



Hometoksiinien pikamääritysmenetelmät

Analytiikkapäivät 2012, Kokkola

Sari Rämö

Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus

Hometoksiinit

- Erilaisten homesienien metaboliatuotteita
- Muodostuu joko kasvukaudella tai varastoitaessa
- Tarvitsee sopivat kosteus- ja lämpötilaolosuhteet
- Esiintyy kasviperäisissä elintarvikkeissa
 - Mm. viljat, pähkinät, hedelmät, palkokasvit
- Krooniset haittavaikutukset ovat akuutteja vaikutuksia yleisempiä
 - Aiheuttavat mm. maksa-, munuais- ja kurkunpääsyöpää (kehitysmaat)
- Aiheuttaa eläimillä mm. ruokahaluttomuutta, tuotoksen laskua, lisääntymishäiriöitä, sisäisiä verenvuotoja
 - keskenmenot

MTT:n määrittämät *Fusarium*-lajit ja niiden tuottamat toksiinit

MTT punahomeseminaari 28.11. 2007

- *F.avenaceum* (*F.av.*): Moniliformiini (MON), enniatiinit (ENN) ¹⁾
- *F.culmorum* (*F.culm.*): Deoksinivalenoli (DON), tsearalenoni (ZON) ²⁾
- *F.graminearum* (*F.gram.*): DON, ZON, asetyylideoksinivalenoli (AcDON) ²⁾
- *F.sporotrichioides* (*F.spor.*): T-2 ja HT-2 –toksiinit ²⁾, beauverisiini (BEA) ¹⁾
- *F.poa*: nivalenoli (NIV), fusarenon X (F-X), diasetoksiskirpenoli (DAS) ²⁾, BEA ¹⁾
- *F.langsethiae* (*F.lang.*): T-2 ja HT-2
- *F.tricinatum* (*F.tric.*): MON, ENN ¹⁾
- *F.arthrosporioides*: MON, ENN ¹⁾
- *F.equiseti*: DAS ²⁾
- *F.sambuscinum*: DAS ²⁾

1) Jestoi M., Emerging *Fusarium*-mycotoxins in Finland, EELA 01/2005

2) Widestrand J., Assessment of Trichothecene Contamination – Chemical aspects and biological methodology, Agraria 274 (2001)

Homeoksiinianalytiikka MTT:llä

- Kromatograafisilla menetelmillä
- *Fusarium*-toksiinit
 - 8 ns. trikotekeeniä
 - DON, DAS, 3-AcDON, 15-AcDON, NIV, T-2 ja HT-2
 - TMSI-johdannaisinaan GC-MS-tekniikalla
 - Sisäisen standardin menetelmä
 - Akkreditoitu 2003 ->
- Lisäksi HPLC-FLD –tekniikalla
 - Tsearalenoni
 - Okratoksiini A (Penisillium-ryhmän homeet)
 - Aflatoksiinit B1, B2, G1 ja G2 (Aspergillus-ryhmän homeet)
 - TFA-johdannaisinaan

Miksi pikamenetelmiä?

- EU on asettanut muutamille hometoksiineille suurimmat sallitut pitoisuudet
 - Viljan ostaja vaatii, että viljaerä täyttää vaatimukset
 - Kuluttajan ja tuotantoeläimen terveys (pikkulapset, emakot, porsaas)
- GC-MS ja LC-MS tekniikkaan perustuvat menetelmät
 - Vaativat kemiallista osaamista
 - Kalliita tavalliselle viljelijälle
 - Läpimenoajat eivät täytä vilja- ja elintarviketeollisuuden tarpeita

EU:n asettamat raja-arvot 2006

	DON µg/kg	ZON µg/kg	OTA µg/kg	AflaB1(summa) µg/kg	Fumonisiinit µg/kg
maissi	1750	200	5	5,0 (10)	2000
kaura	1750	100	5	2,0 (4,0)	-
Muu vilja	1250	100	5	2,0 (4,0)	-
Lasten- ruoka	200	20	0,5	0,10	200

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 1881/2006, annettu 19 päivänä joulukuuta 2006, tiettyjen elintarvikkeissa olevien vierasaineiden enimmäismäärien vahvistamisesta

EU:n raja-arvosuositukset 2012

	T-2 + HT-2 µg/kg
kaura	1000 - 1500
Ohra ja mallasohra	100 - 200
maissi	100 - 200
Vehnä, ruis ja muut viljat	50 - 75

Brussels,C(2012) final SANCO/11225/2012 – rev 2, Draft
COMMISSION RECOMMENDATION
of on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products
intended for human consumption

Esimerkkejä pikamenetelmistä

- ELISA kuoppalevyanalyysit
 - Soveltuu laboratorionkäyttöön
- Sivuvirtaustestit
 - Käytössä viljanvastaanotossa
- NIR/NIT –tekniikka
 - Viljanvastaanottoon, kuivaamoille
- Dip Stick –testit
 - Lähinnä kvalitatiivinen
- Fluoresenssipolarisaatio
 - Vaatii kallista laitetekniikkaa

Lähde: Pro gradu-tutkielma, Jenni Hankomäki, Turun yliopisto, 2009

ELISA kuoppalevyanalyysit

- Perustuu spesifisiin vasta-aineiden ja antigeenien sitoutumiseen
 - = enzyme-linked immunosorbent assay
 - hometoksiini = antigeeni
- Kaupalliseja kittejä eri valmistajilta
 - Neogen, r-Biopharm, RomerLabs, Helica, Biocontrol
 - DON, ZON, OTA, AFLAtotal, AFLA M1, Fumonisiinit, T-2/HT-2, Patuliini
 - 48 tai 96 kuoppalevyjä
 - Sisältävät standardit ja reagenssit
 - Selkeät käyttöohjeet
 - Kemikaalien kulutus vähäistä
- Yleensä tyypiltään kilpaileva ELISA –testi
 - Joissakin kiteissä lisäksi toinen vasta-ainelisäys

Lähde: Pro-gradu-tutkielma, Jenni Hankomäki, Turun yliopisto, 2009

Neogen Veratox T-2/HT-2

- SafeCereal: 20 kauranäytettä
- referenssinä Eviran LC-MS tulokset
- mittaukset 28.-31.8.12
- Lot: 126033 kaikissa kiteissä
- n. 5 kk käyttöaika jäljellä
- Standardit: 0, 25, 50, 100 ja 250 ppb

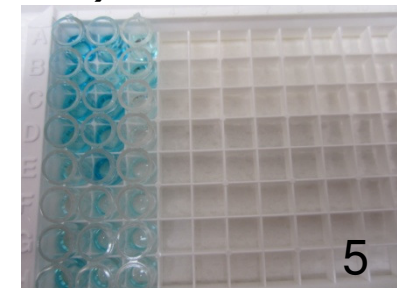
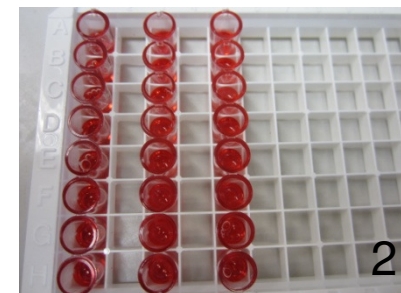
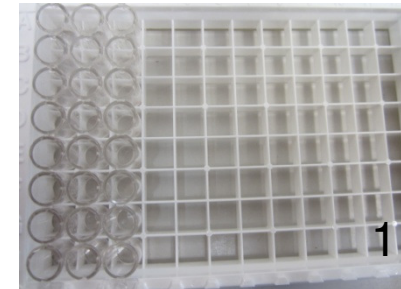


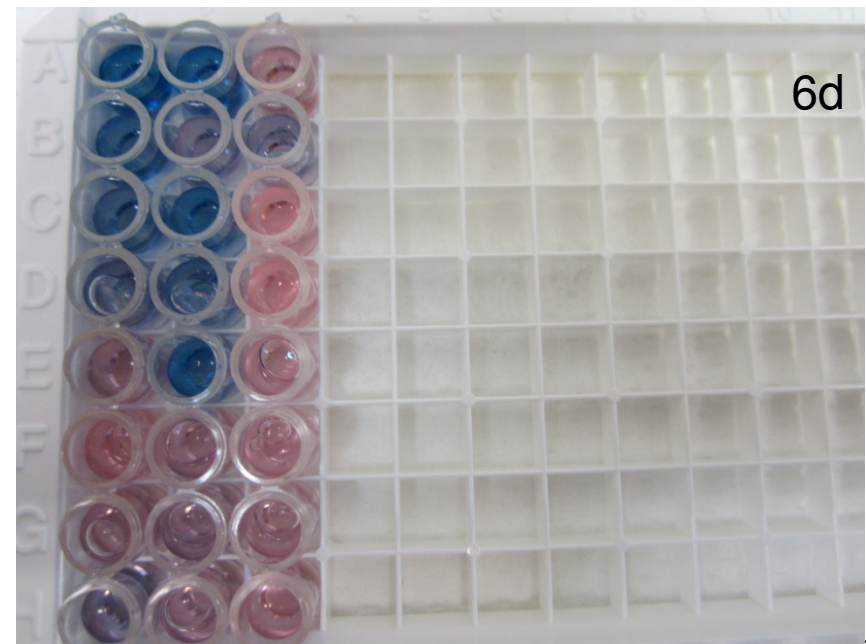
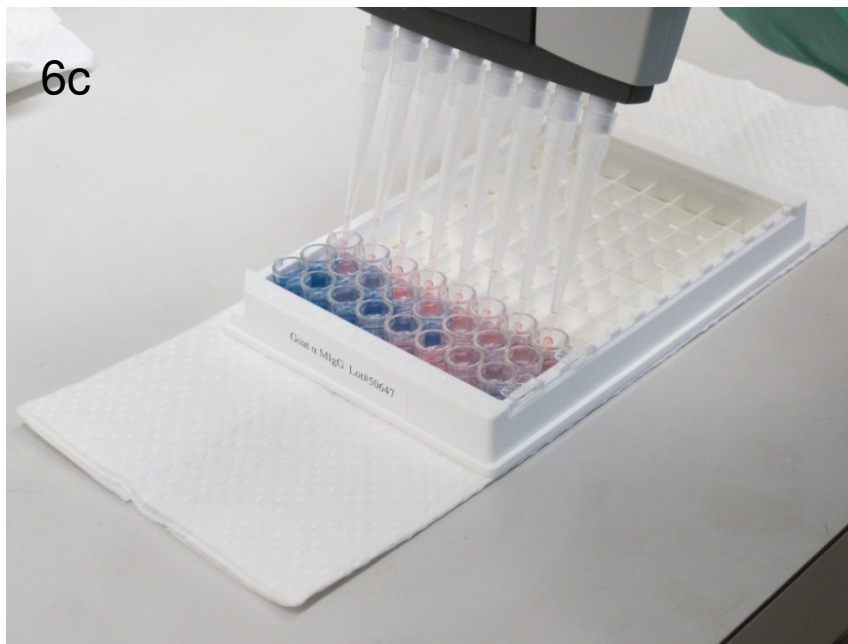
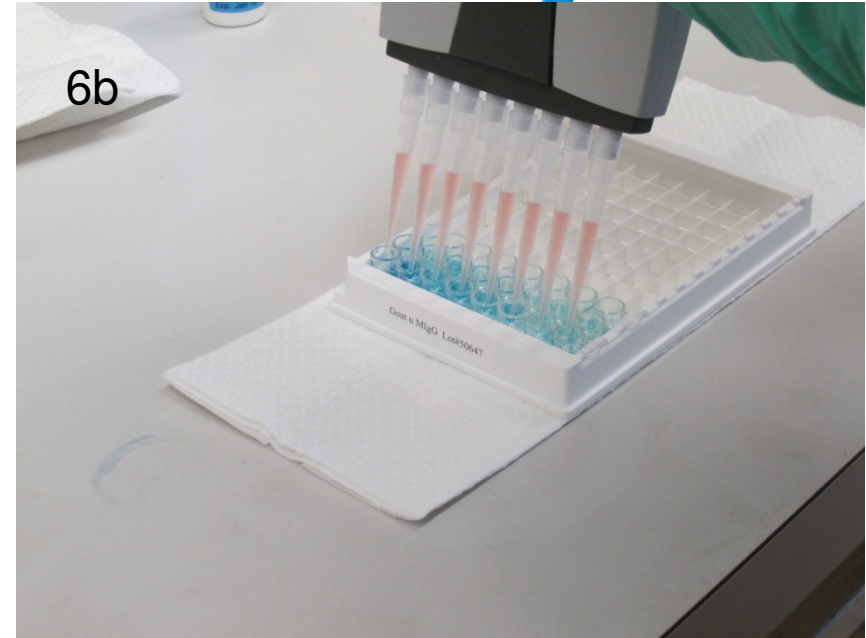
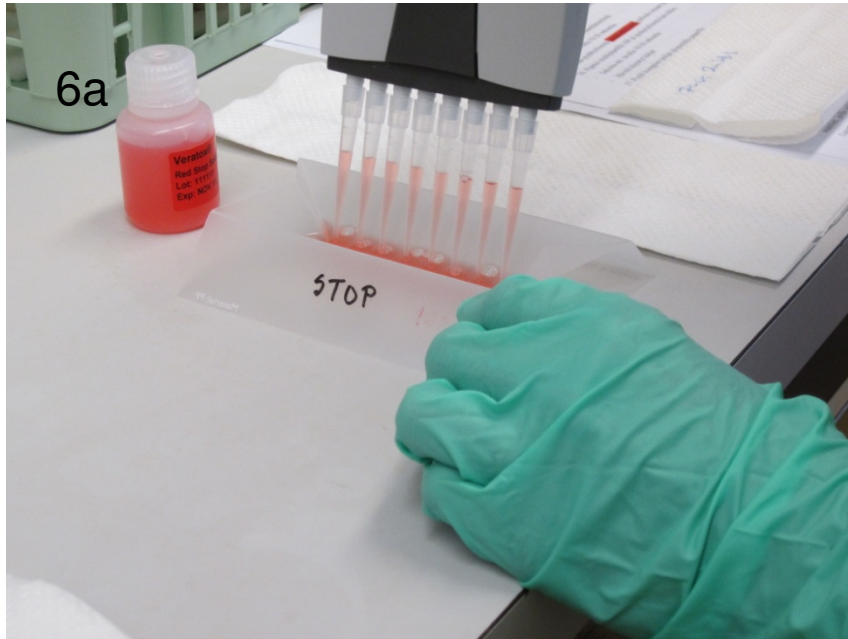
Näytteen valmistaminen ELISAan

- Jauhettu näyte
 - 5, 10 tai 20 g
 - Edustettava koko näyte-erää
 - Hienon pikakahvijauheen kaltainen, 2 mm seulan läpi
- Muutaman minuutin uutto ravistellen
 - Uuttoliuos riippuu analysoitavasta hometoksiinista
 - Vesi, vesi-metanoli (esim. 70% metanoli)
- Näytteen suodatus
 - Whatman #1 tai vastaava
- Uutteen laimennus
 - Vedellä, kittiin kuuluvalla puskuriliuoksella
 - Ohjeen mukaan

Kilpaileva ELISA

1. Vasta-aine kiinnittyneenä kuoppaan
2. Lisätään analyytin ja konjugaatin seos
 - Tai lisätään ensin näyte/standardi ja sitten konjugaatti
 - Näytteen sisältämä antigeeni kilpailee antigeenikonjugaatin kanssa vasta-ainepaikoista
3. (Lisätään toinen vasta-aine)
 - Ridascreen: DON, Aflatoksiinit, Fumonisiinit
4. Pestään pois sitoutumaton konjugaatti
 - + kuivaus
5. Lisätään substraatti
 - Väri muodostuu, kun substraatti liittyy konjugaattiin (sininen)
 - Mitä enemmän väriä, sitä vähemmän toksinia
6. Lisätään pysäytysliuos
 - Värinmuutos keltaiseksi tai sinipunaiseksi





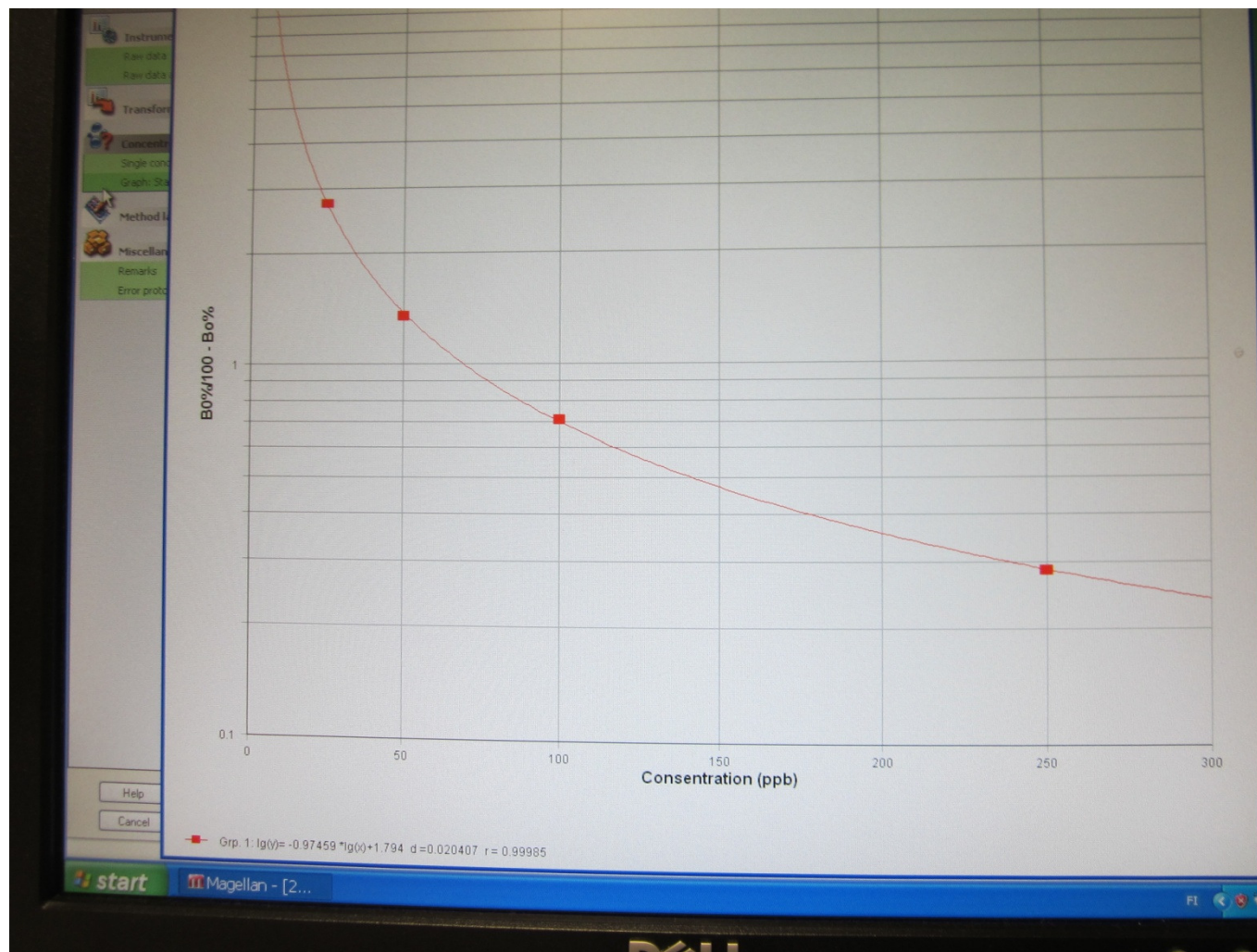
ELISA toksiinipitoisuuden mittaaminen

- Kuoppalevylukijalla
 - Väriin optinen tiheys
 - Korkein absorbanssi STD 0 ppb
 - Mitä alhaisempi absorbanssi, sitä enemmän toksiinia
 - Keltainen väri: 450 nm
 - Sinipunainen väri: 650 nm
 - Ilmoittaa pelkän absorbanssin, jolloin

$$\frac{\text{Näytteen t. standardin absorbanssi}}{\text{standardi 0 ppb:n absorbanssi}} = \% \text{ absorbanssi}$$

- Ohjelma: kalibraatiokäyrä, standardien ja näytteiden pitoisuudet
 - Neogen: $r \geq 0,995$, hyväksyttävä kalibraatio

Magellan 6: Veratox T-2/HT-2 kalibraatiokäyrä 29.8.2012



Tekemisessä huomioitavaa

- Näytteenotto
 - Siilo- ja viljakuormista on otettava riittävästi osanäytteitä
 - Yhdistetään ja otetaan edelleen osanäytteitä=> laboratorionäyte
- Käytä vain voimassa olevia kittejä (exp.date)
- Reagenssien on oltava huoneenlämpöisiä
 - Prof. Erastus Kangethe, Nairobien yliopisto, Kenia
 - Havaittu käytännössä
- Monikanavapipetti välttämätön
 - Konjugaatin, substraatin ja stop-liuoksen lisäämiseen
- Pipetointitekniikka
 - Estä kuoppien kontaminoituminen
 - Oikea pipetointitilavuus

Mittauksiin liittyvät ristireaktiot

- Ristireaktiot B-tyyppin trikotekeeneillä
 - häiritseviä
 - Mittaa DON:n lisäksi 3-AcDON, 15-AcDON, NIV, ZON
 - Voivat olla > 100 %, jopa 300 %
 - Jos DON 1500 µg/kg ja 3-AcDON 150 µg/kg, niin tulos voisi olla joko 1650 µg/kg < 1750 µg/kg tai 1950 µg/kg > 1750 µg/kg
 - 300 % ristireaktio Neogen Veratox 5/5 DON 15-AcDON:lle maissireferenssistä (Lajittelu- ja kuorinta-hanke, Jenni Hankomäki)
- Ristireaktiot A-tyyppin trikotekeenillä
 - toivottuja
 - 100 % ristireaktio sekä T-2 ja HT-2 toksiinille
 - Neogen Veratox T-2/HT-2
 - Useimmilla vain T-2 100 %, HT-2 ei ilmoitettu tai < 50 %

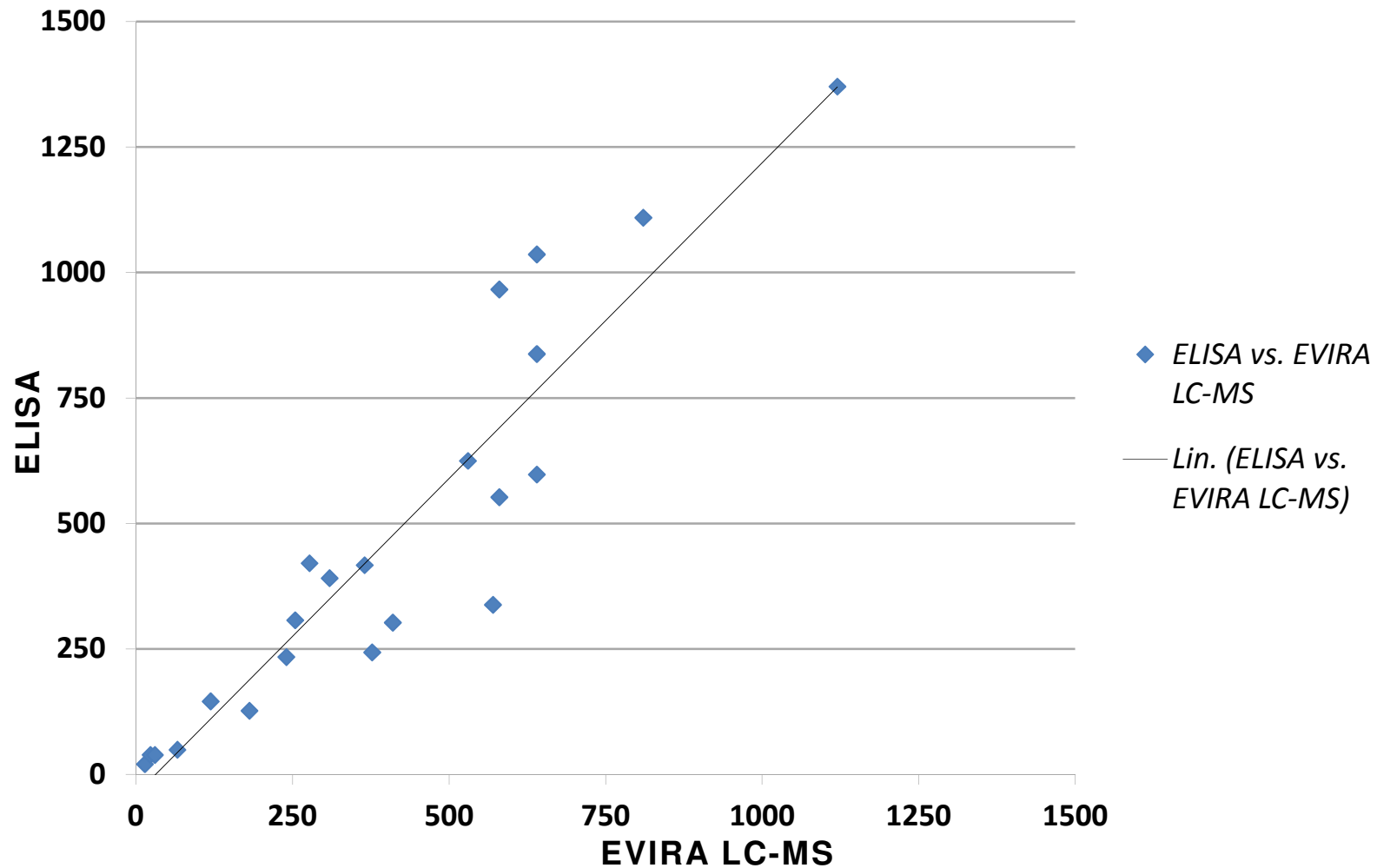
Mittauksiin liittyvät ristireaktiot jatkoa

- Totaali Aflatoksiini
 - Ainoastaan Aflatoksiini B1:lle 100 %, muille alhaisempi
 - Ei yleensä haittaa, koska AFB1 yleisin ja myrkyllisin
- Fumonisiinit
 - Fumonisiini B1:lle 100 %, muille alhaisempi
- + Matriisin vaikutus
 - Tarkista soveltuuko tutkittavalle näytematriisille
 - => Onko suoritettava oma validointi?
 - Neogen Veratox T-2 ja HT-2 sopii vehnälle ja kauralle,
 - Antaa liian suuret tulokset ohralle

Lupaavia ELISA-mittauksia

- Safe Food –Safe Dairy –hanke (MTT, Evira, Nairobi YO)
 - Keniassa ongelmana aflatoksiinien ja fumonisiinien saastuttama maissi
- => Aflatoksiini M1 jäämät lehmän ja äidin maidossa
- Tuhansia maissi- ja maitonäytteitä analysoitu RidaScreen ELISA –menetelmillä
 - Aflatoksiinit total: AFB1 ja AFB2
 - Aflatoksiini M1
 - Fumonisiinit: FB1, FB3, FB2
 - Myös durra- ja hirssinäytteitä
 - HPLC –varmistukset meneillään syksyllä 2012

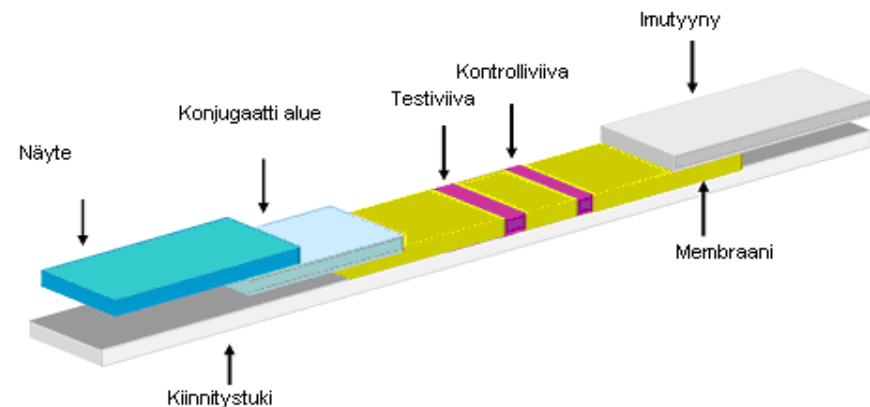
SafeCereal: MTT Veratox T-2/HT-2 ELISA vs. EVIRA LC-MS



- regressiosuoran yhtälö $y = 1,25811 x - 39,4972$

Sivuvirtaustestit

- (Lateral flow test) eli liuskatesti (strip test)
- Perustuu immunokromatografiaan
- Koostuu näyte-, konjugaatti- ja imutyynystä, membraanista, kontrolli- ja testiviivasta sekä kiinnitystuesta
- Näytteen valmistus mittaukseen ei merkittävästi poikkea kuoppalevyanalyyysistä
- Lukijalla kvantitatiivinen tulos
 - Sisäänrakennettu kalibraatio



Kaupallisia sovelluksia

- Charm Science ROSA + ROSA M -lukija
 - DON, ZON, OTA, T-2/HT-2, aflatoksiinit ja fumonisiinit
 - Erillinen inkubaattori
- Neogen Reveal + AccuScan -lukija
 - DON, T-2/HT-2, ZON, OTA,, aflatoksiinit (total ja M1) ja fumonisiinit
- Vicam Vertu
 - DON, aflatoksiinit, fumonisiinit
- RomerLabs
 - DON, aflatoksiinit ja fumonisiinit
- r-Biopharm Rida Quick ja Rida Quick Scan
 - DON, ZON, Aflatoksiinit, Fumonisiinit

MTT:Ilä 2007-2008 testatut

Reveal[®] for DON

Neogen Inc.



ROSA[®] DON

Charm Science Inc.



MTT:n DON-testien tulokset

- MTT GC-MS DON referenssimenetelmänä
- Reveal for DON
 - Soveltui ohralle, 3-AcDON kasvattaa liuskalla saatua tulosta
 - toimi vehnänäytteille suhteellisen hyvin
- DON ROSA
 - Soveltui vehnälle, 3-AcDON ristireaktiota ei havaittu
 - Soveltui ohralle alhaisissa pitoisuuksissa
 - Ohralla korkeat pitoisuudet jopa kaksinkertaiset
 - Kitin positiivinen kontrolli toimi epäluotettavasti
- Antoivat kauralle epäluotettavat tulokset
 - Jauhetusta tai murskatusta jyvästä
 - Ongelmana maitomainen uute
 - Tulos saattoi olla referenssitulosta alhaisempi tai korkeampi

Rida Quick Scan

- 24.10.2012, Mari Koskinen, Mediq Finland
 - Suomessa n. 40 laitetta käytössä
 - Suomen Viljava, Ravintoraisio, Agrimarket, Osuuskauppa
 - Lisäksi muita käyttäjiä
 - Keskeneneräisiä tarjouksia
- NJF-seminaari 11/2012 Uppsala
 - Ruotsissa analysoitu yli 20 000 viljanäytettä: DON
 - Norjassa tutkittu mahdollisia ristireaktioita
- VYR-jäsenistölle lähetetty sähköpostikysely
 - Yleisin käytössä oleva DON –pika-analyysi Suomessa
 - Laboratorioissa, varastoissa, rehutehtaalla
 - Myllyissä

Validoinnista

- R-Biopharm on käyttänyt validoinnissa vehnää ja ruisvehnää
 - Trilogy vehnäreferenssillä
 - Todellisilla ja standardilisätyillä näytteillä
 - Pitoisuusalue vaikuttaa kattavalta
- yksi yritys raportoi tekemästään kauravalidoinnista
 - Rida Quick Scan, ELISA, HPLC (ulkopuolinen laboratorio)
 - ELISA poikkesi kahdesta muusta eniten
 - Jos HPLC tulos < 1300 µg/kg, pikatestin tulos poikkesi vain vähän siitä
 - Useiden näytteiden mittaustuloksia verrattu
 - Jos HPLC tulos > 1300 µg/kg, pikatestin tulos yleensä korkeampi
 - < 1750 µg/kg > alueella olisi pitänyt mitata enemmän näytteitä

Yhteenveto sähköpostivastauksista

- Testataan kaikki elintarvikekaurat
 - Joillakin myös kaikki vehnät
 - Lisäksi testejä ohrasta ja rukiista
- Näytteenotto viljanvastaanotossa
 - Edustava näyte automaattikairalla useasta pisteestä
 - Automaattikaira ei ollut kaikissa tapauksissa käytettävissä
 - Osanäytteet yhdistetään ja sekoitetaan
 - Jaetaan näytteenjakajalla 2 x 1 kg (työ- ja varastonäyte)
- Ennakkonäyte
 - Viljelijän ottama näyte, edustavuus viljelijän vastuulla
- Rinnakkaisten analyysien määrä
 - Yleensä yksi määrittäminen
 - Laimennus > 5,5 ppm näytteestä

Yhteenveto jatkoa

- Laadunvarmistus
 - Kaupallisia referenssimateriaaleja ei ole käytössä
 - Kaikista elintarvikeraja-arvon ylittävistä näytteistä ei tehdä kromatografista määrittystä
 - Oman näytteen käyttäminen referenssinäytteenä ei ollut tullut kenenkään mieleen
 - Vertailutulos kromatografisella määrittelyksellä toisi lisävarmuutta
- Hylkäämisperusteet
 - Pika-analyysin tulos riittää yleensä hylkäämisperusteeksi
 - Lähellä raja-arvoa saatetaan tehdä uusi pika-testi tai käyttää kromatografista menetelmää
 - Uusinta-analyysit saman yrityksen toisessa toimipisteessä

Tulokseen vaikuttavista tekijöistä

- Näytemäärä
 - Rida Quick Scan: 1-2 g jauhettua näytettä, muilla enemmän
=> Saadaanko edustava DON -tulos näytteestä ja koko viljaerästä?
- Uttoliuos
 - Rida Quick: valmistajan uuttopuskuri, muilla vesi
=> Onnistuuko DON -analyysi kaurasta toistettavammin?
- Laitteen testaus
 - Viivakoodinluku = mitä kalibraatiota käytetään?
 - kontrolliliuosten mittaus: negatiivinen ja positiivinen kontrolli
 - Charm DON ROSA: positiivinen kontrolli: 1000 ppb ± 500 ppb
=> Kun hyväksyttävä tulos, voit aloittaa varsinaisen näytteiden mittauksen
- Laadunvarmistus
 - Kontrolli- ja testiviivojen on oltava ehjät
=> Pitäisi mitata lisäksi sertifioituja referenssinäytteitä

Soveltuuko Rida Quick Scan –kauralle?

- Vuoden 2012 turvallisuustietoseurannan kaurat
 - 80 näytettä
- Analysoitu MTT:llä GC-MS –tekniikalla
 - DON lisäksi tulos 3-AcDON:sta ja NIV:sta
- Turun AMK tekee Rida Quick Scan määritykset
 - opinnäytetyönä

NIR/NIT -tekniikka

- Lähi-IR-alue on 720-2500 nm
- Perustuvat yleensä heijastus- tai läpäisy-spektreihin
 - Vaativat kemometrisiä ohjelmia spektrien hyödyntämiseen analyyttisiin tarkoituksiin
- Edellyttää hyvää kemiallista referensimenetelmää toimivien NIR-kalibraatioiden aikaansaamiseksi
 - mm. typpi/proteiini, kosteus ja rasva-/öljypitoisuus
- Soveltuu bulkkimateriaalien määrittämiseen
 - Vähäinen tai ei ollenkaan esikäsittelyä
- NIR-mittaus ei tuhoa näytettä
- Mittauksen kesto < 1 min

Lähde: Pekka Manninen, MTT, sähköposti 22.11.2012

NIR/NIT hometoksiinianalytiikassa

- Ei päästä niin alhaisiin pitoisuuksiin kuin kemiallisilla määrityksillä
 - molaarinen absorptiviteetti on pieni
- MTT ja Boreal kasvinjalostus testaavat DON:lle
 - Rahoittajana lisäksi VYR
- Haasteena riittävän edustavan näytemateriaalin löytäminen

Lähde: Pekka Manninen, MTT, sähköposti 22.11.2012

Kiitos mielenkiinnosta!

