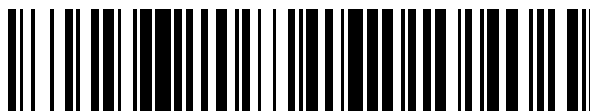


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 159**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2001 E 07021724 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1881324**

54 Título: **Ensayo homogéneo basado en la polarización de la fluorescencia para la determinación de desoxinivalenol en granos**

30 Prioridad:

11.09.2000 US 231887 P

11.07.2001 US 903061

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

05.05.2015

73 Titular/es:

**DIACHEMIX LLC (100.0%)
223 NORTH WATER STREET, SUITE 500
MILWAUKEE, WI 53202, US**

72 Inventor/es:

**NASIR, MOHAMMAD SARWAR y
JOLLEY, MICHAEL E.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 535 159 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

Ensayo homogéneo basado en la polarización de la fluorescencia para la determinación de desoxinivalenol en granos

5

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de los ensayos de micotoxinas. Más particularmente, esta invención se refiere a un ensayo homogéneo que utiliza cambios en la polarización de la fluorescencia para detectar la presencia de desoxinivalenol en granos.

2. Descripción del área relacionada

El desoxinivalenol (DON), que también se conoce como vomitoxina, es una micotoxina producida en diversos granos, como trigo, maíz, cebada, avena y centeno, por el *Fusarium graminearum* y otras cepas de *Fusarium*¹⁻⁴. La presencia de DON en los alimentos provoca rechazo a los alimentos, vómitos y depresión del crecimiento en suinos, enfermedad gastrointestinal en los seres humanos y embriotoxicidad e inmunotoxicidad en animales de laboratorio¹⁻⁴. Debido a los riesgos de salud latentes, se están llevando a cabo investigaciones para explorar métodos analíticos de detección del DON.

Más en general, DON es una micotoxina particularmente problemática dentro del grupo de las micotoxinas conocidas como tricotecenos. Como se muestra en la figura 1, los tricotecenos tienen un esqueleto común que puede tener diferentes grupos unidos en R¹-R⁵. La figura 2 identifica los grupos R¹-R⁵ de la figura 1 para DON y para algunos de los otros tricotecenos más conocidos.

Se utilizan diversos métodos para el análisis cuantitativo de DON y otros tricotecenos en granos, como cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El método de TLC es un método oficial (primera acción) de la AOAC internacional. Aunque es relativamente simple, el método de TLC carece de sensibilidad y es sólo semicuantitativo. Además, la mayoría de estos métodos cromatográficos requiere procedimientos de limpieza minuciosos después de la extracción y no es adecuado para el análisis de campo^{4,5}.

Recientemente, se han aplicado con éxito métodos de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) a la detección sistemática de DON en granos². Sin embargo, los métodos de ELISA implican indeseablemente un uso intensivo de mano de obra, dado que normalmente comprenden varios lavados, transferencias de líquidos y tiempos de incubación. Por lo tanto, existe la necesidad de un método simple, pero sensible, para la determinación de DON y otros tricotecenos en granos que sea rápido y se pueda llevar al campo.

En Nielsen, K. et al., "A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*", Journal of Immunological Methods, 1996, 195, 161-168, se describe un ensayo homogéneo de polarización de la fluorescencia para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en suero bovino. En Ligler, F.S. et al., "A Homogeneous Immunoassay for the Mycotoxin T-2 Utilizing Liposomes, Monoclonal Antibodies, and Complement", Analytical Biochemistry, 1987, 163, 369-375, se describe un ensayo de competición homogéneo para la micotoxina tricoteceno T-2 basado en la lisis de liposomas mediada por complemento. En Adamczyk, M. et al., "Synthesis of Conjugates for a Barbiturate Screening Assay", Bioconjugate Chem., 1997, 8, 281-288 se describen derivados de barbituratos y su uso para desarrollar un inmunoensayo de polarización de la fluorescencia.

Resumen de la invención

En un primer aspecto principal, la presente invención proporciona un trazador para utilizar en un ensayo homogéneo para la determinación de desoxinivalenol (DON) en granos, donde el trazador consiste en un fluoróforo conjugado a DON, capaz de unirse a un anticuerpo específico contra DON para producir un cambio detectable en la polarización de la fluorescencia.

En un segundo aspecto principal, la presente invención proporciona un ensayo homogéneo para la determinación de tricotecenos en granos. Según el método, el tricoteceno se extrae de una muestra de grano. El extracto se combina con un trazador y un anticuerpo para proporcionar una mezcla. El trazador consiste en un tricoteceno predeterminado conjugado a un fluoróforo y el trazador es capaz de unirse al anticuerpo para producir un cambio detectable en la polarización de la fluorescencia. Después se mide la polarización de la fluorescencia de la mezcla. La polarización de la fluorescencia medida se compara con un valor de polarización de la fluorescencia caracterizado que corresponde a una concentración conocida de tricoteceno.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura química básica de los tricotecenos, con R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ que representan posiciones de sustitución en el esqueleto básico de los tricotecenos.

La figura 2 es una tabla de identificación de los grupos R¹-R⁵ de la figura 1 para algunos tricotecenos muy conocidos.

La figura 3 es una curva estándar para un ensayo de polarización de la fluorescencia para DON, que utiliza los datos de la tabla 1, de conformidad con una realización preferida de la presente invención.

La figura 4 es una curva estándar para un ensayo de polarización de la fluorescencia para DON, que utiliza los datos de la tabla 2, de conformidad con una realización preferida de la presente invención.

La figura 5 es una curva estándar para un ensayo de polarización de la fluorescencia para DON, que utiliza los datos de la tabla 3, de conformidad con una realización preferida de la presente invención.

La figura 6 es una gráfica que compara la concentración de DON de muestras inoculadas con la concentración de DON calculada a partir de la curva estándar de la figura 5, de conformidad con una realización preferida de la presente invención.

La figura 7 es una curva estándar para un ensayo de polarización de la fluorescencia para DON, que utiliza los datos de la tabla 5, de conformidad con una realización preferida de la presente invención.

La figura 8 es una gráfica que compara la concentración de DON medida por HPLC con la concentración de DON calculada a partir de la curva estándar de la figura 7, de conformidad con una realización preferida de la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención describe un ensayo homogéneo para la determinación de tricotecenos como DON en granos, que se basa en mediciones de polarización de la fluorescencia. La técnica de polarización de la fluorescencia se ha utilizado con éxito en varios ensayos relacionados con proteínas, enzimas, medicamentos, drogas de abuso, ADN, hormonas, péptidos y anticuerpos⁶⁻⁸.

El principio detrás de la técnica de polarización de la fluorescencia es el siguiente. Las sondas fluorescentes que tienen bajo peso molecular tienen valores de polarización bajos debido a su rápida rotación, mientras que las sondas fluorescentes con mayor peso molecular tienen un valor de polarización más alto debido a su rotación más lenta. Por consiguiente, el valor de polarización de un fluoróforo aumenta al unirse a una molécula más grande. Más información acerca de la técnica de polarización de la fluorescencia se proporciona en las patentes de Estados Unidos N° 5,427,960 y 5,976,820 y en Nasir, M. S. y Jolley, M. E., "Fluorescence Polarization: An analytical tool for Immunoassay and Drug Discovery," *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 1999, 2, 177-190.

El ensayo utiliza un trazador, que consiste en un fluoróforo conjugado a DON, que proporciona un valor de polarización especificado y es capaz de unirse a un anticuerpo específico contra DON para producir un cambio detectable en la polarización de la fluorescencia. Este trazador DON-fluoróforo compete con el DON libre de los extractos de granos por la unión a un anticuerpo específico (un ensayo de inhibición), que da lugar a un valor de polarización de la fluorescencia que es inversamente proporcional a la cantidad de DON en el grano.

En realizaciones preferidas, el ensayo es rápido, simple (en cuanto a que se requiere un entrenamiento mínimo) y se puede llevar al campo, por lo que es útil para la determinación de rutina y cuantitativa de DON en granos. El ensayo preferido también puede detectar cantidades muy pequeñas de DON (< 0.2 ppm).

1. Materiales y métodos

Todos los productos químicos y solventes se utilizaron como se recibieron a menos que se indique lo contrario. DON y fluoresceinamina (isómero II) se obtuvieron de Sigma. Los anticuerpos monoclonales específicos contra DON fueron provistos por el Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL). Las mezclas de reacción se separaron en TLC preparativa usando placas de gel de sílice (Sigma). La polarización de la fluorescencia se midió a temperatura ambiente usando un instrumento de polarización de la fluorescencia de un único tubo Sentry-FP (Diachemix Corp.) Los datos se graficaron usando el programa Graph Pad Prism, y los valores desconocidos se obtuvieron de la gráfica.

2. Preparación del anticuerpo monoclonal contra DON

Varias técnicas diferentes para la preparación de anticuerpos específicos contra DON fueron dadas a conocer por diversos grupos^{1-2,9}. Puesto que DON es una molécula pequeña, habitualmente se conjuga a una proteína para volverlo inmunógeno.

El método preferido para la preparación de anticuerpos específicos, contra DON que fue el método empleado para preparar los anticuerpos utilizados en estos estudios, es el siguiente. Se hace reaccionar DON (5 mg) con 1,1'-carbonildiimidazol (40 mg) en 800 μ l de acetona durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añade agua lentamente (20 μ l) seguido de 5.8 mg de ovoalbúmina en 385 μ l de tampón de bicarbonato de sodio 0.1 M (pH 8.5). La mezcla se mantiene a 4 °C durante 24 horas y se dializa extensamente contra solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0.1 M. El conjugado de DON-proteína se diluye a una concentración de 1 mg/ml con PBS 0.1 M, se distribuye en porciones de 200 μ l y se liofiliza. Este material liofilizado se reconstituye con agua inmediatamente antes de usarlo para inmunizar a los ratones. Luego se analiza la especificidad contra DON de los anticuerpos producidos por estas líneas celulares. Más detalles se proporcionan en Chris M. Maragos y Susan P. McCornnick, "Monoclonal Antibodies for the Mycotoxins Deoxynivalenol and 3-Acetyl-Deoxynivalenol," Food and Agricultural Immunology, 2000, 12, 181-192.

3. Preparación del trazador DON-F

Se mezclaron 100 μ L de una solución de acetona de DON (Sigma, 0.625 mg) con 2 mg de 1,1'-carbonildiimidazol (Sigma) y se mantuvieron a temperatura ambiente. Después de dos horas, esto se mezcló con 100 μ l de una solución del isómero II de fluoresceinamina (6-aminofluoresceína, Sigma, 10 mg/ml en carbonato de sodio 0.1 molar, pH ~ 9.5) y después de agitar exhaustivamente, la reacción se incubó durante la noche a temperatura ambiente. El producto resultante se separó por TLC preparativa (sílice, CHCl₃:CH₃OH:CH₃CO₂H, 90:10:1), y el producto (R_f ~ 0.4) se recogió, se agitó con metanol, se centrifugó y se filtró para dar trazador DON-F puro. Esta solución madre de trazador DON-F se almacenó a 2-8 °C y se diluyó adecuadamente para usar. También se podrían emplear otros fluoróforos, dependiendo del anticuerpo.

Se observó que 10 μ l de este trazador diluido en 1 ml de PBS dio una intensidad equivalente a ~ fluoresceína 1 nM. Además, se encontró que este trazador proporcionaba una polarización de 40-50 mP, que cambió a ~ 250 mP al añadir el anticuerpo contra DON diluido adecuadamente provisto por el Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL).

4. Protocolo para el ensayo de polarización de la fluorescencia de DON

Un protocolo preferido para realizar el análisis de DON es el siguiente. La muestra de grano en la que se va a determinar DON se tritura. Después, 20 gramos de grano triturado se agitan en 100 ml de agua durante 10-20 minutos para extraer el DON para el análisis. De manera beneficiosa, este extracto se puede utilizar sin pasos adicionales de purificación.

Para determinar la cantidad de DON presente en las muestras de grano, se obtiene primero una curva estándar utilizando soluciones estándar de DON como sigue. Se pueden preparar una serie de soluciones estándar de DON diluyendo una cantidad adecuada de solución acuosa madre de DON (10 mg/ml) en 1 ml de tampón PBSA que contiene gammaglobulina bovina (BGG) en una concentración de 0.01%. Una cantidad fija de estándar, por ejemplo 10 μ l o 20 μ l, se transfiere con pipeta a 1 ml de solución diluida de anticuerpo en un tubo de ensayo de vidrio de 10 x 75 mm y la mezcla se agita exhaustivamente con vórtex. La solución diluida de anticuerpo es preferentemente alrededor de 1/20 000 a 1/40 000 en PBSA con BGG. Esta mezcla se utiliza para realizar una lectura del blanco en el instrumento. Las lecturas se deben repetir hasta que sean estables (normalmente dos lecturas). 10 μ l de solución de trazador DON-F, preparada como se describió antes, se agregan después al tubo de ensayo de vidrio que contiene la solución del anticuerpo y el estándar, y el tubo de ensayo se agita exhaustivamente en vórtex. El tubo de ensayo se vuelve a colocar en el instrumento, y se registran los valores de mP hasta que se estabilizan. Las otras soluciones estándar se leen de la misma manera, y se construye una curva estándar usando los valores de mP estabilizados.

Las muestras, preparadas como se describió antes, se miden de manera similar. Específicamente, una cantidad fija de la muestra extraída, normalmente 10 μ l o 20 μ l, dependiendo de lo que se utilizó para la curva estándar, se transfiere con pipeta a 1 ml de solución diluida de anticuerpo en un tubo de ensayo de vidrio 10 x 75 mm. La mezcla se agita exhaustivamente en vórtex y se usa para realizar una lectura del blanco en el instrumento. Se agregan 10 μ l de trazador al tubo de ensayo de vidrio que contiene la solución de anticuerpo y la muestra, y el tubo de ensayo se agita exhaustivamente en vórtex. El tubo de ensayo se vuelve a colocar en el instrumento, y se registran los valores de mP. La concentración de DON en la muestra extraída se calcula después usando la curva estándar.

5. Curva estándar para el ensayo de polarización de la fluorescencia de DON

Las curvas estándar se obtuvieron para el instrumento de polarización de la fluorescencia Sentry-FP usando el protocolo descrito antes para los estándares de DON en diferentes concentraciones. La tabla 1 indica las lecturas de polarización de la fluorescencia en unidades mP para soluciones estándar de DON, utilizando 10 µl de la solución estándar y "Anticuerpo N° 1" del Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL). La figura 3 muestra la curva estándar, que relaciona la señal de polarización de la fluorescencia en mP con la concentración de DON en ppm, que se obtuvo a partir de estos datos.

10 Tabla 1

Concentración de estándar de DON (ppm)	mP
0.00	171
0.10	143
0.25	130
0.50	112
1.00	87
2.00	65
3.00	52
4.00	46
5.00	43

La tabla 2 indica las lecturas de polarización de la fluorescencia en unidades mP para soluciones estándar de DON, utilizando 20 µl de la solución estándar y "Anticuerpo N° 4" del Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL). La figura 4 muestra la curva estándar, que relaciona la señal de la polarización de la fluorescencia en mP con la concentración de DON en ppm, que se obtuvo a partir de estos datos.

15 Tabla 2

Concentración de estándar de DON (ppm)	mP
0.00	247
0.10	241
0.25	215
0.50	183
1.00	145
2.00	98
4.00	76

6. Resultados del ensayo de polarización de la fluorescencia de muestras de trigo inoculadas con DON

20 El Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL) proporcionó trigo carente de DON. 20 g de muestras de trigo se complementaron con diversas concentraciones de DON (Sigma, solución 1 mg/ml) y se extrajeron con 100 ml de agua agitando durante 10-20 minutos. En cada caso se centrifugó y analizó 1 ml del sobrenadante. Cuando no se analizaron inmediatamente, las muestras se almacenaron en un refrigerador. Se mezclaron 20 µl de la muestra con 1 ml de una solución 1/40 000 del "Anticuerpo N° 1" del Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL) en tampón PBSA-BGG y se leyeron como blanco en el instrumento Sentry-FP. Luego se agregaron 10 µl de trazador adecuadamente diluido y se midió la polarización de la fluorescencia. Cada muestra se corrió por duplicado. Se trazó una gráfica estándar (Figura 5), utilizando los datos de la tabla 3. Sin embargo, se encontró que el "anticuerpo N° 4," no producía resultados confiables con muestras reales.

30 Tabla 3

Concentración de estándar de DON (ppm)	mP (corrida 1)	mP (corrida 2)	mP (corrida 3)
0	224	228	223.45

Cconcentración de estándar de DON (ppm)	mP (corrida 1)	mP (corrida 2)	mP (corrida 3)
0.5	203.08	192.33	196
1.25	168.89	171.49	169.02
2.5	143.2	145	146.42
5	111.12	110.07	112.01
10	82.68	84.92	86.52

5 Se calculó la concentración de DON (en ppm) de cada muestra a partir de la gráfica estándar de la figura 5, utilizando el valor promedio mP de las corridas por duplicado de esa muestra. La tabla 4 muestra estos resultados. La figura 6 es una gráfica de la concentración de DON (en ppm) de las muestras según fueron inoculadas, frente a la concentración de DON (en ppm) calculada a partir de la curva estándar de la figura 5. Se observó una buena correlación (un valor de r^2 de 0.994) entre estas concentraciones de DON teórica y calculada.

Tabla 4

Concentración de DON en la muestra inoculada (ppm)	mP	Concentración de DON calculada (ppm)	% de recuperación de DON
3.5	134.03	2.95	84.28
0.5	200.52	0.49	98
1.5	169.00	1.42	94.66
6.5	100.64	6.00	92.3
10	178.29	11.1	111
20	151.03	21	105
0.2	209.85	0.26	130
1.2	177.30	1.14	95
0.8	188.01	0.82	102
2.5	147.17	2.28	91.2
8	186.31	8.7	108

10 7. Comparación del ensayo de polarización de la fluorescencia para DON con HPLC

15 Se ensayaron varias muestras de trigo diferentes con cantidades variables de DON, provistas por el Dr. Chris Maragos (USDA, Peoria, IL), siguiendo el procedimiento del ensayo de polarización de la fluorescencia descrito antes utilizando el anticuerpo N° 1. Las muestras también se analizaron por HPLC usando métodos estándar. La tabla 5 muestra los datos para la gráfica estándar (Figura 7) utilizados en este estudio.

Tabla 5

Cconcentración de estándar de DON (ppm)	mP (corrida 1)	mP (corrida 2)	mP (corrida 3)	mP (corrida 4)
0	235	235	234	232
0.2	225	228	222	222
0.5	214	217	215	214
1.25	201	201	203	203
2.5	190	190	191	191
5	161	161	164	163
10	134	135	133	133
20	107	107	108	109

20 La tabla 6 muestra la concentración de DON (en ppm) de cada muestra calculada a partir de la gráfica estándar de la figura 7.

Tabla 6

Número de la muestra	mP	Concentración de DON calculada (ppm)
1	133.5	9.46
2 (dilución 1 x 10)	196.75	1.93
3	182.25	3.06
4	139.5	8.26
5	144	7.48
6	125	11.64
7	123	12.27
8	136	8.93
9	110.5	18.73
10	153.25	6.12
11	133.5	9.46
12	156.25	5.73
13	228.5	0.04
14	234	0.00
15	121.5	12.79
16	126.75	11.13
17	129.75	10.33
18	146.25	7.12
19	166.5	4.55
20	173	3.89
21	190	2.43
22	159.75	5.30
23	168.5	4.34
24	237.75	0.00
25	170.75	4.11
26	199	1.77
27	213.5	0.82
28	217.5	0.58
29	212	0.92
30	155	5.89
31	213.25	0.84
32	161.75	5.07
33	228	0.05
34	184.25	2.89

5 La figura 8 es una gráfica de las concentraciones de DON (en ppm) calculadas con el ensayo de polarización de la fluorescencia, como se muestra en la tabla 6, frente a la concentración de DON (en ppm) de la muestra medida por HPLC. Se calculó una línea de ajuste mejor a partir de estos datos. Su pendiente fue 1.2112 ± 0.0391 y el valor de r^2 fue 0.9676, lo que indica que los resultados del ensayo de polarización de la fluorescencia estuvieron de acuerdo con los resultados de HPLC.

8. Otros tricotecenos

Se encontró que el anticuerpo N° 1, cuando se usa en un ensayo de polarización de la fluorescencia con el trazador DON-F, como se describió antes, tiene una reactividad cruzada con otros tricotecenos. Específicamente, se encontró que el anticuerpo N° 1 tiene una reactividad cruzada de 358% con 15-acetil-desoxinivalenol y una reactividad cruzada de 9% con la toxina HT-2. Se encontró que los otros tricotecenos indicados en la figura 2 tenían menos de 4% de reactividad cruzada.

El porcentaje de reactividad cruzada para cada tricoteceno se calculó dividiendo el valor de CI_{50} para DON entre el valor de CI_{50} de los tricotecenos y multiplicando por 100%. El valor de CI_{50} de un tricoteceno es la concentración de tricoteceno necesaria para dar una respuesta de 50% de polarización de la fluorescencia, donde el 100% corresponde a la respuesta del ensayo sin el tricoteceno y 0% representa la respuesta del ensayo sin anticuerpo.

Debido a esta reactividad cruzada, el ensayo de polarización de la fluorescencia descrito en este documento se puede utilizar para la determinación de tricotecenos distintos de DON. Por otra parte, dado que DON está estrechamente relacionado con otros tricotecenos, se pueden desarrollar ensayos de polarización de la fluorescencia específicamente para estos otros tricotecenos.

9. Kit del ensayo

Los materiales utilizados para realizar el ensayo de la presente invención están preferentemente disponibles en forma de kit. El kit incluye preferentemente trazador y anticuerpo en una cantidad adecuada para al menos un ensayo, junto con un embalaje adecuado e instrucciones de uso. El trazador y el anticuerpo se pueden proporcionar en solución, como una dispersión líquida, o como un polvo sustancialmente seco (por ejemplo, en forma liofilizada).

El embalaje adecuado puede ser cualquier matriz o material sólido como vidrio, plástico, papel, aluminio y similares, capaces de mantener por separado dentro de límites fijos el tampón, el trazador y el anticuerpo. Por ejemplo el trazador y el anticuerpo monoclonal se pueden suministrar como soluciones en frascos o viales etiquetados diferentes, hechos de vidrio o plástico.

Para la determinación de DON, el anticuerpo es específico contra DON y es preferentemente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal preferido se puede preparar como se describe en este documento y se conoce en el área.

Para la determinación de DON, el trazador consiste en un fluoróforo, como 6-aminofluoresceína, conjugado a DON. Se pueden utilizar otros fluoróforos siempre que el trazador resultante sea capaz de unirse a los anticuerpos monoclonales para producir un cambio detectable en la polarización de la fluorescencia.

10. Bibliografía

- 1: Sinha, R. C.; Savard, M. E.; Lau, R. "Production of Monoclonal Antibodies for the Specific Detection of Deoxynivalenol and 15-Acetyldeoxynivalenol by ELISA," *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 1740-1744.
- 2: ((a) Casale, W. L.; Pestka, J. J.; Hart, L. P. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Employing Monoclonal Antibody Specific for Deoxynivalenol (Vomitoxin) and Several Analogues," *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 663-668. (b) Pestka, J. J.; Abouzied, M. N.; Sutikno. "Immunological Assays for Mycotoxin detection," *Food Technology*, 1995, 120-128.
- 3: Trucksess, M. W.; Ready, D. E.; Pender, M. K.; Ligmond, C. A.; Wood, G. E.; Page, S. W. "Determination and Survey of Deoxynivalenol in White Flour, Whole Wheat Flour and Bran," *J. AOAC Int.*, 1996, 79, 883-887.
- 4: Trucksess, M. W.; Nesheim, S.; Eppley, R. M. "Thin Layer Chromatographic Determination of Deoxynivalenol in Wheat and Corn," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1984, 67, 40-43.
- 5: Chang, H. L.; DeVries, J. W.; Larson, P. A.; Patel, H. H. "Rapid Determination of DON cleanup," *JAOAC*, 1984, 67, 52-57.
- 6: Nielsen, K.; Gall, D.; Jolley, M.; Leishman, G.; Balsevicius, S.; Smith, P.; Nicoletti, P.; Thomas, F., *J. Immun. Methods*, 1996, 195, 161-168.
- 7: ((a) Lynch, B. A.; Loiacono, K. A.; Tiong, C. L.; Adams, A. E.; MacNeil, I. A. "A fluorescence polarization based Src-SH2 binding assay," *Anal. Biochem.*, 1997, 247, 77-82. (b) Wei, A. P.; Herron, J. N., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3372-3377. (c) Kauvar, L. M.; Higgins, D. L.; Viller, H. O.; Sportsman, J. R.; Engquist-Goldstein, A.; Bukar, R.; Bauer, K. E.; Dilley, H.; Rocke, D. M., *Chem. Biol.*, 1995, 2, 107-118.
- 8: ((a) Nasir, M. S.; Jolley, M. E. "Fluorescence Polarization: An Analytical Tool for Immunoassays and Drug Discovery," *Combinatorial Chem. & High Throughput Screening*, 1999, 2, 177-190. (b) Jolley, M. E. "Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma," *J. Anal. Toxicol.*, 1981, 5, 236-240. (c) Eremin, S. A.; Gallacher, G.; Lotey, H.; Smith, D. S.; Landon, J., *Clin. Chem.*, 1987, 33, 4113-4122. (d) Jolley, M. E., "Fluorescence polarization assays for the detection of

proteases and their inhibitors," J. Biomol. Screen., 1996, 1, 33-38

9: Zhang, G.; Li, S. W.; Chu, F. S., "Production and characterization of antibody against deoxynivalenol triacetate," J. Food Protection, 1986, 49, 336-339.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un trazador para utilizar en un ensayo homogéneo para la determinación de desoxinivalenol (DON) en granos, donde el trazador consiste en un fluoróforo conjugado a DON, capaz de unirse a un anticuerpo específico contra DON para producir un cambio detectable en la polarización de la fluorescencia.
- 2.** El rastreador de la reivindicación 1, en el cual el fluoróforo es 6-aminofluoresceína.
- 10 **3.** El rastreador de la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo específico contra DON es un anticuerpo monoclonal.
- 4.** Un ensayo homogéneo para la determinación de tricotecenos en granos, donde dicho ensayo homogéneo comprende los pasos de:
- 15 extraer tricoteceno de una muestra de grano para proporcionar un extracto;
 combinar dicho extracto con un trazador y un anticuerpo para proporcionar una mezcla, donde dicho trazador consiste en un tricoteceno predeterminado conjugado a un fluoróforo y es capaz de unirse a dicho anticuerpo para producir un cambio detectable en la polarización de la fluorescencia;
 medir la polarización de la fluorescencia de dicha mezcla para obtener una medida de la polarización de la fluorescencia; y
20 comparar dicha medida de la polarización de la fluorescencia con un valor caracterizado de polarización de la fluorescencia, donde dicho valor caracterizado de polarización de la fluorescencia corresponde a una concentración conocida de tricoteceno.
- 5.** El ensayo de la reivindicación 4, en el cual dicho tricoteceno predeterminado es el de desoxinivalenol (DON).
- 25 **6.** El ensayo de la reivindicación 5, en el cual dicho fluoróforo es 6-aminofluoresceína.
- 7.** El ensayo de la reivindicación 4, que comprende además los pasos de:
- 30 proporcionar una pluralidad de soluciones estándar de tricoteceno, donde cada una de dichas soluciones estándar de tricoteceno tiene una concentración conocida diferente de tricoteceno;
 agregar dicho trazador y dicho anticuerpo a cada una de dicha pluralidad de soluciones estándar de tricoteceno de modo de proporcionar una pluralidad de mezclas estándar; y
 medir la polarización de la fluorescencia de cada una de dicha pluralidad de mezclas estándar para proporcionar una pluralidad de valores de polarización de la fluorescencia estándar correspondientes a
35 concentraciones de tricoteceno conocidas.
- 8.** El ensayo de la reivindicación 7, donde dicho valor de polarización de la fluorescencia caracterizado es uno de dichos valores de polarización de la fluorescencia estándar.

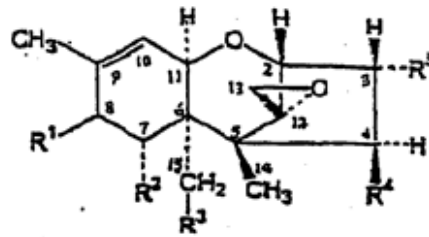


FIG. 1

Nombre común	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Desoxinivalenol	=O	OH	OH	H	OH
3-Acetil-desoxinivalenol	=O	OH	OH	H	OAc ^a
15-Acetil-desoxinivalenol	=O	OH	OAc	H	OH
Triacetil-desoxinivalenol	=O	OAc	OAc	H	OAc
Nivalenol	=O	OH	OH	OH	OH
Fusarenon-X	=O	OH	OH	OAc	OH
Tricotecolona	=O	H	H	OH	H
Tricotecina	=O	H	H	X ^b	H
Isotricodermina	H ₂	H	H	H	OAc
8-Hidroxisotricodermina	OH	H	H	H	OAc
Escirpentriol	H ₂	H	OH	OH	OH
Diacetoxiescirpenol	H ₂	H	OAc	OAc	OH
Toxina T-2	ISV ^c	H	OAc	OAc	OH
Triol T-2	ISV	H	OH	OH	OH
Tetraol T-2	OH	H	OH	OH	OH
Toxina HT-2	ISV	H	OAc	OH	OH
Neosolaniol	ISV	H	OAc	OAc	OH
Verrucarol	H ₂	H	OH	OH	H

^a OAc representa -OCOCH₃

^b X representa -OCOCH=CHCH₃

^c ISV representa -OCOCH₂CH(CH₃)₂.

FIG. 2

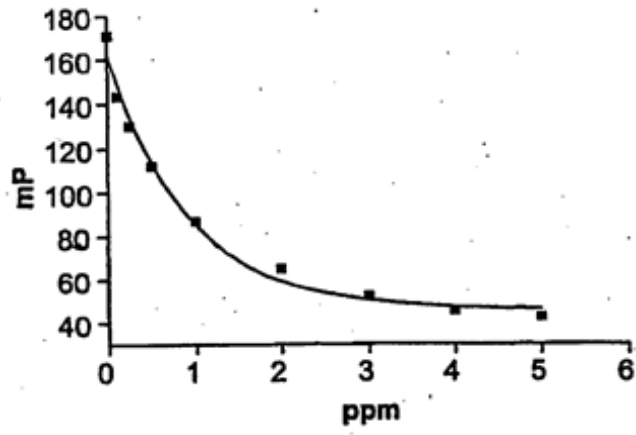


FIG. 3

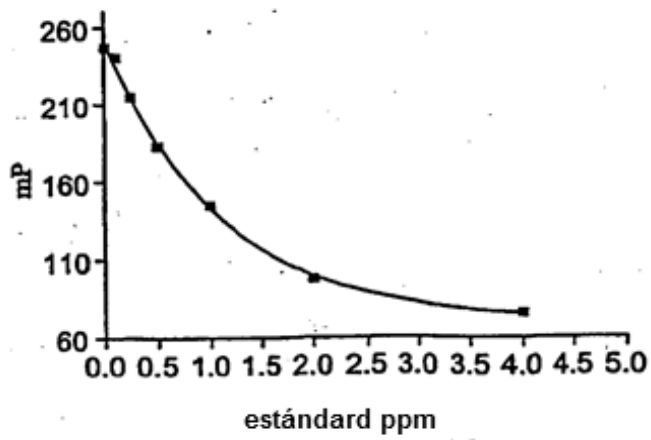


FIG. 4

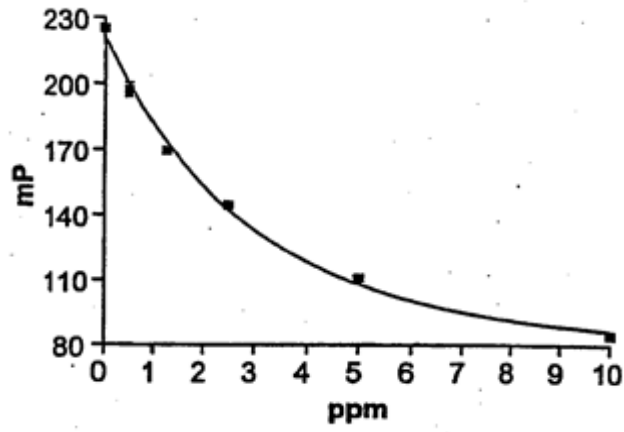


FIG. 5

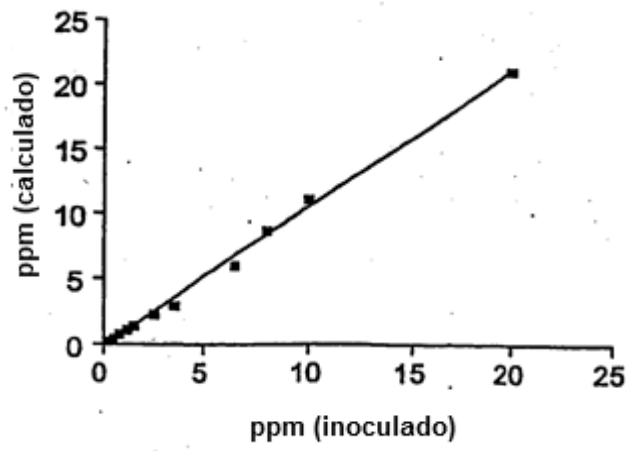


FIG. 6

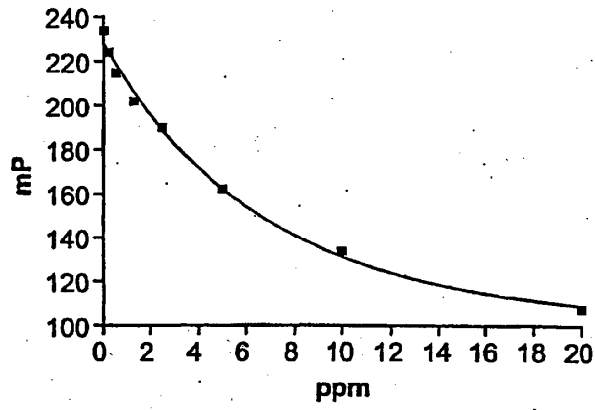


FIG. 7

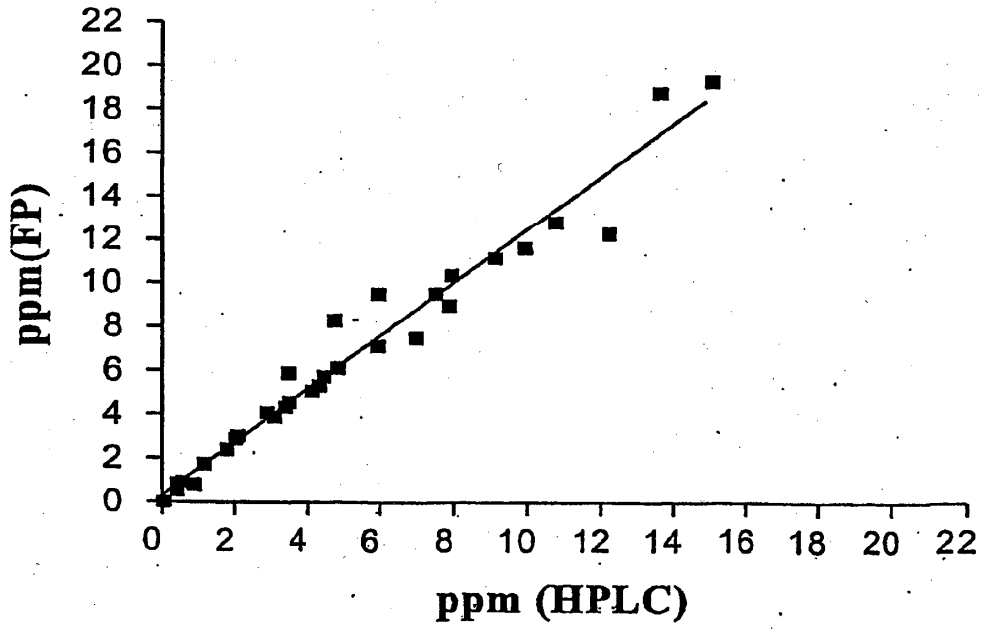


FIG. 8