

Schnellnachweis des Mykotoxins Zearalenon mittels 3D-Immunofiltration

O. Schewtschenko, M. Hoffmann, M. Pietraszczyk, P. Miethe

Motivation

Das Mykotoxin Zearalenon (ZEA) ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt ubiquitär vorkommender Fusarien, insbesondere der Arten *Fusarium colorum* und *Fusarium graminearum*, welche überwiegend Getreide befallen (Abb. 1). Zearalenon (Abb. 2) ist chemisch stabil, übersteht den Verarbeitungsprozess und gelangt so in Lebens- und Futtermittel, wo es auf Grund seiner stark toxischen Wirkung auf Menschen und Nutztiere zu den Kontaminanten gehört. Die gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmengen für Zearalenon im unverarbeiteten Getreide sind in der VO (EG) 856/2005 wie folgt festgelegt:

- unverarbeiteter Hartweizen und Hafer: max. 100 µg/kg
- alle anderen unverarbeiteten Getreide: max. 100 µg/kg
- unverarbeiteter Mais: max. 200 µg/kg

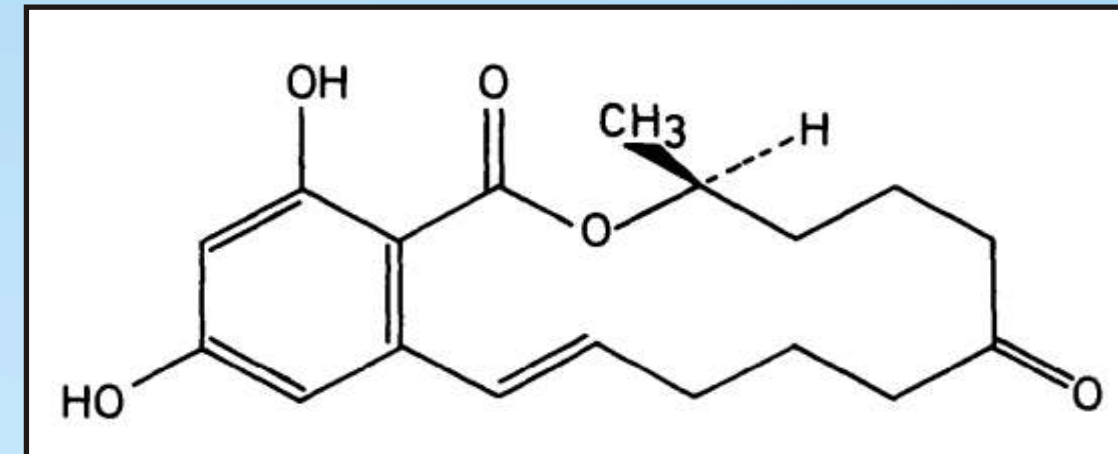


Abb. 2: Strukturformel Zearalenon



Abb. 1: Ährenbefall durch Fusarium

Ziel eines FuE-Projektes am fzmb ist die Entwicklung einer feldtauglichen Schnellanalysemethode zum quantitativen Nachweis von Fusarientoxinen. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden drei kompetitive Immunoassays auf Basis der 3D-Immunofiltration entwickelt und vergleichend getestet.

Methode

Die 3D-Immunofiltration ist ein dem lateral-flow Verfahren verwandtes immunologisches Nachweisverfahren. Im Unterschied zum lateral-flow wird hierbei der analytspezifische Fängerantikörper auf einem Volumenfilter immobilisiert und der Assay im Durchfluss durchgeführt. Durch die spezifische Bindung an die modifizierte Filtermatrix erfolgt eine Anreicherung des Analyten auf dem Filter. Die Bindung von Farbstoffkonjugaten an den auf dem Filter gebundenen Analyten erzeugt eine spezifische Einfärbung, welche photometrisch nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Durch Variation des Ablaufes können folgende Assays realisiert werden:

- Kompetitiver Immunoassay: markiertes und unmarkiertes Zearalenon der Probe konkurrieren um freien ZEA-Antikörper an der Oberfläche des 3D-Filters (Abb. 3a).
- Sequentieller Immunoassay: unmarkiertes Zearalenon verdrängt einen Teil des bereits an ZEA-Antikörpern gebundenen biotinylierten Zearalenons (Abb. 3b).
- Immunoassay mit Direktkonjugat: unmarkiertes Zearalenon konkurriert mit dem Direktkonjugat um freie ZEA-Antikörper an der Oberfläche des 3D-Filters (Abb. 3c). Das Direktkonjugat stellt dabei eine Suspension aus Farbpartikeln dar, die mit den Zearalenonmolekülen beschichtet sind.

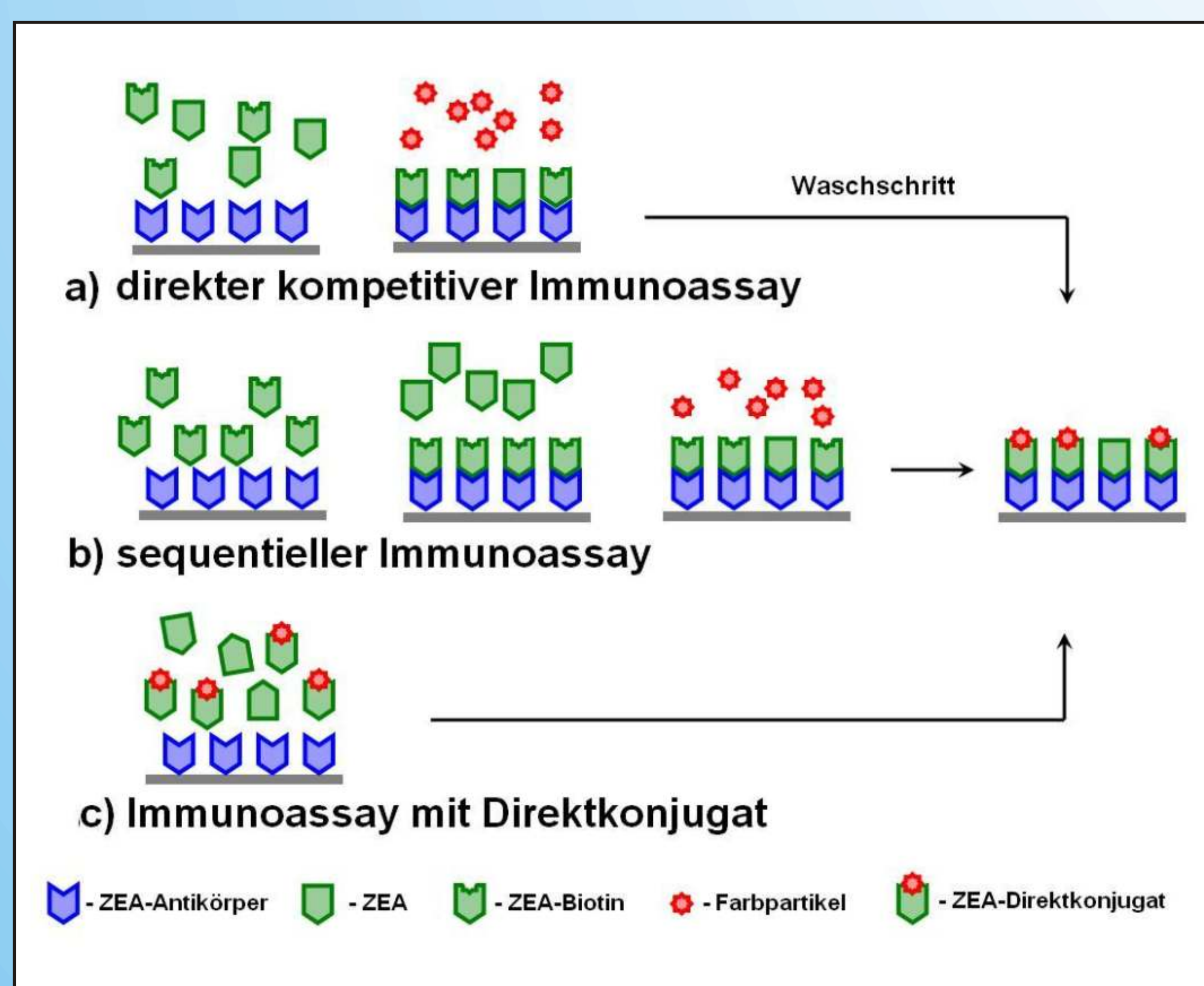


Abb. 3: Schematische Darstellung der Immunoassays

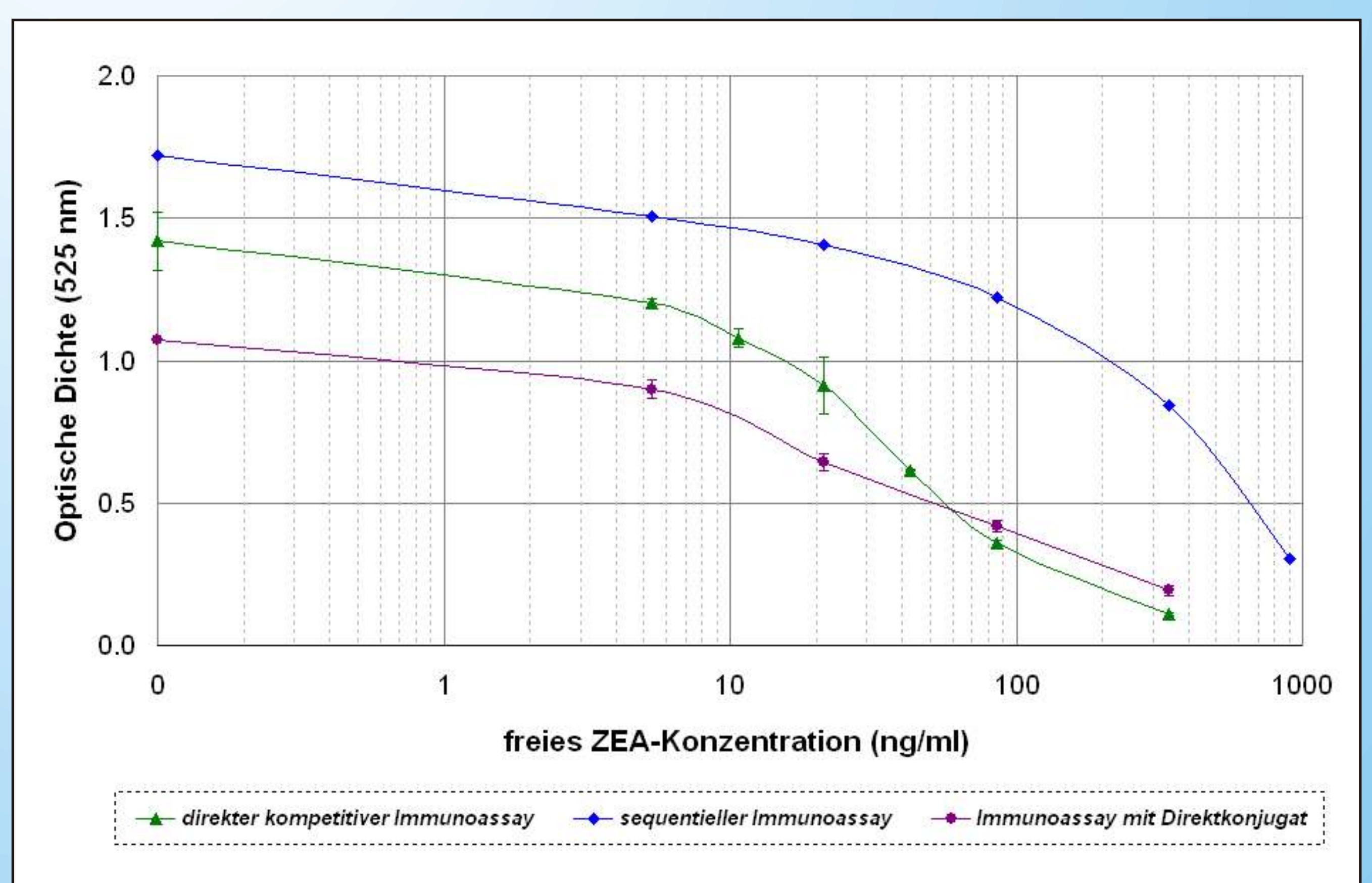


Abb. 4: Gegenüberstellung der Kalibrationskurven

Die gemessene optische Dichte des 3D-Filters ist direkt proportional zur Menge an gebundenen Farbpartikeln und somit umgekehrt proportional zur Konzentration an Zearalenon in der Probe. Die Kalibrationskurven der drei Assayvarianten sind in Abb. 4 dargestellt. Die Detektionsbereiche der Assays umfassen 10 - 1.000 ng/ml. Das beste Kompetitionsverhalten weist der direkte kompetitive Assay auf.

Fazit

Die weitere Entwicklung des Schnelltests zum Nachweis von Zearalenon im Getreide wird auf dem vorgestellten Prinzip des direkten kompetitiven Immunoassay basieren. Das Einsetzen der Farbpartikel als Marker bringt den Vorteil, dass einige zusätzliche Arbeitsschritte (u.a. Substratzugabe) entfallen. Somit verkürzt sich die Analysezeit.