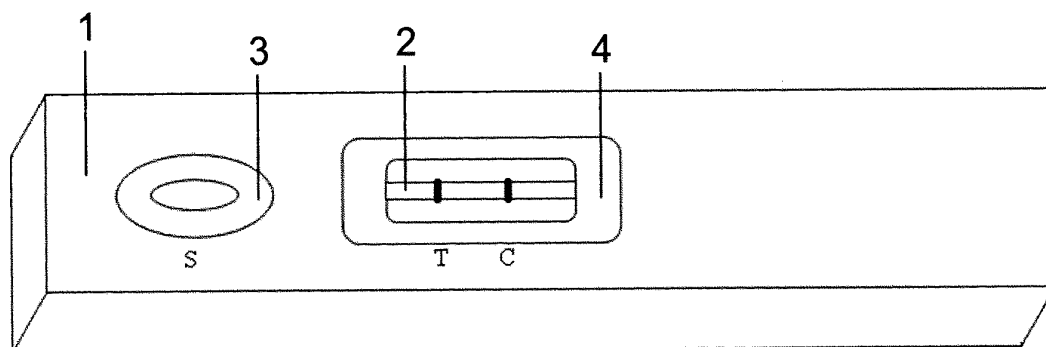


FIG. 5

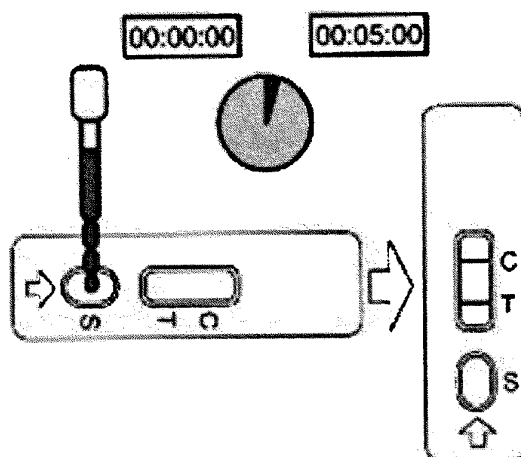


FIG. 6





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 306 626

② Nº de solicitud: 200801537

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.05.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9904267 A2 (CHARM SCIENCES, INC.) 28.01.1999, página 10, línea 4 - página 18, línea 19; página 21, líneas 1-6; figuras 1,7,13,14.	1-34
X	WO 2007024735 A2 (CHARM SCIENCES, INC.) 01.03.2007, párrafos 41-46.	1-34
X	US 5137808 A (ULLMAN et al.) 11.08.1992, columna 2, línea 64 - columna 3, línea 15.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

07.10.2998

Examinador

J. López Nieto

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)