

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 919**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2006 E 06829574 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1966594**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para la detección de micotoxinas**

30 Prioridad:

23.12.2005 DE 102005062377

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

15.04.2013

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(50.0%)**

Alfred-Nobel-Strasse 10

40789 Monheim , DE y

**BAYER CROPSCIENCE AKTIENGESELLSCHAFT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

BURMEISTER, JENS;

DORN, INGMAR;

RABE, UWE y

HÄUSER-HAHN, ISOLDE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 400 919 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

Dispositivo y procedimiento para la detección de micotoxinas

La invención se refiere a un dispositivo y a un procedimiento para la detección de micotoxinas así como a kits que son adecuados para la realización del procedimiento.

- 5 La detección de micotoxinas comprende un gran campo de aplicación, por ejemplo, en el sector de la alimentación y de los piensos, en la analítica ambiental, en protección fitosanitaria así como en la investigación bioquímica.

10 Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por mohos con estructura química muy diversa. Las micotoxinas se originan en productos de cosecha como cereales, semillas que contienen aceite y frutos y pueden ser la causa de intoxicaciones en humanos y animales. Se han identificado hasta la fecha más de 300 micotoxinas distintas que se clasifican en aproximadamente 25 tipos de estructura y muestran distintos efectos tóxicos. Las micotoxinas pueden provocar, según cada tipo de toxina, intoxicaciones agudas o crónicas. Comúnmente grupos que provienen de micotoxinas son aflatoxinas, ocratoxinas, alcaloides del cornezuelo del centeno, patulina y fusariotoxina. Entre las fusariotoxinas son de especial relevancia el desoxinivalenol, zearalenona, nivalenol, toxina T-2/HT2 y la fumonisina, ya que son frecuentes en productos de cereales. En consecuencia se debería realizar un ensayo de micotoxinas, por ejemplo, de toxinas de hongos de los cultivos, por ejemplo fusariotoxinas, o de toxinas de hongos de almacén en puntos de recepción de cereales, en manipuladores de cereales así como procesadores de cereales, por ejemplo, molinos, malterías, fabricantes de piensos, en agricultura, consejos reguladores, universidades o ministerios, por ejemplo, el ministerio de consumo, para asegurar la calidad de los alimentos.

20 En el estado de la técnica se conocen una serie de procedimientos para la detección de micotoxinas. La detección de micotoxinas se realiza, por ejemplo, mediante procedimientos cromatográficos como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), que pueden estar acoplados con detección basada en fluorescencia, absorción o de espectroscopia de masas. Previo al análisis por HPLC, por ejemplo de una muestra de cereal, se realiza en general el enriquecimiento y purificación del analito mediante columnas de inmuno-afinidad. Son desventajas de todos los procedimientos basados en HPLC la elevada inversión, la manipulación de muestras relativamente compleja así como los prolongados tiempos de análisis. Debido a las desventajas citadas los procedimientos de detección basados en HPLC no son adecuados para análisis rápidos, económicos y sencillos, por ejemplo, de muestras de cereales en operaciones de producción, recepción, manipulación o procesamiento de cereales. Es su lugar se realiza el análisis basado en HPLC en laboratorios de análisis especializados. Como consecuencia en la práctica el resultado se proporciona ya con un retraso temporal de varios días.

30 Un procedimiento alternativo para la detección de micotoxinas es la técnica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Para el ensayo ELISA se preparan placas de microtítulos, cuyos pocillos están recubiertos por ejemplo con captadores-anticuerpos, que se unen de forma específica a una micotoxina. Son desventajas del ensayo ELISA las múltiples etapas de pipeteado, lavado e incubación que pueden llevar a tiempos de análisis relativamente largos de más de 30 minutos. Esto impide llevar a cabo el ensayo rápidamente in situ fuera de un laboratorio analítico. Además de esto el ensayo no permite la detección simultánea de varios analitos, ya que en general se recubre cada placa de microtítulos sólo con un tipo de anticuerpos.

40 Otro procedimiento para la detección de micotoxinas son ensayos de flujo lateral (LFA). Para la detección de micotoxinas por medio de LFA se puede considerar, por ejemplo, un inmunoensayo directo, competitivo sobre una tira de nitrocelulosa, en donde la muestra que se va a analizar se hace pasar por toda la tira de nitrocelulosa mediante fuerzas capilares. Es desventajoso que el procedimiento permita sólo una detección de micotoxina cualitativa. Además es desventajoso que para cada micotoxina en este ensayo sea necesaria una tira por separado.

45 En el estado de la técnica se encuentran también trabajos para el desarrollo de procedimientos de detección para micotoxinas, por ejemplo, como describen M. M. Ngundi y col., Anal. Chem. 2005, 77, 148 a 154. En este procedimiento se hace referencia a un inmunoensayo indirecto, competitivo para la detección de ocratoxina A, inmovilizándose la ocratoxina A sobre portaobjetos de cristal. La mezcla de un anticuerpo marcado con fluorescencia contra ocratoxina A y la muestra que se va a determinar se añade sobre los portaobjetos de vidrio y tras la separación de los anticuerpos no unidos mediante lavado se pueden leer estos. Es desventajoso en este procedimiento que sean necesarias etapas de lavado y tiempos de incubación de 10 a 20 minutos y que se requieran sistemas de emisión de imagen de fluorescencia costosos para la lectura de los resultados. Por estos motivos esto no posibilita desarrollar un ensayo rápido que se pueda realizar in situ, fuera de un laboratorio analítico.

50 F.S. Ligler y col., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 377, 3, 469-777 describe un procedimiento de análisis de micotoxinas por medio de un sensor matricial de guíasondas en un fluoroinmunoensayo competitivo. Para determinar la fumonisina micotoxina se seleccionó un ensayo competitivo, donde la fumonisina se inmoviliza en la superficie del sensor y se incubó con una mezcla de anticuerpos anti fumonisina Cy5 marcados con fluorescencia y muestra.

Los procedimientos conocidos en el estado de la técnica para la detección de micotoxinas necesitan por tanto

grandes costes de inversión debido a los complicados equipos de lectura, implican muchas etapas manuales, o no son de utilidad fuera de un laboratorio analítico.

5 La presente invención se basa por tanto en el objetivo de proporcionar un procedimiento que supere al menos una de las desventajas del estado de la técnica previamente citadas, especialmente un procedimiento que haga posible la detección rápida, de manipulación sencilla y económica de micotoxinas en una muestra.

Este objetivo se consigue mediante un procedimiento para la detección rápida de micotoxinas que comprende las siguientes etapas:

Se describe además un dispositivo para la realización del procedimiento para la detección de micotoxinas.

Otro objeto es un kit adecuado para la realización del procedimiento para la detección de micotoxinas.

10 Resultan otras configuraciones ventajosas de la invención a partir de las reivindicaciones subordinadas.

15 De forma sorprendente, se encontró que el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de micotoxinas se realiza de forma sencilla, y se puede realizar fuera de laboratorios de análisis especializados. Esto posibilita que se pueda realizar el procedimiento de acuerdo con la invención en forma de un ensayo rápido, sin que se deban entregar muestras necesariamente a un laboratorio para el análisis. Además es ventajoso que la detección de micotoxina según el procedimiento de acuerdo con la invención no necesita, o sólo pocas, etapas de lavado. Esto es especialmente ventajoso ya que la realización de etapas de lavado lleva tiempo, retrasa la obtención de un resultado de análisis, y especialmente en la realización poco cuidadosa o inadecuada los resultados del análisis se alteran o puede hacer completamente imposible la detección.

20 La combinación de propiedades ventajosas del procedimiento de acuerdo con la invención hace posible que se pueda realizar una detección de micotoxinas en alimentos, por ejemplo, en puntos de recepción de cereales, en manipuladores de cereales o procesadores de cereales. Especialmente

25 a) preparar un guíaondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a), y donde sobre la capa (a) se inmovilizan separados espacialmente conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina como elemento de reconocimiento químico o bioquímico para un ente de unión que se une a micotoxina,

30 b) aplicación de una muestra que contiene micotoxina(s) y de entes de unión que se unen a micotoxina a los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina, donde un elemento de marcado está unido a un ente de unión o a los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados,

35 c) detectar una señal en el campo de evanescencia que se origina por el cambio de las propiedades ópticas en la interfaz con el guíaondas debido a la interacción de los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina con las micotoxinas de la muestra y/o los entes de unión que se unen a la micotoxina,

después

d) determinar la cantidad de micotoxina(s) presente(s) en la muestra.

posibilita la viabilidad sencilla y rápida del procedimiento, pudiendo realizarse este también por personas que no sean laborantes especializados de un laboratorio.

40 En formas de realización preferidas del procedimiento se usa como guíaondas de capa fina un chip biológico de campo de evanescencia, que se basa en un guíaondas de capa fina, preferiblemente un chip biológico de guíaondas óptico plano, que se basa en un guíaondas de capa fina.

45 Los guíaondas ópticos son una clase de transductores de señal, con los que se puede detectar el cambio de propiedades ópticas de un medio, que limita con una capa guíaondas, de forma típica un dieléctrico. Si se transporta luz como modo dirigido a la capa guíaondas el campo de luz no cae de forma abrupta en la interfaz medio/guíaondas, sino que decrece exponencialmente en el denominado medio de detección que limita con el guíaondas. Este campo de luz de caída exponencial se designa como campo evanescente. Si cambia las propiedades ópticas del medio que limita con el guíaondas dentro del campo evanescente se puede detectar este mediante un equipo de medición adecuado.

50 Es ventajoso en el uso de guíaondas como transductores de señales que se pueda detectar con elementos de reconocimiento inmovilizados en la interfaz del guíaondas la unión en el elemento de reconocimiento o la reacción del elemento de reconocimiento, cuando con esto cambian las propiedades ópticas del medio de detección en la

interfaz con el guiaondas.

En correspondencia es posible un ahorro de tiempo en la realización de la detección, así como también una simplificación de la secuencia.

5 Por tanto la detección de una señal o de un elemento marcado se puede realizar mediante las propiedades ópticas cambiantes del medio, por ejemplo, de una muestra que se va a analizar, directamente en la superficie del transductor de señal o del guiaondas de capa fina, por ejemplo mediante un cambio de la absorción, de la fluorescencia, de la fosforescencia, de la luminiscencia o similares.

10 Preferiblemente se detecta en el campo de evanescencia una señal de fluorescencia. Elementos de marcado que se pueden usar de acuerdo con la invención para un marcado del ente de unión, por ejemplo, micotoxinas, conjugados de micotoxina, conjugados de anticuerpo o anticuerpos son preferiblemente fluoróforos orgánicos, partículas de tamaño nanométrico, partículas de tamaño nanométrico fluorescentes, esferas, esferas fluorescentes, proteínas fluorescentes u otras moléculas o unidades o combinaciones discretionales que facilitan señales de distintos elementos de marcado. Se usa preferiblemente entes de unión marcados con poder luminiscente. Son elementos de marcado preferidos fluoróforos orgánicos y/o proteínas fluorescentes.

15 Según el procedimiento de acuerdo con la invención se puede incitar al ente de unión preferiblemente marcado con fluorescencia mediante un campo evanescente. En formas de realización preferidas se genera el campo evanescente mediante un guiaondas óptico plano, como describen Duveneck y col. en el documento US 5.959.292. La fluorescencia emitida isotrópica se puede detectar mediante una disposición adecuada. En otras formas de realización se puede desacoplar del guiaondas la fluorescencia acoplada en el guiaondas mediante un elemento óptico adecuado y se puede detectar con una disposición óptica adecuada.

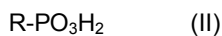
20 Es especialmente ventajoso que se pueda limitar un lavado del ente de unión preferiblemente marcado con fluorescencia o de una muestra o solución que contiene ente de unión marcado antes de la detección de una señal o se pueda incluso renunciar completamente a este. Esto hace posible un ahorro de tiempo en una detección de micotoxina, así como también una simplificación de la realización, ya que también se puede renunciar a una preparación de las distintas soluciones tampón usadas normalmente en el protocolo de lavado.

25 Guiaondas de capa fina que se pueden usar comprenden preferiblemente una capa (a) de guiaondas ópticamente transparente que contiene óxidos seleccionados del grupo constituido por TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y/o ZrO_2 , seleccionado preferiblemente del grupo constituido por TiO_2 , Ta_2O_5 y/o Nb_2O_5 . Se prefiere que la capa (a) de guiaondas ópticamente transparente esté configurada por TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 o ZrO_2 , preferiblemente TiO_2 , Ta_2O_5 y/o Nb_2O_5 . Se ha revelado como especialmente ventajoso el uso de pentóxido de tántalo, especialmente en la detección de una señal de fluorescencia.

En formas de realización preferidas se aplica sobre el guiaondas de capa fina, especialmente sobre la capa (a) de guiaondas ópticamente transparente que contiene óxidos seleccionados del grupo constituido por TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y/o ZrO_2 , monocapas o capas múltiples de ácidos organofosfóricos según la siguiente fórmula (I)



y/o ácidos organofosfónicos según la siguiente fórmula (II)



y/o sus sales, en donde

R representa alquilo con C_{10} a C_{24} .

40 Preferiblemente se pueden usar ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos, preferiblemente organofosfatos y/o organofosfonatos, seleccionándose R del grupo constituido por alquilo no ramificado con C_{10} a C_{20} , seleccionándose preferiblemente del grupo constituido por alquilo no ramificado con C_{12} a C_{18} , preferiblemente ácido dodecilsfosfórico, fosfato de dodecilo, fosfonato de octadecilo y/o ácido octadecilsfosfónico.

45 Se pueden usar preferiblemente ácidos organofosfóricos u organofosfatos, que se pueden aplicar en forma de sales solubles en agua desde solución acuosa sobre los guiaondas de capa fina.

En formas de realización preferidas se aplican los ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos, preferiblemente organofosfatos, en forma de una monocapa sobre las guiaondas de capa fina, especialmente un chip biológico de campo evanescente, preferiblemente un chip biológico guiaondas óptico plano. La aplicación se puede realizar en forma de procedimiento de inmersión.

50 La monocapa o monolayer se puede aplicar como una capa para adherirse sobre la capa ópticamente transparente constituida por óxidos. De forma más ventajosa los ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos pueden

interactuar con elementos de reconocimiento, especialmente con proteínas o elementos de reconocimiento acoplados a proteínas y reforzar la unión de los elementos de reconocimiento al chip biológico.

5 Entes de unión que se unen a micotoxina que se pueden usar se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por anticuerpo anti-micotoxina, conjugados de anticuerpo anti-micotoxina, micotoxinas, conjugados de micotoxina, fragmentos de anticuerpo anti-micotoxina, péptidos que se unen a micotoxina, anticalinas que se unen a micotoxina, aptámeros que se unen a micotoxina, espejalmers que se unen a micotoxina y/o polímeros impresos que se unen a micotoxina, preferiblemente seleccionados del grupo constituido por anticuerpo anti-micotoxina, conjugados de anticuerpo anti-micotoxina.

10 Los entes de unión interactúan respectivamente de forma específica y/o por afinidad con los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina correspondientes. A modo de ejemplo anticuerpos anti-micotoxina, que se aplican sobre un guíaondas de capa fina, se unen por afinidad a micotoxinas inmovilizadas sobre este guíaondas de capa fina. Igualmente se unen por afinidad anticuerpos anti-micotoxina inmovilizados sobre un guíaondas de capa fina a micotoxinas o conjugados de micotoxina, que se aplican sobre los guíaondas de capa fina. A este respecto la especificidad de la unión depende de los entes de afinidad usados. De este modo anticuerpos anti-micotoxina de
15 utilidad que reaccionan cruzadamente se unen por afinidad a las micotoxinas correspondientes, por ejemplo, del grupo de fumosinas, pero de forma menos específica que por ejemplo un anticuerpo especial contra fumosina B1. Entes de unión, que están inmovilizados, se designan también como elemento de reconocimiento o “moléculas captadoras”.

20 Conjugados de anticuerpos anti-micotoxina y conjugados de micotoxina se pueden configurar, por ejemplo, a partir de una proteína y anticuerpos anti-micotoxina o micotoxina.

En formas de realización preferidas, por ejemplo, en ensayos indirectos competitivos los entes de unión inmovilizados son conjugados de micotoxina. Los conjugados de micotoxina se pueden configurar preferiblemente a partir de micotoxina unida a proteínas, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA, Bovine Serum Albumine). Es especialmente ventajoso en el uso de un conjugado de micotoxina-BSA de este tipo que se pueda configurar una
25 mejora de la unión de la micotoxina en el guíaondas de capa fina mediante una interacción entre proteína y ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos. Esto puede proporcionar una mejora de la adherencia de los elementos de reconocimiento al guíaondas de capa fina.

Un elemento de marcado, por ejemplo un colorante de fluorescencia o fluoróforo, puede estar unido directamente a un ente de unión, por ejemplo a un anticuerpo anti-micotoxina o a una micotoxina, o por un elemento espaciador, por
30 ejemplo, una proteína o una cadena de alquilo o polietilenglicol. El elemento de marcado, por ejemplo un colorante de fluorescencia o fluoróforo, está unido preferiblemente por una proteína a la micotoxina. Una proteína adecuada es, por ejemplo, BSA. Una unión de un fluoróforo a una micotoxina por medio de BSA puede mejorar claramente la unión del elemento de marcado al ente de unión, por ejemplo, anticuerpos. Resulta una ventaja más en cuanto se pueden evitar procedimientos costosos para la unión directa, por ejemplo, de un fluoróforo a una micotoxina.
35 Preferiblemente se pueden usar como ente de unión para un conjugado de micotoxina-BSA marcado con fluorescencia anticuerpo anti-micotoxina inmovilizado, por ejemplo, en un ensayo competitivo directo.

La detección de micotoxinas se puede realizar principalmente en muestras, soluciones o aquellos medios que se pueden aplicar sobre un guíaondas de capa fina. En formas de realización preferidas las muestras son alimentos para seres humanos o animales. Preferiblemente se realiza la detección de micotoxinas según el procedimiento de
40 acuerdo con la invención en cereales, productos de cereales, vino, zumos y/o frutos y/o en productos que contienen cereales, vino, zumos y/o frutos. En esto se puede aplicar la muestra que se va a analizar, por ejemplo, un alimento o producto, al guíaondas de capa fina o se puede extraer con un disolvente o mezcla de disolventes y se puede usar el extracto extraído. El extracto se puede usar diluido o concentrado.

La micotoxinas se pueden lixiviar de la muestra que se estudia, por ejemplo, cereales u otros alimentos, mediante
45 tratamiento con un disolvente o mezcla de disolventes. Por ejemplo, se pueden lixiviar micotoxinas de muestras de cereales mediante molienda y subsiguiente extracción con agua o disolventes orgánicos o mezclas de disolventes, por ejemplo, con mezclas de agua, a las que dado el caso se puede añadir sustancias tampón, sales, ácidos o bases y otros aditivos, y disolventes orgánicos, por ejemplo, con mezclas de agua y metanol o etanol o agua y acetoneitrilo. Se conocen por parte del especialista en la técnica otros procedimientos que conducen a la extracción de micotoxinas. Las micotoxinas obtenidas, disueltas se pueden analizar a continuación directamente o tras dilución o enriquecimiento sobre el guíaondas de capa fina o chip.
50

Elementos de reconocimiento que se pueden usar, que se designan también como “moléculas captadoras”, se seleccionan preferiblemente de conjugados de micotoxina BSA, preferiblemente dos o más distintos, se pueden inmovilizar sobre la superficie del guíaondas de capa fina o chip de forma covalente o no covalente, por ejemplo,
55 mediante adsorción hidrófoba. Se puede realizar una inmovilización, por ejemplo, mediante una aplicación designada como moteado de los elementos de reconocimiento en forma de campos de medida, las denominadas motas, sobre la superficie del guíaondas de capa fina o del chip. Preferiblemente se realiza un moteado de solución

preferiblemente de soluciones tampón, que contienen el o los entes de unión como elemento de reconocimiento, mediante equipos para la aplicación automática, denominado punteador. Preferiblemente se incuban los guiondas de capa fina o chips tras el moteado al menos una hora, preferiblemente algunas horas, de modo que los elementos de reconocimiento se pueden fijar sobre el guiondas de capa fina o chip.

- 5 Se prefiere que los chips biológicos se traten tras el moteado durante al menos una hora, preferiblemente de 2 horas a 6 horas, con especial preferencia de 3 horas a 4 horas con una solución de proteína, preferiblemente una solución de una proteína de bloqueo que se pueda usar, por ejemplo BSA. Después de la separación de la solución se pueden secar y conservar los guiondas de capa fina o chips biológicos.

- 10 La aplicación de la muestra y del ente de unión que se une a la micotoxina preferiblemente marcado con fluorescencia a los elementos de reconocimiento inmovilizados sobre el guiondas de capa fina, preferiblemente chip biológico de campo evanescente, preferiblemente un chip biológico guiondas óptico plano, se puede realizar de forma simultánea o sucesiva. De este modo la adición de entes de unión preferiblemente marcados con fluorescencia, por ejemplo de uno o varios anticuerpos contra una o varias micotoxinas marcados preferiblemente con fluorescencia, se realiza antes o durante la incubación de una muestra, por ejemplo de un extracto sobre el chip.
- 15 Se puede añadir sobre el chip, por ejemplo, también un extracto de una muestra que se va a estudiar en la mezcla con anticuerpos contra una o más micotoxinas preferiblemente marcados, preferiblemente marcados con fluorescencia.

- 20 Es de especial ventaja que la muestra según el procedimiento de acuerdo con la invención pueda incubarse menos de 15 minutos, preferiblemente menos de 10 minutos, con especial preferencia menos de 5 minutos antes de la detección de la señal con los entes de unión inmovilizados como elemento de reconocimiento químico o bioquímico sobre el guiondas de capa fina y/o los entes de unión.

- 25 Esto posibilita una gran ventaja frente a los procedimientos conocidos, donde los tiempos de incubación con conjugado de micotoxina aplicado con una solución de anticuerpos de micotoxina marcados necesitan hasta dos horas, o frente a procedimientos que requieren preincubaciones de muestras con anticuerpos anti-micotoxina marcados. Esto hace posible que la determinación de micotoxinas según el procedimiento de acuerdo con la invención se pueda realizar claramente más rápido que con los procedimientos conocidos, especialmente se puede acortar claramente el tiempo de incubación. En formas de realización especialmente preferidas el tiempo de incubación puede llevar menos de 10 minutos incluso sólo 5 minutos. Especialmente en combinación con la otra ventaja, relativa a que se puede evitar la etapa de lavado, es posible que mediante el procedimiento de acuerdo con
- 30 la invención se pueda presentar un resultado en menos de 20 minutos, preferiblemente en menos de 15, con especial preferencia en menos de 10 minutos.

- 35 Con uso del procedimiento de acuerdo con la invención se pueden determinar de forma cuantitativa micotoxinas y preferiblemente con menor variación. A modo de ejemplo, el denominado coeficiente de variación interlaboratorio, una medida de la precisión en comparación, puede ser inferior al 50 %, preferiblemente inferior al 40 %. Además el denominado coeficiente de variación interlaboratorio, una medida de la precisión en repetibilidad, es inferior al 20 %. Esto hace posible el uso del procedimiento de acuerdo con la invención en el marco de un procedimiento estandarizado y sencillo para la determinación de micotoxinas en alimentos, por ejemplo cereales, productos de cereales o vino.

- 40 Micotoxinas detectables se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por aflatoxinas, ocratoxinas, alcaloides del cornezuelo del centeno, patulina y/o fusariotoxinas, seleccionadas por ejemplo del grupo constituido por desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A y/o fumonisinas. Las fumonisinas se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por fumonisina B1, fumonisina B2 y/o fumonisina B3.

- 45 De manera correspondiente se seleccionan entes de unión que se pueden usar preferiblemente seleccionados del grupo de micotoxinas constituido por aflatoxinas, ocratoxinas, alcaloides del cornezuelo del centeno, patulina y/o fusariotoxinas seleccionadas por ejemplo del grupo constituido por desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A y/o fumonisina y anticuerpos contra micotoxinas seleccionadas del grupo constituido por aflatoxinas, ocratoxinas, alcaloides del cornezuelo del centeno, patulina y/o fusariotoxinas seleccionadas por ejemplo del grupo constituido por desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2 y/o fumonisinas.

- 50 Dependiendo del tipo del inmunoensayo usado se inmoviliza uno de los entes de unión, por ejemplo, en el caso de un inmunoensayo indirecto competitivo de una o más de las micotoxinas, como elemento de reconocimiento sobre el guiondas de capa fina, mientras que los otros entes de unión se añaden, por ejemplo, en el caso de un inmunoensayo indirecto competitivo de uno o más de los anticuerpos anti-micotoxina, antes o simultáneamente con la muestra, a las guías de ondas de capa fina, con esto está marcado el ente de unión que se añade preferiblemente con luminiscencia, preferiblemente marcado con un fluoróforo.

- 55 Preferiblemente se seleccionan entes de unión que se pueden usar del grupo constituido por desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina H-2, ocratoxina A y/o fumonisina B1, fumonisina B2 y/o fumonisina B3 y anticuerpos contra micotoxinas seleccionadas del grupo constituido por el grupo constituido por desoxinivalenol,

nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, ocratoxina A y/o fumonisina B2 y/o fumonisina B3.

A este respecto se pueden usar anticuerpos monoclonales contra micotoxina, por ejemplo, anti-fumosina B1, anti-fumosina B2 o anti-fumosina B3. Además se pueden usar anticuerpos que actúan contra el grupo de las fumosinas. Entes de unión que se pueden usar, preferiblemente anticuerpos contra micotoxinas, se pueden usar individualmente o en mezcla, además se pueden usar igualmente anticuerpos que reaccionan cruzadamente.

Una ventaja especial del procedimiento de acuerdo con la invención resulta de ser las micotoxinas detectables mediante el procedimiento de acuerdo con la invención con mayor selectividad. Por ejemplo se pueden detectar micotoxinas especialmente en alimentos para humanos o animales, por ejemplo, cereales, vino, zumos, frutos y/o productos de los mismos, o en extractos de alimentos o productos ya a rango de concentraciones nanomolares o picomolares de micotoxinas. A modo de ejemplo se pueden detectar micotoxinas en extracto de cereal ya en el intervalo de 0,1 pM a 100 nM de micotoxina, preferiblemente en el intervalo de 1 pM a 1 nM de micotoxina, especialmente se pueden detectar concentraciones de menos de 1 nM, preferiblemente de menos de 100 pM de micotoxina, preferiblemente de menos de 10 pM de micotoxina, con especial preferencia de menos de 1 pM de micotoxina.

Además se pueden detectar micotoxinas en extracto de cereal en el intervalo de 10^{-4} ppb a 10000 ppb de micotoxina, en cereales en el intervalo de 10^{-2} ppb a 10000 ppb de micotoxina. Preferiblemente se pueden detectar micotoxinas en extracto de cereal en el intervalo de $\leq 0,1$ ppb de micotoxina, preferiblemente en el intervalo de $\leq 0,01$ ppb de micotoxina, con especial preferencia en el intervalo de $\leq 10^{-4}$ ppb de micotoxina, en cereales en el intervalo de $\leq 0,1$ ppb de micotoxina, preferiblemente en el intervalo de $\leq 0,01$ ppb de micotoxina, con especial preferencia en el intervalo de $\leq 10^{-4}$ ppb de micotoxina.

Esto hace posible una determinación exacta fuera de un laboratorio analítico de las micotoxinas contenidas en alimentos como no era posible hasta ahora.

El procedimiento de acuerdo con la invención hace posible que se pueda detectar al menos dos micotoxinas, preferiblemente de 2 a 1000 micotoxinas, preferiblemente de 5 a 100 micotoxinas. Especialmente se pueden determinar las micotoxinas simultáneamente. Esto significa una gran ventaja frente a los procedimientos conocidos que en su mayor parte sólo permiten de forma simultánea la detección de una micotoxina determinada.

Una forma de realización preferida del procedimiento para la detección de micotoxinas prevé que se inmovilice separados espacialmente sobre la superficie de un guíaondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a), y donde sobre la capa (a) se inmovilizan separados espacialmente conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina como ente de unión específico y/o afín para un ente de unión que se une a micotoxina. A continuación se pueden añadir las muestras que se van a analizar y los entes de unión que se unen a micotoxina preferiblemente marcados con un fluoróforo simultáneamente o de forma consecutiva. La interacción específica y/o por afinidad entre los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina, la(s) micotoxina(s) de las muestras y/o los entes de unión que se unen a micotoxina preferiblemente marcados con un fluoróforo se puede detectar como cambio de señal en el campo evanescente. A este respecto la presencia de una micotoxina en la muestra conduce a un cambio de señal en el campo evanescente.

De acuerdo con la invención se puede realizar la detección de las micotoxinas mediante un ensayo, por ejemplo, un inmunoensayo sobre el chip. La detección de las micotoxinas se realiza preferiblemente en forma de un inmunoensayo, preferiblemente de un inmunoensayo competitivo, por ejemplo, un inmunoensayo directo o indirecto competitivo, con especial preferencia en forma de un inmunoensayo competitivo indirecto.

Se puede prever un procedimiento para la detección de micotoxinas en forma de un inmunoensayo directo competitivo de modo que se inmovilizan separados espacialmente anticuerpos anti-micotoxina como elemento de reconocimiento químico o bioquímico para micotoxinas sobre la superficie de un guíaondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a). A continuación se pueden añadir micotoxinas preferiblemente marcadas con un fluoróforo o preferiblemente conjugados de micotoxina-BSA marcados con un fluoróforo simultáneamente o antes de la muestra que se va a analizar. Se pueden detectar como cambio de señal en el campo evanescente la interacción entre los anticuerpos anti-micotoxina inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina, la(s) micotoxina(s) de la muestra y/o las micotoxinas o conjugados de micotoxina-BSA preferiblemente marcados con un fluoróforo.

En el caso de un inmunoensayo competitivo directo se pueden inmovilizar preferiblemente dos o más anticuerpos anti-micotoxina distintos sobre la superficie del chip de forma covalente o no covalente, por ejemplo, mediante moteado. Si se añade por ejemplo un extracto a una de las muestras que se estudia en mezcla con micotoxinas o conjugados de micotoxina preferiblemente marcados con fluorescencia sobre el chip, se llega a la competición de las micotoxinas o conjugados de micotoxina marcados y no marcados por los puntos de unión con anticuerpos

disponibles sobre el chip. La adición de las micotoxinas marcadas con fluorescencia se puede realizar antes o después de la incubación del extracto sobre el chip. La cantidad de micotoxinas marcadas unidas al anticuerpo inmovilizado se inversamente proporcional a la cantidad en micotoxinas que se encuentra en el extracto.

5 La detección se puede plantear también en forma de un ensayo sándwich. En este caso se usan en lugar de las micotoxinas o conjugados de micotoxina marcados anticuerpos de detección marcados, que se unen a un complejo inmovilizado de anticuerpos y micotoxina inmovilizados sobre el chip. En el ensayo sándwich la cantidad de fluoróforos unidos al anticuerpo es proporcional a la concentración de micotoxinas en el extracto.

10 Se puede prever la forma de realización preferida del procedimiento para la detección de micotoxinas en forma de un inmunoensayo indirecto competitivo, de modo que se inmovilizan separados espacialmente conjugados de micotoxina-BSA preferiblemente marcados con un fluoróforo como elemento de reconocimiento químico o bioquímico sobre la superficie de un guíaondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a). A continuación se pueden añadir anticuerpos anti-micotoxina preferiblemente marcados con un fluoróforo simultáneamente o antes de la muestra que se va a analizar. Se puede detectar como cambio de
15 señal en el campo evanescente la interacción entre los conjugados de micotoxina-BSA preferiblemente marcados con un fluoróforo, la(s) micotoxina(s) de la muestra y/o los anticuerpos anti-micotoxina preferiblemente marcados con un fluoróforo inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina.

20 De acuerdo con la invención se puede realizar la detección de micotoxinas también mediante un inmunoensayo indirecto competitivo. En este caso se pueden inmovilizar sobre el chip conjugados de micotoxina-BSA. Si se añaden un extracto de una muestra que se estudia en mezcla con anticuerpos anti-micotoxina preferiblemente marcados con fluorescencia al chip, se llega a la competición de las micotoxinas inmovilizadas y que se encuentran en la solución por los puntos de unión disponibles de los anticuerpos marcados con fluorescencia. La adición de anticuerpos anti-micotoxina marcados con fluorescencia se puede realizar antes o durante la incubación del extracto sobre el chip. La cantidad de los anticuerpos marcados unidos es en este caso inversamente proporcional a la cantidad en
25 micotoxinas que se encuentra en el extracto.

Además es ventajoso que se pueda realizar la detección de la señal en el campo de evanescencia por medio de un equipo de lectura. El equipo de lectura puede ser, por ejemplo, un equipo de lectura robusto y económico.

La valoración de la intensidad de señal, por ejemplo de la intensidad de fluorescencia se puede realizar por medio de un software adecuado, así como el cálculo de la cantidad de micotoxinas presente en la muestra.

30 Las ventajas proporcionadas del procedimiento de acuerdo con la invención, especialmente una combinación de un procedimiento que se puede realizar de forma sencilla, la posibilidad de poder detectar de forma simultánea varias micotoxinas cuantitativamente sobre un equipo de lectura robusto y económico, hacen posible una detección sencilla y rápida de micotoxinas fuera de un laboratorio analítico.

35 Un dispositivo para la realización del procedimiento para la detección de micotoxinas presenta un guíaondas de capa fina, preferiblemente un chip biológico guíaondas óptico plano, que se basa en un guíaondas de capa fina, que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a). Preferiblemente los elementos de reconocimiento están inmovilizados sobre la capa (a).

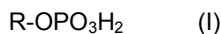
40 Se describen guíaondas ópticos planos adecuados, por ejemplo, en el documento WO 01/92870 o en el documento US 5.959.292.

45 En formas de realización preferidas del dispositivo la capa (b) ópticamente transparente del guíaondas de capa fina, preferiblemente chips biológicos guíaondas ópticamente planos, puede estar configurada por silicatos como vidrio o cuarzo o por un plástico transparente, seleccionado preferiblemente del grupo constituido por policarbonatos, poliimidias, polimetacrilatos, poliesterenos, poliolefinas cíclicas, y/o copolímeros de poliolefina cíclicos, preferiblemente de poliolefinas cíclicas o copolímeros de poliolefina cíclicos. Plásticos adecuados para la preparación de la capa (b) ópticamente transparente se describen, por ejemplo, en el documento WO 03/020488.

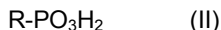
Se prefieren plásticos termoplásticos o inyectables transparentes, por ejemplo, seleccionados del grupo constituido por policarbonato, poliimida, acrilato, especialmente poli(metacrilato de metilo) o poliestireno.

50 En formas de realización preferidas del dispositivo la capa (a) de guíaondas ópticamente transparente puede comprender óxidos seleccionados del grupo constituido por TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y/o ZrO_2 , seleccionándose preferiblemente del grupo constituido por TiO_2 , Ta_2O_5 y/o Nb_2O_5 . Se pueden usar también combinaciones de varios óxidos de este tipo. Preferiblemente una capa (a) de guíaondas ópticamente transparente está configurada a partir de TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y/o ZrO_2 , preferiblemente de TiO_2 , Ta_2O_5 y/o Nb_2O_5 . Especialmente se deduce como especialmente ventajoso el uso de pentóxido de tántalo.

En formas de realización preferidas el guiaondas de capa fina comprende, especialmente sobre la capa ópticamente transparente que contiene óxidos seleccionados del grupo constituido por TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y/o ZrO_2 , monocapas o capas múltiples de ácidos organofosfóricos según la siguiente fórmula (I):



5 y/o ácidos organofosfónicos según la siguiente fórmula (II)



y/o sus sales, en donde

R representa alquilo con C_{10} a C_{24} .

10 Preferiblemente se pueden usar ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos, preferiblemente organofosfatos y/o organofosfonatos, seleccionándose R del grupo constituido por alquilo no ramificado con C_{10} a C_{20} , seleccionándose preferiblemente del grupo constituido por alquilo no ramificado con C_{12} a C_{18} , preferiblemente ácido dodecilsfosfórico, fosfato de dodecilo, fosfonato de octadecilo y/o ácido octadecilsfosfónico.

Son preferidos ácidos organofosfóricos u organofosfatos que se puedan aplicar en forma de sales solubles en agua a partir de solución acuosa sobre los guiaondas de capa fina.

15 En formas de realización preferidas se aplican los ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos, preferiblemente organofosfatos, en forma de una monocapa sobre los guiaondas de capa fina, especialmente un chip biológico de campo evanescente, preferiblemente un chip biológico guiaondas óptico plano.

20 La monocapa o monolayer se puede aplicar como una capa de adhesión sobre la capa ópticamente transparente configurada por óxidos. De forma más ventajosa los ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos pueden interactuar con elementos de reconocimiento, especialmente con elementos de reconocimiento acoplados a proteínas portadoras y reforzar la unión de los elementos de reconocimiento al chip biológico.

25 En una forma de realización preferente del dispositivo se aplican los ácidos organofosfóricos y/o ácidos organofosfónicos, preferiblemente organofosfatos, sobre el guiaondas de capa fina preferiblemente sobre la capa ópticamente transparente configurada por óxidos en forma de una capa de adhesión. La capa de adhesión puede reforzar la unión de los elementos de reconocimiento al guiaondas de capa fina o chip biológico.

Se prefiere que la capa de adhesión presente un grosor de menos de 200 nm, preferiblemente menos de 20 nm.

Preferiblemente el acoplamiento de la luz de activación se realiza en la capa (a) de guiaondas ópticamente transparente con uso de una o varias estructuras en rejilla.

30 Preferiblemente la estructura en rejilla es una rejilla en relieve con perfil discrecional, por ejemplo, con perfil en rectángulo, triángulo o semicircular, o una rejilla de fases o volumen con una modulación periódica del índice de refracción en la capa (a) ópticamente transparente esencialmente plana. La estructura en rejilla puede ser también una rejilla de difracción con un periodo único o una rejilla multidifracción. La estructura en rejilla puede presentar una periodicidad variable espacialmente, vertical o paralelamente respecto a la dirección de propagación de la luz de activación acoplada en la capa (a) de guiaondas ópticamente transparente.

35 Se prefiere que las estructuras en rejilla que se pueden usar para el acoplamiento de la luz de activación presenten un periodo en el intervalo de 200 nm a 1000 nm, preferiblemente en el intervalo de 200 nm a 400 nm. Se prefiere además que la profundidad de modulación de la rejilla se encuentre en el intervalo de 3 nm a 60 nm, preferiblemente en el intervalo de 10 nm a 40 nm. Se prefiere que la relación de profundidad de modulación al grosor de la primera capa (a) de guiaondas ópticamente transparente sea igual o inferior a 0,4. Se prefiere igualmente que la modulación del índice de refracción sea pronunciada tanto en la interfaz entre la capa a y la capa b como también en la interfaz de la capa a con el medio de análisis.

40 Preferiblemente la capa (a) de guiaondas ópticamente transparente presenta un grosor en el intervalo de 40 nm a 1000 nm, preferiblemente en el intervalo de 40 nm a 300 nm, aún más preferiblemente en el intervalo de 80 nm a 200 nm.

45 La diferencia en el índice de refracción entre la capa (a) y (b) es preferiblemente $\geq 0,2$, preferiblemente $\geq 0,5$, y se encuentra aún más preferiblemente en 0,56.

La longitud de onda de la luz de activación se encuentra preferiblemente en el intervalo de 300 nm a 1100 nm, preferiblemente en el intervalo de 300 nm a 800 nm, aún más preferiblemente en el intervalo de 500 nm a 700 nm.

La luz de activación adecuada se puede acoplar con una estructura en rejilla, en la que en dirección de la

propagación de la luz acoplada y dirigida a la capa (a) se encierra en una ordenación una zona no modulada de la capa (a) con una multiplicidad de zonas de medidas dispuesta sobre la misma, sobre la que se realiza la detección de las distintas micotoxinas. En esta se puede encerrar en la dirección de propagación de la luz dirigida de forma ventajosa una o varias estructuras en rejilla adicionales con una ordenación adicional de zonas de medida que se encuentra bajo estas. De forma alternativa las zonas de medida de una ordenación o también de una multiplicidad de ordenaciones se pueden encontrar sobre la zona modulada de la capa (a).

Se prefiere que a cada ordenación de zonas de medida subsiguientes en la dirección de propagación de la luz de activación acoplada se asigne una estructura en rejilla específica para esta ordenación para el desacoplamiento de esta luz de activación, con lo que pueden estar configuradas específicamente para ordenaciones únicas verticalmente respecto a la dirección de propagación de la luz de activación acoplada las estructuras en rejilla o pueden prolongarse también en esta dirección por todo el guiondas de capa fina.

El dispositivo puede presentar un número muy grande de campos de medida únicos. En formas de realización preferidas del dispositivo se aplican los entes de unión específicos y/o afines como elemento de reconocimiento químico o bioquímico en forma de hasta 100.000 campos de medida o "motas" en una disposición en dos dimensiones, en donde un campo de medida o mota presenta preferiblemente una superficie en el intervalo de 0,001 mm² a 6 mm², preferiblemente en el intervalo de 0,1 mm² a 1 mm². Se prefieren más de 10, preferiblemente más de 50 campos de medida por centímetro cuadrado sobre el guiondas de capa fina o chip biológico.

Otro objeto de la invención es un kit para la detección de micotoxinas. El kit contiene al menos un guiondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guiondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a), y donde sobre la capa (a) se inmovilizan separados espacialmente conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina como elemento de reconocimiento químico o bioquímico para un ente de unión que se une a micotoxina.

El kit puede contener además al menos un reactivo que comprende preferiblemente entes de unión marcados. El kit puede contener también varios reactivos que comprenden entes de unión preferiblemente marcados o un reactivo que contiene una mezcla de distintos entes de unión marcados. El kit puede contener además tampones y/o disolventes, que son necesarios para la realización de la detección según una de las primeras reivindicaciones. Se puede prever que el kit contenga también una unidad de detección.

Los kits se pueden usar para la detección rápida de micotoxinas.

Se da a continuación un ejemplo, que sirve para aclarar la presente invención.

Ejemplo 1

Determinación de una curva patrón para la medida de zearalenona en un inmunoensayo indirecto competitivo sobre un chip biológico de campo evanescente

Siete chip biológicos (compañía Unaxis, Liechtenstein) con las medidas exteriores de 1 cm x 2 cm de vidrio, en los que se incorporó una rejilla óptica con una profundidad de rejilla de 18 nm, provistos con una capa de 155 nm de pentóxido de tántalo, se recubrieron con ácido octadecilfosfónico mediante inmersión en una solución de 500 µM de ácido octadecilfosfónico en n-heptano/isopropanol en relación 9:1. Con ayuda de un punteador del tipo "Biochip Arrayer" (Perkin Elmer, Alemania) se aplicaron sobre el chip biológico conjugados de zearalenona y albúmina de suero bovino (ZEA-BSA, relación ZEA-BSA = 50:1, preparado por la compañía Biopure, Tulln, Austria) así como la molécula de BSA marcada (DyLight 647-BSA) con el colorante DyLight 647 (Pierce, Alemania). Las soluciones de moteado contenían DyLight 647-BSA en una concentración de 5×10^{-4} mg/ml en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) con BSA al 0,1 % y Tween 20 al 0,1 %, conjugado de BSA-ZEA de concentración 0,5 mg/ml en PBS en BSA al 0,1 % y Tween 20 al 0,1 %. Las motas se aplicaron sobre el chip en forma de nuevas series alternantes respectivamente de 10 motas de DyLight-647-BSA y motas de conjugado BSA-ZEA en forma de segundo campo (ordenaciones).

Las motas se incubaron durante la noche con gran humedad ambiental (40 %), a continuación se trataron los chip biológicos durante 4 horas con una solución al 3 % de BSA en PBS. Sobre los chips se aplicaron cámaras de medida de modo que sobre cada chip se formaron dos ordenaciones con cámaras de reacción separadas. Se prepararon soluciones acuosas de zearalenona a distintas concentraciones en el intervalo de 0 µg/l a 31 µg/l y se adicionó a estas anticuerpo anti-zearalenona monoclonal (Biotex, Berlín) que estaban marcados con DyLight 647, de modo que se obtuvo respectivamente una solución 1 mM del anticuerpo.

Se añadieron las mezclas de distintas concentraciones respectivamente a las cámaras de medida y se midieron los chips biológicos sin otras etapas de tratamiento en el periodo de diez minutos como máximo en un equipo de lectura de fluorescencia "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Alemania). Las intensidades de fluorescencia obtenidas para cada mota de zearalenona se dividieron por el valor medio de las intensidades de fluorescencia de los valores superior e inferior que dan las respectivas motas DyLight 647-BSA. Se determinaron los valores medios de las

intensidades de fluorescencia de las 40 motas de una ordenación. Se ajustaron con ayuda del programa informático Origin 7G (Origin Lab Corporation, Estados Unidos) mediante un ajuste sigmoideal las intensidades de fluorescencia obtenidas en función de la concentración.

5 Se pudo comprobar que en un intervalo de 0,4 ppb a 4 ppb de zearalenona, que corresponde a 80 % o 20 % de la intensidad de fluorescencia máxima en la curva sigmoideal ajustada, correspondiente a un intervalo de 1 nM a 10 nM de la concentración de ZEA usada en la solución fue posible una cuantificación de la concentración de ZEA mediante valoración de la intensidad de fluorescencia de las muestras.

Ejemplo 2

10 Determinación de una curva patrón para la medida de desoxinivalenol (DON) y medida de una muestra de cereal de pienso contaminado

15 15 chip biológicos (compañía Unaxis, Liechtenstein) con las medidas exteriores de 1 cm x 2 cm de vidrio, en los que se incorporó una rejilla óptica (profundidad de rejilla 18 nm), provistos con una capa (155 nm) de pentóxido de tántalo, se recubrieron con ácido octadecilfosfónico (mediante inmersión en una solución de ácido octadecilfosfónico en n-heptano/isopropanol 9:1). Con ayuda de un punteador del tipo Nanoplotter (GeSiM, Alemania) se aplicaron sobre el chip biológico conjugados de desoxinivalenol y albúmina de suero bovino (DON-BSA, relación DON-BSA = 100:1, preparado por la compañía Biopure, Tulln, Austria) así como IgG de perro (dog-IgG, Rockland, Estados Unidos). Las soluciones para moteado consistían en IgG de perro en una concentración de 0,2 mg/ml en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) con trehalosa así como en conjugado BSA-DON de concentración 1 mg/ml en PBS con trehalosa. Se aplicaron las motas sobre el chip en forma de dos series de 12 motas de IgG de perro y una serie entre ellas de 12 motas de conjugado BSA-DON en forma de dos campos (ordenaciones).

25 Se incubaron las motas durante 1 hora a 37° C, a continuación se trataron los chip biológicos hasta durante 4 horas con una solución de BSA en PBS. Sobre los chips se aplicaron las cámaras de medida de modo que sobre cada chip se formaron dos ordenaciones con cámaras de reacción separadas. Se extrajo 5 g de harina de trigo no contaminada con una solución de metanol al 70 % en agua (v/v) mediante agitación durante 5 minutos. Se centrifugó el extracto y a continuación se diluyó con un tampón Tris-citrato (pH 7,4), que contenía BSA, caseína, leche en polvo seca desgrasada, Tween 20, polietilenglicol y sacarosa, en relación 1:4 v/v (extracto:tampón). Se prepararon soluciones de desoxinivalenol a distintas concentraciones (15 a 150 µg/l) y se les adicionó un anticuerpo anti-desoxinivalenol monoclonal, que estaba marcado con DyLight 647 así como con un anticuerpo cabra-anti-IgG de perro monoclonal, que estaba marcado igualmente con DyLight 647, de modo que contenía respectivamente una solución 1 nM del anticuerpo.

35 Se añadieron las soluciones de distinta concentración respectivamente a las cámaras de medida y se midieron los chips biológicos sin otras etapas de tratamiento en un periodo máximo de diez minutos sobre un equipo de lectura de fluorescencia "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Alemania). Se dividieron las intensidades de fluorescencia obtenidas para cada mota de desoxinivalenol por el valor medio de las intensidades de fluorescencia del valor superior e inferior de la mota de IgG de perro. Se determinaron los valores medios normalizados de las intensidades de fluorescencia de las 12 motas de DON de una ordenación. Se ajustaron las intensidades de fluorescencia normalizadas dependientes de la concentración obtenidas con ayuda de un programa informático con un ajuste potencial.

40 De forma análoga al procedimiento de extracción representado anteriormente se extrajeron 5 g de una muestra de harina de cereal para pienso contaminada con DON (compañía Coring, Alemania, certificado 526 ppb de DON) y se diluyó el extracto. Se adicionó un anticuerpo anti-desoxinivalenol monoclonal que estaba marcado con DyLight 647 así como a un anticuerpo de cabra-anti-IgG de perro, que estaba igualmente marcado con DyLight, de modo que se obtuvo respectivamente una solución 1 nM del anticuerpo. Se añadieron respectivamente 100 µl de la solución en una cámara de medida y se midieron los chips biológicos sin más etapas de tratamiento en un periodo máximo de diez minutos en un equipo de lectura de fluorescencia "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Alemania). Se dividieron las intensidades de fluorescencia obtenidas para cada mota de desoxinivalenol por el valor medio de las intensidades de fluorescencia del valor superior e inferior de la respectiva mota de IgG de perro. Se determinaron los valores medios normalizados de las intensidades de fluorescencia de las 12 motas de DON de una ordenación. Se calcularon las intensidades de fluorescencia obtenidas con ayuda de la curva patrón anteriormente descrita en concentraciones de DON en harina de cereal para pienso, en donde se obtuvo un valor promedio sobre las tres medidas de 590 ppb.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección rápida de micotoxinas, que comprende las siguientes etapas:

5 a) preparar un guíaondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a), y donde sobre la capa (a) se inmovilizan separados espacialmente conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina como elemento de reconocimiento químico o bioquímico para un ente de unión que se une a micotoxina,

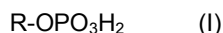
10 b) aplicación de una muestra que contiene micotoxina(s) y de entes de unión que se unen a micotoxina a los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina, donde un elemento de marcado está unido a un ente de unión o a los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados,

15 c) detectar una señal en el campo de evanescencia que se origina por el cambio de las propiedades ópticas en la interfaz con el guíaondas debido a la interacción de los conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina inmovilizados sobre el guíaondas de capa fina con los entes de unión que se unen a la micotoxina,

después

d) determinar la cantidad de micotoxina(s) presente(s) en la muestra.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** sobre la capa (a) se aplican monocapas o capas múltiples de ácidos organofosfóricos según la siguiente fórmula (I)



y/o ácidos organofosfónicos según la siguiente fórmula (II)



y/o sus sales, en donde

R representa alquilo con C_{10} a C_{24} .

25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque** se usan ácidos organofosfóricos, ácidos organofosfónicos, organofosfatos y/o organofosfonatos, seleccionándose R del grupo constituido por alquilo no ramificado con C_{10} a C_{20} , seleccionándose preferiblemente del grupo constituido por alquilo no ramificado con C_{12} a C_{18} , preferiblemente ácidos organofosfóricos, ácidos organofosfónicos, organofosfatos y/o organofosfonatos seleccionados del grupo constituido por ácido dodecilsfosfórico, fosfato de dodecilo, fosfonato de octadecilo y/o ácido octadecilsfosfónico.

30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se usa un guíaondas de capa fina que comprende una capa (a) de guíaondas ópticamente transparente que comprende óxidos seleccionados del grupo constituido por TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 y/o ZrO_2 , seleccionados preferiblemente del grupo constituido por TiO_2 , Ta_2O_5 y/o Nb_2O_5 .

35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se seleccionan los entes de unión que se unen a micotoxina del grupo constituido por anticuerpo anti-micotoxina, conjugados de anticuerpo anti-micotoxina, fragmentos de anticuerpo anti-micotoxina, péptidos que se unen a micotoxina, anticalinas que se unen a micotoxina, aptámeros que se unen a micotoxina, espiegelmeros que se unen a micotoxina y/o polímeros impresos que se unen a micotoxina, preferiblemente seleccionados del grupo constituido por anticuerpo anti-micotoxina, conjugados de anticuerpo anti-micotoxina.

40 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se une a micotoxinas un elemento de marcado, preferiblemente un fluoróforo, por medio de una proteína, preferiblemente por medio de albúmina de suero bovino.

45 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la muestra es un alimento para seres humanos o animales, seleccionada preferiblemente del grupo constituido por cereales, vino, zumos, frutos y/o productos que contienen cereales, vino, zumos y/o frutos, o un extracto de alimentos o productos extraído con un disolvente o una mezcla de disolventes.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se incuba la muestra menos de 15 minutos, preferiblemente menos de 10 minutos antes de la detección de la señal con los

conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina como elemento de reconocimiento químico o bioquímico y/o los entes de unión que se unen a micotoxina.

- 5 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las micotoxinas se seleccionan del grupo constituido por aflatoxinas, ocratoxinas, alcaloides del cornezuelo del centeno, patulina y/o fusariotoxinas, seleccionadas por ejemplo del grupo constituido por desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2 y/o fumonisinas, preferiblemente seleccionadas del grupo constituido por ocratoxina A, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, toxina HT-2, fumonisina B1, fumonisina B2 y/o fumonisina B3.
- 10 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la detección se lleva a cabo en forma de un inmunoensayo.
- 15 11. Kit para la detección rápida de micotoxinas, **caracterizado porque** el kit contiene al menos un guíaondas de capa fina que comprende una primera capa (a) de guíaondas ópticamente transparente sobre una segunda capa (b) ópticamente transparente, en donde (b) posee un índice de refracción menor que (a), y donde sobre la capa (a) de guíaondas se inmovilizan separados espacialmente conjugados de albúmina de suero bovino y micotoxina como elemento de reconocimiento químico o bioquímico para un ente de unión que se une a micotoxina,
- 20 12. Kit según la reivindicación 11, **caracterizado porque** el kit contiene un reactivo que comprende entes de unión que se unen a micotoxina preferiblemente marcados con fluorescencia.
13. Uso de un kit según una de las reivindicaciones precedentes para la detección rápida de micotoxinas.

20