

Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Általános és Fizikai Kémia Tanszék



Dezoxinivalenol (DON) mikotoxin kvantitatív analízisére alkalmas módszerek összehasonlító vizsgálata

TDK dolgozat

Szerző: Szomor Nikolett

2. évfolyam, Biotechnológia Msc

Témavezető: Dr. Czéh Árpád^{1, 2}

¹Soft Flow Kft., ²PTE-TTK Alkalmazott Molekuláris Tudományok Külső Tanszék

Lezárva: 2023. január 11.

Tartalmi összefoglaló

Rendkívül fontos, hogy a DON mikotoxin mennyiségének kvantitatív meghatározására kellően (1) pontos, (2) egyszerű, (3) gyors és (4) költséghatékony mikotoxin analitikai eljárás álljon rendelkezésére.

Célunk az elérhető módszerekkel, toxinmentes és feltételezhetően DON toxinnal szennyezett minták mérése során kapott adatok összehasonlító elemzése volt. Munkánk során három DON toxin mérésére alkalmas módszert, két immunkémiai (Toxi-Watch ELISA és MycoFoss™) és egy elválasztástechnikai (HPLC) módszert választottunk és hasonlítottunk össze, ugyanazon 35 kukoricaminta párhuzamos vizsgálata során.

Eredményeink alapján levonható következtetések:

- A MycoFoss, ELISA és a HPLC módszerekkel a kukorica minták értékeinek összehasonlításakor erős, pozitív korreláció volt megfigyelhető. Mindhárom módszer alkalmas DON toxin kukoricában történő meghatározására.
- A vizsgált minták ~30%-a tartalmazott határérték feletti mennyiségű DON toxint – pozitív minták).
- 11 db pozitív mintából 7db a határérték ötszörösét is meghaladta. Ezen minták eredményeiben nagyobb (de elfogadható mértékű) eltérés tapasztaltunk, melynek feltételezhető oka, hogy ezek az erősen szennyezett minták a kalibrációs görbe ellaposodó részére esnek, ahol – görbe jellegéből adódóan – nagyobb mérési bizonytalansággal kell számolnunk.
- A mérések során megfigyelhető tendencia, miszerint az immuntechnikák 'hajlamosak' false pozitív eredményeket adni, magyarázható azzal, hogy az alkalmazott monoklonális antitestek bizonyos esetekben nem csak a toxinokat, hanem annak származékait (33-Acetyl-Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol stb.) is detektálni tudja.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	5
1.1 Mikotoxinok	5
1.1.1. A mikotoxinokról általában	5
1.1.2. A mikotoxinok rendszerezése	5
1.1.3. Mikotoxinok megjelenése az élelmiszerláncban	5
1.2. Toxintermelő gombák	6
1.2.1 A Fusarium fajok általános jellemzése	6
1.2.2 A Fusarium fajok által termelt mikotoxinok	7
1.2.2.1 DON általános jellemzése	7
1.2.2.2 Mikotoxikózisok és a DON toxin okozta egészségkárosodások lehetőségei	8
1.3 Mikotoxin analitikai eljárások	8
1.3.1 Elválasztástechnikai módszerek	9
1.3.1.1 Vékonyrétegkromatográfia (TLC)	9
1.3.1.2 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	9
1.3.1.3 Tömegspektrometriás detektálással kapcsolt elválasztástechnikai módszerek (GC/MS, HPLC/MS)	10
1.3.2 Immunkémiai módszerek	10
1.3.2.1 Az immunanalitikai alapjai	10
1.3.2.2 Enzimhez kötött immun-szorbens analízis (ELISA)	13
1.3.2.3 Mikrogyöngy alapú kompetitív fluoreszcens immunoassay (CFIA)	15
1.3.2.3.1 Áramlási citometria	15
1.3.2.3.2 Multiplex-mikrogyöngy rendszer (CFIA)	16
1.3.2.4 A Fusarium fajok által szintetizált mikotoxinok műszeres analitikai vizsgálatának módszerei	17
2. CÉLKITŰZÉS	17
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
3.1. Felhasznált vegyszerek	18
3.2. Vizsgált kukoricaminták	19
3.3. Alkalmazott módszerek	19

3.3.1	Mintaelőkészítés - Kukorica őrlmények extrakciója	19
3.3.2	MycoFoss mérés.....	20
3.3.3	ELISA mérések meghatározásának körülményei	21
3.3.4	HPLC mérés.....	21
3.4.	Adatok statisztikai elemzése	21
4.	AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE	22
4.1.	MycoFoss mérés eredményei – rendelkezésre álló minták minősítése	22
4.1.1	Kalibrációs görbe	22
4.1.2	Mérési eredmények	22
4.2.	ELISA mérés eredményei	25
4.2.1	Kalibrációs görbe	25
4.2.2	Mérési eredmények	26
4.3	HPLC mérés eredményei	28
4.3.1	Mérési eredmények	28
4.4	Alkalmazott módszerek összehasonlító elemzése	29
4.4.1	MycoFoss-ELISA összehasonlítás	29
4.4.2	MycoFoss-HPLC összehasonlítás	30
4.4.3	ELISA-HPLC összehasonlítás	31
5.	ÖSSZEFOGLALÁS, KITEKINTÉS	34
5.1	Módszerek alkalmazhatósága	35
6.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
7.	IRODALOMJEGYZÉK	38

1. BEVEZETÉS

A 21. század egyik legfőbb élelmiszerbiztonsági problémája a nem megfelelő minőségű élelmiszerkészlet és annak eloszlása. Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági világszervezet (FAO) szerint 2050-ig a világ élelmiszertermelésének olyan szintű gyorsulást kellene felvenni, hogy az a jelenlegi mennyiséget kétszeresére tudja növelni. Problémát jelent az, hogy a mennyiségi növekedés mellett az élelmiszerek mikotoxin mentessége megmaradjon. Az élelmiszertermelés ilyen mértékű növekedéséhez szükség van a gabonák toxinmentességének megőrzésére az élelmiszerlánc valamennyi szegmensében (betakarítás, tárolás feldolgozás).

1.1 Mikotoxinok

1.1.1. A mikotoxinokról általában

1960-ban érkezett az Egyesült Királyságba egy földimogyoró szállítmány, mely gombás fertőzést szenvedett a szállítás során. Emberi fogyasztásra alkalmatlan volt, így állati takarmányként hasznosították. Sajnálatosan, ez döntés 100.000 pulyka pusztulását okozta. A fertőzött földimogyoró tételek egy fonalas gombák által termelt mérgező anyagot, aflatoxint tartalmaztak. Az aflatoxinok kimutatásával nagyobb figyelem irányult az emberi és állati egészségre veszélyt jelentő ágensek, mikotoxinok kutatására, így jelenleg több mint 300 különböző mikotoxin került azonosításra, melyek kiemelt figyelmet kapnak világszerte.

A mikotoxinokat termelő mikroszkópikus fonalas gombák a világ minden táján előfordulnak és eltérő mennyiségben jelennek meg mezőgazdasági termékekben. Ezek a fonalas gombák gyakran fejlődnek emberi fogyasztásra alkalmas növényeken, ezáltal toxikológiai szempontból jelentős koncentrációban jelennek meg mikotoxinok az ételekben és a takarmányokban (Rahmani és mtsai., 2009).

1.1.2. A mikotoxinok rendszerezése

A mikotoxinokat nem csak definiálni nehéz, de rendszerezésük is kihívást jelent. Ennek forrása, hogy különböző kémiai szerkezettel és bioszintetikus eredettel rendelkeznek, biológiai hatásuk diverz és számos gombafaj szintetizálja őket. A rendszerezési stratégiák gyakran tükrözik a kategorizálást végző személy megközelítési irányát. A klinikusok általában az alapján osztályozzák, hogy milyen szervet érint. Így a mikotoxinokat hepatotoxin, nefrotoxin,

neurotoxin, immunotoxin csoportokba sorolhatjuk. A sejtbiológusok teratogének, mutagének, karcinogének, és allergénekként osztályozzák őket. A szerves kémikusok a kémiai szerkezetük alapján, a biokémikusok a bioszintetikus eredetük alapján, a mikológusok pedig az őket termelő gombák alapján csoportosítják a mikotoxinokat. Azonban, egyik csoportosítási stratégia sem teljesen kielégítő (Bennett, és mtsai., 2003).

1.1.3. Mikotoxinok megjelenése az élelmiszerláncban

A mikotoxin szennyezés megjelenhet a betakarítás előtt, a növény növekedése során, vagy a betakarítás után, tárolás során, feldolgozás, csomagolás alkalmával. A termékek és gabonafélék tárolása sok esetben helytelenül történik, ugyanis a hosszú ideig tartó magas hőmérséklet és a nem megfelelő páratartalom elősegíti a penészgombák megtelepedését és mikotoxin termelését. A kukorica rendkívül érzékeny a mikotoxin kontaminációval szemben, míg a rizs a legkevésbé érzékeny.

A legtöbb mikotoxin kémiai és fizikailag stabil marad az élelmiszerek feldolgozása során, beleértve a főzést, forralást, sütést és a pasztörizálást. A mikotoxinok az emberek étlapjára kerülhetnek, olyan állati eredetű termékek által, mint például a hús, tojás, és a tej; ezek forrása a nem megfelelő minőségű és szennyezett takarmányok. Számos hazai és nemzetközi közegészségügyi- és hatósági szervezet, mint például az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA), Egészségügyi világszervezet (WHO), Élelmezésügyi és Mezőgazdasági világszervezet (FAO), és az Európai élelmiszerbiztonsági hatóság (EFSA) komolyan odafigyel az ételek és takarmányok mikotoxin szennyezettségére, és ennek a globális problémának a megoldása érdekében szigorú szabályozásokat vezetnek be az ételek mikotoxin tartalmával kapcsolatban. Jelenleg, körülbelül 100 olyan ország van, mely határértékeket szabott ki az ételek és takarmányok mikotoxin tartalmára (Alshannaq, és mtsai., 2017).

1.2. Toxintermelő gombák

1.2.1 A *Fusarium* fajok általános jellemzése

A *Fusarium* fajok az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok mellett az egyik legjelentősebb csoportja a mikotoxintermelő penészeknek (1. ábra). Számos *Fusarium* faj növényi patogén és a legtöbbjük

megtalálható a talajban. Kukorica, búza, árpa, és a termékek, melyek ezekből készülnek általában fertőzöttek. Ugyanakkor a rozs, tritikálé, köles, és zab is lehet fertőzött.

A *Fusarium graminearum* egy növényi patogén, mely világszerte megtalálható a talajban, és az egyik leggyakrabban előforduló *Fusarium* faj. Számos gabona betegség okozója, mint például a kukorica Gibberella fertőzése, vagy az árpa és a búza tűzelhalása. A *Fusarium* fajok három jelentős osztályba tartozó mikotoxint termelnek, név szerint a trichotecéneket, fumonizineket, és a zearalenont. Ezek a toxinok erősen toxikusnak és rákkeltőnek bizonyultak a haszonállatokra és a laboratóriumi állatokra nézve, illetve számos szünetési rendellenesség és a humán nyelőcsőrák okozója (United States Department of Agriculture, 2006).

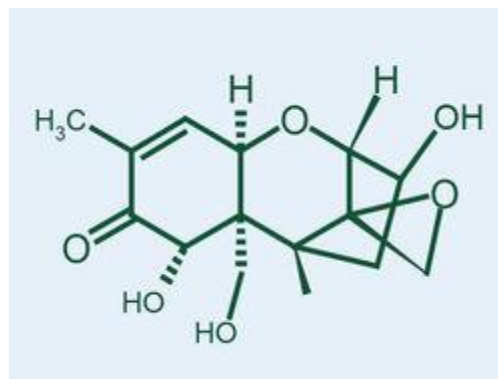


1. ábra Természetes sokközpontú *F. verticillioides* fertőzés (Mesterházy Ákos felvétele)

1.2.2 A Fusarium fajok által termelt mikotoxinok

1.2.2.1 DON általános jellemzése

A dezoxinivalenol egy epoxi terpenoid mikotoxin, mely a trichotecének, azon belül is a B típusú trichotecének közé tartozik. A *Fusarium* fajok termelik, melyek a búzán, kukoricán, árpán, rizsen, zabon és más gabonaféléken jelenik meg a szántóföldön és a tárolás során. Legfőbb képviselői a *F. graminearum*, *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. crookwellense*, *F. solani* és a *F. pulicaris* fajok. Elfogyasztása számos mellékhatást vonhat maga után, többek között hányást, mely miatt vomitoxinnak is nevezik (2. ábra).



2. ábra DON (Vomitoxin) Forrás: <https://www.romerlabs.com/>

1.2.2.2 Mikotoxikózisok és a DON toxin okozta egészségkárosodások lehetőségei

A dezoxinivalenol a központi idegrendszerben fejti ki hatását. Erős fehérjeszintézis gátló hatással rendelkezik, így az idegszövetben növeli egy aminosav, a triptofán felvételét, mely hatására fokozódik a szerotonin szintézis. A dezoxinivalenol és más trichotecének a megnövekedett szerotoninszint miatt anorexiát okozhatnak, valamint irritálhatják az emésztő szervrendszert. A toxin jelenléte kimutatható a vérplazmában, az epében, a májban, a combizomban, a háti zsírszövetben és egyéb állati eredetű termékekben is. (Sobrova és mtsai., 2010).

1.3 Mikotoxin analitikai eljárások

A mikotoxinok analitikai vizsgálatára jelenleg több módszer is rendelkezésünkre áll. Manapság a legelterjedtebb módszerek közé tartozik az ELISA, TLC, HPLC-MS és a GC-MS. Ezzel párhuzamosan megjelentek új módszerek is, mint például a FOSS-nak a Mycofoss™ módszere, mely képes hat mikotoxin egyidejű mennyiségi analízisére a mikrogyöngy módszer segítségével.

A kívánt elemzés szintjétől függ, hogy a vizsgálatokhoz milyen módszert szeretnénk alkalmazni. A vékonyréteg kromatográfia egy bizonyos koncentráció határig jó minőségű elválasztást eredményez, viszont alacsony koncentrációjú minták mennyiségi analízisére alkalmatlan. Ebben az esetben a vizsgálni kívánt mintában a mikotoxinok mennyiségi meghatározásához nagyműszeres mérésekre van szükségünk, melyek közül a legelterjedtebb a HPLC-MS, HPLC-MS/MS, és a GC-MS. A GC-MS esetén a mikotoxinok kimutatási határa már megfelelő szintű,

ellenben az egyszerű detektálási módszereknél alkalmazott detektorokkal (FID, ECD), mely sok esetben nem bizonyult megfelelőnek. Az egyik leggyakrabban használt módszer, mellyel a mikotoxinok szinte teljes spektruma kimutatható, a HPLC-MS technika (B.Tóth, 2014)

1.3.1 Elválasztástechnikai módszerek

1.3.1.1 Vékonyrétegekromatográfia (TLC)

A vékonyrétegekromatográfia módszernél az állófázis egy körülbelül 20x20 cm méretű hordozó (üveg, műanyag, alumínium), melyen vékony rétegben kiterített bevonat található (szilikagél, alumínium-oxid, cellulóz stb.). A lemez szélétől körülbelül 1-2 cm távolságra van lehetőség a minta felvitelére, mely mikrofecskendő segítségével történik. Egyidejűleg akár 10-15 minta is futtatható. Ezután, a mintákat tartalmazó lemez a kifejlesztő kamrákba kerül, ahol a kapilláris erők hatására a mozgófázis viszonylag egyenletes sebességgel, felfelé halad a szilárd állófázison.

A Fusarium mikotoxinok kimutatásához már az 1980-as évek óta elfogadottá váltak a vékonyrétegekromatográfiás (TLC) módszerek, melyeknél a normál és a fordított fázisok egyaránt használatosak voltak. A TLC vizsgálatok előnye amellett, hogy kevés anyagi ráfordítást igényelnek, a kémiai előhívó szerek és a toxinok saját fluoreszcenciája miatt csoportanalízis is végezhető (Lamper., 2001)

1.3.1.2 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A vizsgálni kívánt mintát feloldjuk és az oldat egy részét az áramló mozgó fázisba injektáljuk. Az oszlopban található álló fázis specifikus kémiai vagy fizikai kölcsönhatást alakít ki a mintával, így az a folyadékáramhoz képest visszamarad. A visszatartás mértéke függ a vizsgálandó anyag és az állófázis tulajdonságától és a mozgó fázis összetételétől. Az időtartam, mely alatt egy adott anyag megjelenik az oszlop végén retenciós időnek nevezzük. A retenciós idő, az egy adott rendszerben lévő, vizsgálni kívánt vegyületek egyedi jellemzője.

A HPLC alkalmazható az A és B típusú trichotecének, zearalenon és annak származékainak mennyiségi meghatározására. A szakirodalmak többségében fordított fázisú (C8, C18) oszlopot, metanol/víz, vagy acetonitril/víz oldószert használnak, izokratikus, vagy grádiens elúcióval

kombinálva. Ahhoz, hogy nagyobb érzékenységet érjenek el, oszlop-előtti és oszlop utáni kezelési módszereket alkalmaznak, többnyire a T-2 és HT-2 mikotoxinok mérése során.

1.3.1.3 Tömegspektrometriás detektálással kapcsolt elválasztástechnikai módszerek (GC/MS, HPLC/MS)

A tömegspektrometria már az 1920-as években is a kutatólaboratóriumok egyik nélkülözhetetlen eszköze volt, hiszen egy rendkívül érzékeny, szelektív és sokoldalú szerkezetazonosításra alkalmas műszer. Az elmúlt évtizedben, a tömegspektrometriával kombinálható elválasztástechnikai eljárások jelentős fejlődésen mentek keresztül. A tömegspektrometriás detektálás előnye, hogy érzékenysége eléri a fluoreszcenciás- és elektronbefogadásos detektorok érzékenységét. Továbbá, nagyfokú szelektivitás is jellemzi, melyre azért van szükség, mert a hagyományos detektálási módszerek esetében [HPLC/UV, fluoreszcenciás (FL), refraktometriás (RI), GC hővezetőképességi (TCD), lángionizációs (FID), elektron-befogásos (ECD)] egy kromatográfiás csúcsban több komponens is megjelenhet, mely jelentősen megnehezíti a pontos minőségi és mennyiségi meghatározásokat. A HPLC és GC kolonna végén megjelenő (eluálódott) komponensek a tömegspektrométer megfelelő ionforrása (pl.: mátrixszal elősegített lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI)) után érkeznek az analizátor (mágneses, quadrupól, repülési idő (TOF), ioncsapda) részébe, melyben a detektor a molekulákat és a fragmens ionokat tömeg/töltés (m/z) szerint detektálja (Lamper, Cs., 2001).

A detektáláshoz a kiválasztott ion figyelési módot (selected ion monitoring, SIM), vagy a pásztázó ion figyelési módot (SCAN) lehet alkalmazni. Az előbbire rendkívüli érzékenység jellemző (pikogramm-femtogramm), az utóbbi esetében pedig a spektrumkönyvtári azonosításra van lehetőség.

1.3.2 Immunkémiai módszerek

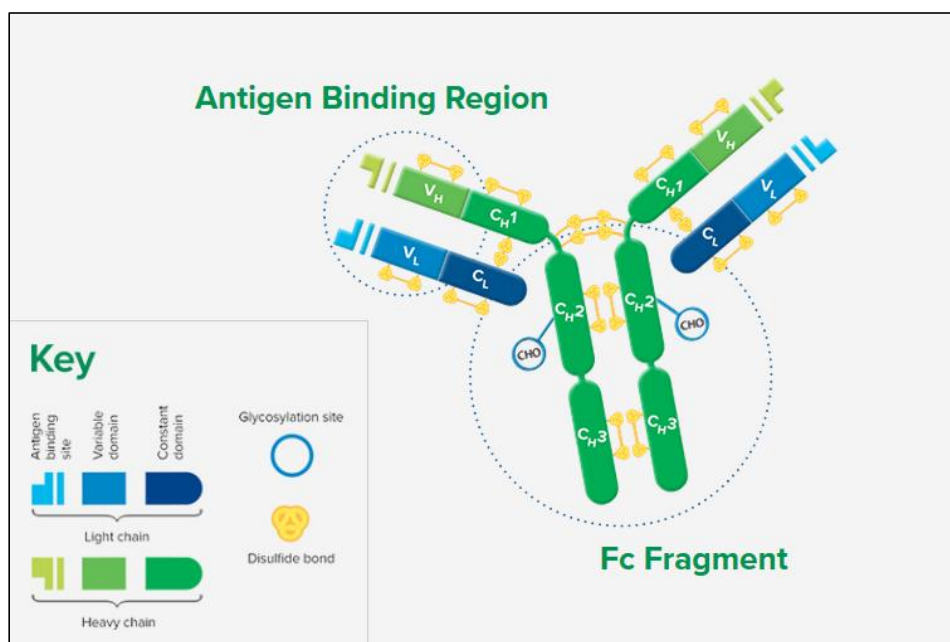
1.3.2.1 Az immunanalitikai alapjai

Az immunanalitikai módszerek az analitikán belül is egy új ágat képviselnek; a klinikai kémiai analízisben fontos szerepük van. A különböző biológiai folyadékokban található fehérjék, mikotoxinok, gyógyszerek, antitestek szelektív és érzékeny meghatározására alkalmas

módszerek. A környezetvédelmi analitikiában is előszeretettel alkalmazzák az immunanalitikai eljárásokat, ugyanis a vegyszerek, növényvédőszerek, illetve mikotoxinok koncentrációjának megállapításához is jelentős szenzitivitású módszerre van szükség.

A szervezetbe bejutó antigének hatására meginduló humorális immunválasz során termelődő specifikus ellenanyagok az antitestek. A termelődő antitestek az immunhatást kiváltó antigénhez kötődnek, így immunkomplexet hoznak létre. Az immunanalitika ezt a magasabb rendű állatokban (gerincesekben) lejátszódó folyamatot kombinálja a biokémiával. Az immunológiai reakció, mely során az immunológiai komplex kialakul nagymértékű szelektivitást mutat, így alkalmas az antigén, illetve az ellenanyag analitikai meghatározására is. Az immunanalitikai vizsgálatokhoz gerinces állatok vérszérumából kinyert antitesteket használnak.

Az antitest egy multifunkcionális fehérje, mely képes arra, hogy adott antigént specifikusan megkössön. A szérumfehérjék elektroforézise során, az ellenanyag-molekulák együtt futnak a β - és γ -globulinokkal, így az immunoglobulin nevet kapták (Ig). Az immunoglobulinok kétféle polipeptidláncból állnak, melyeket diszulfidhidak kapcsolnak össze. Az egyik a nagyobb molekulatömegű nehézlánc (heavy chain), a másik pedig a kisebb molekulatömegű könnyűlánc (light chain). Normál szérumban az Immunoglobulin G fordul elő a legnagyobb mennyiségben, mely két könnyű- és két nehézláncból áll. Az antitesteket izotípusokra oszthatjuk a nehézlánc konstans doménjai alapján: IgG, IgM, IgD, IgA, IgE.



3. ábra Az immuno-globulin (IgG) szerkezete (Forrás: <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/groups/whole-igg>)

Az IgG molekula kettő antigénkötőhellyel rendelkezik, melyek térszerkezete az azt felépítő aminosavak számától és elrendezésétől függ. Már néhány aminosavnak a cseréje is megváltoztathatja az antigénkötőhely tulajdonságait, ezzel változtatva az az antitest specifitását. Körülbelül 106 kombinációs lehetőség van az antitestek specifitásának variabilitására. Ez a könnyű- és nehézláncok variábilis részeinek mintegy 1000 eltérő, genetikailag meghatározott szekvenciaszakaszainak köszönhető. Az immunrendszer csak bizonyos méret feletti immunogénekre ad immunválaszt, azonban a kisebb méretű molekulákat, úgynevezett hapténeket önmagában felismerni nem tudja. A haptének komplexeket hozhatnak létre a testben található nagyobb méretű molekulákkal, így immunogénné alakíthatóak. Többnyire ezek a hordozómolekulák fehérjék, és az így kapott fehérjemolekulákkal végezhető az immunizálás. (Fülöp és mtsai., 2012)

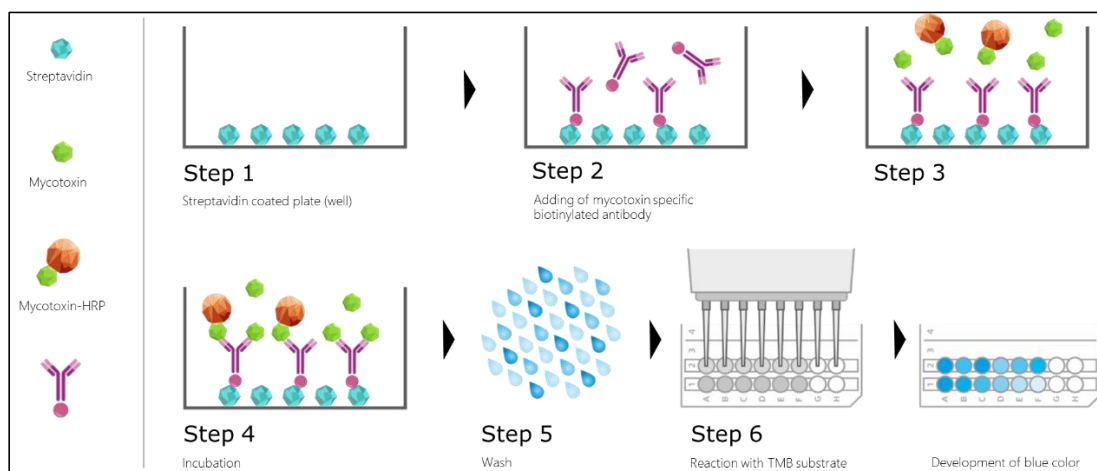
Az immunanalitikai módszerek használata többnyire a fehérjék és kisméretű molekulák kimutatására terjed ki. Ezen belül megkülönböztünk számos eljárást, mely antitesten vagy antigénen alapul. A kihívást az jelenti, hogy a kialakult immunkomplex keletkezésének hatására

nem keletkezik semmilyen mérhető végtermék, így a detektáláshoz szükség van, valamilyen mesterségesen bevitt jelölésre.

1.3.2.2 Enzimhez kötött immun-szorbens analízis (ELISA)

Az 1950-es évek elején született immunoassay technológia már az 1980-as években széleskörben alkalmazott módszernek bizonyult. 1970-1972-ben jelentek meg az első olyan publikációk, melyek az antigén-antitest reakciók enzim jelzéséről szólnak.

A kialakult immunkomplex jelölésére, majd annak analitikai meghatározására a legígéretesebbnek a jelzőenzimek bizonyultak. A jelzőenzimek az antigénre és antitestekre egyaránt kapcsolhatók, olyan módon, hogy a komplex mind immunológiai, mind pedig enzimatisz aktivitással rendelkezzen.



4. ábra Toxi-Watch ELISA felépítése (saját ábra)

Az ELISA technikák többsége legalább egy elválasztási lépést foglal magába, melyben az antitesthez kötődött szabad célvegyület és annak konjugátuma vesz részt (4. ábra). Az antitesthez nem kötődött frakció így elválasztható és az enzim aktivitása mérhetővé válik. Az enzimaktivitást általában az enzim kromofór szubsztrátjával mérik, mely színreakciót eredményez. Ennek alapján, az antiteszthez kötődött szabad antigén koncentrációja és mennyisége kimutatható.

A reakció során kialakult antigén-antitest komplex stabilitása függ azok térszerkezetétől. A reagensek egyik része szabad, a másik része pedig kötött formában található meg. A reakció az egyensúlyi állapot eléréséig tart, mely a tömeghatás törvényével jellemezhető.

Az antigének szabad vagy kötött állapotban való megjelenése adott mennyiségű antitest esetében, függ a reakcióhoz hozzáadott antigén összmenyiségétől. Az ELISA módszernél a kimutatáshoz az antitestre, vagy a hapténra valamilyen jelzőenzimet kötünk, mely majd egy későbbi lépésben a kolorimetrikus szubsztrátjával összetalálkozva színreakciót eredményez. A rendszerben lévő jelölt antigén és nem jelölt antigén versenyeznek az antitestek megkötéséért, kompetitív módon kapcsolódnak azokhoz. Ez a reakció is, csak úgy mint az előbbi az egyensúly eléréséig tart.

Adott mennyiségű antitest és jelzett antigén esetén a kötött és a szabad frakció arányát a nem kötött antigén mennyisége szabja meg. Az eljárás rohamos terjedésével, a fotometriás módszer segítségével mind több különféle biológiailag hatásos anyag kis koncentrációjának meghatározása válik lehetővé.

Az ELISA rendszerekben a jelölés az antigénen és az antitesten is elhelyezhető. Ez alapján az ELISA módszereken belül megkülönböztetünk enzimmel jelzett antigén, valamint enzimmel jelzett antitest alapú vizsgálatokat. További osztályozás történhet az antigén-antitest egyensúlyi reakciójának a kivitelezési módja alapján. Az ELISA módszerek típusát tekintve fontos, hogy a jelölt antigén verseng-e a jelölt antigénnel az antitest kötőhelyeiért (kompetitív/szendvics); a jelölőenzimet közvetlenül kapcsolják-e a célvegyületek specifikus antitesteihez, vagy szükséges-e egy másodlagos antitest (direkt/indirekt); az antigén és az antitest közötti reakció egyensúlyi-e (egyensúlyi/nem egyensúlyi).

A mikotoxinok kis méretére való tekintettel, vizsgálatukhoz kizárólag a kompetitív ELISA módszer alkalmazható indirekt, vagy akár direkt formában is. Az eljárás során a jelölt antigént az antigént tartalmazó vizsgálati mintával keverik össze. A mintában lévő antigén versenyezni fog a antitesten lévő kötőhelyekért az enzimmel jelölt antigénnel. Ezután a be nem kötődött antigének egy mosási lépés alkalmával eltávolíthatók a rendszerből, majd az enzim szubsztrátját hozzáadva mérhetővé válik az enzimaktivitás.

Amikor az antigén van immobilizálva a szilárd hordozón, az enzimmel jelölt antitestet és a vizsgálati mintát, mely ismeretlen mennyiségben tartalmazza az antigént, reagáltatjuk egymással. Az immobilizált antigén és az antitest mennyisége meghatározott, azonban a mintában található antigén mennyisége változó. Így az immobilizált antigén és jelölt antitest által alkotott komplex enzimaktivitása csökkenni fog, amennyiben a minta antigén tartalma növekszik. Ezen eljárásnak a módosított, azonban gyakrabban alkalmazott változata, mely során első lépésben, az antigén megkötéséhez jelöletlen elsődleges antitestet használnak, majd második lépésben egy enzimmel jelölt másodlagos antissal reagáltatják az első lépésben kialakult komplexet. Ezt a módszert indirekt módszernek is nevezik, ugyanis a jelzőenzim nem az elsődleges, antigén-antitest komplex részét képezi. Egy másik eset, mikor a szilárd hordozón immobilizált komponens az antigén. Ebben a rendszerben az antigén és annak enzimmel jelölt változata verseng az antigén kötőhelyeiért. A rögzített antitest miatt ezen módszer esetében az érzékenység magasabb, viszont a hátránya az, hogy az enzimgátló komponensek tönkretelhetik a mérést. Ezt az eljárást direkt módszernek is nevezik, mivel az antigén-antitest komplex egyik tagja van jelölve. Számos indirekt módszer ismeretes, azonban a gyakorlatban a jobb kivitelezhetőség és érzékenység miatt a direkt eljárások használatosak, viszont kidolgozásuk is valamivel bonyolultabb, hiszen az antigén-enzim konjugátum előállítása szükséges (Hegedűs., 2003)

1.3.2.3 Mikrogöngy alapú kompetitív fluoreszcens immunoassay (CFIA)

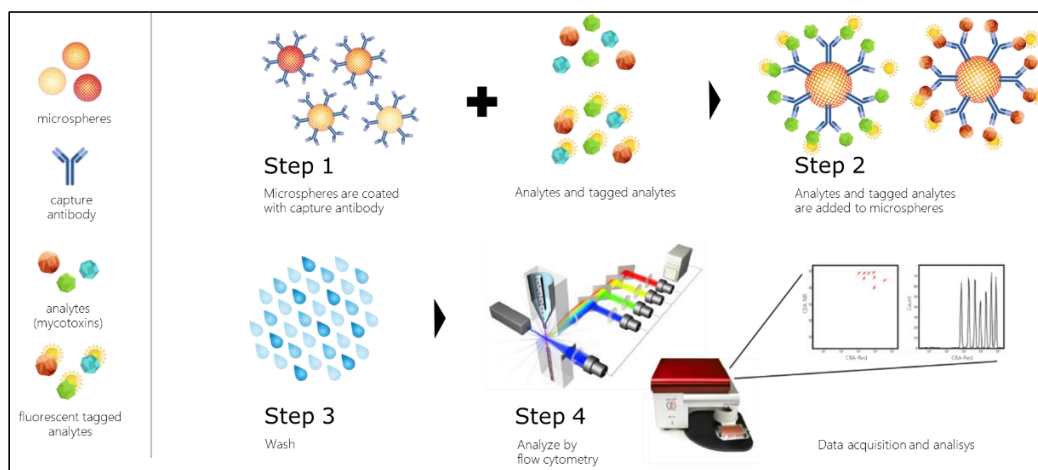
1.3.2.3.1 Áramlási citometria

Az áramlási citometria (FCM: flow cytometry, FACS: fluorescence-activated cell sorting) egy olyan laboratóriumi eljárás, mely különálló sejtek gyors, többparaméteres (kémiai és fizikai tulajdonságok), mennyiségi vizsgálatára alkalmas. Fluoreszcens jelölésekkel lehet a vizsgálni kívánt sejtek funkcionális vagy morfológiai tulajdonságait analizálni. A sejtek egyesével, egymás után végigmennek egy kapillárison, melyben egy lézersugár világítja meg őket, a készülék pedig detektálja az optikai jeleket, s feldolgozza azokat. Ezen technika segítségével lehetővé válik, hogy az egyes sejtpopulációkat azonosítsuk és szétválogassuk (sorting) az immunológiai fenotípusuk és funkcionális állapotuk alapján.

Napjainkra már széleskörben elterjedtek ezen a módszeren alapuló, szolubilis molekulák mérésére kidolgozott mikrogyöngy alapú rendszerek (CBA: Cytometric Bead Array; Mycosphere-based flow cytometry assay), melyek alapja a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET), így akár a molekuláris interakciók és a módosított (pl.: foszforilált) fehérjék nyomon követhetőek, az ellenük alkalmazott antitestek segítségével. Továbbá, lehetővé teszi a sejten belüli fehérjék kimutatását immunfenotipizálással kombinálva, ezáltal a proteomikai vizsgálatok sejtszinten kivitelezhetővé válnak. Ennek köszönhetően az áramlási citometria a diagnosztikában mára már nélkülözhetetlenné vált. (Hegedűs., 2003)

1.3.2.3.2 Multiplex-mikrogyöngy rendszer (CFIA)

Az ELISA módszerhez hasonlóan, a multiplex-mikrogyöngy rendszer is antigén-antitest kölcsönhatáson alapul. Az eljárás során a sejt méretű (0,5-10 mm átmérőjű), fluoreszcens festékekkel jelölt polisztirol műanyag mikrogyöngyöket alkalmazunk. A mikrogyöngyök felszínére különböző molekulákat lehet kötni, többnyire antitesteket, fehérjéket, oligonukleotidokat, lipideket és szénhidrátokat, melyek képesek az általunk vizsgálni kívánt analitoknak a megkötésére. A mikrogyöngyök a méretbeli detektálhatóságot, az antitestekre kötött különböző színű fluorokrómok pedig az analitok megkülönböztetését biztosítják (5. ábra).



5. ábra Multiplex-mikrogyöngy rendszer felépítése (saját ábra)

Az ELISA módszer esetében az immunkomplex az ELISA lemez zsebeinek aljához és oldalához kötve található, a CFIA esetén a komplex a mikrogyöngy felszínén képződik, az oda kötött antitestek miatt. A különböző fluoreszcens mikrogyöngyök egyidejű alkalmazásával lehetőség nyílik különböző analitok egyszerre történő mérésére. Ma már egyes műszerek 10-17 fluoreszcens szín egyidejű detektálására is képesek (Hegedűs., 2003). A vizsgálat további előnyei közé tartozik, hogy többféle analitot lehet egyszerre kvantitatívan kimutatni nagyon kismennyiségű mintából (5 g darált mintából). A módszer érzékenysége vetekszik az ultraszenzitív ELISA módszerekével (pg/ml) (Czeh.,2008).

1.3.2.4 A Fusarium fajok által szintetizált mikotoxinok műszeres analitikai vizsgálatának módszerei

Az ELISA módszer közkedvelt immunoassay technológiává vált, így már az 1990-es évek óta alkalmaznak kompetitív ELISA módszert a legtöbb fejlett országban. (Barna-Vetro et al., 1994). Az Európai Szabványügyi bizottság (CEN) és az Analitikai Vegyészek Szövetsége (AOAC) számos olyan számos mikotoxin analitikai módszert közölt, melyek szabványosítva vannak. A módszerek validációja műszerösszehasonlító vizsgálatok alapján történt. Az módszerösszehasonlító vizsgálatokat végző laborok száma minden évben egyre több, ezáltal a módszerek elfogadottsága is növekszik. Az AOAC által közölt validált módszereket tartalmazó tanulmánya, körülbelül 40 mikotoxin analitikai módszerről számol be.

Hat mikotoxinra megfelelően érzékeny és pontos, kromatográfiás, illetve immunkémiai technikákat alapul vevő módszerek állnak rendelkezésre. Számos új analitikai módszer jelent meg, a mikotoxinok detektálására: MIP (molecular imprinted polymers), fluoreszcencia polarizációs próba, infravörös spektroszkópia, kapilláris elektroforézis, vékonyréteg kromatográfia, HPLC, és gázkromatográfia (GC). (Czeh et al., 2014). Az ELISA kitek, melyek jelenleg elérhetőek a mikotoxin analitikában, egyszerre csak egy mikotoxint képesek kimutatni. Ez azért okoz problémát, mert az utóbbi években megjelenő publikációk több mikotoxin egyidejű megjelenéséről számolt be, így a multiplex vizsgálatokra alkalmazására megnövekedett az igény. Szükségessé vált a multi-mikotoxinos szennyezések széleskörű vizsgálata, ugyanis több mikotoxin egyidejű megjelenése súlyos egészségügyi kockázatokat

rejt. Az LC-MS/MS technológia fejlődésével segítségével több mikotoxin egyidejű azonosítása vált lehetővé. A műszeres háttér fejlődése miatt a mintaelőkészítés is egyszerűsödött; megszületett a QuEChERS, mely a LC-MS/MS-hez kapcsolódó mintaelőkészítési technika. A jelenleg alkalmazott tesztek többsége a növényi eredetű termékek multi-mikotoxin tartalmának meghatározására koncentrálnak. A multi-mikotoxin szennyezések kimutatására az egyik legalkalmasabb módszer a multiplex mikrogyöngy rendszer lehet, hiszen ez egyidejűleg egyszerre több mikotoxin jelenlétét tudja kimutatni. 2008-ban Budapesten, a sejtanalitikai világkongresszuson került bemutatásra az az áramlási citometriás módszeren alapuló mikotoxin esszé, mely öt mikotoxin egyidejű analízisére alkalmas. 2010-ben Anderson egy olyan kompetitív mikrogyöngy esszét hozott létre, mely két mikotoxin egyidejű vizsgálatát tette lehetővé. 2011-ben Peters és munkatársai bemutatták azt a vizsgáló rendszert, mely közvetett gátláson alapulva hat mikotoxin analízisére képes. Ez a módszer a Luminex (Austin, TX, USA) áramlási citométerére lett kidolgozva. Peters a rendszerében, karboxil csoporttal rendelkező mágneses mikrogyöngyöket használ (x-MAP MultiAnalyte). 2011-ben kereskedelmi forgalomba került egy hat mikotoxin vizsgálatára képes mikrogyöngyöket alkalmazó, multiplex esszé, mely megoldást jelenthet a világméretű multi-mikotoxin szennyezésre. (Czeh et al., 2012)

2. CÉLKITÚZÁS

- A tervezett módszerösszehasonlításhoz bizonyítottan alkalmas mintabank felállítása.
- A hosszú évek óta elérhető ELISA alapú immuntechnika összehasonlítása az újonnan bemutatott mikrogyöngy alapú multi-toxin analitikai immuneljárással, a Mycofossal.
- A fent említett immunanalitika eljárások összevetéssel a területen alkalmazott és elfogadott referencia módszerrel, a HPLC-vel.
- A különböző alkalmazhatóságának áttekintése. módszerek

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált vegyszerek

Az ELISA vizsgálatok elvégzéséhez TOXI-WATCH DON ELISA Kitet (katalógusszám: 3000031) alkalmaztunk, amely valamennyi szükséges reagenst magába foglalta. A Mycofoss méréshez

szükséges készüléket, eszközöket és reagenseket (extrakciós puffer; sheath liquid; DON standard cartridge; DON assay cartridge) a Soft Flow Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A HPLC méréseket együttműködő partnerünk végezte el.

3.2. Vizsgált kukoricaminták

Az általunk vizsgált 35 darab kukoricaminta mindegyike a 2021 évi aratás során került betakarításra a Dél-Magyarországi régióban.

Betakarítást és a kéthetes szárítási periódust követően a teljes mennyiséget (kb. 1 kg) 1-2 mm-es részecskékre őröltük a mintavételi hiba csökkentése miatt. Ezt a mintát alaposan összekevertük, és az őrölt mintából 100 g-ot elkülönítettünk. Ebből 50 g-ot különítettünk el, ELSIA és Mycofoss mérésekre. A fennmaradó mintamennyiség szolgált alapanyagul a HPLC mérésre partnerünk analitikai laborjában.

3.3. Alkalmazott módszerek

3.3.1 Mintaelőkészítés - Kukorica őrlemények extrakciója

Az őrleményeket a mérés időpontjáig hűtőkamrában 2-8°C-on tároltuk. Az előzetesen 1-2 mm-es részecskékre őrölt mintákból gabonadarálóval finomra őrölt gabonamintákat készítettünk, homogenizáltuk. A darált mintának olyan szemcseméretűnek kell lennie, hogy az anyag 95 %-a átmenjen egy 0,845 mm-es, 20 mesh-es vagy 850 mikronos rostán.

Az ELISA méréshez a kivonatokat az alábbi módon készítettük el; 5 gramm őrölt mintát Erlenmeyer-lombikba mértünk, majd 30 ml 23%-os (v/v) etanolt (24 rész 96%-os etanolt és 76 rész desztillált vizet) adtunk hozzá és rázógépből (300 ford./perc, szobahőmérséklet) 10 percig extraháltuk.

10 perc után a kivonatot szűrőpapíron leszűrtük és centrifugacsőbe gyűjtöttük. Végül a kivonatokat PBS pufferrel 40-szer (pl. 3900 µL PBS puffer + 100 µL kivonat) hígítottuk fel.

Mycofoss mérések esetén a használatra kész mintatartó tégelybe 5g mintát mértünk és a tégelyt a készülékbe helyeztük. Az extrakciót a készülék maga végezte el.

HPLC mérésekhez szükséges extraktumokat együttműködő partnerünk Perten Laboratory Mill (Típus: 3310, Perten Instruments, 126 53 Hagersten, Svédország) segítségével finoman porrá őrölte, majd a méréseket egy korábbi (Szabó, és mtsai., 2018) publikáció alapján végezte el.

3.3.2 MycoFoss mérés

A Foss Analytical MycoFoss™ néven kifejlesztett módszere 6 mikotoxin egyidejű vizsgálatára alkalmas. A módszer egy rendkívül gyors és pontos, teljesen automatizált eljárás, amely a „kompetitív immunoassay” és az áramlási cytometria összekapcsolásán alapul.

A megdarált minta műszerbe helyezését követően, a készülék valamennyi előkészítési, inkubálási és mérési feladatot külső beavatkozás nélkül, automatizált módon látja el. 8 percen belül akár 6 mikotoxin egyidejűleg elvégzett vizsgálatának eredményei ppb-ben a képernyőn megjelennek és felhőszolgáltatás révén a felhasználó döntéshozatal céljából az adatok bármikor és bárhol hozzáférhetők.

A MycoFoss esetében szintén az - 1.2.2.1 szakaszban - ismertetett tipikus kompetitív immunoassay a mérés alapja. Ennél a módszernél, a DON toxin ellen termeltetett monoklonális antitest a fluoreszcens festékkel megjelölt polisztién mikrogyöngyök felületén került rögzítésre. Így itt a reakció a már a folyadékfázisban lejátszódik, az immunkomplex keletkezésének helye, a mikrogyöngy felszíne. A kompetitív eljárásban az fluoreszcens festékkel jelzett antigént a készülék összekeveri a vizsgálati mintával, amely antigént tartalmaz. A mintában levő antigén versengeni fog az enzimhez kötött antigénnel a korlátozott mennyiségű kötőhelyért (antitestért). A nem kötött antigéneket azután mosás útján a készülék eltávolítja a rendszerből. Az készülékbe épített fluoreszcens detektorok párhuzamosan detektálják a gyöngyök felületéről érkező – konjugátum fluoreszcens festékéből származó – jeleket (riporter paraméter), valamint a mikrogyöngy anyagából származtatott fluoreszcens jeleket (klaszterező paraméter).

A riporter paraméter alapján történik a minták kvantitatív vizsgálata. Ismert toxin tartalmú standardok mérése során kapott fluoreszcens jelek segítségével kalibrációs görbét készít a műszer. Azután az ismeretlen DON toxin tartalmú minták fluoreszcencia intenzitása alapján a kalibrációs görbéről leolvasható a minta jellemző DON szennyezettsége. A klaszterező paraméter elemzése teszi lehetővé több különböző színintenzitású mikrogyöngy – ezen keresztül - több mikotoxin szimultán vizsgálatát.

3.3.3 ELISA mérések meghatározásának körülményei

Méréseinkhez egy kereskedelmi forgalomban kapható ELISA terméket választottunk (TOXI-WATCH DON ELISA Kit, katalógusszám: 3000031, Soft Flow, Pécs, Magyarország) Ezt a terméket speciálisan élelmiszer és takarmány (kukorica és búza,) minták DON szennyezettségének kvantitatív meghatározására fejlesztették ki. Az alkalmazott ELISA Kit megfelelő DON-BSA konjugátum ellen termelődött egér monoklonális antitestet használ, amely alacsony keresztreaktivitást mutat a mintában potenciálisan fellelhető egyéb mikotoxinokkal. A termék mérési tartománya ennek megfelelően 312.5 – 5.000 ppb, érzékenysége pedig 233.3 ppb. A kompetitív immunoassay elven működő módszer 20 perces szerves extrakcióval indul, majd egy 60 perces inkubációval folytatódik, végül 10 perces előhívást követően követő 450 nm detektálható a színreakció.

A vizsgálat lépései röviden a következők voltak: 50 µl hígított extraktumot/standard oldatot, 50 µL DON-HRP-t és 50 µL biotinilált DON antitestet adtunk valamennyi well-be. 1 órát inkubáltuk a mintát 37 °C-on, platerázó berendezésen. Az inkubálást követően a cellákat 280 µl mosópufferrel (0,05% Tween-20 0,01 M PBS-ben, pH = 7,40) háromszor mostuk. Előhívásnál 150 µL 3,30 ,5,50 --tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrátot adtunk a cellák mindegyikéhez. 10 perccel később a színeképző reakciót 1 N kénsavval (50 µl/lyuk) leállítjuk. Az abszorbancia/optikai sűrűséget hagyományos lemezleolvasóval mértük 450 nm-en (referencia hullámhossz 630 nm). A mintákat két párhuzamos méréssel mértük.

3.3.4 HPLC mérés

Partnerünk a DON toxint Agilent Infinity 1260 HPLC-vel (Agilent, Santa Clara, CA, USA) mérte, Szabó és munkatársai által leírt módszer alkalmazásával (Szabó, és mtsai., 2018).

3.4. Adatok statisztikai elemzése

Az adatok statisztikai elemzését és ábrázolását a Prism v9.3.1 (GraphPad szoftver, La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével hajtottuk végre. A módszerek összehasonlításához 95%-os konfidencia intervallumokkal lineáris regressziós,- és Pearson-korrelációs elemzéseket végeztünk. A szövegben a korrelációs együtthatók értékei (r),- az egyenesek illeszkedésének értékei (R^2),- a lineáris regressziós elemzésekhez kapcsolódó $Sy.x$ értékek,- a 95%-os

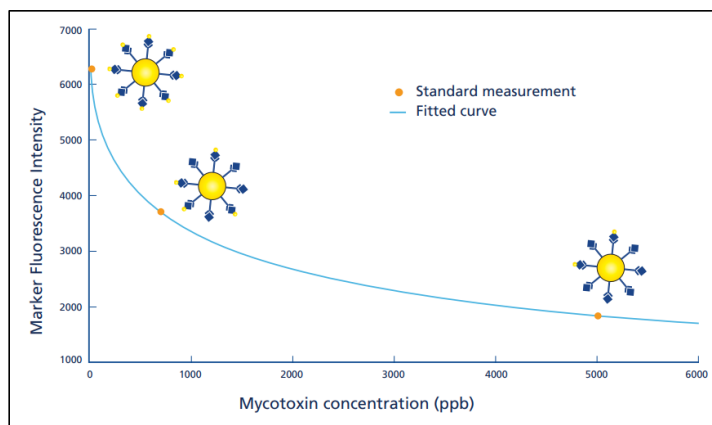
konfidencia intervallumokhoz (CI) tartozó adatok,- és a p -értékek vannak feltüntetve. Az r értékek információt nyújtanak a két folytonos változó közötti kapcsolat erősségéről és irányáról (ahol $r = \pm 1$ jelenti a tökéletes, lineáris és monoton összefüggést és $r = 0$ reprezentálja azt, hogy nincs lineáris vagy monoton kapcsolat az adatok között; az $r < 0$ mutatja a negatív vagy fordított kapcsolatot, míg az $r > 0$ a pozitív kapcsolatot). A * $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

4.1. MycoFoss mérés eredményei – rendelkezésre álló minták minősítése

4.1.1 Kalibrációs görbe

A MycoFoss készülék a mérések előtt és között előre megjelölt időpontokban kalibrációt végez, melynek eredménye a 6. ábrán látható kalibrációs görbe.



6. ábra MycoFoss jellemző kalibrációs görbe (forrás: <https://www.fossanalytics.com/>)

4.1.2 Mérési eredmények

A rendelkezésünkre álló 35 db kukorica mindegyikéből két párhuzamos mintát készítettünk elő és mértünk a MycoFoss készüléken. Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

A kapott eredmények alapján a mintákat 3 csoportba soroltuk:

1. Pozitív minták. DON toxint az 1,75 ppm határértéket meghaladó mennyiségben tartalmazó minták. Ezeket piros színnel jelöltük

2. Jelentős mennyiségű DON toxint tartalmazó minták. A vonatkozó határérték 50%-át (0.875 ppm) meghaladó mennyiségű DON-t tartalmazó minták. Sárga színnel jelölve.
3. Negatív minták, melyek kevesebb, mint 0.875 ppm DON toxin tartalmaznak. Kiemelés nélküli adatok.

<i>Azonosító</i>	<i>DON (ppm)</i>	<i>Azonosító</i>	<i>DON (ppm)</i>
101	2.24	167	0.34
111	12.94	170	0.80
112	16.80	174	1.02
113	15.79	175	0.57
115	0.67	180	0.12
117	0.06	184	1.32
120	0.07	189	0.10
122	0.15	193	4.74
125	0.03	203	0.62
132	13.74	206	0.60
133	9.25	208	0.44
147	0.21	211	15.38
148	0.09	219	0.69
151	0.40	227	1.04
160	0.07	228	4.80
161	3.16	232	10.83
162	1.32	237	0.96
166	1.24		

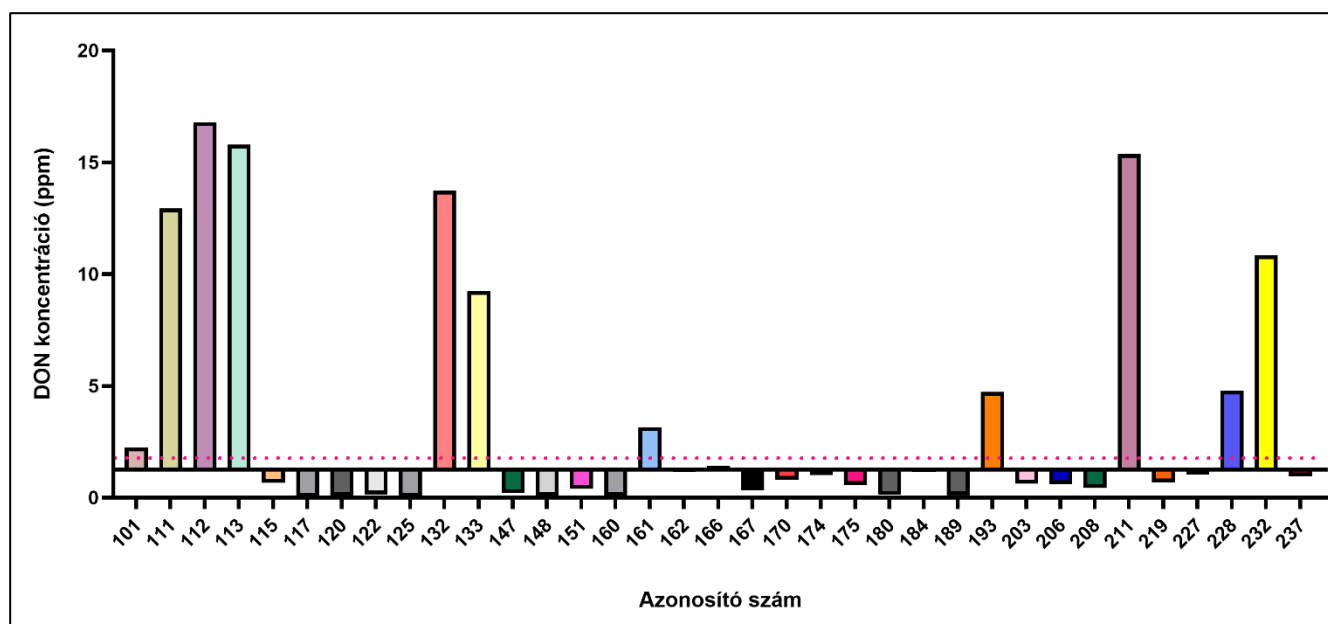
1. táblázat Munkánk során vizsgált 35 db kukoricaminta jellemző DON koncentráció értéke ppm-ben. A méréseket MycoFoss módszerrel végeztük el.

Pozitív minták

Tekintettel a 1881/2006/EK rendeletben foglalt 1,75 ppm határértékre, megállapítható, hogy a minták több mint 30%-ban határértéket meghaladó DON szennyezettség tapasztalható. (Ezen minták jellemző DON értékeit piros színnel jelöltük.)

Az érvényben lévő szabályozás értelmében ezen pozitív minták emberi fogyasztásra alkalmatlanok, így ezek további csoportosítására a direktíva nem tér ki.

Felhívnam azonban a figyelmet arra a tényre, hogy a 11 db pozitív mintából 7db a határérték ötszörösét is meghaladta (sőt egy minta ~10x-es határértéket mutatott), ami analitikai szempontból jelentős kihívás. A határértéket jelentő koncentráció a mérés során alkalmazott kalibrációs görbe középső lineáris szakaszára esik, ahol a rendszer pontossága a legjobb. Ezek az erősen szennyezett minták viszont a görbe ellaposodó részére esnek, ahol – görbe jellegéből adódóan – nagyobb mérési bizonytalansággal kell számolnunk.



7. ábra MycoFoss mérések eredményei.

Minden oszlop egy-egy minta DON toxin tartalmát mutatja. Az 'X' tengelyen a minta azonosítókat tüntettük fel, a 'Y' tengelyen a jellemző DON koncentráció látható ppm-ben ábrázolva.

Az ábrán látható vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. A magenta színű, szaggatott, vízszintes vonal a "Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica" minták esetén kötelező 1.75 ppm határértéket mutatja.

Jelentős mennyiségű DON toxint tartalmazó minták

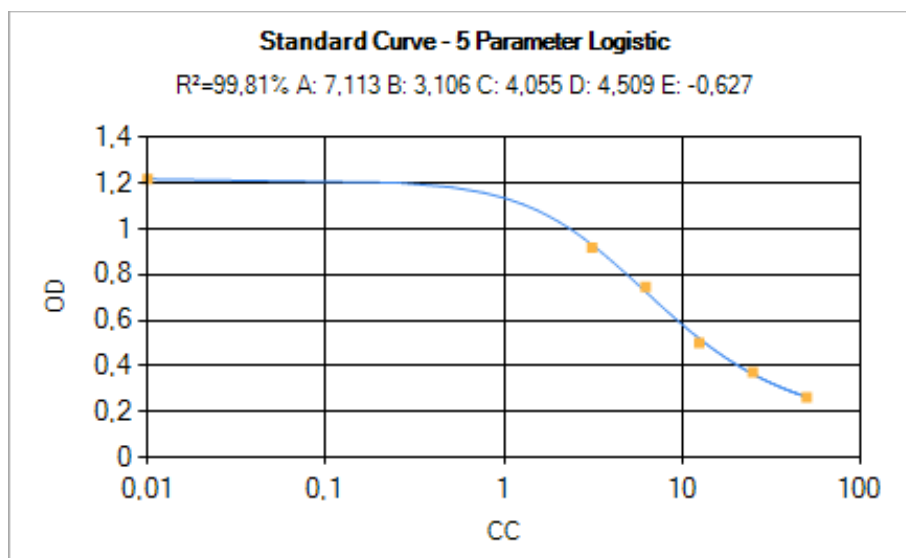
Fontos kiemelni, hogy további 6 minta tartalmazott a határérték 50%-át meghaladó DON toxin mennyiséget. Mindösszesen tehát a 35-ből 17 minta tekinthető szennyezettnek (lásd. 7. ábra), ami teljes mintamennyiség 49%-a.

Az a tény, hogy az általunk gyűjtött minták közül minden második valamilyen szint fertőzöttséget mutat, rámutat a monitorozás fontosságára.

4.2. ELISA mérés eredményei

4.2.1 Kalibrációs görbe

Az általunk alkalmazott Toxi-Watch ELISA kit instrukcióit követve a felhasználásra kész standardok segítségével kalibrációs görbét vettünk fel (8. ábra)



8. ábra Toxi-Watch DON ELISA kalibrációs görbe

Az 'X' tengelyen a DON toxin koncentrációt (0-50 ppm) ábrázoltuk, míg az 'Y' tengelyen a koncentráció értékhez tartozó OD értékeket, amelyek meghatározása 450 nm-en történt.

4.2.2 Mérési eredmények

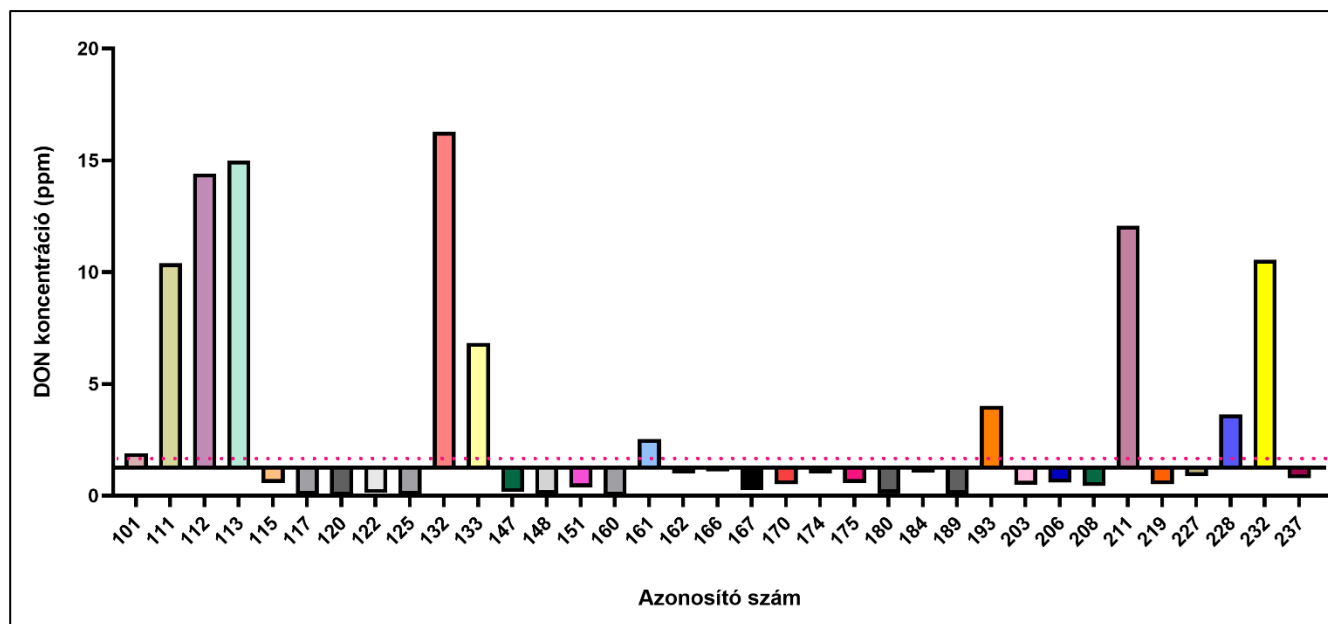
A korábban vizsgált kukorica minták extraktumait a kit-hez tartozó protokollnak megfelelően mértük el. A kapott eredményeket kategorizáltuk és szín kódoltuk a 4.1.2 szakaszban ismerttetettek szerint. Az eredményeket a 2. táblázat mutatja be.

<i>Azonosító</i>	<i>DON (ppm)</i>	<i>Azonosító</i>	<i>DON (ppm)</i>
101	1.89	167	0.27
111	10.39	170	0.51
112	14.41	174	1.00
113	14.99	175	0.57
115	0.57	180	0.11
117	0.04	184	1.02
120	0.00	189	0.10
122	0.13	193	4.01
125	0.04	203	0.49
132	16.28	206	0.58
133	6.84	208	0.43
147	0.16	211	12.07
148	0.06	219	0.52
151	0.37	227	0.88
160	0.00	228	3.63
161	2.54	232	10.56

162	0.98	237	0.77
166	1.08		

2. táblázat Munkánk során vizsgált 35 db kukoricaminta jellemző DON koncentráció értéke ppm-ben. A méréseket Toxi-Watch ELISA módszerrel végeztük el.

Hasonlóan a MycoFoss eredményekhez (1. táblázat, 7. ábra), ez ELISA mérések során is ugyanaz a 11 minta adódott pozitívnak. A mért koncentrációk alapján a minták megoszlása a különböző általunk felállított kategóriák között egy kivétellel megegyezik. Az eltérő, 237. számú mintát mindkét módszer határérték alá mérte, emberi fogyasztásra alkalmasnak találta. A minta DON koncentrációjára a MycoFoss módszerrel 0.96 ppm-et mértünk, ELISA-val ugyanakkor 0.77 ppm-nek adódott ez az adat (2. táblázat, 9. ábra). Ez a minimális eltérés eredményezte azt, hogy a minta a 'Jelentős mennyiségű DON toxint tartalmazó minta' kategóriából a 'Negatív minta' kategóriába került.



9. ábra ELISA mérések eredményei.

Az ábrán minden oszlop egy-egy minta DON toxin koncentrációját mutatja. Az 'X' tengelyen a kukoricaminta azonosító számokat tüntettük fel, a 'Y' tengelyen a jellemző DON koncentráció látható ppm-ben.

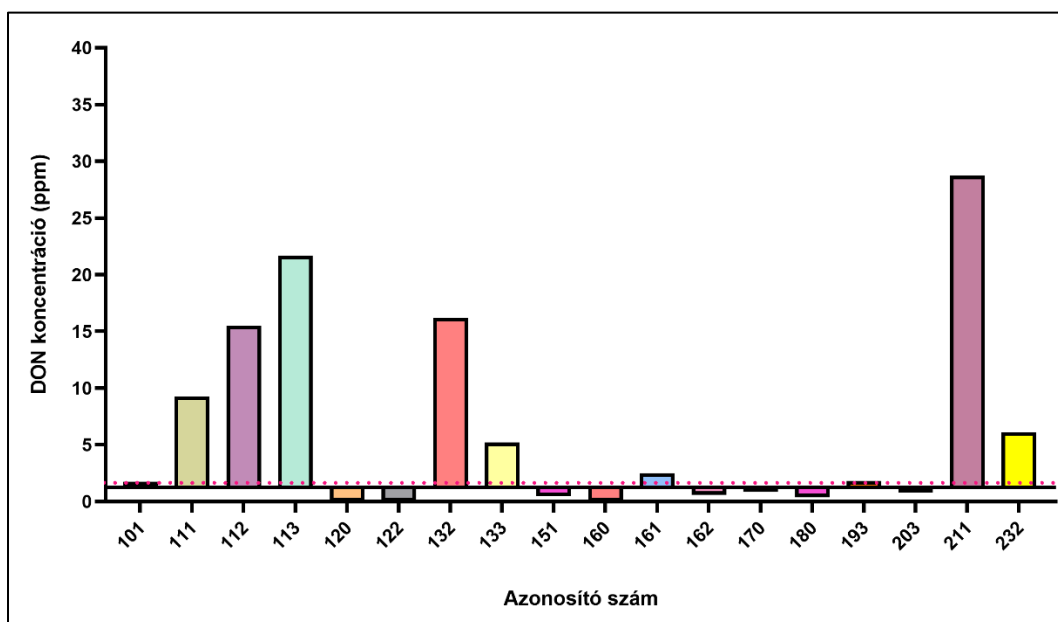
Az ábrán feltüntetett vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. A magenta színű, szaggatott, vízszintes vonal a "Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica" minták esetén a kötelező 1.75 ppm határértéket jelöli.

4.3 HPLC mérés eredményei

4.3.1 Mérési eredmények

Az ELISA és a MycoFoss mérések eredményeit (1. és 2. táblázat, 7. és 9. ábra) alapul véve kiválasztottunk 18 db mintát, HPLC mérésre. A minták kiválasztása során fontos szempont volt, hogy megközelítőleg 50-50 %-ban vizsgáljunk határérték feletti és alatti DON koncentrációval rendelkező mintákat. Végül együttműködő partnerünk 10 db határérték feletti és 8 db határérték alatti DON-t tartalmazó minta vizsgálatát végezte el. Az eredményeket a 10. ábra tartalmazza.

Megállapítható, hogy az általunk MycoFoss és ELISA módszerekkel kapott eredmények (1. és 2. táblázat, 7. és 9. ábra) megoszlása megerősítést nyert a HPLC, azaz a referencia módszer által (10. ábra).



10. ábra HPLC mérések eredményei.

Az ábrán minden oszlop egy-egy minta DON toxin tartalmát mutatja. Az 'X' tengelyen a minta azonosítók, - míg az 'Y' tengelyen a minták jellemző DON koncentrációja látható ppm-ben.

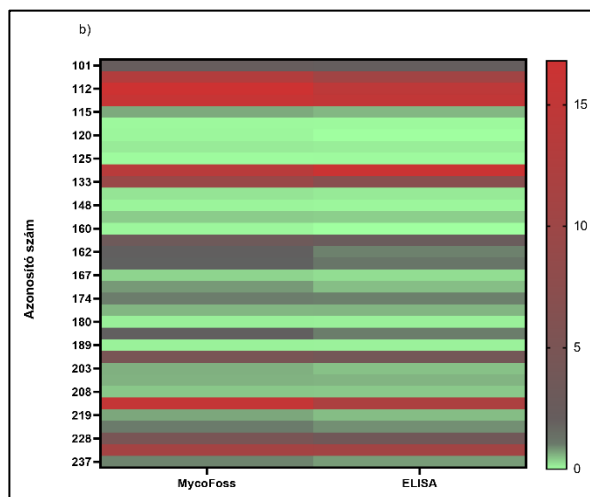
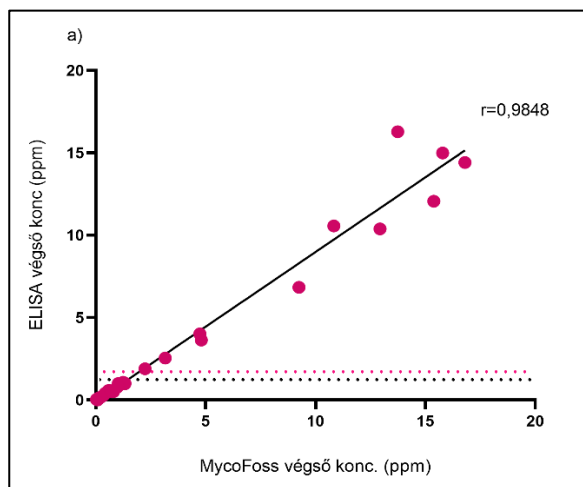
Az ábrán feltüntetett vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. A magenta színű, szaggatott, vízszintes vonal a 'Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica' minták esetén kötelező 1.75 ppm határértéket jelöli.

4.4 Alkalmazott módszerek összehasonlító elemzése

4.4.1 MycoFoss-ELISA összehasonlítás

A MycoFoss és az ELISA módszerekkel kapott DON toxin értékek összehasonlításához 95%-os konfidencia intervallumokkal lineáris regressziós,- és Pearson-korrelációs elemzéseket végeztünk (9a. ábra). Ezen módszerekkel a kukorica minták értékeinek összehasonlításakor különösen magas pozitív korreláció volt megfigyelhető ($r = 0.9848$, $R^2 = 0.9699$, CI 95 % = 0.9699 – 0.9924, $Sy.x = 0.8652$). A korrelációs elemzés során statisztikailag szignifikáns $**** p < 0,0001$ értéket kaptunk.

Az kapott eredmények alapján a vizsgált két immunanalitikai eljárás által mért eredmények között nem tapasztalható szignifikáns eltérés (11a. és b ábra). Ez a magas szintű egyezés többek között annak is köszönhető, hogy mindkét rendszerben azonos mAb klón került alkalmazásra, jelölésre használt enzim/fluoreszcens konjugátum hasonló metodikával került előállításra. Fontos megjegyezni, hogy a határérték körül tartományban – a görbe lineáris szakaszán - a legpontosabb a két módszer egyezése (11a. ábra). Köszönhetően a kompetitív görbe jellegének, magas koncentráció tartományban, a görbe ellaposodó részén magyarázhatók nagyobb eltérések, de ez ebben az összehasonlításban nem jellemző.



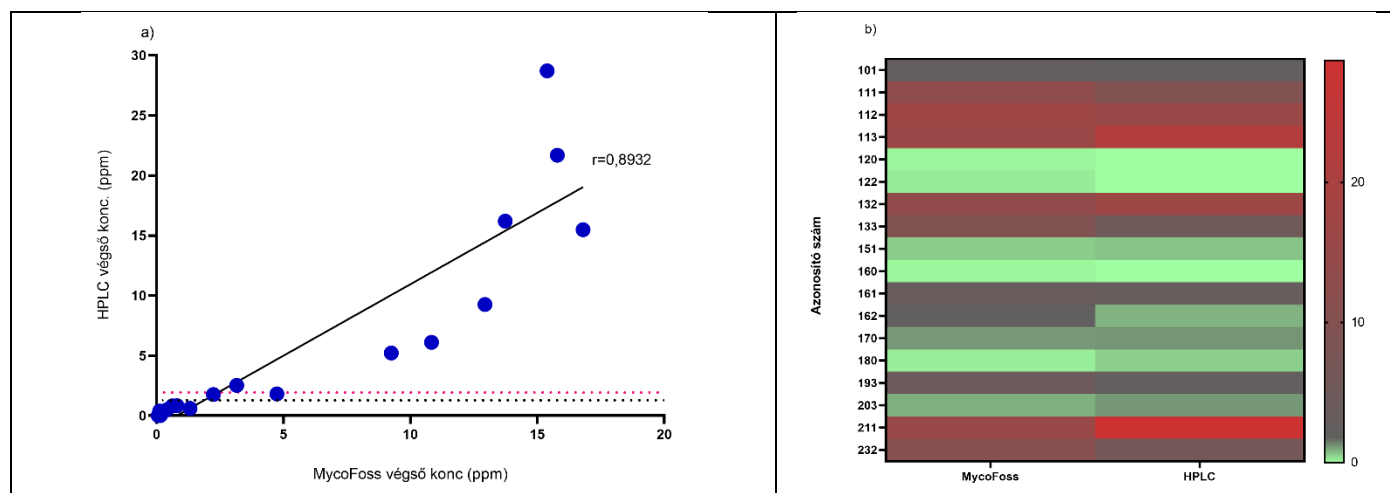
11a és b ábra MycoFoss és ELISA módszer eredményeinek összehasonlítása

A 11a ábrán a lineáris regressziós elemzés eredményeként kapott egyenest ábrázoltuk. A pontdiagram 'x' tengelyén a MycoFoss módszerrel kapott DON koncentrációkat, az

az 'y' tengelyen ugyanazon mintaszámokhoz tartozó, ELISA módszerrel mért DON koncentrációkat tüntettük fel, majd hasonlítottuk össze ppm-ben. Az ábrán a Pearson-korreláció eredményeként kapott r-értéket tüntettük fel, amely a kapcsolat jellegét mutatja meg. Az $r=0,9848$ érték alapján a két módszer mért adatai között különösen erős, pozitív, szignifikáns kapcsolat tapasztalható. A 11a ábrán látható vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. Az ábrán továbbá a "Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica" minták esetén kötelező 1.75 ppm határérték került jelölésre (magenta színű szaggatott vonal).

Az ábra jobb oldalán (11b), egy hő térképen hasonlítottuk össze a két módszerrel mért minták eredményeit. Az eltérő színekhez és színmélységekhez (világos zöldtől-pirosig) eltérő koncentrációs értékek társíthatók. A világos zöld tartomány a 0-1.25 ppm-ig (határérték alatti értékek) terjed, a színek mélyülése a piros irányba a növekvő DON koncentrációkat (ppm) mutatja minden minta esetén.

4.4.2 MycoFoss-HPLC összehasonlítás



12a és b ábra MycoFoss és HPLC módszer összehasonlítása

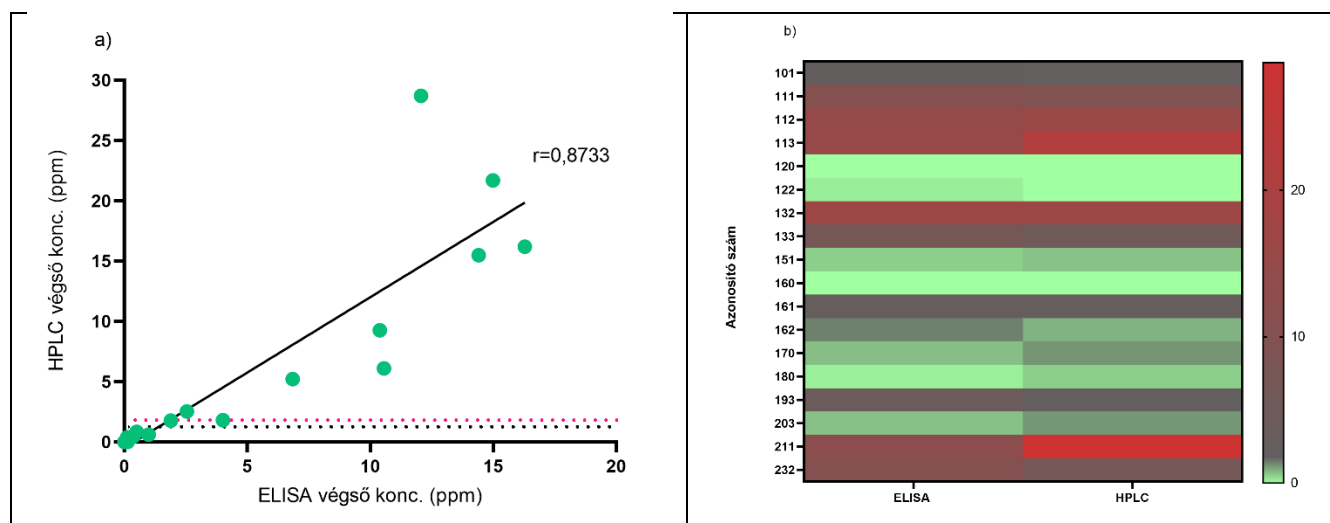
A 12a ábrán a MycoFoss és HPLC mérések adatainak lineáris regressziós elemzését és a kapott egyenest mutatjuk be. A pontdiagram 'x' tengelyén a MycoFoss módszerrel kapott DON koncentrációkat, az 'y' tengelyen ugyanazon mintaszámokhoz tartozó, HPLC módszerrel mért DON koncentrációkat tüntettük fel, majd hasonlítottuk össze ppm-ben. Az ábrán, az egyenes mellett a Pearson-korreláció eredményeként kapott r-értéket is feltüntettük, amely a kapcsolat jellegére mutat rá a két módszer között. Az $r=0,8932$ érték alapján a két módszer mért adatai között erős, pozitív, szignifikáns kapcsolat tapasztalható. A 12a ábrán látható vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. Az ábrán ez mellett a "Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica" minták esetén kötelező 1.75 ppm határérték került jelölésre (magenta színű szaggatott vonal).

Az 12b ábrán, egy hő térképen hasonlítottuk össze a MycoFoss és HPLC módszerrel mért minták eredményeit. Az eltérő színekhez és színmélységekhez (világos zöld tartománytól-pirosig) eltérő koncentrációs értékek társíthatók. A világos zöld tartomány a 0-1.25 ppm-ig

(határérték alatti értékek) terjed, a színek mélyülése a piros irányba a növekvő DON koncentrációkat (ppm) mutatja a minták esetén.

A MycoFoss és a HPLC módszerekkel a kukorica minták értékeinek összehasonlításakor erős pozitív korreláció volt megfigyelhető ($r = 0,8932$, $R^2 = 0.7978$, CI 95 % = 0.7313 – 9598, $S_{y.x} = 4.001$). A korrelációs elemzés során statisztikailag szignifikáns **** $p < 0,0001$ értéket kaptunk (10a ábra). Hasonlóképpen a korábbi összehasonlításhoz, jól látszik, hogy a két módszerrel kapott eredmények között a legkisebb eltérés az alacsonyabb (0-5 ppm) tartományban jelentkezik (12a és b ábra). Ennek egyik fő oka, hogy ez a tartomány pontosan megegyezik a MycoFoss mérési tartományával. Az 5 ppm-et meghaladó koncentráció értékeket csupán 'jóslás útján' állapítja meg a műszer. Ebben a tartományban jellemzően magasabb koncentrációértéket – False pozitív eredmény - kapunk az immuntechnika esetén, ami magában rejti az ismétlés lehetőségét és kizárja, hogy DON toxinnal szennyezett minta jusson az élelmiszerláncba.

4.4.3 ELISA-HPLC összehasonlítás



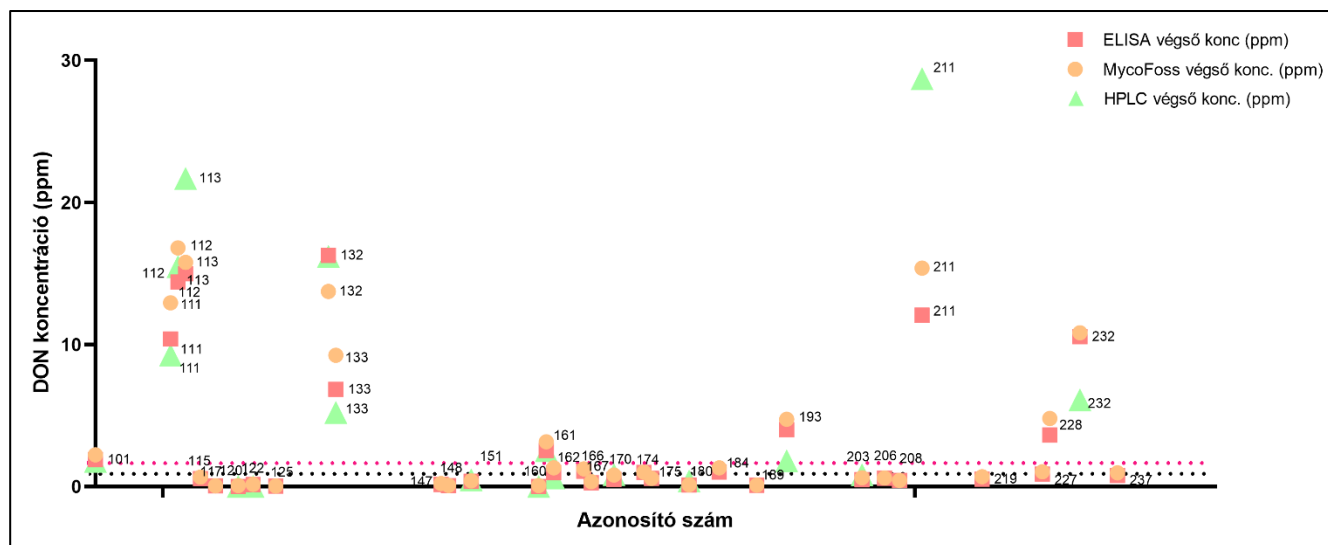
13 a és b ábra ELISA és HPLC módszer összehasonlítása

A 13a ábrán az ELISA és HPLC mérések adatainak lineáris regressziós elemzését és a kapott egyenest ábráztuk. A pontdiagram 'x' tengelyén az ELISA módszerrel kapott DON koncentrációkat (ppm), az 'y' tengelyen ugyanazon mintaszámokhoz tartozó, HPLC módszerrel mért DON koncentrációkat (ppm) tüntettük fel és hasonlítottuk össze. Az ábrán, az egyenes mellett a Pearson-korreláció eredményeként kapott r-értéket is feltüntettük, amely a kapcsolat jellegére világít rá a két módszer között. Az $r=0,8733$ érték alapján a két módszer mért adatai között erős, pozitív, szignifikáns kapcsolat tapasztalható. A 13a ábrán látható vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és

kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. Az ábrán ez mellett a "Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica' minták esetén kötelező 1.75 ppm határérték került jelölésre (magenta színű szaggatott vonal).

Az 13b ábrán, egy hőtésképen hasonlítottuk össze az ELISA és HPLC módszerrel mért minták eredményeit. Az eltérő színekhez és színmélységekhez (világos zöld tartománytól-pirosig) eltérő koncentrációs értékek társíthatók. A hőtékép melletti skála reprezentálja a színek/koncentrációk kapcsolatát. A világos zöld tartomány a 0-1.25 ppm-ig (határérték alatti értékek) terjed, a színek mélyülése a piros irányba a növekvő DON koncentrációkat (ppm) mutatja a minták esetén.

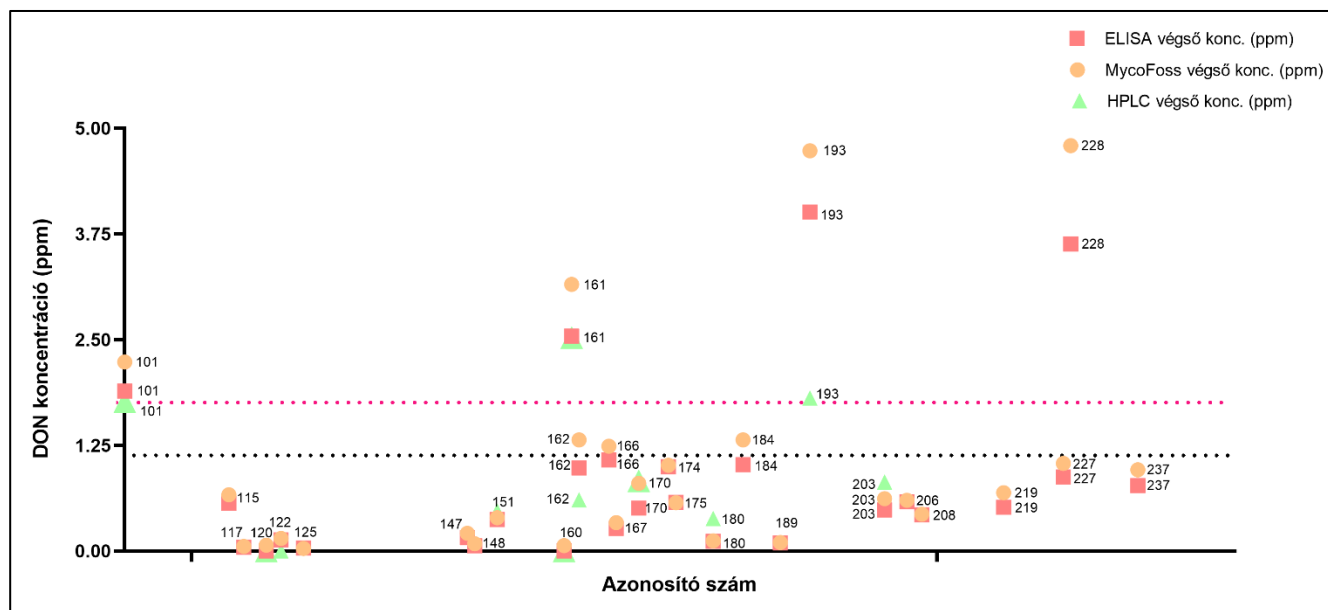
Az ELISA és a HPLC módszerekkel a kukorica minták értékeinek összehasonlításakor erős, pozitív korreláció volt megfigyelhető ($r = 0,8733$, $R^2 = 0.7626$, CI 95 % = 0.6861 – 9520, $S_{y.x} = 4.335$). A korrelációs elemzés során hasonlóan a fentebb említett eredményekhez (9a-b és 10a-b ábra) statisztikailag szignifikáns **** $p < 0,0001$ értéket kaptunk (13a ábra) annak ellenére, hogy itt tapasztaltuk a „legnagyobb eltérést” a mérések között (11a-12a-13a ábrák). A 13b ábrán látható hőtékép megmutatja az ELISA és HPLC mérések közötti hasonlóságot (adoot szín árnyalatának változásával) továbbá a színskála segít a negatív (zöld), közepesen szennyezett (barnás) vagy erősen szennyezett minták (piros) elkülönítésében.



14. ábra A mért kukorica minták DON-koncentrációjának ábrázolása.

A 14 ábrán az összes ELISA, MycoFoss HPLC mérés adatait ábrázoltuk. Az 'x'-tengelyen az azonosító számok, míg az 'y'-tengelyen a minták DON-koncentrációja (ppm) van feltüntetve. A mérések eredményeit különböző színű szimbólumok mutatják. Az ELISA-mérések eredményeit négyzet, a MycoFoss mérések eredményeit kör, végül a HPLC mérésekhez tartozó adatokat egy háromszög szimbolizálja. A grafikon rávilágít az egyes

mért adatok egybeesésére, a szimbólumok átfedésére. A 14. ábrán látható vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. Ez mellett a 'Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica' minták esetén kötelező 1.75 ppm határérték is jelölésre (magenta színű szaggatott vonal) került.



15. ábra A mért kukorica minták DON-koncentrációjának ábrázolása a 0.00-5.00 ppm közötti tartományban.

A 15 ábrán azon ELISA, MycoFoss HPLC mérés adatait ábráztuk, amelyek beleestek a 0.00-5.00 ppm tartományba. Az 'x'-tengelyen az azonosító számok, míg az 'y'-tengelyen a minták DON-koncentrációja (ppm) van feltüntetve. Hasonlóan a 14. ábrához, a mérések eredményeit különböző színű szimbólumok mutatják. Az ELISA-mérések eredményeit négyzet, a MycoFoss mérések eredményeit kör, végül a HPLC mérésekhez tartozó adatokat egy háromszög szimbolizálja. A grafikon rávilágít az egyes mért adatok egybeesésére, a szimbólumok átfedésére, azonban a kisebb tartománynak (0.00-5.00 ppm) köszönhetően az egyes mérési eredmények jobban elkülönülnek, mint a 14. ábrán. A 15. ábrán látható vízszintes fekete vonal a 'Feldolgozatlan gabonafélék, kivéve durumbuza, zab és kukorica' mintákra alkalmazandó 1.25 ppm határértéket jelöli. Ez mellett a 'Feldolgozatlan durumbuza, zab és kukorica' minták esetén kötelező 1.75 ppm határérték is jelölésre (magenta színű szaggatott vonal) került.

5. ÖSSZEFOGLALÁS, KITEKINTÉS

Napjainkban a fejlett országok élelmiszer kínálata mikotoxikológiai szempontból sokkal biztonságosabbnak tekinthető, mint amilyen a XX. század végén volt. Azonban továbbra is jelentős kihívások és teendők várnak ránk az élelmiszerlánc egészét illetően.

Fentiek miatt rendkívül fontos, hogy kellően (1) pontos, (2) egyszerű, (3) gyors és (4) költséghatékony mikotoxin analitikai eljárás álljon a szakma rendelkezésére. Sajnos azonban a fenti négy elvárás egyidejű teljesülése – mai ismereteink alapján - rendkívül nehézkes.

A felhasználóknak tehát fontos segíteni abban, hogy kellő információ legyen a birtokukban, legyenek tisztában az egyes DON analitikai módszerek előnyeivel és limitációival, megfelelő módszert válasszanak a megfelelő méréshez.

Célunk az elérhető módszerekkel, toxinmentes és feltételezhetően DON toxinnal szennyezett minták mérése során kapott adatok összehasonlító elemzése volt. Munkánk során három DON toxin mérésére alkalmas módszert, két immunkémiai (Toxi-Watch ELISA és MycoFoss™) és egy elválasztástechnikai (HPLC) módszert választottunk és hasonlítottunk össze, ugyanazon 35 kukoricaminta párhuzamos vizsgálata során.

Ahogy célkitűzéseink között megfogalmaztuk elengedhetetlen egy – kellő számú és mennyiségű, megfelelően előkészített mintát tartalmazó - mintabank létrehozása. Ezért a Dél-Magyarországi régióban 35 kukorica mintát gyűjtöttünk. A mintákat előkészítettük, részekre osztottuk és a mérés időpontjáig letároltuk. A méréseket 'vak teszt' formájában végeztük, a toxinszintek előzetesen nem voltak ismertek

A két kiválasztott immunkémiai módszerrel valamennyi (35) mintát két ismétlésben párhuzamosan mértük el. Az eredmények ismeretében került kiválasztásra az a 18 minta melynek HPLC vizsgálatát egy független labor végezte számunka.

Eredményeink alapján levonható következtetések:

- A MycoFoss, ELISA és a HPLC módszerekkel a kukorica minták értékeinek összehasonlításakor erős, pozitív korreláció volt megfigyelhető. Mindhárom módszer alkalmas DON toxin kukoricában történő meghatározására.
- A vizsgált minták ~30%-a tartalmazott határérték feletti mennyiségű DON toxint – pozitív minták).
- 11 db pozitív mintából 7db a határérték ötszörösét is meghaladta. Ezen minták eredményeiben nagyobb (de elfogadható mértékű) eltérés tapasztaltunk, melynek oka, hogy ezek az erősen szennyezett minták a kalibrációs görbe ellaposodó részére esnek, ahol – görbe jellegéből adódóan – nagyobb mérési bizonytalansággal kell számolnunk.
- A mérések során megfigyelhető tendencia, miszerint az immuntechnikák 'hajlamosak' false pozitív eredményeket adni, magyarázható azzal, hogy az alkalmazott monoklonális antitestek bizonyos esetekben nem csak a toxinokat, hanem annak származékait (33-Acetyl-Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol stb.) is detektálni tudja.

5.1 Módszerek alkalmazhatósága

Ahogy az eredmények jól mutatják; a DON toxin mennyiségi meghatározására - bizonyos keretek között - mindhárom módszer alkalmas. A mérések során szerzett tapasztalatok és az elérhető információk alapján igyekeztünk megfogalmazni a módszerek legfontosabb erősségeit és limitációit.

- HPLC
 - (+) referencia módszer, pontos, több toxin egyidejű mérésére alkalmas
 - (-) lassú, költséges, tudás- és latorigényes
- ELISA
 - (+) gyors – egyetlen mérésben akár 88 minta is mérhető, olcsó,
 - (-) egyetlen mikotoxin vizsgálata, latorigényes, komplikált mérés – operátori hiba
- MycoFoss™

(+) gyors, automatizált – nincsen operátori hiba, több mikotoxin párhuzamos vizsgálata, on-site mérési lehetőség

(-) új módszer, költséges készülék, limitált mátrixra érhető el jelenleg

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Czéh Árpád címzetes egyetemi docensnek tartozom köszönettel, a téma kijelölése, feldolgozása és a gyakorlati munka során nyújtott segítségért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Telek Viviennek, Dr. Bodó Kornéliának, Dr. Nagyéri Györgynek, valamint a Soft Flow Kft.-ben dolgozó minden munkatársnak, akik bármilyen formában hozzásegítettek a munkám sikeres elvégzéséhez.

Végül köszönetet mondok Dr. Armbruszt Simon ügyvezető úrnak, hogy lehetővé tette számomra a munkát a Soft Flow Kft.-nél.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Rahmani,A., Jinap,S. and Soleimany,F., 2009. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 202.
2. Bennett, J. W., Klich, M., & Mycotoxins, M. (2003). *Mycotoxins*. 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497>
3. Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
4. Liu,Y. and Wu,F., 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 118, 818
5. Reddy,L. and Bhoola,K., 2010. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. *Toxins*. (Basel) 2, 771.
6. Sobrova,P., Adam,V., Vasatkova, A., Beklova,M., Zeman,L., Kizek, R., 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol Sep*;3(3):94-9. doi: 10.2478/v10102-010-0019-x.
7. B.Tóth, Sz., 2014. Mikotoxinok kvantitatív és kvalitatív analízise élelmiszermintákban. Doktori (PhD) értekezés
8. Lamper, Cs., 2001. Hatékony módszerek Fusarium fajok trichotecén-vázis toxinjainak (DON, NIV), szteroid- és zsírsavprofiljának vizsgálatára és a gombafertőzöttség objektív meghatározására. Doktori (PhD) értekezés
9. Fülöp, A. 2012. Immunológiai Szemináriumok. Egyetemi jegyzet.
10. Hegedűs Gy., 2003. Enzimjelzéses Immunanalitikai (ELISA) rendszerek fejlesztése és alkalmazása. Doktori (PhD) értekezés
11. Barna-Vetro,I., Gyongyosi,A. and Solti,L., 1994. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of Fusarium T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 729.
12. Czeh,A., Torok,L., Torok,T., Siklodi,B., Lustyik,G. Development of competitive multiplexed microbead array technology for simultaneous detection of mycotoxins in food and feed products. ISAC XXIV International Congress, Budapest, Hungary, 2008. - Oral Presentation
13. Czeh,A., Mandy,F., Feher-Toth,S., Torok,L., Mike,Z., Koszegi,B. and Lustyik,G., 2012. A flow cytometry based competitive fluorescent microsphere immunoassay (CFIA) system for detecting up to six mycotoxins. *J. Immunol. Methods* 384, 71.
14. Peters,J., Bienenmann-Ploum,M., de,R.T. and Haasnoot,W., 2011. Development of a multiplex flow cytometric microsphere immunoassay for mycotoxins and evaluation of its application in feed. *Mycotoxin. Res* 27, 63.

15. Czeh, A., Schwartz, A., Mandy, F., Szoke, Z., Koszegi, B., Feher-Toth, S., Nagy, G., Jakso, P., Katona, R.L., Kemeny, A., Woth, G. and Lustyik, G., 2013. Comparison and evaluation of seven different bench-top flow cytometers with a modified six-plexed mycotoxin kit. *Cytometry A* 83, 1073.
16. FAO, 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO, Food and Nutrition Paper No. 81
17. Gilbert, J. and Anklam, E., 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends Anal. Chem.* 21.
18. Szabó B., Tóth B., Toldiné É., Varga M., Kovacs N., Varga J., Kocsubé S., Palágyi A., Bagi F., Budakov D.,. A new concept to secure food safety standards against *Fusarium* species and *Aspergillus flavus* and their toxins in maize. *Toxins*. 2018;10:372. doi: 10.3390/toxins10090372.
19. <https://www.romerlabs.com/>
20. <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/groups/whole-igg>
21. <https://www.fossanalytics.com/>