

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.09.06	(73) Titular(es): DSM IP ASSETS B.V.	
(30) Prioridade(s): 2003.09.11 EP 03102730	HET OVERLOON 1 6411 TE HEERLEN	NL
(43) Data de publicação do pedido: 2006.06.07	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.11.19 021/2009	JACOBUS STARK	NL
	EDITH MAGDA LUCIA GEIJP	NL
	(74) Mandatário:	
	MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA	
	RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **TESTE DE SANGUE E URINA**

(57) Resumo:

RESUMO

"TESTE DE SANGUE E URINA"

A presente invenção providencia um meio de teste que compreende um microorganismo de teste, um indicador e um metal na sua forma ionizada, em que a valência do referido metal é pelo menos 2 e a concentração do referido metal está entre 0,001 M e 1 M. Além disso, é providenciado um método para a determinação da presença de um antibiótico caracterizado por ser adicionado um sal metálico ao referido meio de teste e/ou à referida amostra de fluido. Finalmente, é providenciado um kit adequado para a determinação de um antibiótico num fluido.

DESCRIÇÃO
"TESTE DE SANGUE E URINA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um novo método para a detecção rápida da presença ou ausência de resíduos de medicamentos antimicrobianos na urina e sangue.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os medicamentos antimicrobianos não são apenas aplicados como medicação, mas são também amplamente utilizados como substâncias promotoras do crescimento na medicina veterinária. Na agricultura moderna, a utilização legal de medicamentos veterinários como aditivo em rações é uma prática comum. Estes aditivos alimentares previnem a doença do animal, aumentam o seu crescimento ou aumentam a eficácia da ração. Os compostos podem ser adicionados à ração ou à água potável dos animais. Em alguns países é permitida a administração por injeção de por exemplo substâncias promotoras do crescimento, aumentando assim a quantidade de medicamentos antimicrobianos nos alimentos humanos. É óbvio que pode também ocorrer a utilização ilegal de medicamentos veterinários.

A presença de medicamentos antimicrobianos nos alimentos é uma preocupação crescente entre os consumidores. As reacções alérgicas e efeitos na flora intestinal humana causados por antibióticos são bem conhecidos. Outra questão é o desenvolvimento de bactérias resistentes. É bem conhecida que a utilização incorrecta de antibióticos (i.e. administração quando tal não é necessário com bases

médicas, ou ciclos de tratamento incompletos) é a mais importante causa do desenvolvimento de resistência a antibióticos. Também, a presença de compostos antimicrobianos nos alimentos leva a um aumento de bactérias resistentes a medicamentos. As bactérias patogénicas para humanos podem assim desenvolver resistência a antimicrobianos, que são utilizados tanto como aditivos para rações e na medicina humana. Outra desvantagem da utilização de antibióticos em rações como promotores de crescimento é o facto de os antibióticos influenciarem de modo negativo o processo de produção de produtos derivados de carnes fermentadas tais como salsichas, devido à inibição das culturas iniciais.

A maioria dos medicamentos veterinários entram na cadeia alimentar humana através da carne proveniente de animais para abate ou através de produtos de origem animal como o leite e os ovos.

O controlo da presença de medicamentos antimicrobianos em animais para abate, produtos de origem animais e produtos alimentares, é uma questão importante na indústria alimentar. Na maioria dos países foram estabelecidos limites máximos de resíduos ou níveis de tolerância para resíduos de medicamentos em carne fresca e produtos à base de carne. Para compostos que não são permitidos existe uma tolerância zero, tais substâncias nunca podem estar presentes em produtos de origem animal. Para a maioria dos medicamentos é determinado um intervalo de segurança. Este é o período mínimo entre o último tratamento e o momento do abate. Durante este período os resíduos do medicamento diminuem até um nível inferior ao limite máximo de resíduos. No entanto, em alguns casos, mesmo após o

intervalo de segurança podem ainda estar presentes no animal concentrações de medicamento demasiado elevadas. Tal pode ser causado por diferenças naturais individuais no metabolismo, ou por perturbações no processo de excreção do medicamento devido a doença. Finalmente, os procedimentos podem não ter sido aplicados correctamente nos intervalos de segurança. Na maioria dos países a legislação que diz respeito a resíduos de medicamentos veterinários em produtos alimentares é mantida utilizando um programa oficial de controlo. De modo geral, as instituições governamentais examinam uma determinada percentagem dos animais abatidos para a presença de resíduos de medicamentos veterinários. De modo adicional, os matadouros ou supermercados podem examinar também a carne crua, produtos derivados de carne e órgãos tais como o rim e o fígado.

Ainda que muitos dos medicamentos antimicrobianos mais importantes sejam excretados através da urina, até ao momento a urina praticamente não é utilizada como substrato para examinar a presença ou ausência de medicamentos antimicrobianos em animais para abate. Os exemplos de medicamentos antimicrobianos animais, que são excretados por intermédio da urina, são os β -lactâmicos tais como a amoxicilina, ampicilina, penicilina G e a penicilina V, tetraciclinas tais como a clortetraciclina e oxitetraciclina, aminoglicósidos tais como a gentamicina e a estreptomicina, e sulfonamidas tais como a sulfadimidina.

A quantidade de compostos antimicrobianos na urina é indicativa dos níveis de compostos antimicrobianos na porção comestível do animal, p.ex. o tecido muscular e o fígado. É fácil compreender que o exame da urina oferece

vantagens enormes. Para muitas espécies de animais é bastante simples a obtenção de amostras de urina já que muitos animais têm momentos específicos durante os quais a urina é excretada.

A utilização da urina como amostra para testar a presença de medicamentos antimicrobianos na carne, permitiria que o animal fosse testado antes do abate. Tal oferece a possibilidade ao agricultor de verificar se o intervalo de segurança foi terminado como esperado. Caso contrário, o agricultor decidirá esperar alguns dias antes do transporte do animal para o matadouro. Os prejuízos económicos no caso de um animal ser determinado positivo para antibióticos após o abate são elevados. É bastante óbvio que todo o sistema de controlo para a detecção de resíduos de medicamentos antimicrobianos na cadeia alimentar humana será mais eficiente se os animais forem examinados antes ao invés de após o abate.

Como alternativa podem ser utilizadas amostras de sangue de animais para determinar a presença ou ausência de resíduos de medicamentos antimicrobianos em animais para abate. Tanto as amostras de urina como de sangue podem obviamente ser obtidas após o abate do animal. Nesse caso as porções de carne valiosas não têm que ser danificadas para obter uma amostra.

Os resíduos antimicrobianos podem ser detectados utilizando testes de inibição microbial (p.ex. testes de difusão em agar). Tais métodos são principalmente utilizados para examinar fluidos de leite e carne e estão descritos nos documentos GB A 1467439, EP 0005891, DE 3613794, CA 2056581, EP 0285792 e US 5,494,805. Todas estas descrições

lidam com testes prontos a usar que utilizam um organismo de teste. O organismo de teste é maioritariamente embebido num meio de agar, que pode conter um indicador, uma solução tampão, nutrientes e substâncias para alterar a sensibilidade para determinados compostos antimicrobianos de modo positivo ou negativo.

Os organismos de teste adequados são estirpes de *Bacillus*, *Streptococcus* e/ou *Escherichia coli*. De modo geral o princípio do teste é que quando os compostos antibacterianos estão presentes numa amostra com uma concentração suficiente para inibir o crescimento do organismo de teste, a cor de um indicador ácido/base ou redox é mantida, enquanto na ausência de inibição o crescimento do organismo de teste é acompanhado pela formação de metabolitos que irão alterar a cor do indicador. Os métodos de teste actualmente disponíveis são adequados para a detecção de resíduos antimicrobianos em muitos tipos diferentes de amostras. No entanto o problema com estes métodos de teste é o facto de a detecção de resíduos antimicrobianos na urina e no sangue não ser possível devido à presença de substâncias perturbadoras. Estas substâncias interferem com o teste originando resultados falsos positivos.

São conhecidos alguns métodos de preparação das amostras de urina e de sangue. O método mais simples é a diluição da amostra com água (pelo menos três vezes). No entanto é óbvio que a diluição da amostra leva a uma perda de sensibilidade com o mesmo factor.

O ajuste do pH de cada amostra de urina e de sangue para um determinado valor elimina as diferenças entre as amostras.

No caso da urina o pH pode apresentar diferenças consideráveis. Estas flutuações são observadas entre espécies, entre animais da mesma espécie e de dia para dia para o mesmo animal. Por exemplo, devido a diferenças na ração e no intervalo de tempo necessário para obter as amostras de urina o pH pode sofrer fortes variações entre valores ácidos e básicos. No entanto, tais métodos não podem ser utilizados na prática, já que o mais conveniente seria o exame das amostras de urina no local do agricultor. A medição do pH exacto e a titulação da amostra para um determinado valor de pH com a utilização de soluções ácidas ou alcalinas é demasiado complexa nesta situação. A este respeito Erasmunson *et al.* (Analyst 123, 2497-2499 (1988)) sugeriram a remoção de bicarbonato das amostras de urina anterior à análise por tratamento ácido até pH 5,5. As desvantagens desta abordagem são o facto de ser necessária a realização de muitas operações tais como a adição de várias alíquotas de ácido, medição do valor de pH e permitir que o dióxido de carbono evolua e o facto de as amostras serem diluídas diminuindo assim a sensibilidade. Além disso foi também observado que o ajuste do pH não oferece uma solução satisfatória para a maioria das amostras já que ocorrem ainda resultados falsos positivos. Finalmente também ajustando o pH, novamente uma grande desvantagem é a diluição da amostra.

Pode ser concluído que até agora não está disponível qualquer método de teste adequado para a detecção de resíduos antimicrobianos em amostras de urina e de sangue. Os métodos actuais não são fiáveis, são morosos e podem originar resultados falsos positivos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objectivo da presente invenção providenciar um meio de teste melhorado e um método para a determinação de antibióticos em fluidos, de modo particular sangue e urina. Surpreendentemente, verificámos haver uma melhoria substancial que é possível obter aquando da aplicação de um sal de um metal alcalino terroso ao meio de teste.

Para este propósito, é providenciado um meio de teste que compreende um microorganismo de teste, um indicador e um metal na sua forma ionizada, para o qual o metal é um metal alcalino terroso e a concentração de referido metal está entre 0,005 M e 1 M.

Além disso, é providenciado um método para a determinação da presença de um antibiótico num fluido que compreende os seguintes passos:

- (a) colocar em contacto uma amostra do referido fluido com um meio de teste que compreende um microorganismo de teste e um indicador;
- (b) incubar o microorganismo de teste durante um intervalo de tempo para cultivar o microorganismo de teste no caso de não estar presente antibiótico na amostra de fluido; e
- (c) detectar o crescimento ou inibição do crescimento do microorganismo de teste com o indicador.

caracterizado por ser adicionado um sal de um metal alcalino terroso ao referido meio de teste e/ou à referida amostra de fluido e a concentração do metal no meio de teste e/ou amostra está entre 0,005 M e 1 M.

É também providenciado um kit adequado para a realização do método de acordo com a invenção, compreendendo o kit:

(a) pelo menos um recipiente pelo menos parcialmente cheio com um meio de teste que compreende um nutriente de microorganismo de teste e pelo menos um indicador, e;

(b) um sal de um metal alcalino terroso para o qual a solubilidade do sal do metal em água a 20 °C é pelo menos 0,02 M,

ou compreendendo o meio de teste de acordo com as reivindicações 1 ou 2.

É também providenciada a utilização de um sal de um metal alcalino terroso para tratar a amostra antes da determinação da presença ou ausência de um antibiótico num teste de inibição microbiano.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os termos e abreviações indicados abaixo são utilizados ao longo desta apresentação e são definidos como se segue.

O termo "antibiótico" refere-se a uma ou mais substâncias ou constituintes químicos de uma amostra que apresenta actividade anti-bacteriana.

O termo "fluido" refere-se a substâncias ou composições que possuem partículas que se movem facilmente e que alteram a sua posição relativa sem que haja separação da massa, que cede facilmente sob pressão e que é capaz de fluir. No que diz respeito à presente invenção, o termo "fluido" refere-

se a composições tais como soluções aquosas, sangue, guano, líquido proveniente de carne, leite, urina e semelhantes.

O termo "antibiótico β -lactâmico" refere-se a antibióticos que compreendem uma estrutura β -lactâmica na sua estrutura química e que apresentam actividade anti-bacteriana. São exemplos dos referidos antibióticos β -lactâmicos a amoxicilina, ampicilina, cefaclor, cefadroxil, cefprozil, ceftiofur, cefalexina, cefapirina, cefradina, cloxacilina, dicloxacilina, fluoxacilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V e ticarcilina.

O termo "indicador" refere-se a um composto ou substância que, quando se altera de um estado para outro, providencia um sinal detectável tal como uma alteração na cor ou fluorescência.

O termo "teste" refere-se a um método, procedimento, processo ou reacção utilizada para identificar, caracterizar ou quantificar um ou mais antibióticos ou classes de antibióticos.

O termo "dispositivo de teste" refere-se aos componentes ou parte dos componentes adequados para realizar o teste.

O termo "meio de teste" refere-se a um líquido ou suspensão solidificada de microorganismos de teste, compreendendo ainda pelo menos um indicador e compreendendo opcionalmente nutrientes e substâncias tampão. O meio de teste será preferencialmente solidificado na forma de um gel ou sol por intermédio de um agente gelificante.

O termo "microorganismo de teste" refere-se a um microorganismo que é sensível em relação aos antibióticos e que é adequado para monitorizar a presença ou ausência de crescimento.

O termo "limite" refere-se ao valor da concentração acima do qual um determinado antibiótico deve ser considerado como presente e abaixo do qual o referido antibiótico deve ser considerado como ausente. De modo geral, é fornecido um valor limite para cada antibiótico em particular pelas autoridades locais, regionais ou inter-regionais mas pode também estar predefinido para determinados propósitos de investigação.

O termo "valência" refere-se ao grau de poder de combinação de um elemento, tal como um metal, como mostrado pelo número de pesos atômicos de um elemento univalente (como o hidrogénio) com os quais o número atómico do elemento irá combinar ou para os quais pode ser substituído ou com o qual pode ser comparado.

Num primeiro aspecto da invenção é providenciado um meio de teste para a detecção de compostos antimicrobianos em fluidos que compreende um ou mais tipos de microorganismos de teste com agentes de detecção, um indicador e um metal na forma ionizada. De modo inesperado, foi verificado que quando é utilizado um metal na forma ionizada no meio de teste, os problemas do estado da técnica acima mencionados puderam ser ultrapassados com retenção da sensibilidade do teste. De modo preferido, a valência do referido metal é pelo menos 2. O metal é um metal alcalino terroso. Exemplos de tais metais são o bário, berílio, cálcio, magnésio, e estrôncio. De modo mais preferido, o referido metal é o

bário ou o cálcio. A concentração do referido metal no referido teste é entre 0,005 M e 1 M, de modo preferido entre 0,01 e 0,1 M. Os iões adequados como contra iões para os iões metálicos são iões que cumprem os requisitos de solubilidade. Os contra iões preferidos são acetato, benzoato, brometo, cloreto, iodeto, nitrato, nitrito e em alguns casos sulfato. Os sais metálicos devem ter solubilidades em água que permitam a fácil dissolução do sal metálico na amostra de teste ou no meio de teste. De modo geral a referida solubilidade em água deverá ser igual a ou superior a 0,01 M, de preferência igual ou superior a 0,02, mais preferivelmente igual ou superior a 0,1 M, de modo preferido igual ou superior a 1 M. Os sais metálicos preferidos são o brometo de bário, cloreto de bário, iodeto de bário, nitrato de bário, cloreto de berílio, sulfato de berílio, acetato de cálcio, brometo de cálcio, cloreto de cálcio, iodeto de cálcio, nitrato de cálcio, cloreto de magnésio, e sulfato de magnésio. De modo mais preferido o sal metálico é cloreto de cálcio.

De modo opcional, o meio de teste também pode conter nutrientes, estabilizadores, e substâncias que alteram a sensibilidade a determinados compostos antimicrobianos de modo positivo ou negativo, e/ou agentes que aumentam a viscosidade. São exemplos de substâncias que alteram a sensibilidade a determinados compostos antimicrobianos são a adenosina e antifolatos como a ormetofirina, tetroxoprima, e trimetoprima que melhoram a sensibilidade do organismo de teste em relação a compostos sulfatados ou sais de ácidos oxálicos o ácido hidrofúrico, que melhora a sensibilidade em relação à tetraciclina. Pode ser adicionada cisteína para diminuir a sensibilidade em relação à penicilina, quando necessário. São exemplos de

agentes que aumentam a viscosidade o ascorbil metilsilanol pectinato, carbómero, celulose de carboximetilo, álcool cetearílico, álcool cetílico, ésteres cetílicos, cocamida DEA, cera emulsionante, glucose, celulose de hidroxietilo, celulose de hidroxipropilmetilo, lauramida DEA, linoleamida DEA, silicato de magnésio e alumínio, maltodextrinas, distearato PEG-8, poliacrilamida, álcool polivinílico, copolímero PVP/hexadeceno, cloreto de sódio, sulfato de sódio, propil betaína de soja, goma xantana e semelhantes. De modo alternativo, os ingredientes opcionais do meio de teste acima mencionados podem também ser adicionados de modo exógeno.

O meio de teste compreende um ou mais indicadores, no entanto, estes compostos podem também ser adicionados durante o método de teste. Pelo menos um indicador está presente durante o cultivo do microorganismo na presença da amostra de fluido de modo a indicar quaisquer alterações que tomem lugar no meio de reacção. Um especialista na técnica entende que muitos indicadores são adequados para este propósito. São particularmente úteis os indicadores que, aquando da mudança de um estado para o outro, providenciam um sinal visualmente detectável tal como uma alteração na cor ou fluorescência. Tais indicadores podem ser facilmente seleccionados de manuais tais como "H.J. Conn's Biological Stains", R.D. Lillie ed., Baltimore, 1969. Os indicadores preferidos são indicadores de pH e/ou indicadores redox. São exemplos de indicadores adequados os Azul Ácido 120, Laranja Ácido 51, Amarelo Ácido 38, ácido Alizarina, Azul de Alizarina, Azul A, Azul B, Azul básico 3, Negro Brilhante, Azul de Cresil Brilhante, Croceína Brilhante MOO, Amarelo Brilhante, Púrpura de Bromocresol, Azul de Bromofenol, Vermelho de Bromofenol, Azul de

Bromotimol, Vermelho do Congo, Galocianina, Carmim de Indigo, Verde Janus B, Tornesol, Azul de metileno, Azul do Nilo A, Amarelo de Nitrazol (também referido como Amarelo de Nitrazina), o-Nitrofenol, p-Nitrofenol, 1-10 Fenantrolina, Fenolftaleína, Safranina O, Tionina, Azul de Toluidina.

Numa forma de realização do primeiro aspecto da invenção, o meio de teste está de modo preferido na forma de um sol ou gel. São exemplos adequados de agentes gelificantes o agar, ácido algínico e sais do mesmo, carraginato, gelatina, hidroxipropilguar e derivados do mesmo, goma de alfarroba (goma de farinha de semente de alfarroba), alga *Euchema* processada e semelhantes. A quantidade de agente gelificante no meio de teste está entre 2 e 100 g l⁻¹, de modo preferido 5 e 50 g l⁻¹, de um modo mais preferido entre 10 e 20 g l⁻¹, e no modo mais preferido entre 12 e 15 g l⁻¹. No entanto, o técnico especializado compreenderá que outros tipos de meios de teste sólidos podem ser baseados em materiais transportadores tais como cerâmica, algodão, vidro, partículas metálicas, papel, polímeros em qualquer molde ou forma, silicatos, esponjas, lã e semelhantes. No caso de dispositivos de teste comerciais tais como Premi[®]Test ou Delvotest[®] o meio de teste está presente em tubos ou placas. São exemplos de dispositivos úteis para o propósito da invenção os tubos transparentes, unitários ou em conjunto ou combinados como um bloco de material translúcido providenciado com diversas perfurações aí moldados. De modo preferido os dispositivos de teste possuem determinadas dimensões. Tal deve-se à fiabilidade do teste. No caso de um teste baseado na tecnologia de difusão em agar são utilizados tubos de modo preferido. O dispositivo de teste irá ser de modo preferido

suficientemente alto para conter uma quantidade de meio agar e de amostra que corresponde a uma altura de 3-30 mm, de modo mais preferido 5-15 mm. A dimensão do corte transversal interno das unidades de teste é de modo preferido 1-30 mm, de modo mais preferido 5-15 mm. Os dispositivos de teste são de modo preferido encerrados de modo estanque durante o armazenamento, condições sob as quais podem ser armazenados durante pelo menos vários meses. É claro que pode ser utilizado qualquer outro dispositivo de teste adequado para a execução do método da invenção. O volume de meio agar no dispositivo de teste é determinado pela altura do dispositivo de teste e pela percentagem do volume do dispositivo de teste, que está cheia com o meio agar. O volume do meio agar é de modo preferido 0,01-5 ml, de modo mais preferido 0,1-1 ml. Numa forma de realização alternativa, o dispositivo de teste é uma placa que compreende um ou mais poços contendo o meio de teste. Uma amostra do fluido a ser analisado pode ser adicionada directamente a um poço que contém o meio de teste ou pode ser adicionada de modo indirecto ao referido poço, por exemplo, por aplicação inicial da amostra do fluido a ser analisado num material transportador tal como um disco de papel e posteriormente a colocação do material transportador ao qual o fluido está aderido ou absorvido no meio de teste.

Noutra forma de realização do primeiro aspecto da invenção, o microorganismo é um microorganismo termo estável tal como uma espécie de *Bacillus*, de modo preferido *Bacillus stearothermophilus*, ou uma espécie de *Streptococcus*, de modo preferido *Streptococcus thermophilus*. Estas espécies podem ser introduzidas no teste como unidades capazes de produzir colónias, Unidades Formadoras de Colónias (UFCs).

Tais UFCs podem ser esporos, células vegetativas ou uma mistura de ambos. A concentração de tais UFCs é expressa em Unidades Formadoras de Colónias por ml de meio de teste (UFC ml⁻¹) e está geralmente no intervalo de 1x10⁵ a 1x10¹² UFC ml⁻¹, de modo preferido 1x10⁶ a 1x10¹⁰ UFC ml⁻¹, de modo mais preferido 2x10⁶ a 1x10⁹ UFC ml⁻¹, de modo ainda mais preferido 5x10⁶ a 1x10⁸ UFC ml⁻¹, ou de modo ainda mais preferido 5x10⁶ a 2x10⁷. São exemplos das estirpes preferidas *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* C953 (depositado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Técnica de Delft com o número de adesão LMD 74,1 e com o *Centraal Bureau voor Schimmelcultures* (CBS), Baarn com o número de adesão CBS 760,83) e *Streptococcus thermophilus* T101 (DSM 4022). Ambas as estirpes são muito sensíveis a compostos antimicrobianos, especialmente quimioterapêuticos tais como compostos sulfatados e antibióticos tais como penicilinas e tetraciclinas. Podem ser utilizadas estirpes de *Escherichia coli* ou outras bactérias gram negativas adequadas para a detecção de, por exemplo, quinolonas. Os *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* C953 e *Streptococcus thermophilus* T101 possuem um crescimento rápido e são termófilos. Por exemplo, as temperaturas de crescimento óptimas das referidas estirpes de *Bacillus* estão entre 50 °C e 70 °C. A utilização de microorganismos termófilos impede o crescimento do microorganismo durante o armazenamento ou transporte do teste. Quando o organismo de teste é uma estirpe de *Bacillus*, é de modo preferido incorporado no meio agar na forma de uma suspensão de esporos, que pode ser preparada e incorporada no meio agar antes da solidificação utilizando métodos conhecidos (ver por exemplo GB A 1467439). Quando o organismo de teste é uma estirpe de *Streptococcus*, as bactérias são de modo preferido incorporadas no meio agar

na forma de células bacterianas, que podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos (ver por exemplo EP 0285792). A concentração dos organismos de teste no meio agar está de modo preferido entre 10^5 e 10^{10} unidades formadoras de colónias por ml (UFC ml^{-1}) de meio agar.

Ainda em outra forma de realização preferida do primeiro aspecto da invenção, são adicionados nutrientes como uma origem separada, p.ex. como um granulado, pó, comprimido, disco ou papel de filtro. Podem também ser adicionados outros compostos tais como os indicadores, estabilizadores e/ou antifolatos como uma origem separada, opcionalmente incorporados no meio nutriente. São nutrientes adequados para permitir a multiplicação do organismo de teste na ausência de resíduos antimicrobianos por exemplo fontes de carbono assimiláveis (p.ex. lactose, glucose ou dextrose), fontes de azoto assimiláveis (p.ex. peptona) e fontes de factores de crescimento, vitaminas e minerais (p.ex. extracto de levedura).

Num segundo aspecto da invenção é providenciado um método fiável e simples para levar a cabo a detecção de compostos antimicrobianos na urina e sangue. De acordo com a invenção é adicionado um metal alcalino terroso à amostra de fluido a ser analisada, p.ex. uma amostra de urina ou sangue, antes da adição da amostra ao sistema de teste. De modo alternativo o sistema de teste pode conter ele mesmo o referido sal metálico como definido no primeiro aspecto da invenção. De modo inesperado foi verificado que quando um sal metálico é utilizado no método de teste, os problemas do estado da técnica acima mencionados podem ser ultrapassados com retenção da sensibilidade do teste. Os requisitos dos sais metálicos, do meio de teste, do(s)

indicador(es), do microorganismo e dos componentes adicionais e as opções preferidas são as mesmas como definido no primeiro aspecto. Os referidos sais metálicos são adicionados ao meio de teste e/ou à amostra do fluido a ser analisada.

Numa forma de realização do segundo aspecto, o sal metálico é adicionado à amostra de fluido a ser analisada por intermédio de uma solução, de modo preferido uma solução aquosa.

Noutra forma de realização do segundo aspecto da invenção, o sal metálico é adicionado à amostra do fluido a ser analisado na sua forma sólida. De modo opcional o sal metálico na sua forma sólida e a amostra de fluido a ser analisada são misturados antes da análise. De modo preferido o sal metálico na sua forma sólida é adicionado na forma de um pó, granulado, comprimido, disco ou filtro de papel. Tal granulado, pó, comprimido, disco ou filtro de papel pode também conter de modo opcional nutrientes e/ou um ou mais indicadores e/ou estabilizadores, e/ou substâncias que alteram a sensibilidade a determinados compostos antimicrobianos de modo positivo ou negativo, e/ou agentes que aumentam a viscosidade, como acima definido no primeiro aspecto da invenção. A concentração do referido metal na referida amostra de fluido a ser analisada está entre 0,005 e 1 M, de modo preferido entre 0,01 e 0,1 M.

A quantidade de amostra de urina ou sangue a ser adicionada ao meio de teste depende do sistema de teste. O teste é incubado de acordo com as instruções do fabricante. Para os testes de difusão microbiana são adicionados 0,01-1,0 ml,

de modo preferido 0,05-0,5 ml ao meio de teste utilizando métodos bem conhecidos. O tempo de incubação do teste depende das circunstâncias. No caso dos testes de difusão em agar utilizando *Bacillus stearothermophilus* o teste é incubado num banho-maria ou bloco de aquecimento a 60-70 °C, de modo preferido a 62-65 °C. Os resultados podem ser obtidos após 1,5-4 horas, de modo preferido 2,5-3,5 horas.

Qualquer teste adequado para o método da invenção está incluído nesta invenção. Os exemplos são testes para os quais são utilizados microorganismos sensíveis seleccionados, p.ex. testes de difusão em agar, e testes baseados na ligação selectiva do composto a ser detectado. A ligação selectiva pode ser alcançada utilizando a tecnologia de anticorpos bem conhecida ou utilizando marcadores específicos. Qualquer amostra de fluido é adequada para análise pelo método da invenção. Deve ser notado que o método da invenção é também adequado para substâncias sólidas podendo o fluido de interesse das mesmas ser retirado quer por difusão, pressão ou perda natural de fluidos. São exemplos particulares deste último caso a carne e os materiais transportadores que foram impregnados com o fluido a ser analisado.

Num terceiro aspecto da invenção é providenciado um kit para a execução do método do segundo aspecto da presente invenção. Tal kit compreende, ou um meio de teste como descrito no primeiro aspecto da invenção ou compreende:

- (a) pelo menos um recipiente parcialmente cheio com um meio de teste que compreende um microorganismo de teste, nutrientes e pelo menos um indicador, e

- (b) um sal de um metal alcalino terroso em que o sal metálico tem uma solubilidade em água a 20 °C de pelo menos 0,02 M.

Os recipientes podem ser tubos de ensaio de qualquer forma e de qualquer material disponível, desde que seja possível a observação das alterações no indicador. É também possível, os recipientes podem ser poços tais como aqueles incorporados em placas de microtitulação.

O referido sal metálico é um sal metálico capaz de formar iões metálicos como definido no primeiro aspecto da invenção. O sal metálico pode estar presente como uma solução, de modo preferido uma solução aquosa, armazenada num recipiente. De modo preferido o referido sal metálico está presente na forma sólida, por exemplo na forma de um comprimido, um disco ou papel de filtro. A vantagem de fornecer o sal metálico no kit na forma sólida é o facto de poderem ser facilmente embaladas quantidades predeterminadas, por exemplo em comprimidos, o que facilita a dosagem. Ainda outra vantagem é o facto de a utilização de um sal metálico na forma seca não levar à diluição da amostra e consequentemente a uma redução da sensibilidade do teste.

De modo opcional, o referido kit compreende os meios para selar os referidos recipientes cheios com o meio de teste durante a incubação e/ou um anexo com instruções para utilização e/ou meios para regular o tempo necessário para a incubação.

Numa forma de realização do terceiro aspecto , o referido kit compreende nutrientes. De modo preferido os referidos

nutrientes estão contidos num meio tal como um comprimido, disco ou papel de filtro. Também outros compostos tais como o(s) indicador(es), estabilizadores e/ou antifolatos podem ser adicionados como uma fonte separada, de modo opcional incorporada no meio nutriente.

Em outra forma de realização do terceiro aspecto da presente invenção, o referido kit compreende um dispositivo termoestático, com o auxílio do qual as amostras de teste podem ser mantidas a uma temperatura predefinida. De modo preferido, o referido dispositivo termoestático é desenhado de modo a poder conter os referidos recipientes cheios com o meio de teste. De modo opcional o dispositivo termoestático está associado a um meio de regular o tempo necessário para a incubação de modo que o aquecimento e/ou o arrefecimento são parados após a passagem de um período predefinido.

Ainda em outra forma de realização do terceiro aspecto da invenção, o referido kit compreende um suporte de dados carregado com um programa informático adequado para fornecer instruções a um computador para efectuar a análise da informação digital obtida a partir de um dispositivo de leitura das amostras. O referido suporte de dados pode ser qualquer suporte adequado para o armazenamento de informação digital tal como um CD-ROM, uma disquete, um DVD, um cartão de memória, uma fita magnética ou semelhantes. De modo vantajoso, o referido suporte de dados carregado com um programa informático providencia um acesso fácil aos mais recentes programas informáticos disponíveis adequados para a utilização no método da presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1

Adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) a amostras de urina

As amostras de urina foram examinadas utilizando ampolas de teste de inibição microbiana fabricadas de acordo com os métodos descritos no documento EP 0005891 com os nutrientes presentes no agar. O referido teste é também conhecido como Premi®Test (comercializado por DSM, Delft, Holanda).

O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,81 mg, 0,0055 mmol) foi dissolvido em 100 μL de urina obtida a partir de porco (foi avaliado um total de 10 amostras) ou vitelos (foi avaliado um total de 35 amostras), que não continham quaisquer resíduos de medicamentos. Às amostras de controlo não foi adicionado CaCl_2 . As amostras foram adicionadas às ampolas de teste. Após uma pré incubação de 20 minutos à temperatura ambiente a amostra foi removida e o teste foi incubado em banho maria a 64 ± 1 °C de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos após 3-4 horas por leitura da alteração da cor de púrpura para amarelo.

Os resultados como abaixo sumariado demonstram que um tratamento da urina com CaCl_2 é essencial para minimizar os resultados de teste falsos positivos no Premi®Test.

Tabela 1

	Quantidade de resultados falsos positivos (%)	
	Vitelo	Porco
Urina	60	10
Urina + CaCl_2	9	0

Exemplo 2

Influência do CaCl_2 num teste de inibição microbiana

As amostras foram examinadas como descrito no Exemplo 1. O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido em água ou fluido de carne de galinha, em concentrações de 0,0,0078, 0,0156, 0,0312, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 M. As amostras foram adicionadas às ampolas de teste. Após uma pré incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente a amostra foi removida e o teste foi incubado em banho-maria a 64 ± 1 °C de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos após 165 minutos para o fluido de carne de galinha e 185 minutos no caso da água, por leitura da alteração da cor de púrpura para amarelo. Os resultados como abaixo sumariado demonstram claramente que uma concentração de CaCl_2 até 0,25 M em água não influencia os resultados do teste. No fluido da carne de galinha não há inibição no caso da concentração de CaCl_2 ser até 1 M.

Tabela 2

Concentração CaCl_2 (M)	Cor observada nos testes de inibição microbiana	
	Água	Fluido de carne de galinha
0 (controlo)	Amarelo	Amarelo
0,0078	Amarelo	Amarelo
0,0156	Amarelo	Amarelo
0,0312	Amarelo	Amarelo
0,0625	Amarelo	Amarelo
0,125	Amarelo	Amarelo
0,25	Amarelo	Amarelo
0,5	Púrpura	Amarelo
1	Púrpura	Amarelo

Exemplo 3

Adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) a amostras de urina de bovino

Nesta experiência é demonstrado que a adição de CaCl_2 à urina reduz os falsos resultados num teste de inibição microbiana.

As amostras foram examinadas utilizando ampolas de teste de inibição microbiana fabricadas de acordo com os métodos descritos no documento EP 0005891 com os nutrientes presentes no agar. O referido teste é também conhecido como Premi®Test (comercializado por DSM, Delft, Holanda).

O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mg, 0,0068 mmol) foi dissolvido em 100 μL de urina obtida de bovino (foi avaliado um total de 25 amostras) que não continha quaisquer resíduos de medicamentos. Não foi adicionado qualquer CaCl_2 às amostras de controlo. As amostras foram adicionadas às ampolas de teste. Após uma pré incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente a amostra foi removida e o teste foi incubado em banho-maria a 64 ± 1 °C de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos após 3-4 horas por leitura da alteração de cor de púrpura para amarelo.

Os resultados tal como sumarizado na Tabela 3 demonstram claramente que um tratamento da urina com CaCl_2 é essencial para minimizar resultados de teste falsos positivos no Premi®Test.

Tabela 3

	Quantidade de resultados falsos positivos (%)
	Bovino
Urina	100
Urina + CaCl_2 (1 mg/100 μL)	12

Exemplo 4

A adição de acetato de cálcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) a amostras de urina de bovino e de porco.

Nesta experiência é demonstrado que a adição do metal alcalino terroso cálcio quer CaCl_2 ou $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ à urina reduz os falsos resultados num teste de inibição microbiana.

As amostras foram examinadas utilizando ampolas de teste de inibição microbiana fabricadas de acordo com os métodos descritos no documento EP 0005891 com os nutrientes presentes no agar. O referido teste é também conhecido como Premi[®]Test (comercializado por DSM, Delft, Holanda).

O $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0 mg, 0,0068 mmol), o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1,0 mg, 0,0041 mmol) e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, (2,0 mg, 0,0082 mmol) foram dissolvidos em 100 μL de urina obtida de bovino (foi avaliado um total de 25 amostras) e de porco (foi avaliado um total de 9 amostras), que não continham quaisquer resíduos de medicamentos. Não foi adicionado qualquer metal alcalino terroso cálcio às amostras de controlo. As amostras foram adicionadas às ampolas de teste. Após uma pré incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente a amostra foi removida e o teste foi incubado em banho-maria

a 64 ± 1 °C de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos após 3-4 horas por leitura da alteração de cor de púrpura para amarelo.

Os resultados tal como sumariado na Tabela 4 demonstram que um tratamento da urina com metal alcalino terroso cálcio minimiza os resultados de teste falsos positivos no Premi®Test.

Tabela 4

	Quantidade de resultados falsos positivos (%)	
	Bovino	Porco
Urina	100	89
Urina + CaCl_2 (1 mg/ 100 μL)	12	11
Urina + $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1 mg/ 100 μL)	20	0
Urina + $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (2 mg/ 100 μL)	4	12

Lisboa, 19 de Janeiro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um meio de teste que compreende um microorganismo de teste, um indicador e um metal na forma ionizada, caracterizado por o metal ser um metal alcalino terroso e a concentração do metal ser entre 0,005 M e 1 M.
2. Um meio de teste de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o metal alcalino terroso ser seleccionado de um grupo que consiste de cálcio, bário e magnésio.
3. Um método para a determinação da presença de um antibiótico num fluido que compreende os passos:
 - (a) colocar em contacto uma amostra do fluido com um meio de teste que compreende um microorganismo de teste e um indicador;
 - (b) incubar o microorganismo durante um período de tempo para cultivar o organismo de teste no caso de haver presença de antibiótico na amostra; e
 - (c) detectar o crescimento ou a inibição do crescimento do microorganismo de teste com o indicador,caracterizado por o sal de um metal alcalino terroso ser adicionado ao meio de teste e/ou à amostra e a concentração do metal no meio de teste e/ou amostra ser entre 0,005 e 1 M.

4. Um método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o indicador ser pelo menos um indicador de pH ou pelo menos um indicador redox.
5. Um método de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado por o fluido no qual deverão ser determinados os antibióticos é sangue ou urina.
6. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado por o metal alcalino terroso ser seleccionado de um grupo que consiste de cálcio, bário e magnésio.
7. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, caracterizado por a concentração do sal metálico no meio de teste e/ou a amostra não exceder 1 M.
8. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, caracterizado por o sal metálico ser adicionado à amostra.
9. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, caracterizado por o sal metálico ser adicionado à amostra antes da amostra ser adicionada ao meio de teste.
10. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 9, caracterizado por o sal metálico ser adicionado à amostra por intermédio de uma solução.

11. Um kit adequado para levar a cabo o método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 10, compreendendo o kit:

- (a) pelo menos um recipiente parcialmente cheio com um meio de teste que compreende um microorganismo, nutrientes e pelo menos um indicador, e
- (b) um sal de um metal alcalino terroso em que o sal metálico tem uma solubilidade em água a 20 °C de pelo menos 0,02 M,

ou compreendendo o meio de teste de acordo com a reivindicação 1 ou 2.

12. Um kit de acordo com a reivindicação 11, compreendendo ainda um dispositivo termoestático adequado para manter as amostras a uma temperatura predefinida.

13. Um kit de acordo com a reivindicação 11 ou 12, compreendendo ainda um suporte de dados carregado com um programa informático adequado para instruir um computador a analisar a informação digital obtida a partir de um dispositivo de leitura das amostras.

14. Um kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado por o sal metálico ser apresentado em comprimido, disco ou filtro de papel ou uma solução aquosa.

15. A utilização de um sal de um metal alcalino terroso para tratar uma amostra antes de determinar a

presença ou ausência de um antibiótico na amostra num teste de inibição microbiana.

Lisboa, 19 de Janeiro de 2009