



AZ ANALITIKAI LABORATÓRIUMI RÉSZLEG ELISA EGYSÉGE

Dr. Kenéz Árpád

(Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft., Gödöllő)

Mint azt korábbi cikkeinkben is megírtuk az ÁT Kft. szervezeti felépítésében komoly változások történtek az elmúlt hónapokban, minek következtében a korábban önálló Analitikai Laboratórium a Tejvizsgáló Laboratórium részlege lett. Ezen írásunkkal a részlegen belül folyó ELISA vizsgálatokat kívánjuk röviden ismertetni.

A részlegben végzett vizsgálatok közös jellemzője, hogy az úgynevezett ELISA módszer (**E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay, vagyis enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat) különböző változatait alkalmazzuk. Ennek megfelelően a laboratóriumi eszközháttér is így került kialakításra, továbbá a helyiségek elzártsága és külleme is kimondottan a klasszikus laboratóriumi környezetet idézik. A részlegen végzett takarmánytoxin és vemhességi vizsgálatok a Hírlevelünk tavalyi számaiban részletesen kifejtésre kerültek, ám a mérések elve, protokollja és az azt végző csapat bemutatása ez idáig csak érintőleges volt.

Az ELISA vizsgálatok különböző változatai ismertek szerte a világon (kompetitív, nem kompetitív, direkt és indirekt ELISA, és ezeken belüli típusok). Mindegyik lényege az antigén-antitest közötti reakció. Ezen módszerek közös jellemzője, hogy specifikusak és érzékenyek, már kis mennyiségű antigén kvantitatív kimutatását is lehetővé teszik. A reakció során pl. a tejben vagy takarmányban található „antigéneket” enzimmel kapcsolt antitestek segítségével mutatjuk ki. Esetünkben inkább az antigén helyett az analit kifejezés a szerencsésebb, hiszen toxinokról vagy vemhességi fehérjékről van szó. A reakció során színváltozás zajlik le, amelynek intenzitása mintánként a bennük található analitok mennyiségétől függően változó. A szint fotométerrel mérjük. Az így kapott

abszorbancia-értékeket (optikai denzitás vagy OD) az adott ELISA kit követelményeinek (validációs kritérium és interpretációs értékek) megfelelően mindenki számára jól értelmezhető eredményekké alakítjuk (pl. vemhes, üres, 43,56 ng/kg stb.).

Az ELISA méréseket és a hozzájuk kapcsolódó adminisztrációt 4 fő végzi (1 fő részlegvezető, 3 fő laboráns), köztük olyan laboránsokkal is találkozhatunk, akiket korábban a Nyerstejminősítő részlegről is ismerhetnek Partnereink. Az aflatoxin M1 mérési napok: hétfő, szerda és péntek, a takarmánytoxin vizsgálatokra érkezett minták pedig kedden és csütörtökön kerülnek lemérésre. Indokolt esetben pénteken is elindítunk méréseket. A PAG-vizsgálatok folyamatosak, a minta beérkezésének napján megtörténnek. Az így kialakított munkarenddel biztosítható, hogy minden Partnerünk a lehető leghamarabb megkaphassa a vizsgálati minták eredményeit.



Az ELISA vizsgálatokat végző munkatársak

VEMHESSÉGI FEHÉRJÉK (PREGNANCY ASSOCIATED GLYCOPROTEINS) KIMUTATÁSA

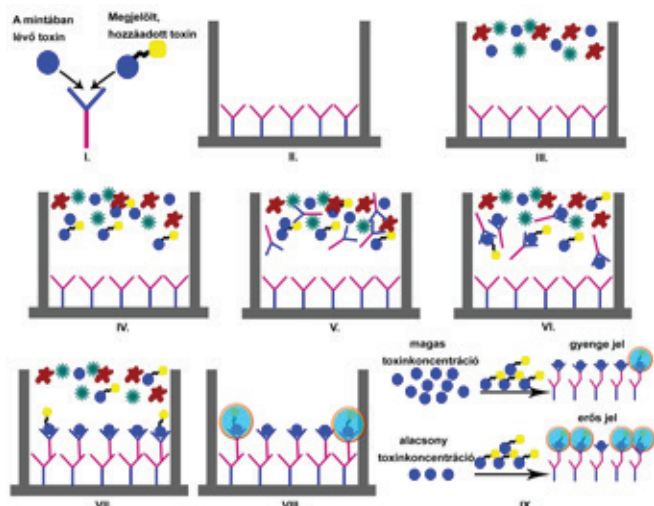
Az általunk használt direkt ELISA teszt által lehetővé válik a szarvasmarha- és kecsketejben található PAG fehérjék kimutatása. Mind a havi ellenőrző befejeésből, mind pedig eseti megrendelésekből származó mintákból módunkban áll vizsgálatokat folytatni. Előző esetben a központi adatfeldolgozáson keresztül juttatjuk ki az eredményeket a partnereink felé (ENAR egyedi azonosítóhoz párosítva), második esetben maga az Analitikai Laboratórium küldi meg az adatokat a megrendelő lapon megadott azonosítók szerint. A laboratórium által havonta végzett vizsgálatok összesítő eredményeit és elemzését a Partnertájékoztató Hírlevélben folyamatosan közöljük.

A vizsgálat során létrejött színreakció arányos a mintákban található vemhességi fehérjék mennyiségével.

AFLATOXIN M1 KIMUTATÁSA TEJBŐL

Ez a vizsgálat a kompetitív ELISA elvén működik (1. ábra), tehát az általunk mintához adott, konjugált (enzimmel jelölt) Aflatoxin M1 molekulák versengenek a mintában eredendően megtalálható toxinmolekulákkal a toxinra specifikus antitestek helyeiért. A fotométerrel az enzimmel konjugált antigének mennyiségére utaló színváltozást „olvassuk” le (450 nm-en), amely fordítottan arányos a mintában lévő toxinmennyiséggel, tehát minél erősebb színű a minta, annál alacsonyabb az Aflatoxin M1 mennyisége, hiszen a rendszerben lehetősége van bekötődni az általunk adagolt konjugált antigéneknek,

1. ÁBRA A KOMPETITÍV ELISA SEMATIKUS ÁBRÁJA



Fotométerrel 450 és 630 nm hullámhosszon mérjük meg a mintákat. A kapott abszorbancia értékek (OD) és a kontrollminták (pozitív és negatív) eredményei alapján a program kiszámítja a minták pontos PAG tartalmát, majd besorolja az „üres”, „vemhes”, vagy „ismételt mintavétel javasolt” státuszba.

A teszt kimutatja a vemhességet már a vemhesítéstől számított 28. naptól (az előző elléstől, illetve vetéléstől viszont 60 napnak kell eltelnie, az esetleges korábbi vemhességet jelző PAG-ok ürülése miatt!), ezáltal lehetővé teszi az üres tehének gyors detektálását, és a mielőbbi újravemhesítést, így a két ellés közötti idő csökkentését is. A masztitiszes tehének teje nem alkalmas a vizsgálatra.

mert van sok üres hely, azokat nem foglalta el a minta eredeti toxinja. Ez a kompetitív ELISA elv teszi lehetővé azt, hogy igen kis mennyiségű antigének vagy analitok mennyiségét is ki tudjuk mutatni a mintákból.

Az Aflatoxin M1 humán egészségügyi szempontból is káros anyag (genotoxikus karcinogén), ezért az élelmiszerbiztonsági szabályozását, a többi mikotoxinhoz (lásd lentebb) hasonlóan az Európai Parlament és Tanács 178/2002/EK és az 1881/2006/EK rendeletek tárgyalják. Laboratóriumunkban az Aflatoxin M1 kimutatása akkreditált vizsgálat.

I. Az alapelv, hogy a mintában eredetileg megtalálható és a konjugált, általunk hozzáadott toxinok versengenek az antitestekért. II. A küvetta felületére gyárilag antitest fogó antitesteket rögzítenek. III. Hozzáadásra kerül a minta, amiben többféle toxin is lehet. IV-V. Hozzáadásra kerül az általunk kimutatni kívánt toxinfeleség enzimmel konjugált változata és a toxinra specifikus antitestet tartalmazó oldat. VI. A mintában eredetileg benne lévő toxinok és a hozzáadott konjugált toxinok lekötődnek a hozzáadott antitestekhez. VII. A már toxinnal összekapcsolt antitestek a fogó antitestekhez kötődnek. VIII. A szabad toxinok kimosásra kerülnek, a megkötött konjugált toxinok enzimjei hozzáadott szubsztrát hatására kék színűvé változtatják az oldatot. IX. A keletkező kék szín erőssége fordítottan arányos a minta eredeti toxintartalmával (a szerző rajza a http 2 alapján).

TAKARMÁNYOKBAN ELŐFORDULÓ TOXINOK

A „takarmánytoxinok” gazdasági jelentőségét korábbi cikkeinkben kollégáink már részletesen ismertették, így erre nem térnek ki. Itt csak az állat- és humánegészségügyi vonatkozásról írok röviden.

Fontos megjegyezni, hogy állatfajonként eltérő lehet az egyes toxinokkal szembeni érzékenység, így az európai és egyéb ajánlásokban legtöbbször gazdasági állatfajonként, és korcsoportonként vannak meghatározva a

takarmányokban maximálisan megengedett mennyiségek.

A takarmányokban lévő esetleges toxinok kimutatása az Analitikai Laboratóriumban jelenleg két módszerrel történik: 1. Klasszikus ELISA (kompetitív ELISA tesztek), 2. ELISA alapú Biochip technológia.

Aflatoxinok: főként az *Aspergillus* fajok termelik (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus*). A takarmányokban az Aflatoxin B1, B2, G1, G2 formában lehet jelen. Ezek közül a B1 a legmérgezőbb. Az aflatoxinok különböző betegségeket idézhetnek elő: aflatoxikózis, Reye-szindróma, krónikus hepatitis (főként Hepatitis-B fertőzött gyerekeknél) (B. Tóth 2014), immunszuppresszió. Az Aflatoxin B1 az állatban Aflatoxin M1-gyé („tejtóxin”) alakulhat, amelynek szintje nagyon gyorsan változik, tehát a toxinos takarmány leváltását követően napokon belül csökkenni kezd a toxin mennyisége. Teratogén és mutagén hatású, tehát embriófejlődési és örökítőanyag problémákat okozhat. Elsősorban a monogasztrikus állatok fiatal vagy vemhes egyedeire veszélyes (Kolozsvári 2009). A laboratóriumban az Aflatoxin M1-hez hasonlóan kompetitív ELISA módszerrel mutatjuk ki. A vizsgálat során kapott szín erőssége fordítottan arányos a takarmányminta toxintartalmával.

DON: Elsősorban a *Fusarium graminearum* faj termeli. A takarmány visszautasítását tapasztalhatjuk, nagyobb mennyiségben hánytató hatásáról ismerszik meg. Embernél is kiválthat megbetegedést és ezzel járó panaszokat: émelygés, hasfájás, hasmenés, szédülés (http1), bár ehhez nagy mennyiségben kell bejuttatni a szervezetbe. A T-2 toxinnal erősítik egymás hatását (B. Tóth 2014).

T-2: Szintén *Fusarium*-toxin (*F. tricinatum*, *F. sporotrichoides*, *F. poae*). Ez a toxinféleség kimondottan dermatotoxikus hatású, elsősorban tehát a takarmányfelvétel során okozhat bőrgyulladást (a sertések a legérzékenyebbek rá) (Kolozsvári 2009). E fentiek mellett azonban sokkal jelentősebb a fehérjeszintézis gátló hatása, a máj méregtelenítő szerepének csökkentése és az immunrendszer működésének gyengítése (fertőző betegségekkel szembeni fogékonyság nőhet). A szervezetből viszonylag gyorsan kiürül, így az állati termékekben is elenyésző mértékben található meg (nem akkumulálódik) (Kovács-Wéber 2008). A T-2 toxint szintén kompetitív ELISA módszerrel mutatjuk ki a takarmányokból, a kapott szín erősségét fotométerrel olvassuk le.

F-2 (Zearalenon): Jellemzően a *Fusarium graminearum*, a *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum* és a *F. scirpi* fajok állítják elő. Akut toxicitása nincs, azonban mivel hatása az ösztrogénhez nagyon hasonló, elsősorban a sertéseknél, de a szarvasmarhánál és a madaraknál (kivéve tyúkfélék) is zavart okozhat az ivarszervek működésében (genitotoxikus). Sertéseknél megnövekedhet az embrióelhalás, a halvaszületések aránya. Metabolitjai a placentán keresztül is átjuthatnak és a tejben is megjelenhetnek (pl. az α -zearalenol elnevezésű metabolit ösztrogén hatása háromszor erősebb a zearalenonnál!) (B. Tóth 2014). A tojásban, húsban, májban is akkumulálódhat, így emberi fogyasztásra szánt termékekben is előfordulhat (Kovács-Wéber 2008, Kolozsvári 2009).

Fumonizin: Leginkább a *Fusarium moniliformae*, a *F.*

verticillioides, *F. proliferatum* fajok termelik. A gazdasági állatok nagy része (főként a lovak és sertések) érzékeny a fumonizinekre, elsősorban agy-, tüdő- és májkárosodást okozhatnak. Rákkeltő hatásúak (emberben is) (Kolozsvári 2009).

Ochratoxin: Elsősorban *Penicillin* és *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxinok. A legjelentősebb típusa az Ochratoxin-A (raktári penészek által termelt toxinok közül a leggyakoribb), laborunk is ezt a típust vizsgálja a takarmányokból. A vese és a hasnyálmirigy működésében okoz komoly zavarokat, immunszuppresszív hatású és teratogén. Elsősorban a baromfifajok és a sertés mutat érzékenységet e toxin iránt. A kifejlett kérődző fajok bendőjében e mérgező anyag ártalmatlan vegyületté alakul át, így ezeket az egyedeket már nem veszélyezteti (Kolozsvári 2009). Embernél is előfordulhat ochratoxikózis. Tünetei vesefájdalmak, depresszió, étvágytalanság (B. Tóth 2014).

A Biochip technológia (Biochip Array Technology): Ezzel a módszerrel több toxinféleség kvantitatív vizsgálatát végezhetjük el egyszerre, ezért a költség és vizsgálati idő hatékonysága sokkal kedvezőbb, mint a klasszikus ELISA módszerek esetén. A technológia részletes leírása az ÁT Hírlevél 2016. XVI. évfolyam, 1. számában olvasható (Kótiné 2016). Most kivonatolva nagyvonalakban újra ismertetésre kerül.

Az immunanalitikai eljárás hasonló a kompetitív ELISA rendszerekhez, de a reakció alapját a kemilumineszcencia jelenti (ez a kémiai reakció zajlik le a katonaságnál, bűvárokodásban használatos világító rúd megtörésekor is), további lényeges különbség, hogy egy-egy teszterületen (biochip hely) több toxinféle specifikus antitest található. Az egyes teszterületekről beérkező fényjelet (Relatív Fény Egységek) a mérést végző műszer (Randox Evidence Investigator) digitális kamerája fogadja és a műszer szoftvere a kalibrációs görbéhez viszonyítva számolja át a partnerek számára is informatív értékekre (pl. 10,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). E technológia tehát lehetővé tette, hogy toxin vizsgálati csomagokat alkossunk. Ezek jelenleg Toxin4 és Toxin7 formában rendelhetők.

Toxin4: aflatoxin B1/B2, DON, T2, F2

Toxin7: aflatoxin B1/B2; aflatoxin G1/G2, DON, T2, F2, fumonizin, ochratoxin-A

A fent említett takarmánytoxinokra vonatkozó határ- és irányértékek megtalálhatók a honlapunkon: <http://www.atkft.hu/info/mikotoxinvizsgalatok>

A jelenleg is kidolgozás alatt álló és tesztidőszakát élő Állategészségügyi Diagnosztikai Laboratóriumunkban is ELISA módszereken alapuló tesztekkel végezzük majd a fertőző betegségek (pl. paratuberkulózis, BVD, IBR) kimutatását a havi ellenőrző fejések mintáiból.