



SZENT ISTVÁN EGYETEM



ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**Érzékeny immunanalitikai módszerek
kidolgozása toxikus maradékanyagok
(mikotoxinok, gyógyszerek)
meghatározására biológiai anyagokban és
takarmányokban**

Doktori értekezés tézisei

Készítette:
Barna-Vetró Ildikó

Témavezető:
Prof. Dr. Solti László

**Budapest
2003**

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Dr. Solti László dékán

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Kar

.....

.....

.....

.....

.....

dr. Barna-Vetró Ildikó

Tartalomjegyzék

1. A téma előzményei, célkitűzések	4
2. Anyag és módszer	6
3. Eredmények	10
4. Következtések, új eredmények, ajánlások	14
5. A dolgozat témakörében megjelent közlemények	17
6. Magyarázatok, rövidítések	18

1.1 A munka előzményei

A komplex élelmiszer és takarmány-minősítés során nemcsak az élelmiszerek természetes összetevőit kell vizsgálni, hanem meg kell határozni mindazon káros anyagokat (növényvédő szereket, antibiotikum- és gyógyszer maradékanyagokat, hormonokat, toxinokat, mikroorganizmusokat), amelyek az ember vagy állat egészségére ártalmasak lehetnek.

Az utóbbi években az Európai Unió számos országában kirobbant élelmiszer botrányok (hormonnal, növényvédő szerekekkel szennyezett hús, tej, tojás forgalomba hozatala, vagy a brit szarvasmarha állományt megtizedelő és az emberre is veszélyesnek tartott kerge-marhakór járvány) eredményeként az EU országokban szigorúbb jogszabályok és minőség ellenőrzés várható az élelmiszertermelés teljes folyamatánál. Ezek a változások hazánkat is érintik, mivel 2004-től Magyarország is az EU tagja lesz.

Az élelmiszerekben jelen levő káros maradékanyagok kimutatásához megfelelő érzékenységű és reprodukálható módszerek szükségesek, mint pl. az ***antigén-antitest reakción alapuló enzim-immunanalitikai technika (ELISA)***. A módszerrel gyors, megbízható, érzékeny, sorozatvizsgálatra alkalmas tesztrendszer fejleszthető.

Munkacsoportommal együtt, közel 12 éves kutató-fejlesztő munkám arra irányult, hogy az élelmiszereket és takarmányokat szennyező anyagok közül, a *mikotoxinok* és *gyógyszer maradékanyagok* mérésére olyan egységes, szűrővizsgálatra is alkalmas diagnosztikai tesztrendszereket dolgozzunk ki, amelyek egyszerűen kivitelezhetők, jól automatizálhatók, áruk pedig sokkal alacsonyabb a külföldi reagens készleteknél. Ilyen diagnosztikai tesztrendszerek fejlesztésével, gyártásával és forgalmazásával Magyarországon egyedül a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Diagnosztikai laboratóriuma foglalkozik.

A tézisekben részletezett fejlesztési munka minden fázisát munkacsoportommal együtt Gödöllőn, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Diagnosztikai Laboratóriumában végeztem.

1.2. Az értekezés célkitűzései

- ◆ Specifikus monoklonális antitestek előállítása és alkalmazásukkal direkt, kompetitív ELISA tesztrendszerek kidolgozása, minőségi jellemzőinek meghatározása *ochratoxin-A (OA)* és *fumonizin B₁ (FB₁)* mikotoxinok mennyiségi mérésére gabonamintákban.
- ◆ Az *ochratoxin-A ELISA* teszt módosításával humán- és sertés szérum, sertés sperma, csirke szövetminták (izom, vese, máj) ochratoxin-A tartalmának mennyiségi meghatározása. A teszt validálása a különböző szövetekre. Közös munka során vizsgálni kívánjuk, hogy az OA-val etetett csirkéknél milyen az OA időbeli megoszlása és lebomlása az egyes szervekben.
- ◆ Specifikus monoklonális antitestek előállításával direkt kompetitív tesztrendszerek kidolgozása és optimalizálása *gentamicin (GE)* és *szulfadiazin (SD)* maradékanyagok mennyiségi mérésére biológiai folyadékokban (tej, sertés szérum). A tesztek validálása.

2. Anyag és módszer

2.1. Monoklonális antitestek előállítása, jellemzése

A hibridoma technika felhasználásával az **ochratoxin-A** és **fumonizin B1** mikotoxinokra, valamint a **gentamicin** és **szulfadiazin** vegyületekre specifikus, nagy érzékenységgű és affinitású **monoklonális ellenanyagokat** állítottunk elő. Az antitesteket a következő adatokkal jellemeztük: keresztreakció (%) a rokon szerkezetű vegyületekkel, IC₅₀ (ng/ml), affinitási konstans (l/mol), alosztály.

2.2 Ochratoxin-HRP konjugátum előállítása kevert anhidrid módszerrel

Ochratoxin-A-t (OA) (2.48 μmol) 100 μl DMF-ben oldottunk és -15 °C-ra hűtöttük, majd ehhez az oldathoz először 1.5 μl Tri-butyl-amint, majd 15 perc után 1 μl i-butyl-kloroformátot adtunk, jól összekevertük és -15 °C-ra hűtöttük. A peroxidáz enzimet (HRP), (RZ: 3. 0, 0. 05 μmol) 250 μl desztillált víz + 250 μl DMF oldószer keverékben oldottuk és - 15 °C-ra hűtöttük. A peroxidáz oldat pH-t 9.0-ra állítottuk 0.1 mol/l NaHCO₃-al. Az aktivált ochratoxin-A oldatot gyorsan, de cseppenként, állandó keverés közben adtuk a peroxidáz oldathoz, a keveréket, 1 órát - 15 °C-on tartottuk, majd 2 órát + 4 °C-on. A konjugátumot 3 napig dializáltuk PBS pufferben. A számított OA/HRP molekula arány 50 volt. A konjugátum munkahígítását ELISA vizsgálattal határoztuk meg.

2.3. Fumonizin B₁-, gentamicin-, szulfadiazin-peroxidáz konjugátumok előállítása perjodát módszerrel

8 mg peroxidáz enzimet 2 ml desztillált vízben oldottuk, ehhez 0.2 ml 0.1 M Na-perjodát oldatot adtunk és 20 percig, szobahőmérsékleten kevertük, majd 18 órát 1 mM Na-acetát

pufferben (pH: 4.4) dializáltuk. Az aktivált peroxidáz oldat pH-t 0.1 M NaOH-al 9-10 közé állítottuk, ehhez 2 mg FB₁ (2.77 μmol) toxint adtunk, amit előtte 0.5 ml desztillált vízben oldottunk. A konjugátumot szobahőmérsékleten 3 órát kevertük, majd a reakciót Nátrium-borohidrid oldattal leállítottuk és 2-3 órát + 4 °C-on tartottuk. A konjugátumot PBS-ben dializáltuk és felhasználásig – 20 °C-on tároltuk. (Mol_{FB1}/Mol_{HRP} = 14).

A gentamicin és a szulfadiazin-perioxidáz konjugátumok előállítására a fenti módszerhez hasonlóan történt, de különböző molarányokkal. (Mol_{GE}/Mol_{HRP} = 5.6; Mol_{SD}/Mol_{HRP} = 400).

2.4. Direkt, kompetitív ELISA teszt OA meghatározására gabona-, szérum-, sperma- és szövetmintákban és FB₁ meghatározása gabonamintákban

Mikrotitráló lemez (Immunoplate F-8, Maxisorp, Nunc, Denmark) felületére első rétegben 150 μl anti-egér Ig nyúl IgG-t kötöttünk, második rétegben 120 μl anti-OA antitestet tartalmazó ascites folyadékot vagy anti-FB₁ ascites folyadékot mértünk munkahígításban, majd szobahőmérsékleten, 18 órán át inkubáltuk. A nem kötődött antitestet mosással eltávolítottuk. A lemezeket beszárítottuk és felhasználásig alumíniumfólia tasakban 4 °C-on tároltuk. A teszteléskor először a vizsgálati minta kivonatból és az ismert OA, illetve FB₁ koncentrációjú oldatokból mértünk 50-50 μl -t a lemezekbe, majd minden anyagra azonnal ráértünk 50-50 μl hígított OA-HRP, illetve FB₁-HRP konjugátumot és szobahőfokon 1 órát inkubáltuk. A nem kötődött reagenseket mosással eltávolítottuk. A kompetitív reakció végén a lemezhez kötődött jelzett konjugátum aktivitása az enzimszubsztrát (urea peroxid) és a szintelen kromogén (tetrametilbenzidin) oldat színváltozása (kék színű) alapján fotométerrel mérhető. Amennyiben 6N kénsav hozzáadásával az enzimreakciót leállítjuk, akkor a keletkezett sárga színű

reakcióterméket fotométerrel, 450 nm-es színszűrővel mérjük. A mért extinkció fordítottan arányos a mintában levő mikotoxin koncentrációjával.

2.5. Direkt, kompetitív ELISA teszt GE és SD mérésére biológiai folyadékokban

Mikrotitráló lemez (Immunoplate F-8, Maxisorp, Nunc, Denmark) felületére 120 µl anti-GE vagy anti-SD antitestet tartalmazó ascites folyadékot mértünk munkahígításban és 48 órát szobahőmérsékleten vagy 18 órát 37 °C-on inkubáltuk. A lemezek előkészítése és tárolása a 2.4 pontban leírtak szerint történt. Teszteléskor először 20-20 µl GE vagy SD standard oldatot vagy a megfelelően előkészített vizsgálati mintát mértünk a lemezbe, majd minden anyagra azonnal ráértünk 100-100 µl GE-HRP vagy SD-HRP konjugátumot munkahígításban, ezután 1 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakció végén a lemezhez kötődött peroxidáz enzim aktivitását az előző pontban leírtak szerint határoztuk meg.

Kiértékelés: Ábrázoltuk az OA, FB₁, GE és SD standard görbéket: az adott mikotoxin vagy a gyógyszervegyület log₁₀ koncentrációját (*x-tengely*) a B/B₀ függvényében (*y-tengely*). (B= a standard vagy a minta koncentrációja, B₀= a 0 koncentráció extinkciója.) A minta koncentrációját úgy kaptuk, hogy a kalibrációs görbéről leolvasott ng/ml-koncentrációt szoroztuk a hígítási faktorról.

2.6. Mintaelőkészítés az ochratoxin-A koncentrációjának meghatározására gabonamintákból

A mintavétel szabályai szerint vett gabonamintát (kukorica, árpa, szója, ipari keveréktakarmányok) finomra daráltuk és 2 g-t Erlenmeyer lombikba töltöttünk. Ezután 10 ml diklórometán,

valamint 5 ml 1 M citromsavat adtunk hozzá és jól lezárva horizontális rázógépen, 2 órán keresztül szobahőfokon ráztattuk. Az anyagot üveg vagy átlátszó műanyag centrifugacsőbe öntöttük és 30 percig 4500 fordulattal centrifugáltuk. Centrifugálás után az anyag három rétegre, a felső vizes, a középső termény, és az alsó diklórmétános fázisra vált szét. A terményréteget tüvel átszűrtük és az alsó diklórmétános fázisból üvegfecskendővel 2 ml-t leszívunk egy másik tiszta kb. 10 ml-es centrifugacsőbe. Ehhez 2.0 ml karbonát puffert (1%) adtunk és lezárva először 30 percig rázógépen ráztattuk, majd 20 percig 4500 fordulattal centrifugáltuk, hogy a fázisok jól elváljanak. A felső karbonát pufferes fázisból 490 µl-t kémcsőbe pipettázunk, hozzáadtunk 10 µl 1 N sósavat, és addig ráztuk, amíg ki nem tisztult. Ebből az oldatból mértünk 50-50 µl-t közvetlenül az ELISA lemezre. Az enzimaktivitás mérése és a kiértékelés a 2.5 pontban leírtakkal azonos volt.

2.7. Mintaelőkészítés az ochratoxin-A koncentrációjának meghatározására humán-, sertés- és csirkeszérumból, valamint sertés spermából

2 ml szérum- vagy sperma mintához 2.5 ml 1 M citromsavat és 4 ml diklórmétánt adtunk és jól lezárva horizontális rázógépen, 2 órán keresztül szobahőfokon ráztattuk. A folyamat további része a 2.6. pontban leírtakkal azonos volt.

2.8. Mintaelőkészítés az ochratoxin-A koncentrációjának meghatározására szövetmintákból

A homogenizált szövetmintákból (csirke vese, máj, izom) 5 g-t mértünk centrifugacsőbe, ehhez 7 ml 1 M citromsavat és 10 ml diklórmétánt adtunk és jól lezárva horizontális rázógépen, 1 órán keresztül szobahőfokon ráztattuk, majd centrifugáltuk. A folyamat további része a 2.6. pontban leírtakkal azonos volt.

2.9. Mintaelőkészítés az FB₁ koncentrációjának meghatározására gabonamintákból

Öt g finomra darált gabonamintához (búza, kukorica, árpa, rozs) 20 ml extraháló oldatot adtunk (50 rész acetonitril + 39 rész víz + 10 rész 0.5% KCl + 1 rész 6% kénsav) és jól lezárva, 2 órán keresztül szobahőfokon rázattuk. Az extraktumot harminc percig, percenként 4500 fordulattal centrifugáltuk. A felülúszót 1:5 arányban PBS/Tween 20 pufferrel hígítottuk és ismét centrifugáltuk. A teszteléshez a tiszta felülúszóból 50 µl-t mértünk a polisztirol lemezre. Az enzim aktivitás mérése azonos volt a 2. 4 pontban leírtakkal.

2.10. Minta előkészítés a szarvasmarha tej GE és SD koncentrációjának méréséhez

A nyerstejet centrifugálással zsírtalanítottuk (3000 x g) és 20 µl mintát közvetlenül mértünk az ELISA rendszerben.

2.11. Minta előkészítés a sertés szérum GE és SD koncentrációjának méréséhez.

A szérum mintát 1:10 arányban hígítottuk PBS/Tween 20 pufferben, ami 0.1% 8-Anilin-naftil-szulfonsavat (ANS) tartalmazott és 20 µl mintát mértünk a polisztirol lemezre. Az enzim aktivitás mérése azonos volt a 2.4., 2.5 pontban leírtakkal.

3. Eredmények

3.1. OA-ELISA teszt jellemző adatai és alkalmazása gabonamintákban.

A teszt mérési tartománya 0.5-10 ng/g (a minta hígítása nélkül), de a minta hígításával a tartomány 10-100 ng/g –re növelhető, a legkisebb mérhető OA tartalom 0.5 ng/g.

A reprodukálhatósági vizsgálat: - a mérésen belüli és a mérések közötti eltérések vizsgálata, az átlag variációs koefficiens (CV) 10%-on belül volt. A pontosságot a visszanyerési arány mérésével jellemeztük: - az érték kukorica, árpa, szója, süldőtáp és lúdtáp mátrix anyagoknál 90-110 %.

A teszt specifitása: - ochratoxin-A 100 %, ochratoxin-B 9.3 %.

Az ochratoxin-A teszt **TOXIKLON ochratoxin-A** márkaneven forgalomban került és már a gyakorlatban is több helyütt rutin módon alkalmazzák.

3.2. Toxiklon OA kit alkalmazása humán szérumból minták OA tartalmának mérésére

A gabonára kidolgozott extrakciós eljárást módosítva, 355 random gyűjtött humán szérumból mintát vizsgáltunk meg az ochratoxin A jelenlétére annak megállapítására, hogy mekkora a hazai populáció ochratoxin A terhelése, mivel erről ellentmondó adatok álltak rendelkezésre. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált szérumból minták 75%-a tartalmazta ugyan a toxint 0.2 - 1.0 ng/ml mennyiségben, de csak néhány esetben (6.8%) fordult elő növekedett toxin-bevitelre utaló (1 ng/ml-nél magasabb) érték. Ez a vizsgálat is igazolta a mikotoxin vizsgálat fontosságát és felhívta az ellenőrző intézmények figyelmét, az élelmiszerellenőrzést szigorítására.

3.3. Toxiklon OA kit alkalmazása sertés szérumból és ondóplazmából OA tartalmának mérésére.

Az ochratoxin A nephrotoxikus hatásáról számos közlemény jelent meg, de nem találtunk adatokat a toxin reprodukzív szervekre gyakorolt hatásáról. Egy újabb kísérlet során tenyésztéssel a humán „tolerable daily intake (TDI)” érték öt- és tízszeresével etetett ochratoxin A megjelenését vizsgáltuk az állatok szérumból és az ondóplazmából. Az eredmények

azt mutatták, hogy az OA felvételt követően a toxin hamar megjelent a szérumban és az ondóplazmában egyaránt, hasonló lefutású görbét, de különböző számszerű értékeket eredményezve a két vizsgált biológiai folyadékban. Úgy tűnik, hogy az ondóplazma megemelkedett ochratoxin A tartalma károsan befolyásolja az ondósejtek élettartamát, ezáltal a sperma eltarthatóságát.

3.4. Toxiklon OA kit alkalmazása csirke szérum és különböző szövetek OA tartalmának mérésére

Csirke etetési kísérlettel vizsgáltuk az OA megoszlását a szérumban és különböző szövetekben. A vizsgálathoz az OA tesztet módosítottuk és validáltuk az egyes szövetekre. A kísérletben vizsgált időtartam (28 nap) alatt a legnagyobb OA toxin koncentrációt 7 nap után a májban mértük és még 28 nap után is mérhető volt a toxin. A vesében az OA lebomlása sokkal gyorsabb volt, a 7. napon mért maximum után a 28. napon OA koncentrációt már nem mértünk. A mell- és combizomban a 7. napon nem mértünk OA toxint, de a 28. napon az OA toxin koncentrációban emelkedést tapasztaltunk.

3.5. Fumonizin B₁-ELISA teszt jellemző adatai és alkalmazása gabonamintákban

Az optimalizált FB₁ teszt mérési tartománya gabonamintákban 10-500 ng/g, a legkisebb kimutatható FB₁ koncentráció 7.6 ng/g.

A reprodukálhatósági vizsgálat: - a mérésen belüli és a mérések közötti eltérések vizsgálata, az átlag variációs koefficiens (CV) 10%-on belül volt. A pontosságot a visszanyerési arány mérésével jellemeztük: - az érték kukorica-, rozs- és búzaliszt mátrix anyagoknál 61-84 % volt.

A teszt specifitása: - FB₁ 100 %, FB₂ 91.8%, FB₃ 209%.

Fumonizin toxinnal természetes úton fertőzött kukorica minták fumonizin toxin tartalmát határoztuk meg ELISA módszerünkkel, az értékek jó egyezést mutattak a HPLC-vel mért értékekkel.

ELISA tesztünk **TOXIKLON FB₁** márkaneven már forgalomba került és a gyakorlatban is alkalmazzák.

3.6. ELISA teszt kifejlesztése gentamicin antibiotikum mérésére tejben és sertés szérumban

Az optimalizált GE ELISA teszt alkalmas a tej és szérum gyors, kvantitatív szűrővizsgálatára. A minta előkészítése egyszerű, a tej közvetlenül, a szérum 1:10 hígítás után mérhető a rendszerrel, a vizsgálati minta térfogata 20 µl. A teszt mérési tartománya szérumban 1.5-100 ng/ml, tejben 0.1-10 ng/ml, a kimutatható legkisebb GE koncentráció szérumban 1.2 ng/ml, tejben 0.03 ng/ml. Az EU-ban megengedett GE koncentráció tejben, szérumban 100 µg/kg. A teszt paraméterei alapján megfelel ennek a követelménynek. A teszt egyik fontos jellemzője a pontosság, amit GE-vel mesterségesen fertőzött tej és szérum visszanyerési vizsgálata alapján határoztunk meg. Az elméleti és a mért GE koncentrációk a tejnél és szérumnál is jó egyezést mutattak, amit a regressziós egyenesek és a korrelációs koefficiensek ($r= 0.999$) is igazoltak.

3.7. ELISA teszt kifejlesztése SD mérésére tejben és sertés szérumban

Monoklonális anti-SD ellenanyag felhasználásával direkt, kompetitív ELISA tesztet fejlesztettünk ki szulfadiazin mennyiségi mérésére tejben és sertés szérumban. A teszt felépítése és a minta előkészítése a GE tesztnél leírtakkal azonos volt. A mérési tartomány tejben 2.5-50 ng/ml, szérumban 25-500, a legkisebb kimutatható SD koncentráció tejben 1.5 ng/ml, szérumban 10 ng/ml. A teszt megbízhatósági

vizsgálata alapján a mért és az elméleti SD értékek jól korreláltak. A teszt paramétereit alapján alkalmas az EU által az élelmiszerekben még megengedett szulfonamid koncentráció (100 µg/kg) mérésére.

4. Következtések, új eredmények, ajánlások

► Specifikus, nagy érzékenységgű és affinitású monoklonális anti-OA antitestet és a konjugálási módszer módosításával peroxidáz enzimmel jelzett OA konjugátumot állítottunk elő. A két immunkémiai alap reagens felhasználásával direkt, kompetitív ELISA tesztrendszert fejlesztettünk ki, amit a gyakorlatban gabonaminták (búza, kukorica, árpa, rozs) és ipari keverék takarmányok OA tartamának kvantitatív és kvalitatív mérésére alkalmaznak. A vizsgálati minták OA tartalmának kivonására (extrahálására) új módszert dolgoztunk ki. A szakirodalomban leírt erős savak helyett, az ugyanolyan hatásos, de sokkal enyhébb *citromsavat* alkalmaztuk. A tesztet reagenskészletté fejlesztettük és **TOXIKLON OA** márkanéven már több éve forgalmazzuk. A reagenskészlet 40 gabonaminta és keverék takarmány mikotoxin tartalmának **kvantitatív**, vagy 46 gabonaminta **kvalitatív** méréséhez szükséges anyagokat tartalmazza.

► A minta előkészítési módszer módosításával az OA tesztet alkalmassá tettük a humán szérum, sertés szérum és sperma, a csirke szérum, valamint szövetek (vese, máj, izom) OA koncentrációjának mérésére is, növelve ezzel az OA reagenskészlet felhasználhatóságát.

► *Glutáraldehid kötőreagens* (rövid kötőreagens) felhasználásával (FB₁-GA-KLH) sikerült nagy affinitású és munkahígítású monoklonális antitestet termelő sejtklont előállítani annak ellenére, hogy a szakirodalom szerint a nagy

affinitású ellenanyagok előállításához a hosszú, legalább 16 atomból álló kötőreagensek alkalmasabbak. Az ellenanyag erős keresztreakciót mutatott a három fő fumonizin molekulával, közülük leginkább az FB₃-al (209 %) reagált. ELISA tesztünk ennek alapján nem egyetlen toxint, hanem egy toxincsoportot mutat ki, ami szűrővizsgálatnál inkább előny, mint hátrány. A szakirodalomban ilyen specifitású antitestet nem írtak le. A kifejlesztett ELISA teszt-kit **TOXIKLON FB₁** néven már forgalomba került.

▶ Az OA és FB₁ toxinokkal együtt jelenleg már **öt mikotoxinra** rendelkezünk **TOXIKLON reagens készlettel**. Ezek a tesztek alkalmasak a mikotoxinok **gyors, kvantitatív szűrővizsgálatára**, a velük, biztonsággal kimutatható toxinmennyiség a takarmánykódexben meghatározott határértékek alatt van. A szűrővizsgálattal pozitívnek vagy kétesnek bizonyult minták esetében minden esetben el kell végezni a megerősítő műszeres mérést.

▶ Egyszerű, gyors, monoklonális antitesten alapuló ELISA tesztet fejlesztettünk ki a gentamicin kvantitatív mérésére tejben és szérumban. Egyszerű módszert dolgoztunk ki a vizsgálati minták előkészítésére. Zsírtalanítás után a tejminta közvetlenül mérhető, a szérum esetében tapasztalt aspecifikus reakciót pedig egy *új összetételű hígító pufferrel* (0.1% ANS-PBS-0.05% Tween 20) kompenzálni tudtuk. Tesztrendszerünk alkalmas a tej és szérum GE tartalmának *gyors, kvantitatív szűrővizsgálatára*. A módszert a jövőben húsról is ki akarjuk dolgozni.

▶ A gyakorlati szempontból fontos szulfonamid vegyületek közül első lépésben a szulfadiazint választottuk. A monoklonális antitest előállítására különböző kémiai módszerrel állítottam elő az immunogéneket. Ezek közül az -

azo-kötéssel előállított SD-BSA immunogénnel sikerült jó titerű antitestet előállítani. Az SD-HRP konjugátumok előállításánál az –azo- kötési módszer nem vált be, helyette a peroxid módszer bizonyult hatásosnak. Az így kialakított un. heterológ tesztrendszer sokkal érzékenyebb volt, mint a homológ rendszer. A tesztrendszer érzékenységét a mintatérfogat/konjugátumtérfogat arányának változtatásával (1:5) még növelni lehetett. A vizsgálati minták előkészítése a GE tesztnél már kidolgozott módszerrel megegyezik. A módszert a GE teszthez hasonlóan húsra is ki akarjuk terjeszteni.

Mivel az általunk előállított ellenanyag a szulfadiazinon kívül csak néhány szulfonamiddal reagál, ezért kívánatos lenne és tervbe is vettük olyan ellenanyag előállítását, amely több szulfonamiddal is képes reagálni. Irodalmi adatok alapján egy szulfathiazol származék (TS vegyület) alkalmas lehet erre a feladatra.

► A Diagnosztikai laboratórium „a mikotoxinok és antibiotikumok elleni monoklonális antitestek előállítására, az ELISA tesztek kifejlesztésére és termelésére” **ISO 9001: 2001** minősítéssel rendelkezik.

5. A dolgozat témakörében megjelent legfontosabb közlemények

Barna-Vetró, I.; Solti, L.; Téren, J.; Gyöngyösi, Á.; Szabó, E. and Wölfling, A. (1996): Sensitive ELISA test for determination of Ochratoxin-A. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 4071- 4074.

IF: 1. 732

Solti, L., Salamon, F., **Barna-Vetró, I.**, Gyöngyösi, Á., Szabó, E., Wölfling, A. (1997): Ochratoxin-A content of human sera determined by a sensitive ELISA. *J. Anal. Toxicol.* **21**, 44-48

IF: 2. 168

Barna-Vetró I., Szabó E., Fazekas B. és Solti L. (1999): ELISA-teszt a fumonizin B1 toxin mérésére. *Növényvédelem* **35**, 609-617.

Solti, L., Pécsi, T., **Barna-Vetró, I.**, Szász Jr., F., Biró, K., Szabó, E. (1999): Analysis of serum and plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Anim. Reproduct. Sci.* **56**, 123-132.

IF: 0.813

Barna-Vetró I., Szabó E., Fazekas B., Solti L. (2000): Development of a sensitive ELISA for the determination of Fumonisin B1 in cereals. *J. Agric. Food Chem.* **48**, (7), 2821-2825.

IF: 1.56

Barna-Vetró, I., Balázs, E., Solti, L. (2000): Immunodiagnosics for food and feed safety, *Am. Lab.* **32**, 64-66.

IF: 0.593

Biró, K.; Solti, L.; **Barna-Vetró, I.**; Bagó, Gy.; Glávits, R.; Szabó, E. and Fink-Gremmels, J. (2002): Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathol.* **31**, 141-148.

IF: 1.655

6. Magyarázatok, rövidítések

- Ascites -hasúri folyadék
ANS - anilin-naftil-szulfonsav
BSA- szarvasmarha szérum albumin
CV - varriációs koefficiens
DMF - dimetil-formamid
ELISA - Enzyme-Linked –Immunosorbent Assay
FBs - fumonizinek
GE - gentamicin
HRP - torma peroxidáz
HPLC - nagy nyomású folyadék kromatográfia
Ig - immunglobulin
IgG - G osztályú immunglobulin
IC₅₀ - 50 %-os gátlási értéknél mért koncentráció (az immunoassay maximális jelintenzitásához képest 50%-os csökkenést okozó gátlószer koncentráció)
KLH - hemocianin
KCl - kálium klorid
OA - ochratoxin-A
PBS - foszfáttal pufferezett konyhasóoldat
SD - szulfadiazin
TDI - tolerable daily intake (a még elviselhető naponta elfogyasztható mennyiség)

Antigén – immunválaszt kiváltó nem saját struktúra

Haptén – kis molekulású, önmagában nem, megfelelő hordozóhoz kapcsolódva immunogén anyag, amely az ellenanyag-molekulákkal vagy immunsejtekkel specifikus reakcióba lép.

Immunogenitás – az antigén immunválaszt kiváltó képessége

Monoklonális antitest - homogén antitest populáció, amelyet specifikus, ellenanyag termelő homogén sejtek termelnek