

# Búzalisztek Fusarium F-2 és T-2 toxin szennyeződésének gyors meghatározása automatizált enzimimmunanalitikai mérőrendszerrel

*Kerekes László*

Somogy megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás,  
Kaposvár

Érkezett: 1995. február 10.

A gabonafélék — de különösen a búza — a hazai ételmezésben igen fontos szerepet töltenek be és növekvő mértékben kerülnek állati takarmányozásra is. A szántóföldi termesztés viszonyai között a gabonafélék különböző, igen elterjedt mikroszkopikus gombák okozta fertőzésnek vannak kitéve. Ezek közül a fitopatogén Fusarium-gombafajok megfelelő körülmények között olyan másodlagos anyagcsere termékeket állítanak elő, melyek a magasabb rendű élőlényekre mérgező hatásúak [1].

A fuzáriumtoxinok közül a zearalenon (F-2 toxin) szerkezetileg béta-rezorcilsav-lakton, kevésbé toxikus, de erős ösztrogén hormon hatású. A trichotecén vázszerkezetű T-2 toxin súlyos tüneteket okozhat, a szervezet immun-rendszerét is károsítja.

A mikotoxinok mérésének hagyományos fizikai-kémiai módszerei (vékonyréteg-, folyadék- és gázkromatográfia) időigényes, többlépcsős előkészítést kívánó eljárások (extrahálás, bepárlás, tisztítás, elválasztás, azonosítás). Ezzel szemben az antigén-antitest reakción alapuló enzimjelzéses immuntechnika, az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) lényegesen gyorsabb, a mintakivonat elkészítése sokkal egyszerűbb, valamint egyidejűleg nagy számú minta vizsgálható és jól automatizálható [2]. Különösebb tisztítási, dúsítási műveletre általában nincs szükség, mivel a szennyező anyagok, valamint a mikotoxin kivonására használt szerves oldószer okozta nem specifikus gátlást a mintakivonat megfelelő hígításával el lehet kerülni [3].

A fuzáriumtoxinok gabonából történő kinyerésére általában metanol—víz vagy acetonitril—víz oldószer elegyet használnak. Az utóbbival az extrahálás jobb hatásfokú, különösen, ha az emulzióképződés elkerülésére 0,5 %-os kálium-klorid oldatot és a közeg alacsony pH-jának biztosítására 6 %-os kénsavat is adagolnak az extraháló elegyhez [3, 6].

A vetélkedés elvén alapuló (direkt kompetitív) ELISA eljárások közül két változat terjedt el a mikotoxinok meghatározására aszerint, hogy az immunkémiai reakcióban résztvevő haptén-antitest bármelyik tagját kötik előzetesen a szilárd hordozó felületéhez. A toxinszármazék (oxim vagy hemiszukcinát), illetve a monoklonális antitest jelzésére magas átviteli számmal rendelkező tormaperoxidáz enzimet használnak, mivel így igen kis mennyiségű anyagok mérhetőek. A fázis elválasztások után az aktív enzim-konjugátum aktivitását - ami fordítottan arányos a mérendő toxin koncentrációjával - arra alkalmas szubsztrát / kromogén (általában hidrogénperoxid / tetrametil-benzidin) felhasználásával fotometriásan mérik [3, 4, 5].

A mikotoxinok ELISA technikán alapuló mérése eddig a hazai gyakorlatban nem terjedt el széleskörűen, mivel nem állt rendelkezésre jó minőségű, a drága nyugati gyártmányoknál jobban hozzáférhető, olcsóbb magyar előállítású reagenskészlet (kit).

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban (Gödöllő) gabonafélék valamint takarmányok **F-2** és **T-2** toxin tartalmának kvantitatív és/vagy kvalitatív mérésére direkt, kompetitív ELISA tesztrendszerrel dolgoztak ki, amihez már előzetesen kifejlesztett érzékeny és specifikus monoklonális antitestet használtak [6, 7].

Közleményünkben célul tűztük ki a fenti hazai kifejlesztésű fuzáriumtoxin ELISA eljárások tesztelését, adaptálását automatikus immun-analitikai mérőrendszerre, valamint alkalmas számítógépes kiértékelő módszer kidolgozását.

## Anyag és módszer

### Reagensok

- a/ Reakciópuffer: konyhasótartalmú foszfát-puffer (PBS/Tween-20 oldat).
- b/ Szubsztrát puffer: urea-peroxid tartalmú citromsav-foszfát puffer.
- c/ **F-2** toxin standardok 10 % etilalkohol / PBS-puffer oldatban.
- d/ **T-2** toxin standardok 4 % acetonitril / PBS-puffer oldatban.
- e/ Peroxidáz enzimmel jelzett **F-2** ill. **T-2** toxin oldat (**F-2**-oxim HRP és **T-2**-HS-HRP konjugátum).
- f/ Kromogén-oldat (tetrametil-benzidin, TMB).
- g/ Leállító (stop) oldat: 3 mol/l kénsav.

### Extraháló oldat

Acetonitril - 0,5 %-os kálium-klorid oldat - 6 %-os kénsav (89:10:1).

## Mikrotitráló lemez

12\*8 db polisztirol mikrokvettát tartalmazó lemez felületén monoklonális anti F-2 ill. anti T-2 antitest van kötve.

## Készülék

ELISA-analizátor: Auto-EIA (II), típus: FP-1300, gyártó: Labsystems, Helsinki (1. táblázat).

### 1. táblázat: Az AUTO-EIA (II) automatikus immunanalitikai mérőrendszer néhány technikai adatai

Típus: FP-1300 Gyártó: LABSYSTEMS (Helsinki)	Technikai jellemzők
Optikai rendszer	Vertikális fotométer, 8 db színszűrő: 340-690 nm Fényforrás: kvarc-halogén lámpa (8V/50W) Lineáris tartomány: 0,0-2,0 A max. dev. < 2%
Optikai fényút/térfogat	3mm = 100 µl, 6 mm = 200 µl, 9 mm = 300 µl
Kapacitás	96 mikrokvetta / 1 mikrotiterlemez
Folyadékadagoló rendszer	21 db on-line reagens csatorna Reagens adagolás: perisztaltikus pumpával, térfogat: 10-300 µl Minta adagolás: Hamilton-fecskendővel térfogat: 1-300 µl (CV < 2%).
Vákuum-pumpa	Kapacitás: 100 ml/40 s
Mosó-pumpa	2 db csatorna
Inkubációs rendszer	Hőmérséklet: 57 °C, 40 °C, szobai
Tömeg	18 kg

Sikrázó gép, típus: 2125, MTA KUTESZ, Budapest.

Block Therm, típus: 656, MTA KUTESZ, Budapest.

## Búzaliszt minták előkészítése az ELISA-hoz

A minta előkészítés során a különböző kiőrlésű, egyneműsített búzalisztból (kenyér-, finom-, rétesliszt és búzadara) 5 g-ot csiszolt dugós Erlenmeyer-lombikba töltöttünk, 20 ml extraháló oldattal 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten rázattuk, majd az elegyet ülepedni hagytuk. A felülúszóból a zearalenon (F-2 toxin) meghatározásnál a reakciópufferrel 1:10 hígítást készítettünk. A T-2 toxin vizsgálatánál 0,4 ml-t reakciócsőbe pipettáztunk és 40-50 °C-on nitrogénáramban bepároltuk. A maradékot 0,1 ml extraháló oldatban feloldottuk és 0,9 ml reakciópuffert adtunk hozzá

(hígítás: 1:10), majd jól összeráztuk. Az így előkészített, hígított minta kivonatokat közvetlenül használtuk fel az ELISA-teszthez.

Az **F-2** és **T-2** toxinok visszanyerési vizsgálata mesterségesen szennyezett búzalisztból 5 g toxinmentes búzaliszt 50 - 400 ng/g tartományban **F-2** toxin benzolos oldatát, 100 - 2000 ng/g tartományban **T-2** toxin kloroformos oldatát adtuk, majd szobahőmérsékleten egy éjszakán át hagytuk beszáradni. Mivel a zearalenon UV-fényben 317 nm-nél jól abszorbeáló toxin, ezért benzolos oldatának koncentrációját spektrofotometriás módszerrel ellenőriztük [8]. A trichotecén toxin standard munkaidőjét mikromérlegben bemért **T-2** toxin törzsoldatból készítettük megfelelő hígítással.

A mesterségesen szennyezett búzaliszt mintákat az előzőek szerint extraháltuk, majd 1:25 vagy 1:50 hígítást készítettünk az ELISA-hoz.

### **Direkt kompetitív ELISA**

Az eljárás során az eredetileg manuális kivitelezésre leírt módszert adaptáltuk az Auto-EIA(II) mérőrendszerre megfelelő számítógépes programok kidolgozásával. Az analizátort számítógép vezérli és felügyeli, az egyes műveletek gondosan szinkronizáltak. Így kiküszöböltük a standard, a minta és reagens oldatok kézi pipettázásából, a mikrotiter lemez mosási műveletek elégtelenségéből származó hibákat.

Az enzimimmun-vizsgálathoz az előkészített tiszta, hígított mintakivonatot használtuk. A vizsgálatra szobahőmérsékleten **F-2** és **T-2** toxin elleni specifikus antitesttel előzetesen bevont mikrotiterlemezen került sor. Az analizátorba helyezett lemezt először vájulatonként 200-200 µl 0,02 % Tween-20 tartalmú desztillált vízzel gépi úton kétszer mostuk, majd szárazra szívattuk. Ezután a toxin standard oldatokból, a hígított mintakivonatokból 50-50 µl-t juttattunk párhuzamosan a lemezre, majd minden vájulatba kiadagoltunk 50-50 µl konjugátumot. Rövid gépi rázatás után 1 órát inkubáltuk. Az ismert toxin tartalmú standard és a vizsgált ismeretlen toxin koncentrációjú oldatokban lévő jelzetlen toxin a peroxidáz enzimmel jelzett **F-2** és **T-2** konjugátummal egyidőben versengenek az antitest korlátozott számú kötőhelyeiért. A kompetitív reakció végén a kötésben maradt jelzett toxin fordítottan arányos a standard oldat sorozatban, illetve a mintakivonatokban lévő toxin mennyiségével. A nem kötődött reagenseket (szabad fázis) szívattással és ötszöri gépi mosással távolítottuk el. Tekintettel a mosási műveletek kritikus voltára, az úgynevezett "soak" (áztató) technikát alkalmaztuk, hogy a hamis immunválasz teljesen elkerülhető legyen.

Az előkészített szubsztrát / kromogén oldatból 150-150 µl-t adagoltunk minden mikroküvetába, és szobahőfokon 15 percig inkubáltuk a rendszert. Az enzimreakciót 50-50 µl stop oldat hozzáadásával állítottuk le, így a kialakult kék reakciótermék színe sárgára változott. A színintenzitást 450 nm-es színszűrő alkalmazásával vertikális fotometrálassal mérte az analizátor. Az eredmények értékelését a standard oldatokkal felvett kalibrációs görbék alapján számítógéppel végeztük.

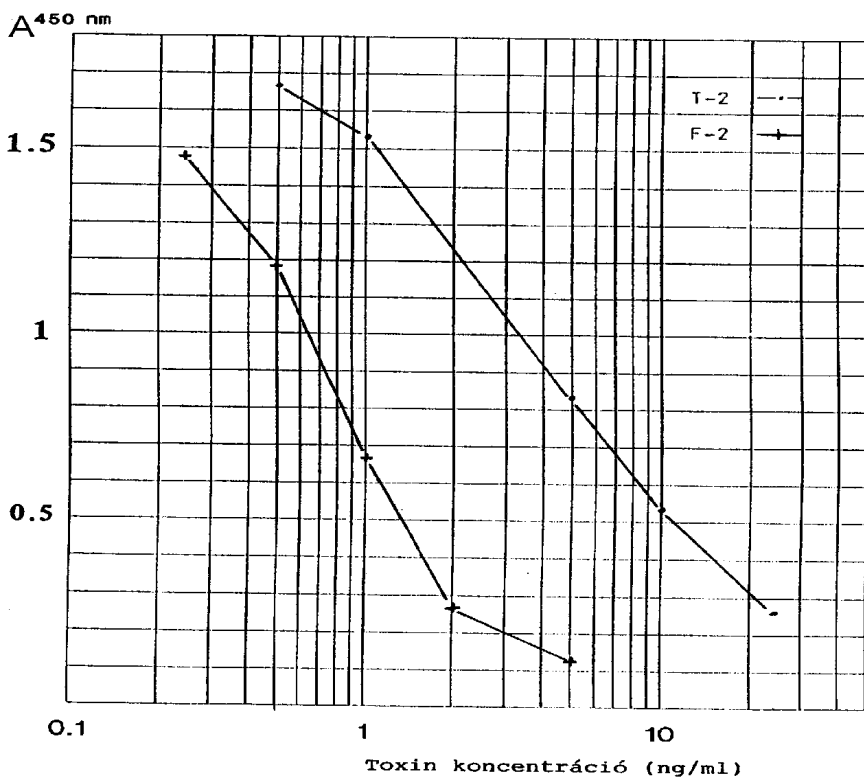
## Eredmények és értékelés

A kalibrációs görbék mérési pontjait párhuzamosban minden méréssorozat mikrotiter lemezére vonatkozóan felvettük. Az 1. ábra az F-2 és T-2 toxin standardokkal mért reprezentatív kalibrációs görbéket ábrázolja. Az abszorbanciát lineáris, a toxin koncentrációt logaritmikus (log 10) skálán vettük fel. Látható, hogy az abszorbancia értékek és a toxin-koncentráció között a teljes mérési tartományban (F-2: 0,25-5,0 ng/ml; T-2:0,5-25,0 ng/ml) nem lineáris az összefüggés. Lineárisnak csak a standard görbék közbülső része (F-2: 0,5-2,0 ng/ml; T-2:1,0-10,0 ng/ml) mondható. A hasonló lefutású görbéken a koncentráció-tartomány kezdeti és befejező szakaszán jellegzetes, kisebb-nagyobb törés található, azaz megváltozik a görbék meredeksége. Így ezek környezetében a mért abszorbancia szerint a koncentráció leolvasás bizonytalan, esetenként nagy hibával történhet. Az x, y adatkárokat jelentő pontokhoz a görbe-illesztés grafikusán nehéz. A nemlineáris regressziós függvények közül tapasztalatunk szerint csak a harmadfokú polinom számítógépes illesztése jöhetne szóba, azonban ennek alkalmazását különböző problémák (maximum, ill. minimum kialakulása, a becslések konfidenciahatárainak nem megbízható előrejelzése stb.) nehezítik. Ezért a grafikus értékelésnél a "görbe" csak a mérési pontok összekötésével vehető fel.

Biometriai ismeretek alapján ezek a szigmoid jellegű görbék az abszorbancia-koncentráció adatkárook megfelelő transzformációja útján linearizálhatók, azaz lehetővé válik az egyenes illesztése lineáris regresszióanalízissel. A számításnál a mért abszorbanciát a maximális abszorbancia értéket adó "0" standardhoz viszonyítva adjuk meg:

$$B/B_0 = \frac{\text{a toxin jelenlétében mért abszorbancia}}{\text{0 toxinkoncentrációnál mért abszorbancia}}$$

A B/B<sub>0</sub>, mint válasz változó logit, probit, arc sin transzformációjával az említett görbék linearizálhatók. Ezen függvények közül a legjobban alkalmazható a logit, azaz a "logit-log" transzformáció [9].



**1. ábra:** Fusarium T-2 és F-2 toxin kalibrációs görbéje

A logit (Y) függvény definíciója:

$$\text{Logit}(Y) = \ln Y/(1-Y) \quad (0 < Y < 1)$$

ahol:  $Y = B/B_0$ .

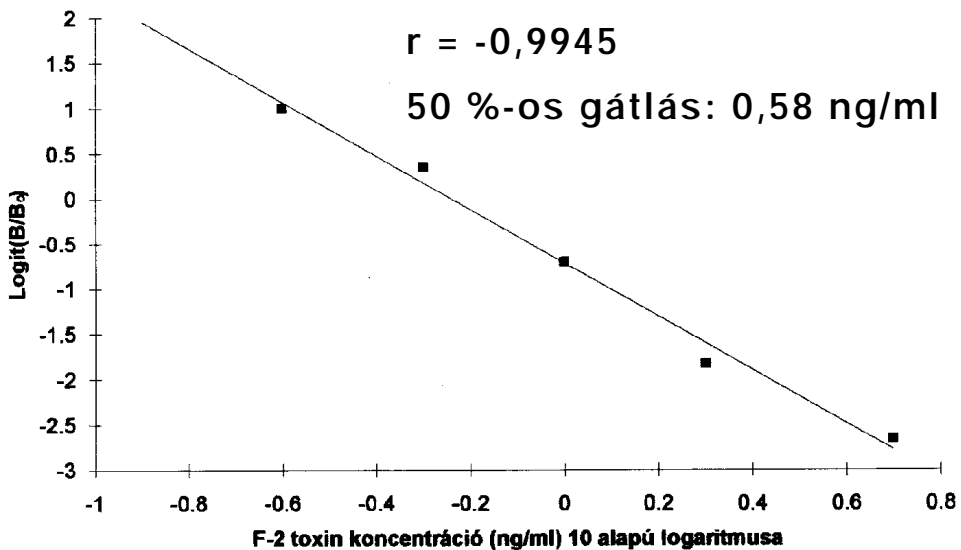
Az ELISA koncentráció - abszorbancia regressziós kapcsolat a következő egyenes egyenletével jellemezhető:

$$y = \text{logit}(Y) = b \cdot \log \text{koncentráció} + \text{konst.}$$

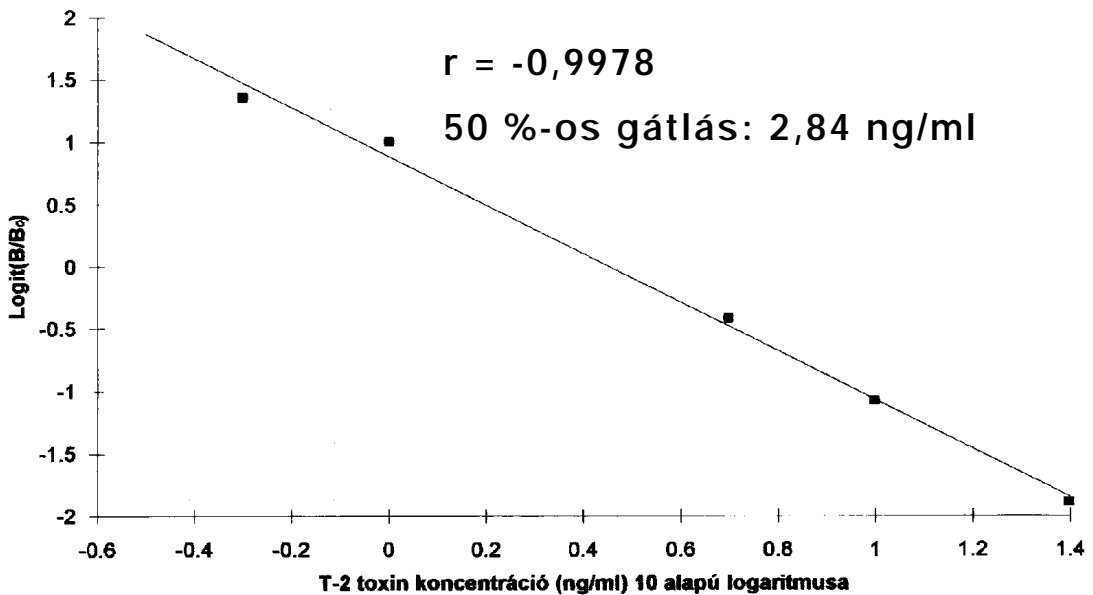
A 2. és 3. ábra szerint ez a lineáris összefüggés a vizsgált koncentráció tartományban igen szoros, a korrelációs koefficiens abszolút értéke:  $|r| > 0,99$ ,  $P=0,1\%$  szinten szignifikáns.

Az alkalmazott monoklonális antitestek érzékenységét jellemző 50 %-os gátlás koncentráció értéke: F-2 toxinnál 0,58 ng/ml, T-2 toxinnál 2,84 ng/ml.

A minták toxintartalmának kiértékelésénél az adatok transzformációját, a regressziós egyenes meghatározását, valamint a koncentráció számítását (intervallum felező iterációs eljárással) a célnak megfelelően kidolgozott számítógépes programmal végeztük. A reprodukálhatóság meghatározására a méréseken belüli (within assay) és a mérések közötti (inter assay) szórásokat vizsgáltuk a különböző standard-koncentrációk szerint (2. táblázat).



**2. ábra:** Fusarium T-2 toxin kalibrációs egyenese (logit-log transzformáció)



**3. ábra:** Fusarium F-2 toxin kalibrációs egyenese (logit-log transzformáció)

Megállapítottuk, y az átlagos variációs koefficiens (CV) 10 %-on belül van, ami jó egyezést mutatott a szakirodalmi adatokkal [3, 6]. A pontosság vizsgálatánál **F-2** toxinnal 50 - 400 ng/g, **T-2** toxinnal 100 - 2000 ng/g tartományban mesterségesen szennyezett búzaliszt toxintartalmát határoztuk meg. A visszanyerési kísérleteknél mért értékeket és a visszanyerési százalékot a 3. táblázat foglalja össze.

Az **F-2** toxinnal szennyezett búzaliszt mintákból a hozzáadott toxint minden koncentráció szinten gyakorlatilag 100 % körül visszanyertük. A **T-2** toxin visszanyerési eredmények már nagyobb ingadozást mutattak.

A 100 - 500 ng/g tartományban az átlagos visszanyerés 76 %-nak, míg a 100 - 2000 ng/g intervallumban 92 %-nak adódott.

**2. táblázat: Az F-2 és T-2 toxin standard görbék szórásának vizsgálata (N = 9 ill. 7)**

Fuzáriumtoxin standard konc. (ng/ml)	Variációs koefficiens (CV), %	
	mérésen belüli	mérések közötti
<b>F-2</b> 0,25	5,54	9,36
0,50	5,81	13,04
1,00	6,62	5,53
2,00	3,43	5,14
5,00	4,75	3,08
Átlag:	5,23	7,23
<b>T-2</b> 0,50	4,26	7,15
1,00	11,93	8,24
5,00	7,01	9,08
10,00	5,64	5,81
25,00	6,23	11,83
Átlag:	7,01	8,42

**3. táblázat: Az F-2 és T-2 toxin visszanyerési vizsgálata mesterségesen szennyezett búzaliszt mintákból**

No.	Hozzáadott (ng/g)		Mért (ng/g)		Visszanyerés (%)	
	T-2	F-2	F-2	T-2	F-2	T-2
1.	50	100	52,0	73,9	104,0	73,9
2.	100	300	102,5	200,5	102,5	66,8
3.	250	500	260,0	440,5	104,0	88,1
4.	400	1000	372,0	1109,0	93,0	110,9
5.	-	2000	-	2375,5	-	118,8
Átlagos visszanyerés (%):					100,98	91,70
Szórás:					5,30	22,65
Variációs koefficiens (C, V%):					5,25	24,70

Az alkalmazott, 10 % alatti acetonitril tartalmu mintakivonatoknál a szerves oldószer és a mintamátrix nem specifikus gátlásban megnyilvánuló zavaró hatását nem tapasztaltuk.

A legkisebb kimutatható toxin mennyiség - ami még a 0 értéktől szignifikánsan eltér - F-2 toxinnál 10 ng/g (1:10 hígításnál) és 25 ng/g (1:25 hígításnál); a T-2 toxinnál pedig 50 ng/g.



A különböző búzaliszt típusokat képviselő, összesen 47 db mintát vizsgálva megállapítottuk, hogy az előzőekben leírt ELISA módszert alkalmazva kimutatható mennyiségben zearalenont (**F-2** toxint) ill. **T-2** toxint nem tartalmaztak, vagyis ezek értéke minden esetben a 10, ill. 50 ng/g kimutatási határ alatt volt.

A kísérleti tapasztalatok és a mérési eredmények alapján megállapítható, hogy a hazai kutatólaboratóriumban kifejlesztett TOXIKLON Zearalenon (**F-2**) és **T-2** toxin ELISA tesztek alkalmasak búzalisztek és más gabonafélék fuzáriumtoxin szennyezettségének gyors meghatározására.

A módszerek jól adaptálhatók automata ELISA analizátorra, ami nagy számú minta szűrővizsgálatát teszi lehetővé. Az automata mérőrendszer és a kidolgozott számítógépes programok nagy mértékben megkönnyítik a vizsgálatok elvégzését és az eredmények kiértékelését. Búzalisztek Fusarium **F-2** és **T-2** toxin szennyeződésének gyors meghatározása automatizált enzimimmún-analitikai mérőrendszerrel lehetséges.

## Irodalom

- [1] Kovács F., Ványi A.: Penészgombák - gombatoxinok - élelmiszer minőség - közegészségügy. Élelmezési Ipar **47** (1993), 362-365.
- [2] Ronald H.: Immunoassay Automation. Journal of Clinical Immunoassay **14** (1991) 2, 60.
- [3] Ramakrishna, N. et al.: Monoclonal Antibody-Based Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay of Aflatoxin B1, **T-2** Toxin and Ochratoxin A in Barley. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73** (1990), 71-76.
- [4] Usleber, E. et al.: Studies on the Application of Enzyme Immunoassays for the Fusarium Mycotoxins Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol and Zearalenone. J. Vet. Med. B. **39** (1992) 617-627.
- [5] Hack, R., et al.: A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of **T-2** toxin at picogram levels. Letters Applied Microbiology **9** (1989), 133-135.
- [6] Barna-Vetró I., Gyöngyösi-Horváth A., Szabó E., Wölfling A., Solti L.: Reagenskészletek gabonaminták Fusarium **T-2** és **F-2** toxintartalmának mérésére. Növényvédelem **29** (1993) 5, 225-233.
- [7] Gyöngyösi-Horváth A., Barna-Vetró I., Solti L.: Monoklonális ellenanyag előállítása Fusarium **T-2** toxin ELISA vizsgálatához. Állattenyésztés és Takarmányozás **41** (1992) 4, 329-336.
- [8] Téren J., Draskovics I., Novák E. K. (szerk.): Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. MÉTE, 1990. pp. 276.
- [9] Szabó A., Morvay J.: Analitikai módszerek a klinikai kémiában. A kémia újabb eredményei 57. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1984. pp. 193.

# **Búzalisztek Fusarium F-2 és T-2 toxin szennyeződésének gyors meghatározása automatizált enzimimmunanalitikai mérőrendszerrel**

*Kerekes László*

A szerző búzalisztek zearalenon (F-2) és T-2 toxin szennyeződésének gyors meghatározására hazai kifejlesztésű direkt, kompetitív ELISA módszereket adaptált automatikus, enzimimmunanalitikai mérőrendszerre (AUTO-EIA/II/, Labsystems) alkalmas számítógépes programok kidolgozásával. A TOXIKLON-tesztek nagy számú minta szűrővizsgálatára alkalmasak. A toxin koncentráció meghatározásánál a szokásos grafikus kiértékelés helyett - az adatok "logit-log" transzformálását követő - számítógépes lineáris regresszióanalízist és iterációs eljárást alkalmazott.

## **Quick Determination of Fusarium F-2 and T-2 Toxin Contaminants in Wheat Flours by Automatic Enzyme Immune-Analytical Measuring System**

*Kerekes, L.*

Direct competitive ELISA methods developed in Hungary were adapted by the author for the fast determination of zearalenon (F-2) and T-2 toxin contamination of wheat flours by elaborating computerized programs applicable to automatic, enzyme immune-analytical measuring system (AUTO-EIA /II/, Labsystems). TOXIKLON tests are useful for the screening of large sample numbers. Instead the regular graphic evaluation, a computerized linear regression analysis and iterative procedure was used for the determination of concentration of toxins, following the "logit-log" transformation of data.

## **Schnellbestimmung der Fusarium F-2 und T-2 Toxine in Weizenmehlen mit einem enzymimmunanalytischen Meßsystem**

*Kerekes, L.*

Verfasser setzte einheimisch entwickelte direkt kompetitive ELISA-Methoden zur Schnellbestimmung von Zearalenon F-2 und T-2 Toxin in Weizenmehlen ein, die dem automatischen, enzymimmunanalytischen Meßsystem (AUTO-EIA/II/, Labsystems) mit geeigneten Rechnerprogrammen angepaßt wurden. Die TOXIKLON-Testverfahren sind bei großer Probenzahl für die Screening-Untersuchung geeignet. Bei der Bestimmung der Toxin-Konzentration wurde anstelle der üblichen graphischen Auswertung die computerisierte lineare Regressionsanalyse und das Iterationsverfahren angewandt, nachdem die Daten einer "Lagit-log" Transformation unterworfen wurden.