(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 794 173**

(21) Número de solicitud: 201900082

(51) Int. Cl.:

G01N 33/04 (2006.01)
G01N 33/551 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

17.05.2019

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

17.11.2020

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (80.0%)
Sec. Contratos y Patentes (OTRI), Fac. Medicina (Edificio Entrepabellones 7 y 8), C/ Dr. Severo Ochoa, 7 Ciudad Universitaria
28040 Madrid ES y
ZEULAB, S.L. (20.0%)

(72) Inventor/es:

RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL, Víctor;
POVEDANO MUÑUMEL, Eloy;
CAMPUZANO RUÍZ, Susana;
BENEDÉ PÉREZ, Sara;
PINGARRÓN CARRAZÓN, José Manuel;
REVIEJO GARCÍA, A. Julio;
GAMELLA CARBALLO, María;
MATA VALLESPIN, Luis María y
GALÁN MALO, Patricia

(54) Título: **Método y plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos**

(57) Resumen:

Método y plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos.

La presente invención se refiere a un método para detectar y/o cuantificar la presencia de calostro en leche y productos lácteos así como la incorporación fraudulenta de leche de orígenes no declarados, en concreto de leche de bovino, ovino y/o caprino. El método incluye la captura y detección de inmunoglobulina G (IgG) mediante anticuerpos anti-IgG sobre partículas magnéticas que se capturan sobre electrodos impresos de trabajo. La invención también se refiere a una plataforma electroquímica inmunosensora que incluye los elementos necesarios para detectar y/o cuantificar estas posibles adulteraciones y fraudes: partículas magnéticas, anticuerpos anti-IgG de bovino, ovino y caprino sin marcar, anticuerpos anti-IgG de las 3 especies conjugados con una molécula de generación y amplificación de la señal electroquímica, y electrodos impresos de trabajo sobre un soporte magnético.

ES 2 794 173 A1

DESCRIPCIÓN

Método y plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de los métodos para realizar análisis de alimentos. Más concretamente, se encuadra en el sector de los métodos para la detección de la incorporación fraudulenta de leche de orígenes no declarados o de calostros, en leches y productos lácteos, mediante biosensores electroquímicos amperométricos y para la cuantificación de dichas adulteraciones y fraudes.

Antecedentes de la invención

La adulteración de los alimentos afecta tanto a la calidad de los productos como a su procesamiento tecnológico y puede plantear tanto riesgos para la salud como problemas económicos y de pérdida de confianza para los consumidores. La leche y sus derivados son uno de los blancos más comunes de la adulteración en alimentos. Los productos lácteos consumidos en todo el mundo, como la leche, el yogur o el queso, son una parte importante de la dieta debido a su alto valor nutritivo y tienen una gran importancia económica en la industria alimentaria.

La adulteración de la leche con leche de otras especies o con calostro de la misma o de diferentes especies animales se considera actualmente un importante problema de gran interés que, además, debe evitarse por razones religiosas, éticas o culturales y por cuestiones de salud (intolerancia o alergia a la leche de determinadas especies).

Sin embargo, este tipo de adulteraciones en la leche son difícilmente detectables debido a la similitud en la composición de las leches procedentes de distintas especies animales. La prevalencia de la producción de leche de vaca en el mundo hace que esta sea uno de los productos alimenticios más económicos, lo que la convierte en el tipo de leche más frecuentemente utilizada en la adulteración de leche de otras especies (oveja, cabra y búfala) empleadas en la industria alimentaria pero con producciones más bajas o marcadamente estacionales, lo que da lugar a déficits en algunos periodos del año que incrementan su precio. Por otro lado, la adición intencionada de calostro crudo a la leche es una práctica ilegal e indeseable para la industria láctea, debido a la presencia de proporciones más elevadas de proteínas de suero de leche y caseína presentes en el calostro, lo que altera las propiedades organolépticas de los productos lácteos y causa problemas tecnológicos en su producción.

Por estas razones, se hace necesario controlar tanto las especies presentes como la adición de calostro en leche y derivados, ya sea mediante métodos de análisis de presencia/ausencia o, dependiendo del caso, mediante el uso de métodos de cuantificación, con el fin de verificar los valores declarados en el etiquetado.

Según el reglamento de la Comunidad Europea, el método de referencia para la detección de la leche de vaca y caseinato en los quesos elaborados a partir de leche de oveja, de cabra, de búfala o mezclas de leche de oveja, cabra y búfala es el enfoque isoeléctrico de las caseínas tratadas con plasmina en presencia de urea y tinción de las proteínas γ_3- y γ_2-caseínas (REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2018/150 DE LA COMISIÓN de 30 de enero de 2018 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1240 en lo que se refiere a los métodos para el análisis y la evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos que

pueden optar a la intervención pública y a la ayuda para el almacenamiento privado). Sin embargo, además de ser excesivamente tediosa, esta técnica no ofrece los resultados deseados cuando el queso ha sufrido un proceso de maduración prolongado y solo permite la detección de la leche de vaca en queso de otras especies.

Otros métodos empleados comúnmente para la detección de adulteraciones en leche con leche de otros orígenes incluyen los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) que emplean anticuerpos dirigidos a caseína, lactoglobulina, otras proteínas del suero o inmunoglobulinas G (IgG) y las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o variantes como PCR-RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) o PCR específica de especies. Sin embargo, todas estas metodologías requieren múltiples etapas e instrumentación costosa, disponible solo en laboratorios centralizados.

La especificidad de las IgG entre diferentes especies animales y los altos niveles encontrados en la leche cruda y el calostro, hacen de las IgG un biomarcador aceptado para discriminar el origen animal de la leche y el mejor indicador de la presencia de calostro en la leche debido a la alta relación de IgG en calostro/leche. Además, las IgG no son fácilmente susceptibles a la proteólisis y son inmunógenos más fuertes que las caseínas y otras proteínas del suero, características que las convierten en dianas muy interesantes para detectar la adulteración de especies en la leche.

Así, en ES1033533U, se describe la utilización de anticuerpos anti-lgG de vaca y de cabra en un kit para la detección de leches extrañas en leche de oveja.

Por otro lado, Galan-Malo, P. *et al.* (2018) *Food Additives & Contaminants*: Part A, DOI: 10.1080/19440049.2018.1426886, describen un test basado en técnicas inmunocromatográficas para detectar leche de vaca en leches de otras especies animales (oveja, cabra), incluida la leche de búfala. Se consiguen límites de detección inferiores a los niveles máximos de leche de vaca permitidos por la legislación de la Unión Europea. Se utilizan los kit comerciales de la empresa ZEULAB (Calokit, IC-Buffalo), basados en la detección de IgG específicas de especie en las muestras.

En Galan-Malo, P. *et al.* (2014). *Small Ruminant Research* 119:156-160, se describe la detección de calostro añadido a la leche mediante la determinación de los niveles de IgG presentes en la mezcla, utilizando el test de la empresa ZEULAB (Calokit-Sheep) para determinar la concentración de IgG específica de oveja en leche de oveja.

Existen kits comerciales que utilizan técnicas tipo ELISA basadas en anticuerpos anti-lgG bovinas, ovinas y caprinas, de varias casas comerciales, como se puede comprobar en la Tabla 1.

IgG diana	**Características analíticas**	**Tiempo en min***	**Empresa**
IgG ovina	LDD: 14 ng/ml	90	ZEULAB kit
IgG ovina	LR: 15,6-1.000 ng/ml	60	Biopanda Reagents
IgG ovina	LDD: 1,56 ng/ml	60	Antibodies online

IgG ovina	LDD: 7,5 µg/ml	57	MyBioSource
IgG bovina	LDD: 70 ng/ml Adulteración con leche de vaca: 0,1% (v/v)	90	ZEULAB Kit
IgG bovina	LDD: 250 pg/ml	180	CYGNUS tecnologies
IgG bovina	LDD: 1,245 ng/ml	120	Abcam
IgG bovina	LDD: 1,18 µg/ml	77	MyBioSource
IgG caprina	LDD: 10 ng/ml Adulteración con leche de cabra: 0,1% (v/v)	90	ZEULAB Kit
IgG caprina	LDD: 1,95 ng/ml	120	Cloud Clone Corp

Tabla 1. Principales características analíticas de los kits ELISA comerciales disponibles para la determinación de IgG bovinas, ovinas y caprinas.

LDD: límite de detección
LR: intervalo lineal
* a partir del momento en que se tapiza la placa de ELISA

Dada la preocupación de los productores de leche de oveja y cabra y fabricantes de quesos con altos estándares de calidad, así como el auge en la demanda de quesos elaborados con leche de búfala, ante la posible introducción de leche de vaca en leches de mayor precio por su producción estacional o en quesos de mezcla en mayores proporciones que la indicada en su etiqueta, así como la preocupación por la adición intencionada de calostro crudo a la leche, que altera las características organolépticas y tecnológicas de la leche, es importante buscar métodos y dispositivos alternativos a los existentes, que sean rápidos, sensibles, asequibles y portátiles.

Explicación de la invención

Método y plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar y cuantificar adulteraciones en leche y productos lácteos producidas por la adición de calostros. Este método incluye varios pasos:
a- elaborar inmunocaptores magnéticos mediante la unión de anticuerpos captores anti-inmunoglobulina G (IgG) de bovino (Bov-CAb) a partículas magnéticas, anticuerpos captores anti-IgG de ovino (Ovi-CAb) a otras partículas magnéticas y anticuerpos captores anti-IgG de caprino (Cap-CAb) a otras partículas magnéticas;

b- elaborar partículas magnéticas definitivas incubando los inmunocaptores magnéticos del paso a- con la muestra de leche a analizar y con anticuerpos detectores anti IgG de bovino (Bov-DAb), anticuerpos detectores anti IgG de ovino (Ovi-DAb) y anticuerpos detectores anti IgG de caprino (Cap-DAb) todos ellos conjugados con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
c- capturar las partículas magnéticas definitivas del paso b- sobre un electrodo impreso de trabajo y colocar dicho electrodo sobre un soporte magnético.

En este método, en el paso b-, de elaboración de las partículas magnéticas definitivas, los inmunocaptores magnéticos con Bov-CAb se incuban individualmente con la muestra y con Bov-DAb, los inmunocaptores magnéticos con Ovi-CAb se incuban individualmente con la muestra y con Ovi-DAb y los inmunocaptores magnéticos con Cap-CAb se incuban individualmente con la muestra y con Cap-DAb.

Para realizar el método para detectar y cuantificar adulteraciones en leche y productos lácteos, las muestras de leche, preferentemente, se diluyen entre 100 y 10.000.000 veces.

A lo largo de esta memoria descriptiva, por anticuerpos captores (CAb) se entienden los anticuerpos de captura anti-inmunoglobulina (IgG) específica de especie: de bovino (Bov-CAb), de ovino (Ovi-CAb) y de caprino (Cap-CAb).

Por inmunocaptores magnéticos se entienden las partículas preparadas para captar las IgG de bovino (MB-Bov-CAb), ovino (MB-Ovi-CAb) y caprino (MB-Cap-CAb), listas para ser utilizadas (o conservadas hasta su utilización).

Los anticuerpos detectores (DAb) son anticuerpos anti-IgG específica de especie: de bovino (Bov-DAb), de ovino (Ovi-DAb) y de caprino (Cap-DAb), que se conjugan con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica.

En esta memoria, por partículas magnéticas definitivas se entienden las partículas magnéticas modificadas con los inmunocomplejos tipo sándwich: CAb + IgG de la muestra (o IgG estándar) + DAb conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica.

Por IgG totales, se entienden las IgG bovinas, ovinas y caprinas simultáneamente. Por otro lado, cuando se citan las IgG estándar o los estándares de IgG se hace referencia a las IgG procedentes de suero de cada una de las tres especies (bovina, ovina y caprina), comercializadas por empresas del sector.

Así mismo, en esta memoria, por plataforma electroquímica inmunosensora se entiende el conjunto de partículas magnéticas definitivas capturadas sobre los electrodos impresos de trabajo y estos colocados sobre soportes magnéticos.

Las partículas magnéticas utilizadas son, preferentemente, nanopartículas o micropartículas y, en cualquiera de los casos, se pueden seleccionar con propiedades superparamagnéticas.

Por otro lado, la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica conjugada con los DAb puede seleccionarse entre: HRP *(horseradish peroxidase,* peroxidasa de rábano), poli-HRP o fosfatasa alcalina; mientras que el electrodo de trabajo puede realizarse con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, plata, mercurio, grafito, carbón vitreo, nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro,

nanopartículas de óxido metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro, eligiéndose, preferentemente, los electrodos de trabajo impresos de carbono.

Para asegurar la captura eficiente y reproducible de las partículas magnéticas definitivas se incluyen uno o varios imanes en el soporte magnético sobre el que se colocan los electrodos impresos de trabajo, embebidos o no en él, y, preferentemente, se incluye un imán de neodimio.

Otro aspecto de la invención se refiere al método de detección y cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos producidas por la adición de calostros al que se añade un paso más con el que se capturan partículas magnéticas definitivas de bovino individualmente en un electrodo impreso de trabajo; partículas magnéticas definitivas de ovino individualmente en un electrodo impreso de trabajo; y/o partículas magnéticas definitivas de caprino individualmente en un electrodo impreso de trabajo, de manera que pueden detectarse y/o cuantificarse simultáneamente 2, 3 o 4 tipos de adulteraciones diferentes.

Tanto en los electrodos de trabajo en los que se capturan 3 partículas magnéticas definitivas diferentes, como en los que se captura solo un tipo de partícula magnética (de bovino, de ovino o de caprino) la concentración preferida de partículas magnéticas definitivas sobre el electrodo impreso de trabajo está comprendida entre 4 y 5 $\mu g/mm^2$.

Otro aspecto de la invención se refiere a una plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y la cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos que incluye:
- inmunocaptores magnéticos de bovino, ovino y caprino formados por la unión de anticuerpos captores anti-inmunoglobulina G (IgG) de bovino (Bov-CAb) a partículas magnéticas, anticuerpos captores anti-IgG de ovino (Ovi-CAb) a partículas magnéticas y anticuerpos captores anti-IgG de caprino (Cap-CAb) a partículas magnéticas;
- anticuerpos detectores anti-IgG de bovino (Bov-DAb), anticuerpos detectores anti-IgG de ovino (Ovi-DAb) y anticuerpos detectores anti-IgG de caprino (Cap-DAb) todos ellos conjugados con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar los tres tipos de partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de bovino, ovino y caprino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG correspondiente.

Preferentemente, las partículas magnéticas incluidas en las plataformas electroquímicas inmunosensoras son nanopartículas o micropartículas y, opcionalmente, pueden tener propiedades superparamagnéticas.

Por otro lado, la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica se puede seleccionar del grupo formado por: HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina; y los electrodos de trabajo pueden realizarse con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, plata, mercurio, grafito, carbón vitreo, nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro, preferentemente, será un electrodo de trabajo impreso de carbono.

Además, la plataforma electroquímica inmunosensora puede incluir uno o más imanes en el soporte magnético, embebidos en el mismo o no, preferentemente de neodimio.

Otro aspecto de la invención se refiere a plataformas electroquímicas inmunosensoras que incluyen, además de cualquiera de los aspectos que se han ido detallando:

- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar las partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de bovino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG de bovino conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar las partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de ovino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG de ovino conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica; y/o
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar las partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de caprino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG de caprino conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica.

Cualquiera de las plataformas electroquímicas inmunosensoras comprendidas en la invención incluye una cantidad suficiente de los elementos de la reacción inmunológica como para que la concentración de partículas magnéticas definitivas sobre el electrodo impreso de trabajo esté comprendida entre 4 y 5 $\mu g/mm^2$.

Las plataformas electroquímicas inmunosensoras para la determinación de IgG específicas de las tres especies animales analizadas proporcionan mejores límites de detección (LDD) que los valores obtenidos con la mayoría de los kits ELISA disponibles (resumidos en la Tabla 1) en un tiempo de análisis significativamente más corto (30 minutos frente a 60-120 minutos). Cabe destacar la importante mejora lograda en los LDD con respecto a los kits ELISA comercializados por ZEULAB aun cuando las plataformas electroquímicas inmunosensoras de la invención se elaboren utilizando los mismos anticuerpos policlonales (LDD de 0,74, 0,82 y 0,66 ng/ml frente a 70,0, 14,0 y 10,0 ng/ml para IgG bovinas, ovinas y caprinas, respectivamente) y en un tiempo de ensayo tres veces menor. La mejora lograda en la sensibilidad del método y de los dispositivos puede ser muy ventajosa en la detección rutinaria de bajos niveles de adulteración en el queso, lo que requiere una mayor sensibilidad debido a los efectos de la matriz y a la pérdida de IgG en el suero y debido a la proteólisis y a la desnaturalización de proteínas durante la fabricación del queso.

Además, en el método descrito la captura por los CAb y el mareaje con los DAb específicos, conjugados con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica, se realizan en una única etapa, permitiendo el desarrollo de metodologías más simples, y en tiempos más cortos, que las conocidas hasta ahora.

Por otro lado, una vez preparados, los inmunocaptores magnéticos presentan una excelente estabilidad durante el almacenamiento, lo que permite que la determinación de la presencia de calostros y/o la presencia de leche de una determinada especie en una muestra pueda realizarse en tan solo 30 minutos.

Mediante este procedimiento, utilizando estas plataformas electroquímicas inmunosensoras, se detectan niveles de adulteración tan bajos como el 0,1% v/v, tanto en leche cruda como en leche tratada por calor. Es importante señalar que este nivel es diez veces inferior al nivel actual permitido en la UE para la leche de vaca (1,0%). Además, la versatilidad de las plataformas electroquímicas inmunosensoras permite el análisis de leche adulterada con calostro y las mediciones multiplexadas permiten detectar los niveles de IgG individuales y de IgG totales. Las mediciones multiplexadas ofrecen información relevante sobre la muestra analizada: especie animal de procedencia de la leche, tratamiento térmico al que se ha sometido y posibles adulteraciones con leche de otras especies o con calostro.

Comparadas con los kits ELISA convencionales y comercializados con fines similares a las plataformas electroquímicas inmunosensoras de la invención, dichas plataformas son más sencillas en cuanto a su utilización, más económicas, más rápidas en ofrecer resultados, permiten la multiplexación y la portabilidad. Todas estas características hacen que las plataformas electroquímicas inmunosensoras de la invención sean una interesante herramienta de análisis para la inspección rutinaria e *in situ* de los productos lácteos, para garantizar que no están adulterados y para garantizar, también, su correcto etiquetado de manera que estén protegidos de posibles fraudes tanto los productores como los consumidores. La sencillez de los métodos desarrollados hace que sean fáciles de utilizar por personal poco cualificado durante la recogida de la leche en la granja o a su llegada a las centrales lecheras.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Representación esquemática de la preparación de los dispositivos:
a) MB preparadas para la determinación sencilla de IgG bovinas, ovinas o caprinas:
b) MB preparadas para la determinación total de IgG, determinación multiplexada de las IgG de las 3 especies estudiadas;
c) soporte magnético y SPCE para la detección amperométrica sencilla de las IgG de una de las 3 especies evaluadas (1, 2 y 3) o bien de las 3 especies conjuntamente;
d) soporte magnético y SPC4E para realizar la determinación amperométrica multiplexada de las IgG específicas de las 3 especies animales por separado (1, 2 y 3) y, sobre el cuarto electrodo del dispositivo, las 3 IgG conjuntamente (4).

Figura 2. Diagramas de calibración obtenidos con las plataformas electroquímicas inmunosensoras elaboradas para estándares de IgG a) bovinas, b) ovinas y c) caprinas. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 3. Respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas immunosensoras construidas para la determinación de las IgG estándares bovinas (B), ovinas (O) o caprinas (C) con MB sin modificar o con los inmunocaptores magnéticos preparados para IgG bovinas. (Bov-CAb; 1), ovinas (Ovi-CAb; 2) y caprinas (Cap-CAb; 3). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 4. Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas electroquímicas inmunosensoras construidas para la determinación de IgG bovinas (1), ovinas (2) o caprinas (3) en ausencia (N, barras claras) y en presencia (S, barras oscuras) de 250 ng/ml de estándares de IgG bovinas, ovinas y caprinas. Valores correspondientes a la relación S/N (rojo), indicando a) la concentración de CAb específicos y b) el tiempo de incubación utilizados para la preparación de los inmunocaptores magnéticos. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 5. Dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas electroquímicas inmunosensoras construidas para la determinación de IgG bovinas (1), ovinas (2) o caprinas (3) en ausencia (N, barras claras) y en presencia (S, barras oscuras) de 250 ng/ml de IgG estándares de bovino, ovino y caprino. Valores correspondientes a la relación S/N (rojo), indicando a) el número de pasos del protocolo de trabajo, b) la dilución de los HRP-DAb específicos y c) el tiempo de incubación con los HRP-DAb específicos utilizados para la

formación de los inmunocomplejos tipo sándwich. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 6. Relación S/N calculada para las respuestas amperométricas obtenidas para cada día de control de la estabilidad de los inmunocaptores magnéticos, en ausencia y en presencia de 100 ng/ml de cada una de las IgG diana con las plataformas electroquímicas inmunosensoras desarrolladas para las IgG a) bovinas, b) ovinas y c) caprinas, utilizando los inmunocaptores magnéticos almacenados. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 7. Selectividad de las plataformas electroquímicas inmunosensoras elaboradas para las IgG estándares.
a) Comparación de las respuestas amperométricas obtenidas con las plataformas electroquímicas inmunosensoras desarrolladas para la determinación de 0,0 y 100,0 ng/ml de IgG estándares bovinas (1), ovinas (2) o caprinas (3) preparadas en solución tampón y en ausencia y presencia de IgG estándares no dianas (bovinas, B; ovinas, O; caprinas C).
b) Comparación de las respuestas amperométricas en diferentes muestras de leche con sus correspondientes diluciones: cruda, pasteurizada o UHT, de vaca (B, azul), oveja (O, morado), cabra (C, verde) o búfala (Buf, amarillo).

Figura 8. Respuestas amperométricas medidas con las plataformas electroquímicas inmunosensoras para IgG bovinas a), ovinas b) y caprinas c) para detectar adulteraciones en leche cruda diluida 100 veces, sin adulterar (0,0%) o adulterada con 0,1 y 0,5% de leche de vaca a), oveja b) y cabra c). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 9. Evaluación de protocolos para la detección de adulteraciones de leche con calostro.
a) Diagramas esquemáticos de los cuatro protocolos evaluados.
b) Respuestas amperométricas obtenidas con cada uno de los protocolos evaluados.

Figura 10. Determinación de IgG totales en un SPCE.
a) Esquema del protocolo.
b) Respuestas amperométricas obtenidas a partir de leche de oveja a la que se le han añadido distintos porcentajes de calostro de oveja (0, 5, 10, 20 y 100%). Se indica, con una línea punteada roja, la línea de corte entre la leche cruda y el calostro detectados. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Figura 11. Plataforma electroquímica inmunosensora multiplexada para la detección de IgG bovinas, ovinas, caprinas y totales en muestras de leche sobre SPC4E. A la izquierda se muestran las gráficas amperométricas y a la derecha las intensidades de medida obtenidas en los análisis detallados en el ejemplo 11. Se muestran las siguientes adulteraciones de una leche de oveja: a) sin adulterar; y adulterada (*) con b) leche de vaca (azul); c) leche de cabra (verde); d) con calostro ovino (rojo). Con fines comparativos, se muestran las gráficas amperométricas obtenidas en ausencia de IgG bovinas, ovinas y caprinas (soluciones tamponadas) como líneas punteadas negras. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar de tres réplicas.

Realización preferente de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Preparación de partículas micromagnéticas (MB) modificadas con anticuerpos captores (CAb).

Se utilizaron partículas micromagnéticas comerciales modificadas con grupos carboxílicos (HOOC-MB, 2,7 µm de diámetro, 10 mg/ml Dynabeads M-270 Carboxylic Acid, 14305D -Dynal Biotech ASA-). Partiendo de 3,0 µl, se depositaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se lavaron dos veces con 50 µl de solución tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; pH 5,0), durante 10 minutos en agitación constante (950 rpm, 25°C).

A continuación, los grupos carboxílicos de las MB se activaron mediante la incubación durante 35 minutos (950 rpm, 25°C) en 25 µl de una solución recién preparada de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)/sulfo-NHS en tampón MES, pH 5,0.

Después de dos pasos de lavado con 50 µl de tampón MES, se incubaron las MB activadas en 25 µl de la solución CAb específica (ver ejemplo 5) de anticuerpos policlonales, de la empresa ZEULAB, SL, para la detección de IgG de bovino (Bov-CAb), ovino (Ovi-CAb) o caprino (Cap-CAb), preparadas en solución tampón MES, pH 5,0, durante 45 minutos (950 rpm, 25°C). Se lavaron dos veces las partículas resultantes, MB-CAb para IgG de bovino (MB-Bov-CAb), ovino (MB-Ovi-CAb) y caprino (MB-Cap- CAb), con 50 µl de solución tampón MES y se incubaron durante 60 minutos (950 rpm, 25°C) con 25 µl de solución de etanolamina 1,0 M (preparada en tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0) para bloquear los grupos activados de las MB modificadas que no habían reaccionado con los CAb. Se eliminó el sobrenadante y los inmunocaptores magnéticos resultantes se lavaron una vez con 50 µl de tampón Tris 0,1 M, pH 7,2, y dos veces con solución bloqueante de caseína (comprada lista para su uso en Thermo Fisher Scientific: 1,0% p/v caseína purificada en solución PBS) (Figura 1a).

Los inmunocaptores magnéticos así preparados pueden utilizarse nada más finalizar su preparación o bien pueden almacenarse en PBS filtrado y a 4°C hasta el momento de su utilización.

Ejemplo 2. Detección sencilla o multiplexada de IgG bovinas, ovinas, caprinas o totales.

Para la detección de las IgG específicas de especie (bovina, ovina y caprina) se prepararon anticuerpos detectores (DAb) partiendo de anticuerpos policlonales específicos para las IgG de cada especie, de la empresa ZEULAB, SL, que se conjugaron con HRP *(horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano). Dichos anticuerpos detectores conjugados se denominaron Bov-HRP-DAb, Ovi-HRP-DAb y Cap-HRP-DAb según la especificidad de especie de los anticuerpos utilizados.

<u>Ejemplo 2.1.</u> Los inmunocaptores magnéticos preparados según el ejemplo 1 se resuspendieron, independientemente, en 25 µl de una solución de mezcla que contenía:
- la IgG estándar procedente de suero de cada una de las tres especies, comercializadas por Sigma-Aldrich, para la determinación de IgG bovinas, ovinas o caprinas suplementada con
- el HRP-DAb específico para las IgG de cada una de las especies, todo ello en solución bloqueante de caseína.

<u>Ejemplo 2.2.</u> Los inmunocaptores magnéticos preparados según el ejemplo 1 se resuspendieron, independientemente, en 25 µl de una solución de mezcla que contenía:
- muestras que debían ser analizadas, convenientemente diluidas (ver ejemplo 4),
- el HRP-DAb específico para las IgG de cada una de las especies, todo ello en solución bloqueante de caseína.

Las mezclas del ejemplo 2.1., o las mezclas del ejemplo 2.2, se incubaron durante 30 minutos (950 rpm, 25°C) obteniéndose así las MB definitivas que se lavaron dos veces con 50 µl de solución bloqueante de caseína y que comprendían inmunocomplejos tipo sándwich formados por CAb-IgG-HRP-DAb sobre la superficie de las MB.

Para la detección sencilla de IgG de una especie determinada se utilizó el total de MB definitivas obtenidas a partir de los 3,0 µl de HOOC-MB que se tomaron como cantidad de inicio en el ejemplo 1 (Figura 1a).

Para la detección multiplexada de IgG totales (Figura 1b) se probaron distintos protocolos para resolver problemas técnicos derivados de reacciones cruzadas (ver ejemplos 10 y 11).

Ejemplo 3. Mediciones amperométricas.

Las mediciones amperométricas se realizaron con un potenciostato CHI812B (CH Instruments), controlado mediante el *software* CHI812B y µStat 8000 Multi Potentiostar/Galvanostat (Metrohm-DropSens S.L.) controlado por el *software* DropView 8400.

Las MB definitivas obtenidas en el ejemplo 2.1. o en el ejemplo 2.2. se resuspendieron en 50 o 10 µl de solución tampón fosfato sodio 0,05 M (pH 6,0), respectivamente, para realizar la detección amperométrica individual o multiplexada en electrodos impresos. Como transductores electroquímicos se utilizaron electrodos impresos comerciales: para las detecciones individuales se utilizaron SPCE *(screen-printed carbón electrodes*, DRP-110, de la casa Metrohm-DropSens, S.L.) de 4 mm de diámetro y, para las detecciones multiplexadas, se utilizaron SPC4E, DRP-4W110, de Metrohm-DropSens, S.L.) que cuentan con 4 electrodos de 2,95 mm de diámetro. En el caso de la detección multiplexada utilizando SPC4E, los electrodos de trabajo 1, 2, 3 y 4 se utilizaron para la captura magnética independiente de MB definitivas preparadas para IgG bovinas (1), ovinas (2), caprinas (3) y mezcla de las 3 anteriores (4), respectivamente (Figura 1d). Los electrodos impresos se colocaron en un soporte magnético para optimizar la localización de las MB definitivas en el electrodo de trabajo.

El conjunto del soporte magnético con los SPCE o SPC4E se sumergió en una célula electroquímica que contenía 10 o 20 ml, respectivamente, de solución tampón fosfato 0,05 M, pH 6,0, con 1,0 mM de hidroquinona (HQ) preparada justo antes de la medición electroquímica. Las mediciones amperométricas en soluciones en agitación se registraron aplicando un potencial de detección de -0,20 V frente a un electrodo de pseudoreferencia de Ag, tras la adición de 50 o 100 µl de una solución 0,1 M H_2O_2 hasta que se alcanzó la corriente de estado estacionario (≈1 min), utilizando el sistema H_2O_2/HQ. Las medidas amperométricas que figuran en estos ejemplos corresponden a la diferencia entre la corriente de estado estacionario y la corriente de fondo y son el promedio de, al menos, tres réplicas (intervalos de confianza calculados para $\alpha = 0,05$).

Se utilizaron los correspondientes cables conectores (DRP-CAC y DRP-CONNECT4W de Metrohm-DropSens S.L.) y carcasas de teflón caseras con 1 o 4 imanes de neodimio (AIMAN GZ) incrustados que se ubicaron justo debajo de cada electrodo de trabajo (Figuras 1c y d), lo que garantizó una captura eficiente y reproducible de las MB definitivas. Todas las mediciones electroquímicas se realizaron a temperatura ambiente.

Para la homogeneización de las soluciones se utilizó un agitador vórtex Bunsen AGT-9. Para la incubación de las MB en agitación y su localización magnética durante los lavados se utilizaron un agitador Thermomixer MT100 de temperatura constante (Universal Labortechnik) y un soporte magnético DynaMag™-2 (123.21D, Invitrogen Dynal AS), respectivamente. Para los

tratamientos térmicos aplicados a las muestras de leche, se utilizó un termociclador (SensoQuest LabCycler, Progen Scientific Ltd.).

Ejemplo 4. Análisis de muestras de leche.

Las plataformas electroquímicas inmunosensoras diseñadas se utilizaron para determinar el contenido endógeno de IgG bovina, ovina y caprina en diferentes muestras de leche: leche cruda y pasteurizada de vaca, leche de oveja y cabra, calostro de oveja y cabra, leche de vaca UHT y leche cruda de búfala. Las muestras de leche cruda, pasteurizada y UHT de vaca se compraron en un supermercado local; la leche cruda de oveja, cabra y búfala así como el calostro de oveja y cabra fueron proporcionados por ganaderos; las leches pasteurizadas de oveja y cabra se prepararon en el laboratorio como se indica más adelante.

El tratamiento que se aplicó a las muestras consistió, sencillamente, en la dilución (entre 100 y 100.000 veces) de la leche con solución bloqueante de caseína, para ajustar el contenido endógeno de IgG al intervalo lineal del diagrama de calibración obtenido con la plataforma electroquímica inmunosensora desarrollada para las IgG diana. Debido a la ausencia de efecto matriz para todas las muestras analizadas una vez diluidas 100 veces o más, la cuantificación se realizó por interpolación simple de las respuestas amperométricas obtenidas para cada una de las muestras diluidas en las gráficas de calibración elaboradas con los estándares de IgG obtenidos en el ejemplo 2.1. (Figura 2).

Se prepararon muestras artificiales añadiendo a la leche diferentes cantidades de leche de otras especies animales o de calostro (0,0; 0,1; 0,5; 5,0; 10,0 y 20,0% (v/v)). A continuación, se prepararon diluciones seriadas y se homogeneizaron por agitación manual y, después, se utilizaron para demostrar la viabilidad del método de detección de adulteraciones.

El protocolo de pasteurización a alta temperatura/tiempo corto (HTST) para la preparación en el laboratorio de leche pasteurizada de oveja o de cabra se realizó incubando 50 µl de leche cruda a 72°C durante 15 segundos.

Para realizar la determinación en las muestras de leche, se resuspendieron los inmunocaptores magnéticos preparados como se describe en el ejemplo 1 para IgG de bovinos, ovinos o caprinos en 25 µl de la muestra debidamente diluida con solución bloqueante de caseína; se complementaron con la solución específica de HRP-DAb, y se incubaron durante 30 minutos (950 rpm, 25°C), como se indica en el ejemplo 2.2., realizando posteriormente dos lavados con 50 µl de solución bloqueante de caseína.

Las mediciones amperométricas se realizaron como se indica en el ejemplo 3. La preparación completa de las plataformas electroquímicas inmunosensoras está esquematizada en la Figura 1.

Ejemplo 5. Optimización de las variables de trabajo.

En la Figura 3, se muestran las respuestas amperométricas obtenidas con los biosensores elaborados con MB sin modificar y con MB modificadas con los CAb específicos para cada tipo de IgG en ausencia y presencia de 250 ng/ml de cada una de las IgG estándar. Los resultados obtenidos muestran la viabilidad de la estrategia desarrollada para la determinación de cada IgG diana, ya que se produjeron diferencias significativas en las respuestas amperométricas en ausencia y presencia de cada estándar de IgG solo cuando las MB se modificaron con el CAb específico para cada IgG diana.

Las variables experimentales implicadas en la preparación de los inmunocaptores magnéticos y en la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich sobre la superficie de las MB se optimizaron para la determinación individual de IgG bovinas, ovinas y caprinas. Se adoptó como criterio de selección la mayor relación, en valor numérico, entre la respuesta amperométrica obtenida en presencia de 250 ng/ml de la IgG diana estándar (S) y en su ausencia (N). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4 (influencia de la. preparación de los inmunocaptores magnéticos) y en la Figura 5 (influencia de la formación de los inmunocomplejos tipo sándwich). Las variables e intervalos analizados, así como los valores seleccionados están resumidos en la Tabla 2**.**

<table>
<tr><th colspan="6">Preparación de los inmunocaptores (Figura 4)</th></tr>
<tr><th>IgG diana</th><th colspan="2">Concentración de CAb, µg/ml</th><th colspan="3">Tiempo de incubación de CAb, min</th></tr>
<tr><th>IgG bovina (D</th><th>Intervalo evaluado</th><th>Valor seleccionado</th><th colspan="2">Intervalo evaluado</th><th>Valor seleccionado</th></tr>
<tr><td rowspan="2">IgG ovina (2)</td><td rowspan="3">0-100</td><td>10</td><td colspan="2" rowspan="3">15-60</td><td rowspan="3">45</td></tr>
<tr><td>25</td></tr>
<tr><td>IgG caprina (3)</td><td>50</td></tr>
<tr><th colspan="6">Detección de IgG (Figura 5)</th></tr>
<tr><th rowspan="2">IgG diana</th><th colspan="2">Número de pasos</th><th colspan="2">Dilución HRP-DAb*</th><th colspan="2">Tiempo de incubación con el HRP-DAb, min</th></tr>
<tr><th>Intervalo evaluado</th><th>Valor seleccionado</th><th>Intervalo evaluado</th><th>Valor seleccionado</th><th>Intervalo evaluado</th><th>Valor seleccionado</th></tr>
<tr><td>IgG bovina (1)</td><td rowspan="3">1-2</td><td rowspan="3">1</td><td rowspan="3">1/5.000-1/250</td><td>1/1.000</td><td rowspan="3">15-90</td><td rowspan="3">30</td></tr>
<tr><td>IgG ovina (2)</td><td>1/500</td></tr>
<tr><td>IgG caprina (3)</td><td>1/1.000</td></tr>
</table>

Tabla 2. Variables experimentales optimizadas para la preparación de las plataformas electroquímicas inmunosensoras.

*Esta dilución se prepara a partir de disoluciones de los 3 HRP-DAb (Bov-HRP-DAb, Ovi-HRP-DAb y Cap-HRP-DAb) que están a una concentración de 3 mg/ml.

Ejemplo 6. Características analíticas y operativas.

En la Figura 2 se muestran los diagramas de calibración construidos para las IgG estándares de a) bovino, b) ovino y c) caprino. Las correspondientes características analíticas se recogen en la Tabla 3.

Los valores del límite de detección (LDD) se calcularon de acuerdo con el criterio de $3xs_b/m$, donde m es la pendiente del diagrama de calibración lineal, y S_b se estimó como la desviación estándar para 10 respuestas amperométricas medidas en ausencia de la IgG diana.

Los valores de la desviación típica relativa (RSD) se calcularon a partir de las respuestas amperométricas obtenidas con 8 plataformas electroquímicas inmunosensoras diferentes, preparadas siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 2.1., para 100 ng/ml de la IgG diana.

La duración de la estabilidad de los inmunocaptores magnéticos durante el almacenamiento se evaluó almacenándolos a 4°C en 50 µl de PBS filtrado y midiendo cada día la respuesta amperométrica obtenida con las plataformas electroquímicas inmunosensoras preparadas a partir de los inmunocaptores magnéticos almacenados, en ausencia (N) y en presencia (S) de 100 ng/ml de cada IgG diana. En la Figura 6, se comprueba que no hubo una disminución significativa de la relación S/N durante, al menos, los 67 días (d) que duró el ensayo.

	IgG bovina	IgG ovina	IgG caprina
R^2	0,9997	0,9968	0,9991
Pendiente, nA ml/ng	6,1 ±0,1	7,2 ±0,5	3,5 ±0,1
Ordenada en el origen, nA	181 ± 13	196 ±48	68 ± 12
L.R., ng/ml	2,6-250	2,7-250	2,2-250
LDD, ng/ml	0,74	0,82	0,66
$RSD_{(n=8,\ 100\ ng/ml)}$, %	4,5	4,6	3,2
Días de estabilidad	67	67	67

Tabla 3. Características analíticas y operativas de la determinación amperométrica de las IgG estándares bovinas, ovinas y caprinas mediante las plataformas electroquímicas inmunosensoras desarrolladas.

Ejemplo 7. Selectividad de las plataformas electroquímicas inmunosensoras.

Ejemplo 7.1. Se analizó la selectividad de las plataformas electroquímicas inmunosensoras en soluciones tamponadas suplementadas con las correspondientes IgG estándares. En los paneles 1-3a de la Figura 7 se muestran las respuestas amperométricas obtenidas con cada

plataforma electroquímica inmunosensora, que fueron significativamente diferentes de la respuesta de base (obtenida en ausencia de IgG) solo en presencia de la IgG diana. Además, la relación S/N fue similar para la IgG diana en ausencia y en presencia de IgG distintas a las IgG diana, lo que confirmó la ausencia de reactividad cruzada entre diferentes IgG y la excelente selectividad de los anticuerpos utilizados solo para la IgG diana.

Ejemplo 7.2. Se analizó la selectividad de las plataformas electroquímicas inmunosensoras en muestras de leche con diferentes contenidos de IgG endógenas. En los paneles 1-3b de la Figura 7 se muestra la excelente selectividad también en muestras de leche. Existe una clara discriminación entre la leche de especies que son extremadamente similares, como la vaca y la búfala o la oveja y la cabra (paneles 1b y 2b de la Figura 7). En el caso de la leche de búfala y la de vaca, se sabe que la discriminación entre ambas es muy difícil debido a la alta homología existente entre las proteínas de la leche de estas dos especies.

Ejemplo 8. Aplicaciones en el análisis de muestras de leche.

Las plataformas electroquímicas inmunosensoras se utilizaron para la determinación de las IgG diana en leches procedentes de distintas especies animales: bovino, ovino y caprino, y con diferentes tratamientos: cruda, pasteurizada y UHT. Para evitar los efectos de matriz, las muestras de leche se diluyeron 100 veces o más. De hecho, los valores de las pendientes de las curvas de calibración para las leches de vaca, oveja y cabra diluidas 100 veces fueron de 5,8 ± 0,7; 7,8 ± 0,7 y 3,7 ± 0,3 nA ml/ng, que no difieren significativamente de los obtenidos en las gráficas de calibración preparadas con las IgG estándares bovinas, ovinas y caprinas (6,1 ± 0,1; 7,2 ± 0,5 y 3,5 ± 0,1 nA ml/ng). Por lo tanto, la cuantificación se realizó mediante la interpolación simple de las respuestas amperométricas medidas con las plataformas electroquímicas inmunosensoras en los diagramas de calibración elaborados con las soluciones de las IgG estándares (Figura 2).

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas así como las diluciones utilizadas en el protocolo de trabajo están resumidas en la Tabla 4. Las concentraciones calculadas, en general, son acordes con el tratamiento aplicado a las muestras de leche. La leche pasteurizada puede retener un 25-75% de concentración de IgG comparado con la leche cruda, mientras que no se detecta actividad IgG después de un tratamiento UHT *(ultra-high temperature)* debido a la desnaturalización del epítopo diana del anticuerpo utilizado. Por otro lado, en las muestras de calostro se encontraron concentraciones de IgG más elevadas.

Animal	Tipo de leche (Dilución)	IgG bovina	IgG ovina	IgG caprina
Vaca	Cruda (1/5.000)	(0,52 ± 0,05)	ND	ND
	Pasteurizada (1/5.000)	(0,050 ±0,001)	ND	ND
	UHT (1/100)	ND	ND	ND
Oveja	Calostro (1/100.000)	ND	(6,2 ± 0,3)	ND

	Cruda (1/5.000)	ND	(0,64 ± 0,07)	ND
	Pasteurizada (1/5.000)	ND	(0,53 ± 0,03) (17,5% actividad IgG perdida comparado con la leche cruda)	ND
	UHT (1/100)	ND	ND	ND
Cabra	Calostro (1/100.000)	ND	ND	(26 ± 4)
	Cruda	ND	ND	(1,1 ±0,2)
	(1/5.000)			
	Pasteurizada (1/5.000)	ND	ND	(0,86 ± 0,04) (24,5% actividad IgG perdida comparado con la leche cruda)
	UHT (1/100)	ND	ND	ND

Tabla 4. Determinación de IgG (en mg/ml) en diferentes muestras de leche con las plataformas electroquímicas inmunosensoras
ND: no detectable

Ejemplo 9. Aplicaciones en la detección de adulteraciones de leche.

Para detectar adulteraciones en la leche se utilizaron las plataformas electroquímicas inmunosensoras y muestras de leche con las adulteraciones más comunes, es decir: leche de oveja, cabra o búfala adulterada con leche de vaca (Figura 8a); leche de cabra adulterada con leche de oveja (Figura 8b); y leche de oveja adulterada con leche de cabra (Figura 8c). Para realizar estos estudios las muestras de leche cruda se adulteraron con 0,1 y 0,5% de la correspondiente leche; las muestras de diluyeron 100 veces y se midieron las respuestas amperométricas de las plataformas electroquímicas inmunosensoras desarrolladas para detectar IgG de vaca (leche adulterada con leche de vaca), IgG de oveja (leche adulterada con leche de oveja) e IgG de cabra (leche adulterada con leche de cabra). Los resultados de la Figura 8 muestran la capacidad de las plataformas electroquímicas inmunosensoras para detectar inequívocamente los tipos más comunes de adulteración con leche de otras especies animales, al menos, en cantidades del 0,1%.

Ejemplo 10. Detección de calostro en muestras de leche.

Debido a los problemas causados en la industria láctea por la adulteración con calostro, se desarrollaron plataformas electroquímicas inmunosensoras específicas para su detección.

Ejemplo 10.1.

Para detectar calostro en muestras de leche, se prepararon CAb-MB con anticuerpos frente a las IgG de las 3 especies animales (bovina, ovina y caprina) según se describe en el ejemplo 1. A continuación, siguiendo el estado de la técnica para detecciones múltiples: Conzuelo *et al. Analytica Chimica Acta* 820 (2014) 32-38; Ruiz-Valdepeñas Montiel *et al. Chemosensors* 2016, 4, 11; doi:10.3390/chemosensors 4030011) se incubó una mezcla de los 3 tipos de CAb-MB (1 µL de Bov-CAb, 1 µL de Ovi-CAb y 1 µL de Cap-CAb) con 25 µl de una mezcla de las 3 IgG estándares (que contenía IgG bovinas, ovinas y caprinas) suplementada con los 3 HRP-DAb (Bov-HRP-DAb, Ovi- HRP-DAb y Cap-HRP-DAb). A continuación, se realizó la deposición conjunta de todas las MB definitivas sobre un electrodo impreso para realizar la detección amperométrica.

Los resultados de este ejemplo están representados en la Figura 9 como protocolo 1. En la Figura 9a, columna 1, se muestra un esquema del procedimiento utilizado en este ejemplo 10.1. y en la Figura 9b se comprueba que, pese a lo esperado, el Protocolo 1 no funcionó.

Ejemplo 10.2.

Dado que el ensayo del ejemplo 10.1. no funcionó para la detección de calostro en muestras de leche, se evaluaron otros 3 protocolos:

a) Protocolo 2 en Figura 9: Se preparó una mezcla de los 3 tipos de CAb-MB (1 µl de Bov-CAb, 1 µl de Ovi-CAb y 1 µl de Cap-CAb), se incubó consecutivamente con cada una de las IgG estándares (25 µl) y suplementada cada una de ellas con los 3 HRP-DAb (Bov-HRP-DAb, Ovi-HRP-DAb y Cap-HRP-DAb).

b) Protocolo 3 en Figura 9: Se prepararon los 3 inmunocaptores magnéticos para cada una de las especies como se describe en el ejemplo 1; cada uno de ellos se incubó con su IgG estándar específica (25 µl) y suplementada cada una de ellas con los 3 HRP- DAb (Bov-HRP-DAb, Ovi-HRP-DAb y Cap-HRP-DAb).

c) Protocolo 4 en Figura 9: Se realizó el ensayo de forma individual, es decir, se prepararon de forma independiente las MB definitivas para cada una de las 3 especies animales (vaca, oveja y cabra), como las preparadas en el ejemplo 2.1.

A continuación, en todos los casos, se realizó la deposición conjunta de todas las MB definitivas sobre un electrodo impreso para realizar la detección amperométrica.

En la Figura 9a) se muestran los diagramas esquemáticos de los cuatro protocolos descritos (1, 2, 3 y 4) en los que los anticuerpos de las 3 especies animales se denominan, genéricamente X, Y y Z. Los resultados que se muestran en la Figura 9b), empleando el protocolo 3, indican que existe reactividad cruzada entre los anticuerpos de oveja y cabra (representadas por Y y Z). Sin embargo, con el protocolo 4 se obtuvieron buenos resultados.

Mediante la aplicación del protocolo 4 se consigue discriminar con claridad entre muestras de leche sin adulterar y muestras de leche adulteradas con calostro de vaca (entre 5 y 100%). También se puede detectar un 5% de calostro de oveja con una menor concentración de IgG en muestras de leche cruda de oveja (barras moradas a la derecha de la Figura 10b).

En la Figura 10a) se muestra un esquema del protocolo 4 para la determinación de IgG totales en un SPCE. La Figura 10b) muestra las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de 1 mg/ml de IgG bovinas, ovinas y caprinas y para la mezcla de las 3 IgG (concentración total, antes de la dilución, de 1 mg/ml), en muestras de leche cruda y en leche cruda de oveja a la que se añadieron diferentes porcentajes de calostro ovino. Todas las IgG estándares y las muestras de leche se diluyeron 10.000 veces.

Ejemplo 11. Plataforma electroquímica inmunosensora multiplexada para la detección de IgG bovinas, ovinas, caprinas y totales.

Se diseñó una plataforma multiplexada para identificar, en un único paso, el origen animal de muestras de leche así como su posible adulteración con leche de otros animales o con calostro. Para ello se realizó la detección multiplexada de IgG bovinas, ovinas, caprinas y totales en un SPC4E. En cada uno de los 4 electrodos de trabajo de un SPC4E se capturaron MB definitivas para la detección de IgG bovinas, ovinas, caprinas y totales como se muestra en la Figura 11. En los electrodos 1-3 se capturaron las MB definitivas procedentes de 3 µl de HOOC-MB utilizadas en la elaboración de los inmunocaptores magnéticos como se describe en el ejemplo 1. En el electrodo 4 se capturó 1 µl de cada uno de los inmunocaptores magnéticos preparados según el ejemplo 1 (Bov-CAb, Ovi-CAb y Cap-CAb).

En la Figura 11, también se muestran resultados amperométricos reales obtenidos con la plataforma electroquímica inmunosensora multiplexada para el análisis de una muestra de leche cruda, que en este ejemplo fue de ovino, diluida 100 veces (W1-W3) o 10.000 veces (W4) tanto sin adulterar (Figura 11a) como adulterada con un 1% de leche cruda de vaca (Figura 11b), un 1% de leche cruda de cabra (Figura 11c) o un 20% de calostro ovino (Figura 11d).

REIVINDICACIONES

1. Método de detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche y productos lácteos que incluye los siguientes pasos:
a- elaborar inmunocaptores magnéticos mediante la unión de anticuerpos captores anti-inmunoglobulina G (IgG) de bovino (Bov-CAb) a partículas magnéticas, anticuerpos captores anti-IgG de ovino (Ovi-CAb) a otras partículas magnéticas y anticuerpos captores anti-IgG de caprino (Cap-CAb) a otras partículas magnéticas;
b- elaborar partículas magnéticas definitivas incubando los inmunocaptores magnéticos del paso a- con la muestra de leche a analizar y con anticuerpos detectores anti IgG de bovino (Bov-DAb), anticuerpos detectores anti IgG de ovino (Ovi-DAb) y anticuerpos detectores anti IgG de caprino (Cap-DAb) todos ellos conjugados con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
c- capturar las partículas magnéticas definitivas del paso b- sobre un electrodo impreso de trabajo y colocar dicho electrodo sobre un soporte magnético;
donde, en el paso b-, los inmunocaptores magnéticos con Bov-CAb se incuban individualmente con la muestra y con Bov-DAb, los inmunocaptores magnéticos con Ovi- CAb se incuban individualmente con la muestra y con Ovi-DAb y los inmunocaptores magnéticos con Cap-CAb se incuban individualmente con la muestra y con Cap-DAb.

2. Método según la reivindicación 1 en el que la muestra de leche del paso b- se diluye entre 100 veces y 10.000.000 veces antes de la incubación.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las partículas magnéticas son nanopartículas o micropartículas.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las partículas magnéticas tienen propiedades superparamagnéticas.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica es HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el electrodo de trabajo está realizado con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, plata, mercurio, grafito, carbón vitreo, nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro.

7. Método según la reivindicación 6 en el que el electrodo es un electrodo de trabajo impreso de carbono.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el soporte magnético incluye un imán de neodimio.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el soporte magnético incluye un imán embebido en la propia estructura del soporte magnético.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye el siguiente paso:
d- capturar partículas magnéticas definitivas de bovino individualmente en un electrodo impreso de trabajo; capturar partículas magnéticas definitivas de ovino individualmente en un electrodo

impreso de trabajo; y/o capturar partículas magnéticas definitivas de caprino individualmente en un electrodo impreso de trabajo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las partículas magnéticas definitivas tienen una concentración sobre el electrodo impreso de trabajo comprendida entre 4 y 5 µg/mm^2

12. Plataforma electroquímica inmunosensora para la detección y/o cuantificación de adulteraciones en leche que incluye:
- inmunocaptores magnéticos de bovino, ovino y caprino formados por la unión de anticuerpos captores anti-inmunoglobulina G (IgG) de bovino (Bov-CAb) a partículas magnéticas, anticuerpos captores anti-lgG de ovino (Ovi-CAb) a partículas magnéticas y anticuerpos captores anti-lgG de caprino (Cap-CAb) a partículas magnéticas;
- anticuerpos detectores anti-lgG de bovino (Bov-DAb), anticuerpos detectores anti-lgG de ovino (Ovi-DAb) y anticuerpos detectores anti-lgG de caprino (Cap-DAb) todos ellos conjugados con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar los tres tipos de partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de bovino, ovino y caprino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-lgG correspondiente.

13. Plataforma electroquímica inmunosensora según la reivindicación 12 en la que las partículas magnéticas son nanopartículas o micropartículas.

14. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-13 en la que las partículas magnéticas tienen propiedades superparamagnéticas.

15. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-14 en la que la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica es HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina.

16. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-15 en la que el electrodo de trabajo está realizado con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, plata, mercurio, grafito, carbón vitreo, nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro.

17. Plataforma electroquímica inmunosensora según la reivindicación 16 en la que el electrodo es un electrodo de trabajo impreso de carbono.

18. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 en la que el soporte magnético incluye un imán de neodimio.

19. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-18 en la que el soporte magnético incluye un imán embebido en la propia estructura del soporte magnético.

20. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-19 que incluye:
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar las partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de bovino

con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG de bovino conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica.;
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar las partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de ovino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG de ovino conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica.; y/o
- un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético para capturar las partículas magnéticas definitivas que se obtienen al incubar los inmunocaptores magnéticos de caprino con la muestra de leche a analizar y con el anticuerpo detector anti-IgG de caprino conjugado con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica.

21. Plataforma electroquímica inmunosensora según cualquiera de las reivindicaciones 12-20 en la que los elementos de la reacción inmunológica están en cantidad suficiente para que la concentración de partículas magnéticas definitivas sobre el electrodo impreso de trabajo esté comprendida entre 4 y 5 $\mu g/mm^2$.

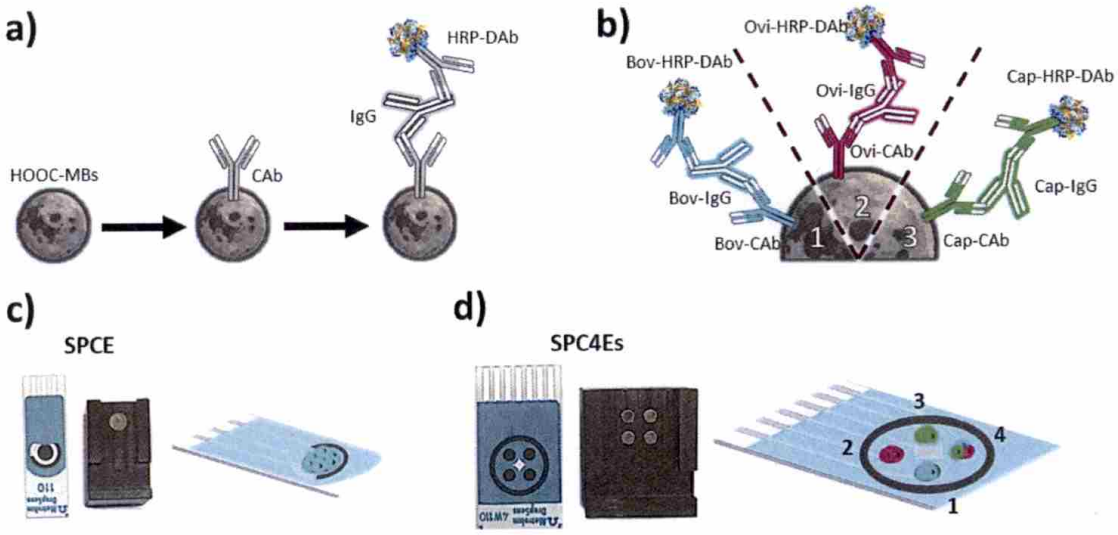
a)
HRP-DAb
IgG
HOOC-MBs
CAb
b)
Ovi-HRP-DAb
Bov-HRP-DAb
Cap-HRP-DAb
Ovi-IgG
Ovi-CAb
Bov-IgG
Cap-IgG
Bov-CAb
Cap-CAb
1
2
3
c)
SPCE
d)
SPC4Es
1
2
3
4

Fig. 1

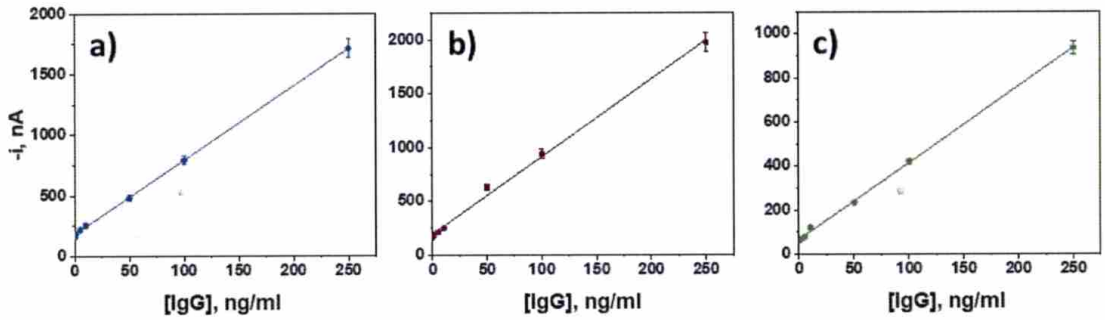
a)
b)
c)
-i, nA
[IgG], ng/ml
[IgG], ng/ml
[IgG], ng/ml

Fig. 2

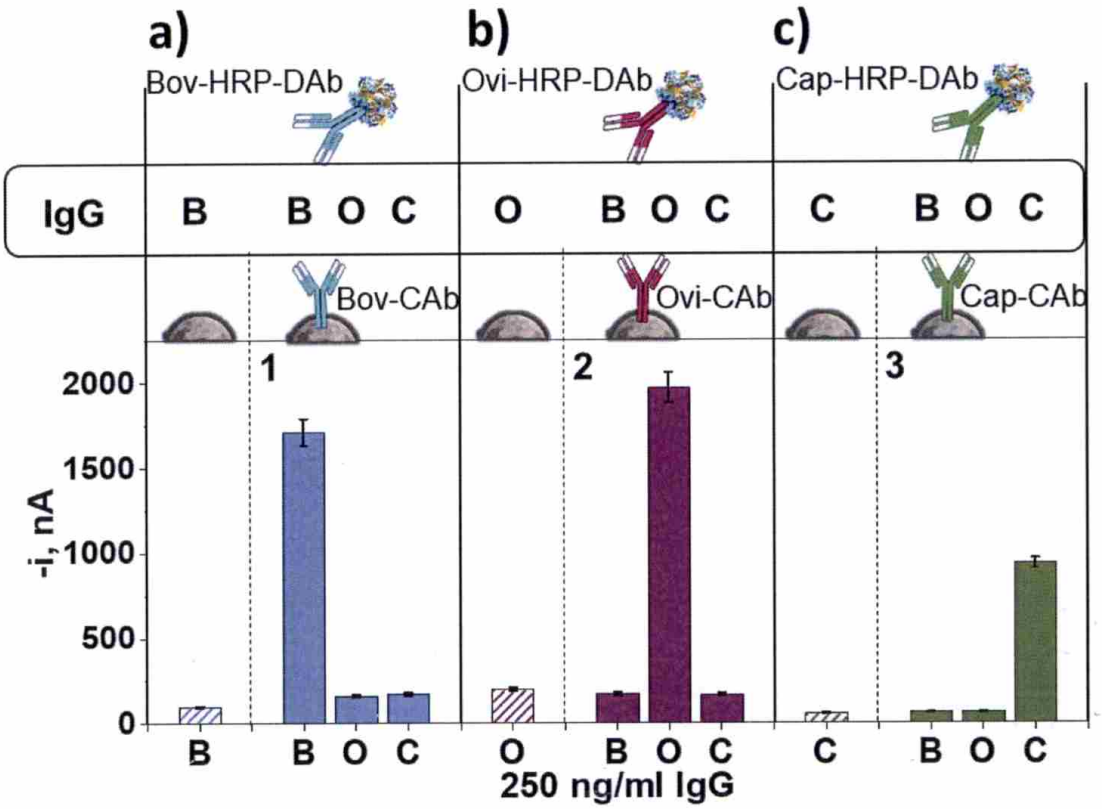
a)
Bov-HRP-DAb
b)
Ovi-HRP-DAb
c)
Cap-HRP-DAb
IgG
B
B O C
O
B O C
C
B O C
Bov-CAb
Ovi-CAb
Cap-CAb
1
2
3
2000
1500
1000
500
0
-i, nA
B
B O C
O
B O C
C
B O C
250 ng/ml IgG

Fig. 3

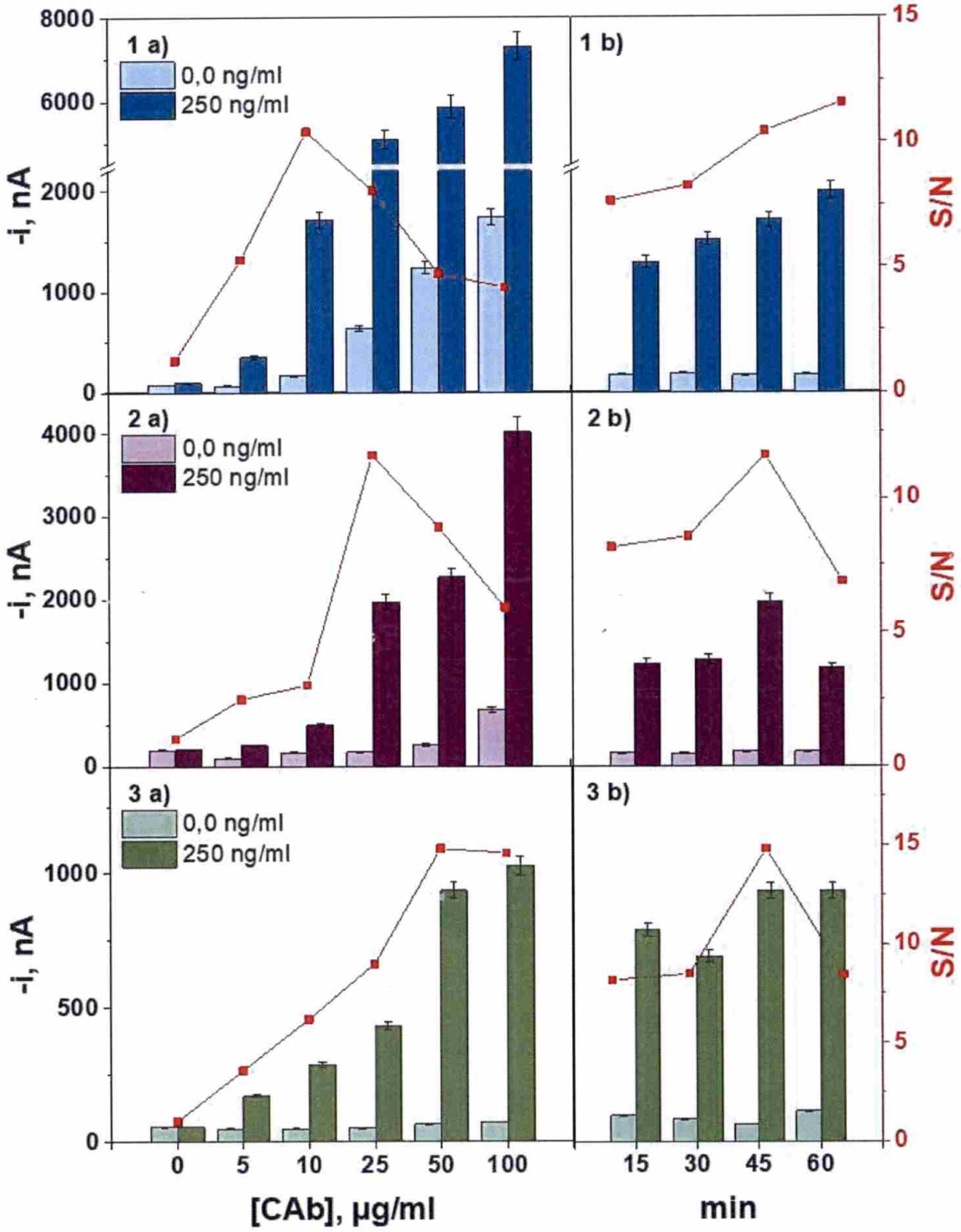
1 a)
0,0 ng/ml
250 ng/ml
1 b)
2 a)
0,0 ng/ml
250 ng/ml
2 b)
3 a)
0,0 ng/ml
250 ng/ml
3 b)
-i, nA
S/N
[CAb], µg/ml
min

Fig. 4

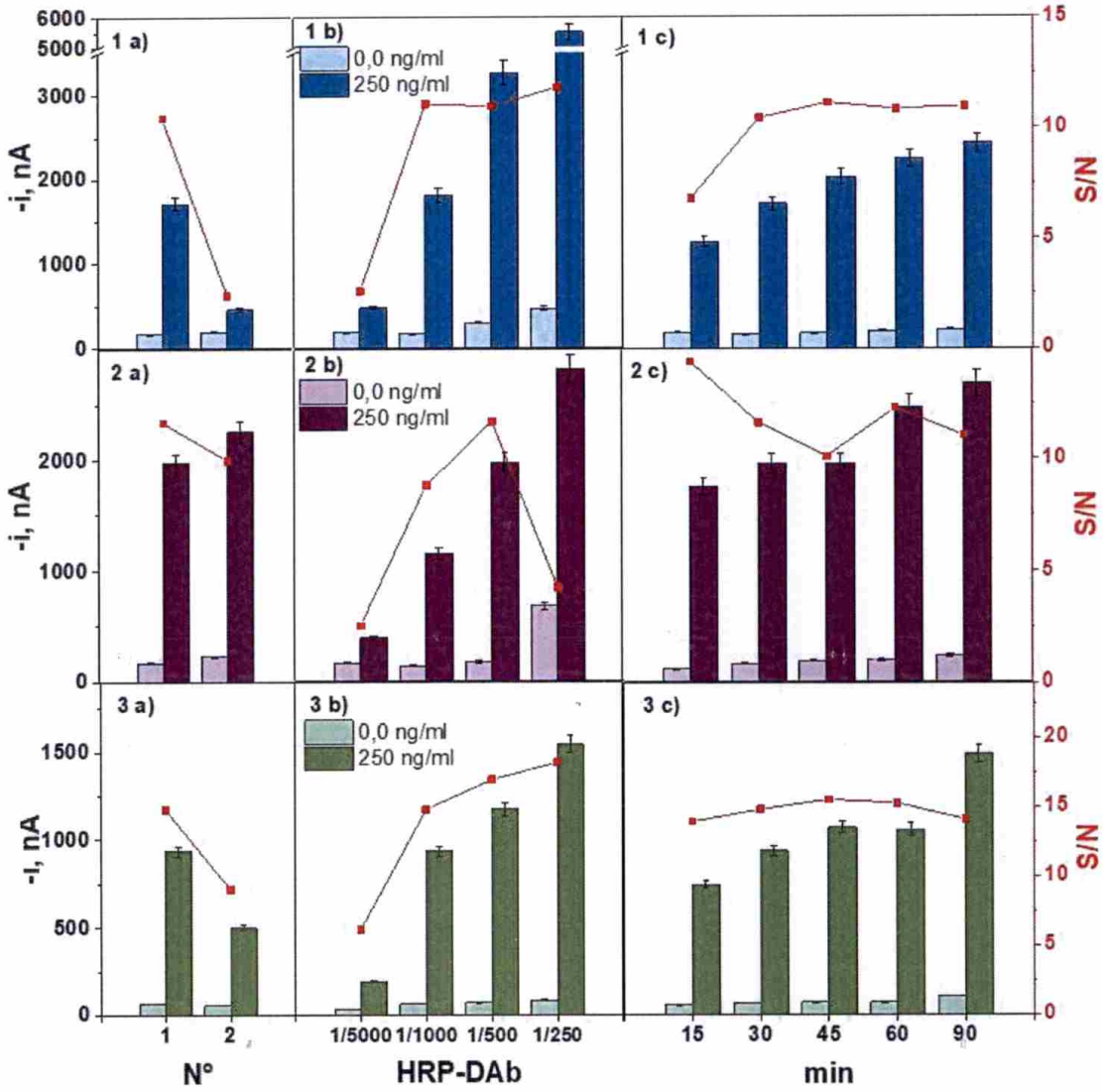
1 a)
1 b)
1 c)
2 a)
2 b)
2 c)
3 a)
3 b)
3 c)
0,0 ng/ml
250 ng/ml
-i, nA
-I, nA
S/N
N°
HRP-DAb
min
1
2
1/5000
1/1000
1/500
1/250
15
30
45
60
90

Fig. 5

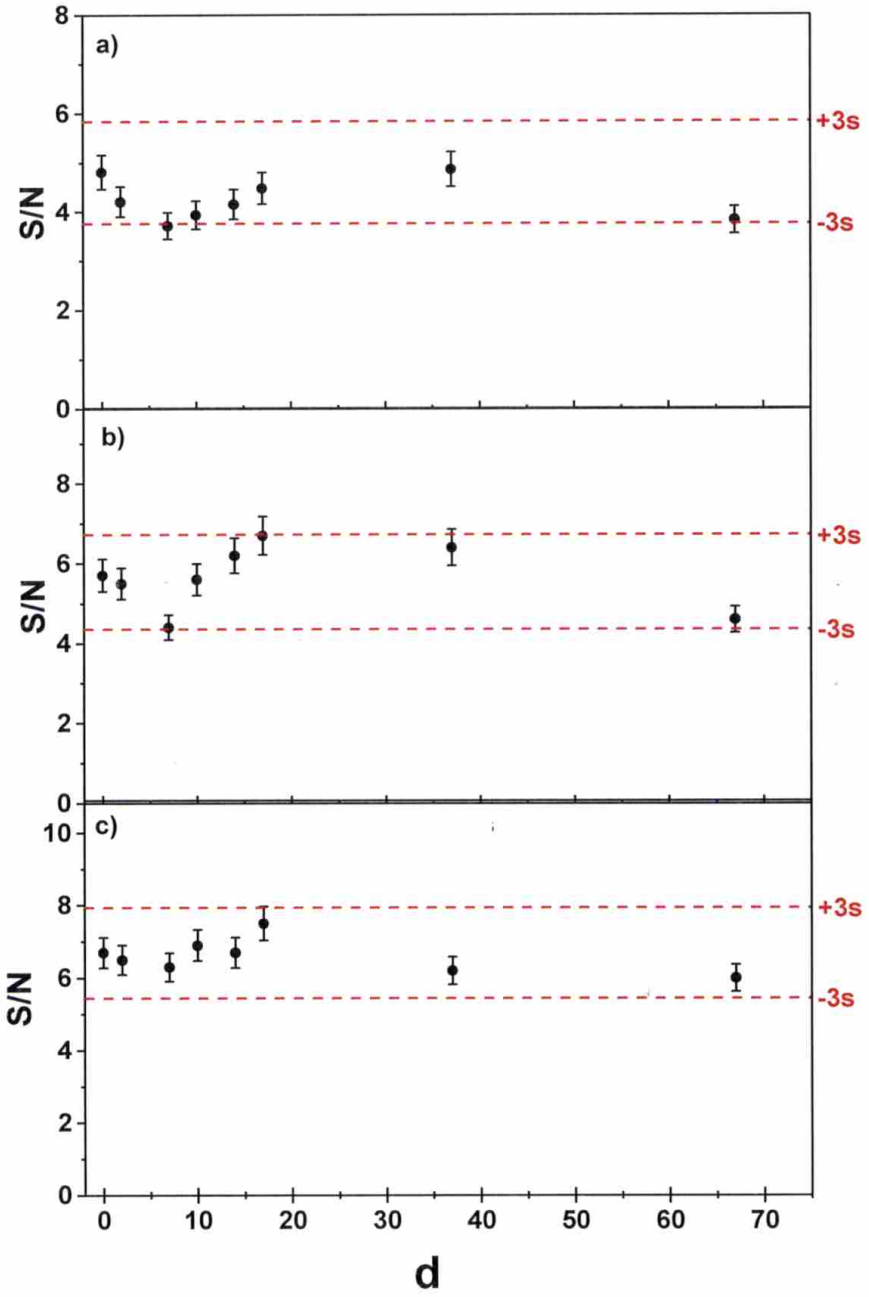

Fig. 6

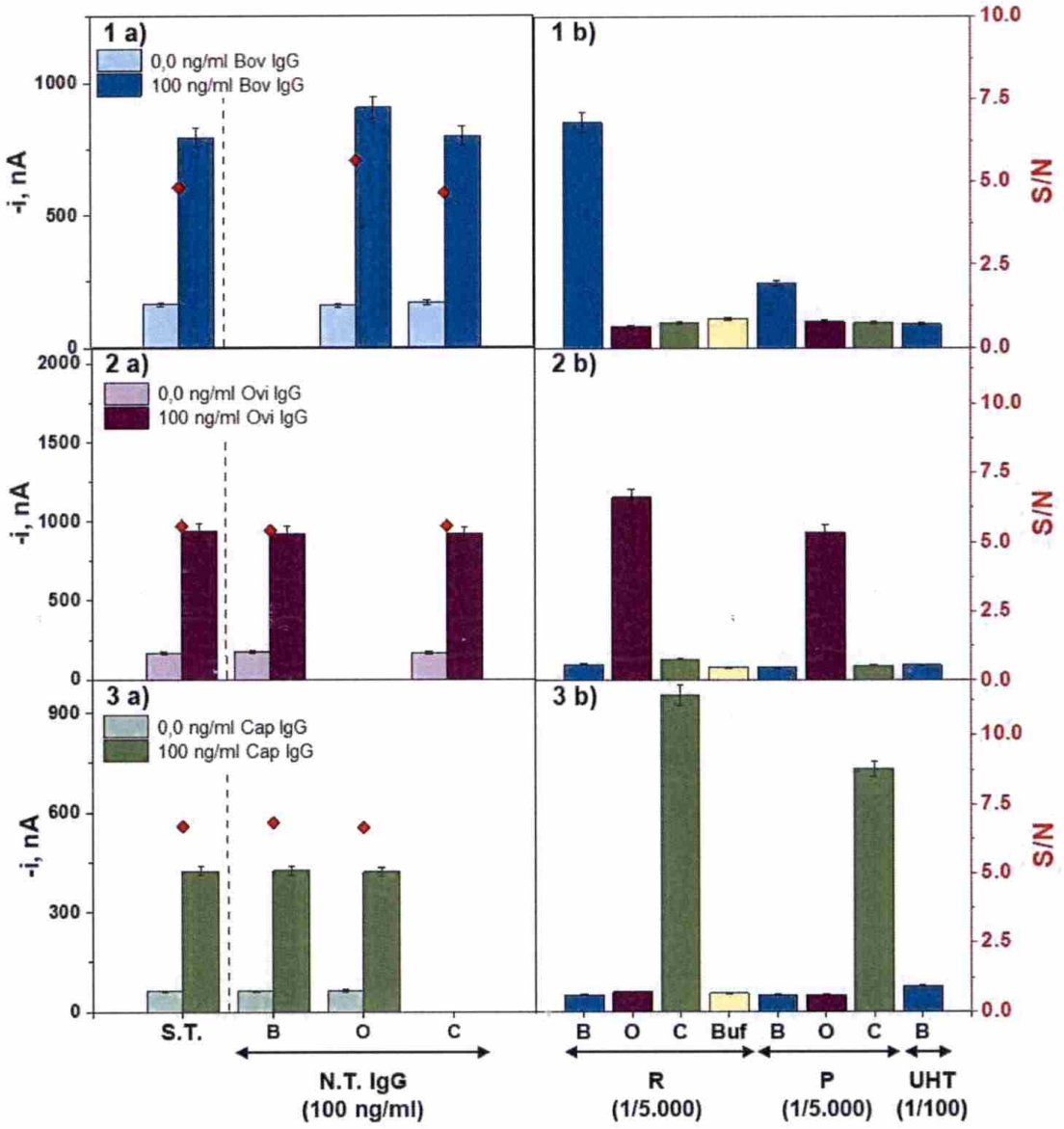
1 a)
0,0 ng/ml Bov IgG
100 ng/ml Bov IgG
1 b)
2 a)
0,0 ng/ml Ovi IgG
100 ng/ml Ovi IgG
2 b)
3 a)
0,0 ng/ml Cap IgG
100 ng/ml Cap IgG
3 b)
-i, nA
S/N
S.T.
B
O
C
Buf
N.T. IgG
(100 ng/ml)
R
(1/5.000)
P
(1/5.000)
UHT
(1/100)

Fig. 7

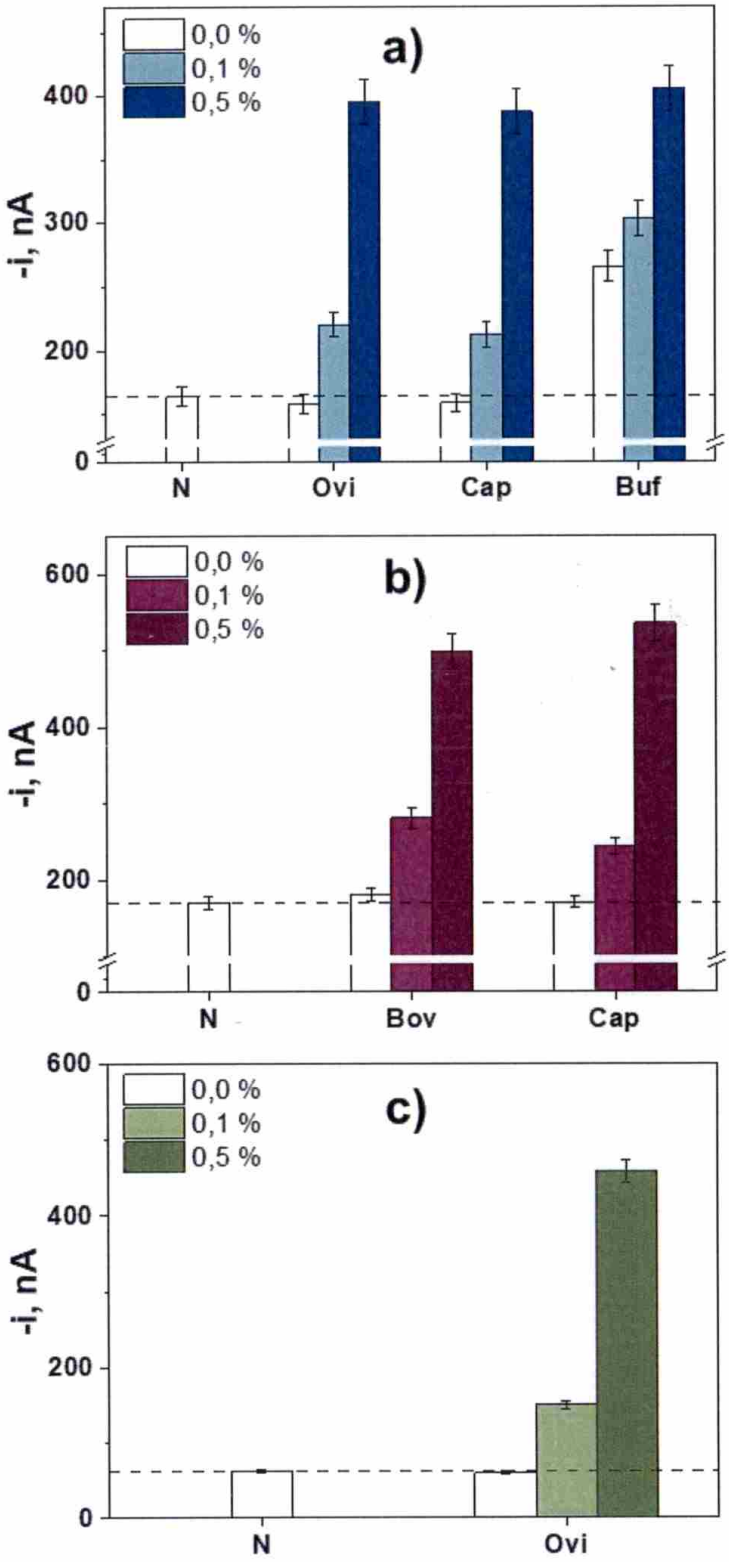
a)
0,0 %
0,1 %
0,5 %
-i, nA
0
200
300
400
N
Ovi
Cap
Buf
b)
0,0 %
0,1 %
0,5 %
-i, nA
0
200
400
600
N
Bov
Cap
c)
0,0 %
0,1 %
0,5 %
-i, nA
0
200
400
600
N
Ovi

Fig. 8

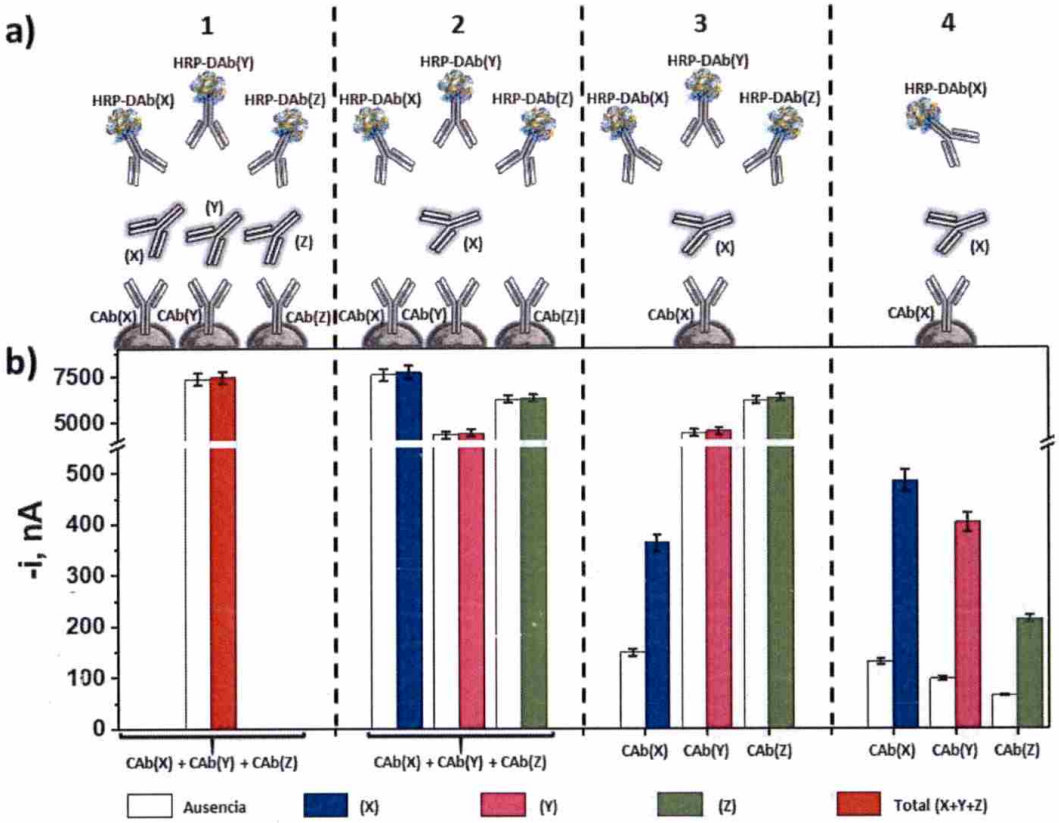
a)
1
2
3
4
HRP-DAb(Y)
HRP-DAb(X)
HRP-DAb(Z)
(Y)
(X)
(Z)
CAb(X)
CAb(Y)
CAb(Z)
b)
-i, nA
7500
5000
500
400
300
200
100
0
CAb(X) + CAb(Y) + CAb(Z)
Ausencia
(X)
(Y)
(Z)
Total (X+Y+Z)

Fig. 9

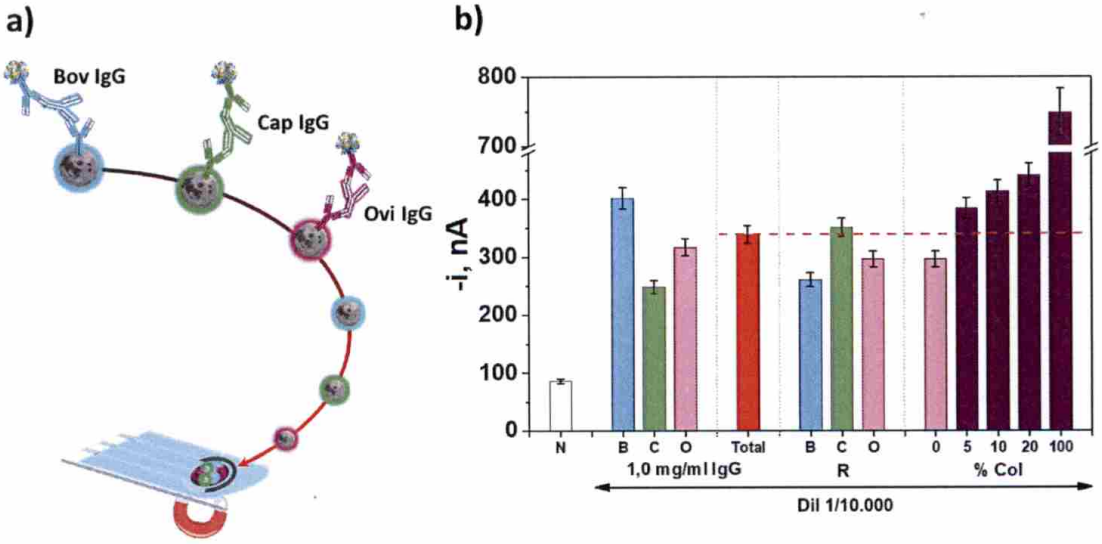
a)
Bov IgG
Cap IgG
Ovi IgG
b)
-i, nA
800
700
400
300
200
100
0
N
B
C
O
Total
0
5
10
20
100
1,0 mg/ml IgG
R
% Col
Dil 1/10.000

Fig. 10

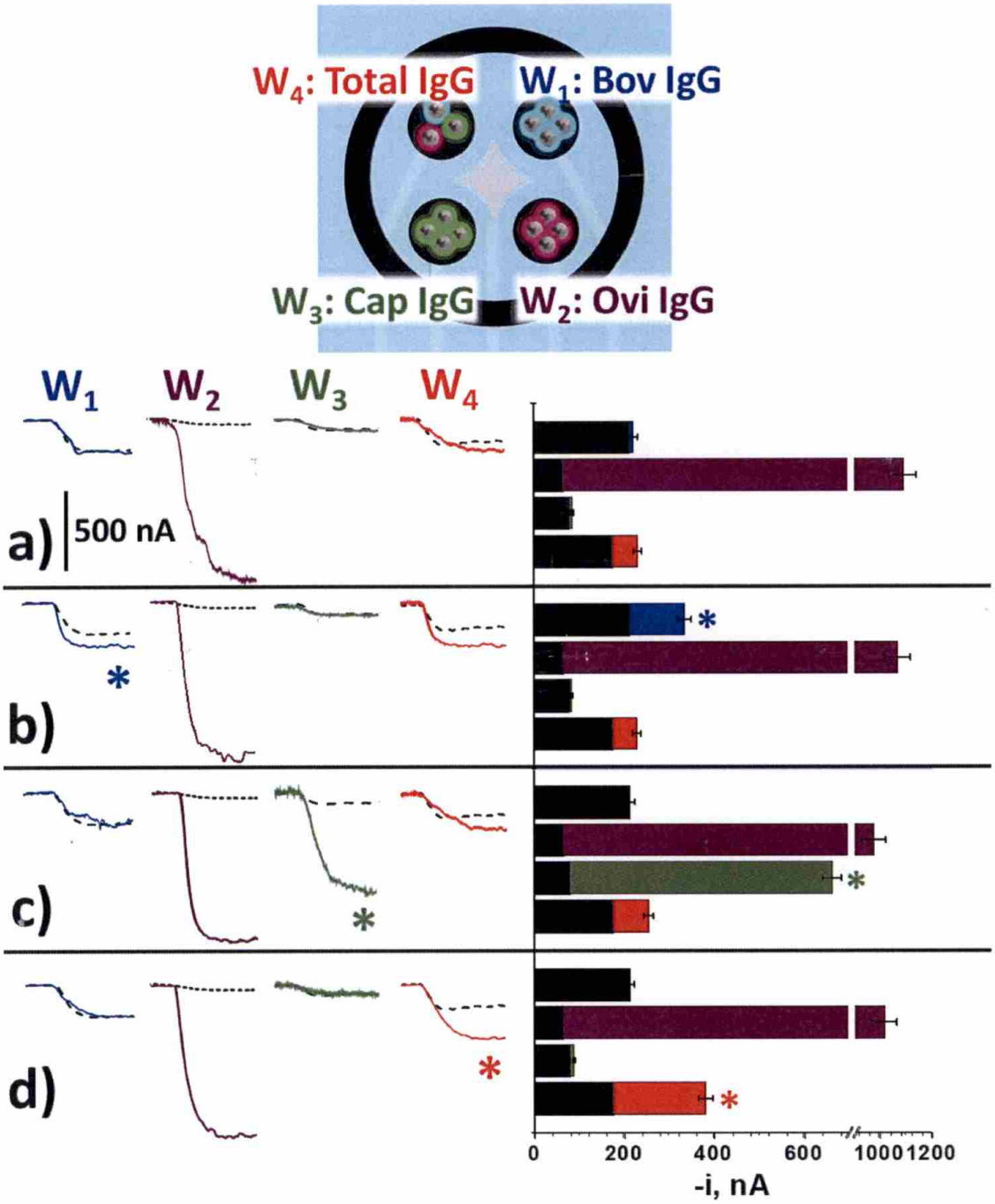
W4: Total IgG
W1: Bov IgG
W3: Cap IgG
W2: Ovi IgG
W1
W2
W3
W4
a)
500 nA
b)
c)
d)
0
200
400
600
1000
1200
-i, nA

Fig. 11

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201900082

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2019

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/04*** (2006.01)
G01N33/551 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PANIEL NATHALIE et al. "Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in milk". Sensors (2010), Vol. 10, páginas 9439 - 9448, ISSN 1424-8220 (Electronic), <DOI: doi: 10.3390/s101009439 pubmed: 22163418>, todo el documento, en particular fig.1.	1-21
X	WO 2014060454 A1 (MODE DIAGNOSTICS LTD) 24/04/2014, Todo el documento, en particular ejemplo 1 y fig. 1.	1-21
X	WO 2014147049 A1 (DROPSENS S. L.) 25/09/2014, Todo el documento, en particular ejemplo 1 y fig. 2	1-21
X	WO 2016146544 A1 (FUNDACION HOSPITAL UNIV VALL D` HEBRON et al.) 22/09/2016, Todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
30.03.2020	M. Hernández Cuéllar	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC WPI