

BIOSENZORY PRO STANOVENÍ MYKOTOXINŮ

¹Miroslav POHANKA, ^{2,3}Daniel JUN, ^{2,3}Kamil KUČA

¹Ústřední vojenský zdravotní ústav, Centrum biologické ochrany, Těchonín

²Univerzita obrany, Centrum pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

³Univerzita obrany, katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

Mykotoxiny jsou jedovaté sekundární metabolity produkované některými druhy hub. Mohou být přítomny v některých zaplísněných potravinách, není však možno vyloučit zneužití mykotoxinů v rámci teroristických aktivit. Včasná detekce a identifikace mykotoxinů hraje důležitou roli v ochraně před těmito látkami. Pro tyto účely bylo v minulosti vytvořeno několik komerčních aplikací metod, jako je HPLC nebo ELISA. Nicméně citlivá metoda využívající jednoduché přenosné zařízení s nízkými pořizovacími a provozními náklady stále není běžně dostupná. Biosenzory se zdají být vhodnou analytickou aplikací splňující vložena očekávání. V tomto souhrnném článku jsou popsány již existující biosenzory, jako jsou fluorimetrické array nebo SPR, spolu s těmi pro budoucnost perspektivními, jako jsou elektrochemické nebo piezoelektrické.

Klíčová slova: Biosenzor; Imunosenzor; Mykotoxin.

Biosensors for Mycotoxins Assay

Summary

Mycotoxins are toxic fungal metabolites that can primary occur in contaminated food commodities. On the other side we can not exclude the risk of mycotoxins misuse for bioterrorist purposes. The ability of timely detection and identification of mycotoxins is one of the main tasks in protection activities. Several commercial methods for mycotoxins assays such as HPLC and/or ELISA were described. Nevertheless a sensitive method, using a simple, portable, and low cost device, has been still missing. Biosensors seem to be convenient methods for mycotoxin assay that fulfill noticed expectancies. In this article the existing biosensors such as fluorometric arrays or SPR biosensors likewise the promising ones such as electrochemical and piezoelectric based biosensors are described.

Key words: Biosensor; Immunosensor; Mycotoxin.

Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované mikroskopickými (*Micromycetes*), resp. makroskopickými (*Macromycetes*) houbami, které jsou schopny vyvolat jak u lidí, tak u teplokrevných živočichů toxické projevy – mykotoxikózu. Celkem je známa široká skupina mykotoxinů (asi 300), z nichž ovšem jsou prakticky významné jen některé. Mezi nejdůležitější patří skupina aflatoxinů (aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂ produkované plísní *Aspergillus flavus*), ochratoxinů (produkované rody *Aspergillus* a *Penicillium*; nejtoxičtější zástupce je ochratoxin A), tremorogenních mykotoxinů (produkované některými kmeny rodu *Penicillium*) a trichothecenů (produkované plísněmi rodu *Fusarium*, nejvýznamnějšími toxiny jsou T2 toxin, nivalenol a deoxyniva-

lenol). Mykotoxiny představují významné riziko při zpracování některých zemědělských komodit. Rovněž možnost zneužití mykotoxinů pro teroristické účely není zanedbatelná (1). Schopnost včasného stanovení představuje významný faktor v ochraně před těmito toxickými látkami. V tomto směru představují biosenzory významnou alternativu (13).

V současné době jsou pro praktické stanovení mykotoxinů používány chromatografické metody, příp. imunochemické metody využívající rekogniční schopnosti protilátek. Co se týče chromatografických metod, kromě běžně používaných chromatografií jako je tenkovrstvá nebo gelová, se stále více prosazuje afinitní (převážně imunoafinitní) chromatografie (18). Jako matrice nemusí sloužit pouze protilátka, běžné jsou také syntetické receptory (7). Specifické mohou být i některé organické polyme-

ry (tzv. molecularly imprinted polymers) ve vhodné konformaci, jak bylo např. publikováno pro ochratoxin A (9, 16). Chromatografii lze úspěšně spojit také s hmotnostní spektroskopií (12). Značnou nevýhodou většiny chromatografických metod je dlouhá doba analýzy. Kvalitnější zařízení jako HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) sice díky vyššímu tlaku zkracují dobu analýzy, na druhou stranu je však cena takovýchto zařízení značně vysoká. V metodách založených na protilátkách jsou komerčně nejhojněji dodávané ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) kity. Tyto kity jsou dodávány širokou škálou výrobců (R-biopharm, Helica, Phone Diagnostix, International Diagnostic Systems Corp., Diffchamb, Neogen, Tepnel, Tome Laboratories, ELISA-technologies aj.), kteří jsou na tyto produkty dlouhodobě zavedeni. Například *MycoMonitor Total Aflatoxin Assay* od firmy Helica je kompetitivní ELISA vhodná pro detekci aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂ extrahovaných 70% methanolem z některých zemědělských komodit. Cena ELISA kitů a zařízení pro jejich vyhodnocování je nižší než u chromatografických zařízení, na druhou stranu chromatografická zařízení vykazují nižší limity detekce. Hlavní předností metody ELISA je možnost současného stanovení velkého množství vzorků (běžné mikrotitrační destičky obsahují 96 jamek, tzn. 96 testovaných vzorků včetně pozitivních a negativních kontrol). Značnou nevýhodou metody ELISA je nemožnost, resp. obtížnost jejího použití v kontinuální analýze. Možným přístupem pro ochranu proti mykotoxinům je i sledování kritického výskytu hub, které je produkují (8).

Možnosti biosenzorů

Biosenzory jsou velice perspektivní zařízení pro stanovení jak mykotoxinů tak i jejich mikroskopických producentů (13). Díky imunogenitě mykotoxinů jsou vhodné a také v drtivé většině používané protilátky nebo antigen v kompetitivním uspořádání jako biorekogniční složka biosenzoru. Děleno podle fyzikálně-chemického převodníku je pro konstrukci biosenzoru ke stanovení mykotoxinů vhodná většina běžně používaných převodníků. Napojení enzymové značky, případně fluorescenční značky (při fluorometrickém měření lze využít i fluorescenci vlastních mykotoxinů), na protilátku jsou léty zavedené postupy užívané v imunochemických metodách a jejich využití pro elektrochemické, resp.

optické biosenzory je nezastupitelné. Elektrochemické biosenzory jsou vysoce citlivá zařízení, která mohou být úspěšně použita pro imuno-stanovení toxických látek. V tomto směru převažují potenciomrické LAPS (Light Addressable Potentiometric Sensor) a amperometrické biosenzory. LAPS biosenzor byl např. použit pro stanovení stafylokokového enterotoxinu B s limitem detekce 5 pg/ml (5), nicméně však tyto biosenzory nebyly doposud ve větším měřítku pro stanovení mykotoxinů testovány. Použitelné jsou rovněž i fyzikálně-chemické převodníky umožňující přímé a nezačtené (label-free) stanovení: SPR (Surface Plasmon Resonance) a piezoelektrické QCM (Quartz Crystal Microbalance) jsou nejběžnějšími zástupci této skupiny. Velkou výhodou SPR a piezoelektrických biosenzorů je okamžitá odezva při výskytu analytu (mykotoxinu) a možnost nejjednoduššího uspořádání: imobilizovaná protilátka na povrchu senzoru jako biorekogniční prvek přímo interaguje s mykotoxinem.

Surface Plasmon Resonance Biosenzory

SPR využívá faktu, že při určitém úhlu dopadu světla na povrch tenké kovové vrstvy (zlatý film) vzniká zřetelná vlna (evanescent wave) elektromagnetické povahy prostupující přes kovovou vrstvu. Na film se z vnější strany chemicky navazuje specifická protilátka, která váže mykotoxin, nebo se navazuje mykotoxin a ten následně kompetuje s mykotoxinem v analytu o přidanou protilátku. Druhá možnost je nevýhodná kvůli vyšší spotřebě drahých protilátek. Vazba protilátky se projeví změnou úhlu lomu a intenzitou odraženého světla. Výrobci SPR zařízení udávají nejmenší detekovatelnou molekulovou hmotnost analytu 10 kDa. Pokud by hmotnost stanovovaného mykotoxinu měla být nižší, je třeba použít právě nákladnější kompetitivní uspořádání. Molekulová hmotnost protilátek (IgG 160 kDa, IgM 900 kDa) je dostatečná pro vznik silného signálu. Nejčastěji užívané jsou 2 typy SPR: Biacore od firmy Biacore AB a Spreeta od Texas Instruments. Limitujícím faktorem pro využití SPR biosenzorů je cena, která se řádově pohybuje na stejné výši jako cena chromatografických aparatur. SPS biosenzor byl vyvinut pro aflatoxin B₁ (3). Autoři zvolili kompetitivní uspořádání, přičemž konjugát aflatoxin B₁ – bovinní albumin, soutěžil s volným aflatoxinem B₁ ve vzorku o paratop na poly-

klonální protilátce. Limit detekce pro tuto analýzu byl 3 ng/ml. Obdobný přístup byl zvolen pro detekci aflatoxinu B₁, zearalenonu, ochratoxinu A, deoxynivalenolu a fumosinu (4) s použitím monoklonálních protilátek.

Piezoelektrické biosenzory

Piezoelektrické biosenzory jsou založeny na aplikaci piezoelektrického jevu, který se projevuje u některých anizotropních krystalů (krystaly bez centra symetrie). Nejběžnějším je právě křemen (quartz). Tyto krystaly při mechanickém namáhání reagují tvorbou orientovaného dipólu. Jev funguje i v obráceném smyslu, mechanická deformace může být způsobena přivedením elektrického napětí. Při přivedení střídavého napětí začíná krystal oscilovat. Dojde-li k navázání jakékoli látky na povrch krystalu, krystal sníží svoji oscilační frekvenci a opačně. Tohoto jednoduchého principu využil Shons v sedmdesátých letech 20. století ke stanovení albuminu (15). Dnešní běžně dostupné čisté QCM vhodné ke konstrukci biosenzoru mají dvě zlaté elektrody a základní frekvenci kmitání 10 Mhz, možné je však koupit i senzory s dvojnásobnou či poloviční základní frekvencí. Citlivost 10 Mhz senzoru je 3 ng/Hz, přičemž i levnější frekvenční čítače jsou schopny zaznamenat rozdíl minimálně 1 Hz. Stejně jako SPR, tak i QCM mohou pracovat v různých módech, přičemž pro stanovení mykotoxinů je nejjednodušší a pravděpodobně nejvhodnější přímá detekce, kdy je na povrch biosenzoru imobilizována protilátka.

Optické biosenzory

Optické biosenzory pro detekci mykotoxinů využívající protilátky nesoucí fluorescenční značku patří mezi často používané. Tyto biosenzory bývají v uspořádání array, kdy na vhodné destičce je navázáno i velké množství různých antigenů (mykotoxinů). Výhodou je možnost multikanálového měření, kdy může být současně měřeno více vzorků, příp. lze stanovit současně více druhů mykotoxinů a vzájemně je rozlišit během jediného měřicího cyklu. V tomto parametru mohou fluorescenční array biosenzory konkurovat metodě ELISA. Zároveň však přebírají i některé nevýhody, které jsou pro tuto metodu typické, obzvláště technická obtížnost

automatického kontinuálního monitoringu. Pro vyhodnocení intenzity emitovaného záření u miniaturizovaných zařízení může posloužit optický CCD snímač propojený díky vhodnému software do počítače. Jeden z takovýchto biosenzorů byl schopen simultánní detekce tří analytů (17): ricinu, stafylokokového enterotoxinu B a F₁-antigenu z mikroorganismu *Yersinia pestis*. Protilátky proti uvedeným analytům byly imobilizovány na povrch jamek skleněné destičky. Stanovení bylo sendvičové – jako próba posloužila Cy₅ značená protilátka specifická proti jednomu z uvedených analytů. Nejnižšího limitu detekce bylo dosaženo pro stafylokokový enterotoxin B: 5 ng/ml. Škála aflatoxinů byla detekována automatizovaným fluorometrickým biosenzorem již od 0,1 ppb (2). Tento biosenzor bylo možno použít opakovaně i stokrát. Fluorometrický array biosenzor byl testován pro současné stanovení dvanácti vzorků včetně mykotoxinu fumonisinu a byl publikován v roce 2003 (6). Uspořádání použité pro tento biosenzor bylo sendvičové nebo kompetitivní. V obou případech bylo dosaženo nízkého limitu detekce 0,5 ng/ml. Ochratoxin A byl stanovován i jako methanolvý extrakt z cereálií a některých nápojů (11). Kompetitivní uspořádání obsahovalo imobilizovaný analog ochratoxinu A. Limit detekce pro ochratoxin A byl v rozmezí 4–100 ng/g pro různé cereálie a 7–38 ng/g pro nápoje. Kompetitivní uspořádání bylo rovněž použito pro stanovení deoxynivalenolu (10). Komplex deoxynivalenol–biotin byl zachycen na předem imobilizovaný avidin. Imobilizovaný na povrch biosenzoru a volný deoxynivalenol ve vzorku kompetovaly o fluorescenčně značenou monoklonální protilátku. Limit detekce pro deoxynivalenol v pufru byl 0,2 ng/ml. Array biosenzor v kompetitivním uspořádání byl vyvinut i pro aflatoxin B₁ (14). Cy₅ značená monoklonální protilátka byla přidávána ke vzorku. Nalezený limit detekce byl 0,3 ng/ml.

Závěr

Použití biosenzorů pro stanovení mykotoxinů přináší mnohé výhody oproti dosud běžně používaným metodám. Zejména nízká pořizovací cena pro většinu použitých převodníků v kombinaci se snadnou aplikací průtočné analýzy umožňují použití biosenzorů pro kontinuální monitoring přítomnosti mykotoxinů.

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci grantového projektu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR: 2A-1TP1/009.

Literatura

1. BRNDIAR, M. – KAČEROVSKÝ, J. – MALÍŘ, F., et al. Mykotoxiny jako bojové biologické látky? *Voj. zdrav. Listy*, 2003, roč. 72, č. 5, s. 203–207.
2. CARLSON, MA. – BARGERON, CB. – BENSON, RC., et al. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, vol. 14, no. 10, p. 841–848.
3. DALY, SJ. – KEATING, GJ. – DILLON, PP., et al. Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B1. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, vol. 48, p. 5097–5104.
4. GAAG, B. – SPATH, S. – DIETRICH, H., et al. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Cont.*, 2003, vol. 14, p. 251–254.
5. LEE, WW. – THOMPSON, HG. – HALL, JG., et al. Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassays, gene probe assay and enzyme inhibition using a silicon-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, vol. 14, no. 10, p. 795–804.
6. LIGLER, FS. – TAITT, CR. – SHRIVER-LAKE, LC., et al. Array biosensor for detection of toxins. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, vol. 377, no. 3, p. 469–477.
7. LOGRIECO, A. – ARRIGAN, DW. – BRENGEL-PESCE, K., et al. DNA arrays, electronic noses and tongues, bio-sensors and receptors for rapid detection of toxigenic fungi and mycotoxins: a review. *Food Addit. Contam.*, 2005, vol. 22, no. 4, p. 335–344.
8. MAGAN, N. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 2006, vol. 162, no. 3, p. 245–253.
9. MARAGOS, CM. Novel assays and sensor platforms for the detection of aflatoxins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, vol. 504, p. 85–93.
10. NGUNDI, MM. – QADRI, SA. – WALLACE, EV., et al. Detection of deoxynivalenol in foods and indoor air using an array biosensor. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, vol. 40, p. 2352–2356.
11. NGUNDI, MM. – SHRIVER-LAKE, LC. – MOORE, MH., et al. Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Anal. Chem.*, 2005, vol. 77, no. 1, p. 148–154.
12. BERGER, U. – OEHME, M. – KUHN, F. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, vol. 47, no. 10, p. 4240–4245.
13. RASOOLY, A. – HEROLD, KE. Biosensors for the analysis of food- and waterborne pathogens and their toxins. *J. AOAC Int.*, 2006, vol. 89, no. 3, p. 873–883.
14. SAPSFORD, KE. – TAITT, CR. – FERTIG, S., et al. Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 21, no. 12, p. 2298–2305.
15. SHONS, A. – DORMAN, F. – NAJARIAN, J. An immunospecific microbalance. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1972, vol. 6, p. 565–570.
16. TURENER, NW. – PILETSKA, EV. – KARIM, K., et al. Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, vol. 20, no. 6, p. 1060–1067.
17. WADKINS, RM. – GOLDEN, JP. – PRITSIOLAS, LM., et al. Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 1998, vol. 13, no. 3, p. 407–415.
18. ZHENG, MZ. – RICHARD, JL. – BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 2006, vol. 161, no. 5, p. 261–273.

Korespondence: Npor. RNDr. Miroslav Pohanka
Ústřední vojenský zdravotní ústav
Centrum biologické ochrany
561 66 Těchonín
e-mail: rau@atlas.cz

Do redakce došlo 22. 1. 2007