

# XI. TUDOMÁNYOS ELŐADÁS ÖSSZEFOGLALÓJA

*Mikotoxinok integrált analitikai és mikrobiológiai vizsgálata: mikrogyöngyös immunoassay fejlesztése és alkalmazása, valamint fungicid-hatásvizsgálatok agrár- és biomonitoring rendszerekben*

## Tartalomjegyzék

<b>XI. TUDOMÁNYOS ELŐADÁS ÖSSZEFOGLALÓJA</b> .....	91
1) Bevezetés és célkitűzések .....	93
a) Mikotoxin analitika.....	96
1. CFIA továbbfejlesztése.....	102
2. Multi-mikotoxin hatások vizsgálata.....	103
3. CFIA módszer tesztelése állati eredetű minták mikotoxin meghatározására .....	104
4. CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben - gabonaalapú alkalmazások .....	105
b) Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktíválásán keresztül.....	107
1. Fonalas gombák izolálása és pontosabb megismerése .....	110
2. Agardiffúziós és CLSI M38-A2 szabványon alapuló mikrodilúciós eljárás MIC protokollok összehasonlítása .....	110
3. Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata.....	111
2) Anyagok és módszerek.....	113
a) Mikotoxin analitika.....	113
1. CFIA továbbfejlesztése.....	113
2. Multi-mikotoxin hatások vizsgálata.....	115
3. CFIA módszer tesztelése állati eredetű minták mikotoxin meghatározására .....	116
4. CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben - gabonaalapú alkalmazások .....	117
c) Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktíválásán keresztül.....	119
1. Fonalas gombák izolálása és pontosabb megismerése .....	119
2. Agardiffúziós és CLSI M38-A2 szabványon alapuló mikrodilúciós eljárás MIC protokollok összehasonlítása .....	120
3. Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata.....	121
3) Eredmények és megvitatásuk .....	123

a)	Mikotoxin analitika.....	123
1.	CFIA továbbfejlesztése.....	123
2.	Multi-mikotoxin hatások vizsgálata.....	129
3.	CFIA módszer tesztelése állati eredetű mikotoxin meghatározására.....	130
4.	CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben - gabonaalapú alkalmazások .....	131
b)	Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktiválásán keresztül.....	136
1.	Fonalias gombák izolálása és pontosabb megismerése .....	136
2.	Agardiffúziós és CLSI M38-A2 szabványon alapuló mikrodilúciós eljárás MIC protokollok összehasonlítása .....	139
3.	Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata.....	141
4)	Diszkusszió és következtetések.....	146
5)	Összefoglalás .....	149
6)	Új tudományos eredmények.....	151
7)	Hivatkozások .....	153

# 1) Bevezetés és célkitűzések

Ez elmúlt, alig több mint 10 év alatt egymilliárd emberrel nőtt a világ népessége. Annak érdekében, hogy az egyre növekvő népességet megfelelő mennyiségű és minőségű élelmiszerral tudjuk ellátni, az emberiségnek az elkövetkező 35 évben 70%-kal több élelmiszert kellene előállítania (Doering & Sorensen, 2018).

Az ipari forradalom óta az üvegházhatású gázok kibocsátása által okozott antropogén éghajlatváltozás a modern civilizációk egyik legnagyobb kihívása (Pörtner et al., 2022). Az szélsőséges időjárási körülmények egyre nagyobb kihívásokat jelentenek a mezőgazdaság számára világszerte. A klímaváltozás okozta hőmérséklet-emelkedés, éghajlati határok eltolódása és a páratartalom változása egyre inkább megzavarja a mezőgazdasági rendszereket, kedvező feltételeket teremtve a gombás kórokozók megjelenésének és felszaporodásának alapvető gazdasági növényeinken (Kos et al., 2023).

Napjainkban a penészgombák terjedése tapasztalható a Kárpát-medencében és egész Európában. A penészgombák növekedésük során az elsődleges anyagcseretermékek mellett másodlagos anyagcseretermékeként termelhetnek hasznos (pl.: antibiotikumok), illetve káros vegyületeket is (Kormos, 2003). Ezeket a káros vegyületeket nevezzük mikotoxinoknak. A mikotoxinokat a természetben keletkező, legerősebb mérgező hatású vegyületekként tarthatók számon; toxikológiai szempontból sokrétű kockázatot jelentenek (neuro-, geno-, és citotoxicitás; immunszuppresszió; endokrin zavarok; karcinogenitás), emiatt komoly kockázatot jelentenek a közegészségre, az állatjólétre és az élelmezésbiztonságra is.

A legjelentősebb mikotoxin-termelő szervezetek az *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* fajok közé tartoznak. Az általuk termelt mikotoxinok, mint az aflatoxinok, ochratoxinok (pl. ochratoxin A (OTA), fumonizinek (pl. fumonisin B1 (FB1)), patulin, zearalenon (ZEA) és a trichotecének közé tartozó deoxyvalenol (DON), T-2 és HT-2 toxin gyakran előfordulnak terményeken (Alshannaq & Yu, 2017). Köszönhetően annak, hogy egy gomba törzs több toxint termelhet, illetve különböző nemzetségek ugyanazon toxin előállítására is képesek, gyakori a mikotoxinok együttes előfordulása. A kialakult mikotoxin kombinációk toxikodinámiája nem pusztán additív; szinergia vagy antagonizmus is felléphet, ami az élelmiszerbiztonság és a kockázatbecslés szempontjából kiemelt fontosságú. A penészek megjelenésük és toxintermelésük helye szerint csoportosíthatók. A raktári penészek, mint például *Aspergillus*-ok magas hőmérséklet (22–35 °C) és alacsony nedvesség mellett; a szántóföldi penészek (pl. *Fusarium*) mérsékelt tartományban (20–25 °C) és magas relatív páratartalom mellett jellemzőek. A klimatikus/stressz tényezők (hőhullámok, csapadék, tárolási körülmények) a kolonizációt, majd a másodlagos anyagcsere – toxinbioszintézis – beindulását segítik.

A mikotoxinok rendkívül stabil kismolekulák, amelyek szerkezetük aromás gyűrűi és erős kovalens kötése miatt ellenállnak a hő-, pH- és enzimatis hatások jelentős részének, emiatt a teljes feldolgozási láncban fennmaradhatnak, sőt egyes esetekben állati eredetű ételekbe is átjuthatnak. Az expozíció tehát lehet direkt (szennyezett élelmiszer, takarmány), illetve indirekt (állati eredetű termékekből: tej, tojás, hús, belsőségek). A becslések szerint a globális termés

jelentős hányada (korábbi becslések szerint ~25%, újabb áttekintések szerint akár még ezt is meghaladó arány) érintett lehet különféle mikotoxinokkal.

Emberi fogyasztás esetén súlyos akut mérgezéseket, valamint egészségkárosodást eredményezhetnek. Káros hatásaik miatt rendkívül nagy figyelmet kell tulajdonítanunk nekik. A mikotoxinok által fertőzött takarmány problémákat okoz a haszonállatok fejlődésében, szaporodásában, valamint az állatok egészségi állapotára is negatív hatást gyakorol. A mezőgazdaságban és élelmiszeriparban előforduló fonalas gombák - különösen azok, amelyek a kukoricát és a búzát támadják meg – az okozott jelentős termés kiesésen és hozamcsökkenésen keresztül jelentős gazdasági veszteségeket is okoznak, valamint mikotoxinok termelésére való képességük miatt komoly közegészségügyi élelmiszer-biztonsági kockázatot is jelentenek. Magyarországon mind a búza, mind a kukorica fontos gabonafélék, amelyek döntő szerepet játszanak az élelmezésbiztonságban. Ezek a gabonafélék azonban különösen érzékenyek a toxinokat termelő fonalas gombák, elsősorban az *Aspergillus* és a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok által okozott fertőzésre. Globális szinten ezek a gombák a betakarított gabona akár 10%-át is fogyasztásra alkalmatlanná teszik, ami évente körülbelül 220 millió tonnát jelent (FAO, 2021), és számos országban jelentős károkat okoznak. Magyarországon a 2019-es búzaepidémia az ötmillió tonnás teljes termésemből 1,2–1,5 millió tonna toxinokkal szennyezett gabonát eredményezett. A kukoricatermesztésben a 2014-es toxinfertőzés a termés felét érintette. Az állattenyésztésben bekövetkezett károkat figyelembe véve a becsült konzervatív gazdasági veszteség meghaladta a 100 milliárd magyar forintot (körülbelül 330 millió USD). Az átlagos 10%-os szennyezettségi arány 50%-os csökkenése tehát csak Magyarországon mintegy 40 milliárd forint bevétel-növekedést jelentene. Kimutatták továbbá, hogy globális mértékekben a takarmány és annak alapanyagának 90%-ában fordul elő legalább egy, 64%-ában pedig egynél többféle mikotoxin (Ragoubi et al., 2021).

Az elmúlt évtizedekben az élelmiszerbiztonság egyre hangsúlyosabbá vált, megerősítése továbbra is fontos szerepet kap a nemzeti és nemzetközi intézkedések során. Ezt tükrözi, hogy az Európai Unió, valamint hazánk is kiemelt figyelmet fordít a mikotoxinok szigorú szabályozására, valamint előfordulásuk monitorozására (Szeitzné, 2007, 2009). Az EU 2023-ban konszolidálta a szennyezőkre (köztük a mikotoxinokra) vonatkozó rendeletét (EU) 2023/915 alatt, majd 2024-ben szigorította a DON határértékeket és bevezette a T2/HT2 kötelező maximumokat, ami az analitikai módszerek LOQ át, mérési bizonytalanságát és mintavételi előírásait is közvetlenül érinti.

Az eddigi irodalmi ismereteink alapján, a jelenleg hatásos toxinmentesítési technikák nem alkalmazhatóak mezőgazdasági léptékben, vagy nem elég hatékonyak. A NÉBIH kijelentése is ezt erősíti, miszerint a toxint maradéktalanul eltávolítani nem lehet. Sajnos az Európában jelenleg alkalmazott mikotoxin-csökkentési gyakorlatok elsősorban a betakarítás előtti és utáni kémiai kezelésekre, a vetésforgóra és az ellenálló fajták használatára támaszkodnak. Ezek a módszerek azonban csak korlátozott védelmet nyújtanak a szélsőséges időjárási körülmények között, amelyek az éghajlatváltozás miatt egyre gyakrabban fordulnak elő. Meglátásunk a jelenleg alkalmazott megközelítéstől gyökeresen eltérő módon célszerű kezelni a mikotoxin problémát, a

megelőzésre fektetni a hangsúlyt. A toxintermelő gomba pontosabb megismerése, kezelése és elpusztítása a toxin megjelenése előtt, megoldást jelenthet a problémára.

Elsődleges célunk komplex innovatív stratégia kidolgozása a toxikogén fonalas gombák és az általuk termelt, gabonafélékben előforduló toxikus szennyeződésének csökkentésére. A stratégia központi elemei (1) egy terepen is használható, kellően gyors, olcsó és egyszerű POCT (Point-of-Care Test) mikotoxin analitikai módszer kidolgozása; (2) adatbázis a mikotoxinok és gombák előfordulásáról és sokféleségéről a különböző klimatikus és mikroklimatikus viszonyok között a magyar gabonafélékben (3) a fonalas gombák felszaporodását meggátló antifungális hatóanyag és alkalmazási protokoll kidolgozása.

Tudományos munkánk 3 pillér; a mikotoxin-analitika, a kockázati adatbázis kiépítése és a penészgombák mikrobiológiai vizsgálata és inaktiválása köré csoportosult.

### **Gyors, terepen alkalmazható mikotoxin-analitika**

- a) A kompetitív fluoreszcens mikrogyöngy immunoassay (CFIA) továbbfejlesztése
  - Projekt 1: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) és accelerated Competitive Fluorescent-microsphere ImmunoAssay (aCFIA) módszerek összehasonlító vizsgálata*
  - Projekt 2: MycoFoss<sup>TM</sup> – Automatizált CFIA alapú módszer bemutatása*
  - Projekt 3: CFIA módszer összehasonlítása tandem tömegspektrometriával (MS/MS) kapcsolt ultra-nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (UHPLC-MS/MS) módszerrel*
- b) Multi-mikotoxin hatások vizsgálata
  - Projekt 1: Anyatoxinok és metabolitok hatása az immunassay működésére*
  - Projekt 2: OTA és metabolitjai állati sejtkultúrákon*
- c) CFIA módszer tesztelése állati eredetű mikotoxin meghatározására

### **Előfordulási és kockázati adatbázis kiépítése**

- a) CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben
  - Projekt 1: Mikotoxin térkép készítése kukorica minták mikotoxin adatai alapján*
  - Projekt 2: Talajművelési technikák hatás a mikotoxin felhalmozódásra*
  - Projekt 3: CFIA alkalmazása mesterségesen fertőzött kukorica hibridek mikotoxin tartalmának meghatározásában*

### **Antifungális hatóanyagok és alkalmazási protokollok fejlesztése**

- a) Fonalas gombák izolálása és pontosabb megismerése
- b) Agardiffúziós és Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) Minimális gátlókoncentráció (MIC) meghatározására alkalmas protokoll-ok összehasonlítása
- c) Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata

## a) Mikotoxin analitika

A mikotoxin-analitikában alkalmazott módszerek jelentős technológiai és koncepcionális fejlődésen mentek keresztül az elmúlt évtizedekben. A megfelelő analitikai módszer kiválasztását mindig az adott alkalmazási terület (referenciamérés, rutin szűrés, kutatás, biomonitoring), a célzott toxinok köre, a mátrix jellege, valamint az elérhető infrastruktúra együttesen határozzák meg. Az alábbiakban – a teljesség igénye nélkül - legfontosabb analitikai módszerek kerülnek röviden bemutatásra.

### 1. Kromatográfias–tömegspektrometriás módszerek

#### 1.1 TLC (Thin Layer Chromatography) módszer

TLC a mikotoxin-analitika egyik legrégebben alkalmazott kromatográfias módszere, amely egyszerűsége, alacsony költsége és robusztussága miatt hosszú ideig alapvető szerepet játszott az élelmiszer- és takarmányvizsgálatokban (Moss, 1991; Trucksess, 2001). A módszer az analitok eltérő megoszlásán alapul a szilárd állófázis (általában szilikagél) és a folyékony mozgófázis között, lehetővé téve a komponensek elkülönítését és azonosítását.

A mikotoxin-analitikában a TLC-t hagyományosan olyan toxinok kimutatására alkalmazták, mint az aflatoxinok, OTA, ZEA, fumonizinek és trichotecének (Turner et al., 2009). A detektálás gyakran UV-fény alatt (különösen fluoreszcens mikotoxinok esetén), illetve kémiai reagensekkel történő előhívással valósul meg. A módszer alkalmas kvalitatív és félkvantitatív meghatározásokra, illetve referencia-standardokkal történő összehasonlításra.

A TLC előnye a minimális műszerigény, az egyszerű alkalmazhatóság és a több minta egyidejű elemzésének lehetősége (Shephard, 2008). Ezek a tulajdonságok különösen hasznossá tették a módszert korlátozott infrastruktúrájú laboratóriumokban és korai szűrővizsgálatokban. Ugyanakkor a TLC érzékenysége és reprodukálhatósága általában elmarad a fejlettebb kromatográfias technikák (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), tandem tömegspektrometriával kapcsolt folyadékkromatográfia (LC-MS/MS)) mögött, és a kvantitatív értékelés pontosságát erősen befolyásolhatják a mátrixhatások és az operátori szubjektivitás.

Napjainkban a TLC szerepe a mikotoxin-analitikában háttérbe szorult, elsősorban oktatási, történeti vagy előszűrő célokra alkalmazzák, illetve továbbfejlesztett formáiban (pl. HPTLC, denzitometriás kiértékeléssel) még mindig releváns lehet bizonyos rutinvizsgálatokban (Shephard, 2008; Trucksess & Stack, 1995). Összességében a TLC a mikotoxin-analitika fejlődésének fontos alapköve, amelyet ma főként gyorsabb, érzékenyebb és automatizálhatóbb módszerek egészítenek ki vagy váltanak fel.

#### 1.2 HPLC és UHPLC alapú elválasztás

A HPLC a mikotoxin-analitika egyik legfontosabb és legszélesebb körben elfogadott referencia-módszere, amely nagy szeparációs hatékonyságot és megbízható kvantitatív eredményeket biztosít komplex élelmiszer- és takarmánymátrixokban (Turner et al., 2009; Shephard et al., 2013). A módszer az analitok mozgó- és állófázis közötti eltérő megoszlásán alapul, lehetővé téve egyedi vagy több mikotoxin párhuzamos meghatározását.

A mikotoxin-analitikában a HPLC-t leggyakrabban fluoreszcens (FLD) vagy UV–Vis detektorral, illetve korszerűbb alkalmazásokban tömegspektrometriás detektorral (LC-MS/MS) kombinálva alkalmazzák (Sulyok et al., 2006). Egyes mikotoxinok – például az aflatoxinok vagy az OTA – esetében elő- vagy oszlop utáni derivatizálás szükséges a megfelelő érzékenység eléréséhez, különösen FLD detektálás esetén (Visconti et al., 2001). A módszer kimutatási határai általában megfelelnek, illetve alul múlják a hatályos élelmiszer-biztonsági jogszabályokban meghatározott határértékeket.

A HPLC-alapú mikotoxin-meghatározást rendszerint összetett minta-előkészítés előzi meg, amely extrakciót, tisztítást (pl. immunaffinitásos oszlop, szilárdfázisú extrakció) és esetenként koncentrációt foglal magában. Ezek a lépések hatékonyan csökkentik a mátrixhatásokat és növelik a mérési pontosságot, ugyanakkor növelik az analízis idő- és költségigényét (Krska et al., 2019). Ennek ellenére a HPLC kiváló pontossága, precizitása és reprodukálhatósága miatt alapvető szerepet tölt be a jogszabályi megfelelés-ellenőrzésben és a megerősítő vizsgálatokban.

Összességében a HPLC módszer a mikotoxin-analitikában robusztus, nagy megbízhatóságú és szabályozói szempontból elfogadott technika, amely kulcsszerepet játszik az immunkémiai szűrőmódszerek (ELISA, LFD) eredményeinek validálásában, valamint a pontos kockázatértékelésben és az élelmiszerlánc-biztonság fenntartásában.

A HPLC továbbfejlesztett változata, az UHPLC a mikotoxin-analitika alapvető elválasztástechnikai eszköze. Az UHPLC a hagyományos HPLC alapjaira épül, de kisebb szemcseméretű állófázisokat és magasabb nyomást alkalmaz, ami rövidebb futási időt, jobb csúcseválasztást és nagyobb érzékenységet és felbontást eredményez (a gyakran 2 mikrométernél is kisebb részecskeméret növeli a felületi kölcsönhatásokat, ami élesebb és jobban meghatározott kromatográfiás csúcsokat eredményez), különösen komplex multi-mikotoxin módszerek esetén ideális módszer.

### 1.3 LC-MS/MS mint referencia- és megerősítő módszer

Az LC-MS/MS jelenleg a mikotoxin-analitika 'gold' standardjának tekinthető. A módszer kiváló szelektivitását a többfokozatú tömegszűrés (MRM – multiple reaction monitoring) biztosítja, amely lehetővé teszi az alacsony ng/kg vagy akár pg/kg szintű kimutatást is.

Az LC-MS/MS különösen előnyös:

- multi-mikotoxin analízishez,
- maszkolt és emerging mikotoxinok kimutatásához,
- megerősítő vizsgálatokhoz hatósági környezetben.

Ugyanakkor a technika hátrányai közé tartozik a magas beruházási és üzemeltetési költség, a képzett személyzet igénye, valamint a jelentős mátrixhatás, amely izotópos belső standardok alkalmazását teszi szükségessé.

### 1.4 High-Resolution Mass Spectrometry

A HPLC-vel kapcsolt nagy felbontású tömegspektrometria (HRMS) napjaink egyik legjelentősebb analitikai technikája komplex minták vizsgálatában. A módszer a HPLC nagy szeparációs

hatékonyságát egyesíti a HRMS nagy pontosságú tömegmérésével, lehetővé téve mind az ismert, mind az ismeretlen vegyületek megbízható kvalitatív és kvantitatív meghatározását, ugyanakkor rutinszerű alkalmazásuk jelenleg korlátozott az adatfeldolgozás komplexitása miatt (Krauss et al., 2010; Niessen et al., 2003; Hernández et al., 2015).

A HPLC során az analitok fiziko-kémiai tulajdonságaik (pl. polaritás, lipofilitás) alapján válnak el egymástól, míg a HRMS detektorok – leggyakrabban Orbitrap vagy repülési idő elvű (time-of-flight, TOF) analizátorok – nagy tömegpontossággal ( $\leq 1-5$  ppm) és nagy felbontással határozzák meg az ionizált komponensek tömeg/töltés arányát (Niessen et al., 2003; Makarov et al., 2010). Az ionizációhoz leggyakrabban elektroporlasztásos ionforrást (ESI) alkalmaznak, amely különösen alkalmas poláros, hőérzékeny vegyületek, így számos természetes toxin vizsgálatára (Kearle et al., 1993).

A HPLC-HRMS kiemelt szerepet tölt be a mikotoxinok analitikájában, mivel ezek a penészgombák által termelt, szerkezetileg sokszínű toxikus vegyületek gyakran alacsony koncentrációban és komplex mátrixokban (pl. gabonák, takarmányok, élelmiszerek) fordulnak elő (Berthiller et al., 2013; Sulyok et al., 2007). A módszer előnye, hogy egyetlen analízis során lehetővé teszi több tucat – akár kémiaiilag eltérő – mikotoxin egyidejű meghatározását, meghaladva a hagyományos LC-MS/MS módszerek célzott jellegét (Sulyok et al., 2007; Malachová et al., 2014).

A nagy felbontású tömegmérés különösen hasznos a maszkolt (rejtett) mikotoxinok, valamint a bomlástermékek és metabolitok azonosításában, amelyek rutinszerűen nem szerepelnek a szabványos analitikai célvegyületek között (Berthiller et al., 2013; Schymanski et al., 2014). Emellett a HPLC-HRMS kiválóan alkalmazható nem célzott és gyanított (suspect) szűrésekre, elősegítve az újonnan megjelenő vagy eddig nem monitorozott mikotoxinok felismerését az élelmiszerláncban (Krauss et al., 2010; Schymanski et al., 2014). Összességében a HPLC-HRMS egy rendkívül érzékeny, szelektív és információgazdag analitikai módszer, amely a modern analitikai kémia meghatározó eszközévé vált. Különösen fontos szerepet játszik az élelmiszerbiztonságban és a mikotoxin-kutatásban, ahol a komplex mátrixokban történő többkomponensű, átfogó toxinmonitorozás egyre nagyobb jelentőséggel bír (Hernández et al., 2015; Sulyok et al., 2007; Malachová et al., 2014).

## 2. Immunanalitikai módszerek

### 2.1 ELISA

Az ELISA egy széles körben alkalmazott, immunkémiai alapú analitikai módszer, amely az antigén–antitest kölcsönhatás nagyfokú specificitását használja ki kvantitatív vagy félkvantitatív meghatározásokra (Van Weemen & Schuurs, 1971; Gosling, 1990). A módszer különböző formátumokban – direkt, indirekt, szendvics és kompetitív ELISA – valósítható meg, amelyek közül a mikotoxin-analitikában elsősorban a kompetitív ELISA terjedt el, mivel a mikotoxinok kis molekulatömegű, haptén jellegű vegyületek (Chu, 1991).

A mikotoxinok, például az aflatoxinok, DON, ZEA, fumonizinek, OTA, valamint a T-2 és HT-2 toxinok ELISA-alapú meghatározása széles körben elterjedt gabonák, takarmányok és

élelmiszerek vizsgálatában (Turner et al., 2009; Anfossi et al., 2016). A módszer előnyei közé tartozik a jó érzékenység (jellemzően  $\mu\text{g/kg}$  tartomány), a párhuzamos mintafeldolgozás lehetősége, valamint a viszonylag rövid analízisidő és egyszerű műszerigény, ami alkalmassá teszi az ELISA-t rutin laboratóriumi szűrővizsgálatokra (Krska et al., 2019).

Az ELISA módszer korlátai közé sorolhatók a mátrixhatások, az antitestek keresztreakciói szerkezetileg rokon mikotoxinokkal, valamint a komplex mintákban tapasztalható kvantitatív bizonytalanság. Ezek miatt az ELISA-eredmények gyakran megerősítő mérést igényelnek nagy szelektivitású referencia-módszerekkel, például LC-MS/MS technikával (Shephard et al., 2013). Ennek ellenére az ELISA továbbra is meghatározó szerepet játszik a mikotoxin-monitorozásban, különösen nagy mintaszámú vizsgálatok és jogszabályi megfelelés előszűrése esetén.

Összefoglalva, az ELISA a mikotoxin-analitikában érzékeny, megbízható és költséghatékony immunkémiai módszer, amely hatékonyan egészíti ki a korszerű kromatográfias megerősítő technikákat az élelmiszer- és takarmánybiztonság területén.

## 2.2 Laterális áramlású immuntesztek (Lateral Flow Devices, LFD)

Az LFD módszer gyors, immunkémiai alapú analitikai technika, amelyet széles körben alkalmaznak helyszíni (point-of-need, PON) vizsgálatokra az élelmiszer- és takarmánybiztonság területén (Posthuma-Trumpie et al., 2009). Működése az antigén–antitest specifikus kölcsönhatásán alapul: a minta kapilláris erők hatására áramlik a hordozómembránon, miközben a célanalit jelölt ellenanyagokhoz kötődik, majd a teszt- és kontrollzónában rögzül, vizuális vagy instrumentálisan mérhető jelet adva.

A mikotoxin-analitikában az LFD-k túlnyomórészt kompetitív immunoassay formátumban működnek, mivel a mikotoxinok kis molekulatömegű, haptén jellegű vegyületek (Anfossi et al., 2016). A módszert sikerrel alkalmazzák számos szabályozott mikotoxin – például aflatoxinok, DON ZEA, fumonizinek és OTA – gyors kimutatására gabonákban, takarmányokban és feldolgozott élelmiszerekben (Turner et al., 2009; Wang et al., 2020).

Az LFD módszer legfontosabb előnyei közé tartozik a rövid analízisidő (jellemzően 5–15 perc), az egyszerű minta-előkészítés, a hordozhatóság és az alacsony költség, ami különösen alkalmassá teszi rutin szűrővizsgálatokra és döntéstámogatásra határérték-közeli koncentrációk esetén (Krska et al., 2019). Korlátként említhető ugyanakkor az érzékenység és kvantitatív pontosság elmaradása (elsősorban kvalitatív vagy félkvantitatív jellegűek) a referencia-módszerekhez (pl. LC-MS/MS) képest, valamint a mátrixhatások és keresztreakciók lehetősége, amelyek megerősítő vizsgálatokat tehetnek szükségessé (Anfossi et al., 2016).

Összességében az LFD technológia a mikotoxin-analitikában gyors, hatékony és költséghatékony szűrőeszközt jelent, amely optimálisan egészíti ki a laboratóriumi, nagy pontosságú megerősítő módszereket a modern élelmiszerlánc-ellenőrzésben.

## 2.3 Áramlási citometria (FC) alapú immunanalitikai megoldások

### 2.3.1 CFIA

A CFIA az immunanalitikai módszerek egy olyan fejlett formája, amely az FC technológiáját kombinálja az antigén–antitest kölcsönhatás nagyfokú specificitásával. Az eljárás alapját a fluoreszcensen kódolt mikrogömb-alapú detektálás képezi, amely lehetővé teszi több analit egyidejű vizsgálatát egyetlen mintában. A CFIA különösen jelentős szerepet tölt be a mikotoxin-analitikában, mivel lehetőséget kínál multiplex, azaz több mikotoxin egyidejű kimutatására egyetlen mérés során, miközben megőrzi az immunanalitikai módszerek gyorsaságát és viszonylagos egyszerűségét (Spischka et al., 2010; Beloglazova & De Saeger, 2015; Turner et al., 2015). Az egyik úttörő technológiai implementációt Czéh és munkatársai ismertették, akik egy FC-n alapuló, kompetitív fluoreszcens mikrogöngy immunoassay rendszert fejlesztettek ki akár hat mikotoxin egyidejű vizsgálatára (Czeh et al., 2012).

Egy kapcsolódó, műszeres összehasonlító tanulmányban Czéh és Schwartz vezetésével hét különböző bench-top áramlási citométer teljesítményét értékelték egy módosított, hatkomponensű mikotoxin-kittel. A tanulmány célja az volt, hogy megvizsgálja, milyen mértékben kompatibilisek a különböző asztali citométerek a multiplex immunoassay-vel, és hogyan befolyásolja a műszer-független fluoreszcencia-kalibráció az analitikai eredményt. Eredményeik szerint az összes vizsgált berendezés alkalmas volt a legtöbb (öt) mikotoxin mérésére, azonban az OTA esetében érzékenységi különbségek figyelhetők meg a műszer-típusok között, ami a műszer beállítások optimalizálást igényelheti a CFIA alkalmazásakor.

A CFIA elvi alapját fluoreszcens jelölésű, különböző optikai tulajdonságokkal rendelkező mikrogöngyök képezik, amelyek egyedi fluoreszcens „ujjlenyomattal” rendelkeznek. Ezeket a mikrogöngyöket specifikus antitestekkel borítják be, amelyek egy adott mikotoxin vagy mikotoxincsoport felismerésére alkalmasak. A mintával történő inkubáció során a toxinok kompetitív immunreakció keretében kötődnek az antitestekhez, majd egy fluoreszcensen jelölt antigen-konjugátum biztosítja a mérhető jelet. Az áramlási citométer a mikrogöngyöket egyenként analizálja, és a fluoreszcens intenzitás alapján kvantitatív információt szolgáltat (Peters et al., 2012; Luminex Corporation, 2018; Leng et al., 2020).

A CFIA egyik legjelentősebb előnye a multiplexitás. Míg a klasszikus ELISA módszerek egyidőben egyetlen mikotoxin analízisre alkalmasak, addig a CFIA technológia lehetővé teszi akár 5–20 mikotoxin egyidejű meghatározását is, minimális többlet minta- és időráfordítással. Ez különösen előnyös gabona- és takarmánymátrixok komplex szennyezettségének vizsgálatakor, ahol gyakran több toxinfajta együttes jelenléte figyelhető meg (Beloglazova et al., 2013; Peters et al., 2014; Sforza et al., 2016).

Analitikai teljesítmény szempontjából a CFIA módszerek érzékenysége általában az ELISA módszerekkel összemérhető, kimutatási határaik sok esetben az európai uniós határértékek alatt helyezkednek el. Több tanulmány beszámol jó precizitásról (RSD <15%) és megfelelő visszanyerési értékekről gabona- és takarmánymintákban, különösen aflatoxinok, trichotecének, fumonizinek és ZEA esetén (Beloglazova et al., 2013; Spischka et al., 2016; Maragos, 2018).

Ugyanakkor a módszer érzékeny lehet a mátrixhatásokra és a keresztreakciókra, ami multiplex panelek kialakításánál analitikai kompromisszumot és alapos optimalizálási igényt jelent.

A CFIA alkalmazása során a mintaelőkészítés kulcsfontosságú tényező. Bár a módszer általában kevesebb tisztítást igényel, mint a kromatográfiás eljárások, komplex mátrixok esetén hígítás, egyszerű extrakció vagy immunaffinitás-alapú előtisztítás alkalmazása javasolt az interferenciák csökkentése és a mérési pontosság javítása érdekében (Peters et al., 2012; Turner et al., 2015).

Alkalmazási szempontból a CFIA elsősorban nagy mintaszámú szűrővizsgálatokra alkalmas, különösen a takarmányiparban, élelmiszerbiztonsági monitoring rendszerekben és a nyersanyag-ellenőrzés területén. Szabályozási környezetben a CFIA jellemzően screening módszerként alkalmazható, amelynek pozitív vagy határérték közeli eredményeit megerősítő referencia LC-MS/MS módszerrel szükséges validálni, összhangban az európai uniós irányelvekkel (European Commission, 2006; European Commission, 2021).

Összefoglalva, a CFIA a mikotoxin-analitika stratégiaileg fontos technológiája, amely hatékonyan egészíti ki a klasszikus immunanalitikai és kromatográfiás módszereket. Multiplexitása, gyorsasága és nagy áteresztőképessége miatt különösen alkalmas komplex szennyezési mintázatok feltérképezésére, ugyanakkor alkalmazása során elengedhetetlen a megfelelő validáció, a mátrixhatások kontrollja és a módszer korlátainak figyelembevétele.

### 2.3.2 MycoFoss™ rendszer

A MycoFoss egy ipari alkalmazásra fejlesztett, automatizált, FC alapú rendszer, amely elsősorban takarmányminták gyors és reprodukálható vizsgálatára szolgál. Előnye a nagy mintaszám kezelése és a standardizált működés, ugyanakkor alkalmazhatósága toxin- és mátrixspecifikus.

## 3. Egyéb és ‘feltörekvő’ technológiák

Az elmúlt években intenzív kutatás zajlik bioszenzorok, elektrokémiai detektálás, valamint hordozható spektroszkópiai eszközök fejlesztésére. Bár ezek a módszerek jelenleg elsősorban kutatási fázisban vannak, hosszú távon jelentős szerepet játszhatnak a decentralizált mikotoxin-monitoringban.

### Felhasználói igények és elvárások

A 2023-as tanulmány 63 résztvevő (mezőgazdaság, feldolgozás, kereskedelem, hatóságok, laborok) véleményét gyűjtötte össze arra vonatkozóan, hogy milyen az ideális mikotoxin-analitikai eljárás. A tanulmányból kiderül, hogy a megkérdezett mezőgazdasági termelők és élelmiszerfeldolgozók számára a legfontosabb elvárások a következők: (1) Egyszerű mintelőkészítés, (2) Alacsony költség, (3) Gyors eredmények és (4) Mobil, terepen is használható screening eszközök. A megkérdezettek többsége (87,5% gazdálkodók; 80% feldolgozók) igényli az előszűrő (screening) eszközöket – például POCT (Point-of-Care Test) módszereket.

Ettől eltérően a hatóságok és kereskedelmi laboratóriumok fő szempontjai: (1) Alacsony LOQ; (2) Több komponens egyidejű meghatározása (multi-toxin módszerek), (3) Magas mérési

megbízhatóság és pontosság. Számukra másodlagos a költség; számottevőbb a mérési idő és érzékenység (Csenki et al., 2023).

Ez az összetett igénykör azt mutatja, hogy a technológiai fejlesztéseknek a gyorsaság (a résztvevők >70%-a szerint fontosabb a mérés időtartama, mint a költség), pontosság, egyszerű használat, multiplikálhatóság (több mikotoxin egyidejű vizsgálata) kritériumokat egyszerre kell kielégíteniük a felhasználói elvárások szerint. Meglátásunk szerint az általunk korábban kifejlesztett CFIA módszer már jelen formájában is alkalmas a piaci elvárások jelentős részének lefedésére.

Az alábbiakban részletesen bemutatásra kerül a 'Mikotoxin analitika' témakörben folytatott kutatómunka tudományos háttere.

## 1. CFIA továbbfejlesztése

### Projekt#1: ELISA és aCFIA módszerek összehasonlító vizsgálata

Klinikai alkalmazásban már az 1980-as években megjelentek az első áramlási citométerek (FCM), melyek lehetővé tették több biomarker egyidejű kimutatását. A mikotoxin analitikai területén az FCM-ek és az immunanalitikai együttes alkalmazásában rejlő lehetőséget első ízben azonban csak 2008-ban használtuk ki, amikor Fungi-Plex néven bemutatásra került az első, öt mikotoxin egyidejű kimutatására alkalmas módszer. Végül 2012-ben készült el az első, hat mikotoxin egyidejű kimutatására alkalmas platform, a CFIA rendszer.

A hagyományos kimutatási módszer az ELISA, amely egyetlen toxinra optimalizált, külön extrakciós protokollt és hosszú (~45 perc) inkubációt igényel. Ez költséges és időigényes, különösen több toxin egyidejű vizsgálatakor. Az FC-n alapuló CFIA lehetővé teszi több mikotoxin (multi-mikotoxin szennyezés) párhuzamos kimutatását egyetlen univerzális extrakcióval.

A CFIA multiplex formátuma bizonyítottan alkalmas hat toxin egyidejű mérésére, azonban a PON alkalmazásokhoz bizonyos paraméterek finomításra, további vizsgálatra szorulnak. A projekt keretében kidolgozásra került egy gyorsított, aCFIA protokoll. **Vizsgálataink során a lehető legnagyobb mértékű időcsökkentést és két toxin (T-2, ZEA) egyidejű kimutatását céloztuk meg, a kötési kinetika javításával, az analitikai teljesítmény megőrzése mellett.**

### Projekt#2: MycoFoss – automatizált CFIA alapú módszer bemutatása

A hagyományos kimutatási módszerek (ELISA, HPLC-MS/MS, GC-MS) több manuális lépést igényelnek, ami időigényes és képzett szakembert kíván. Az automatizált, gyors immunoanalitikai megoldások célja a manuális lépések csökkentése és a mérési idő lerövidítése. Korábbi CFIA eredményeinket alapul véve a dán FOSS (hardver, szoftver) és a magyar Soft Flow Kft. (mikrogyöngy alapú módszer) munkatársai együttműködésben elkészítették az első automatizált, CFIA alapú eljárást. A MycoFoss™ platform képes hat különböző mikotoxin egyidejű kimutatására búzában, kukoricában és árpában, áramlási citometriás immunoassay technológiával. **Célunk az új módszer bevezetése és összehasonlítása HPLC-MS/MS módszerrel, kizárólag referencia minták alkalmazása mellett.**

### Projekt#3: CFIA módszer összehasonlítása HPLC-MS/MS módszerrel

A *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok – különösen a trichotecének (pl. DON), fumonizinek és ZEA – világszerte jelentős élelmiszerbiztonsági kockázatot jelentenek. Kísérletünk tervezése során az említett toxinok közül választásunk a DON toxinra esett, hiszen ez a leggyakoribb trichotecén a gabonafélékben, és már alacsony szinten is immunfunkció-változásokat okozhat. A hagyományos kimutatási módszerek (ELISA, LFD, TLC, HPLC-MS/MS, GC-MS) közül a HPLC-MS/MS tekinthető referencia technológiának, azonban költséges és időigényes. A globális élelmiszerláncban egyre nagyobb az igény gyors, automatizált, - egyszerű használat több mikotoxint egyszerre kimutató rendszerekre. A MycoFoss™ platform integrálja a mintakészítést és az analízist, és kevesebb mint 8 perc alatt eredményt ad. **A vizsgálat célja a MycoFoss™ és az UHPLC-MS/MS módszer összehasonlítása DON kimutatásában, természetes minták tesztelésével.**

## 2. Multi-mikotoxin hatások vizsgálata

A mikotoxinokra jellemző az együttes előfordulás. Ez annak köszönhető, hogy az egyes környezeti feltételek általában többféle gomba növekedésének is kedvezhetnek, illetve egy gombafaj nem csak egyféle toxin termelésére képes. A toxinok egymással való interakciója még nem minden esetben tisztázott. Előfordul szinergista, de antagonistá hatás is (Kovács, 2018). Amerikából, Ázsiából és Európából gyűjtött takarmányminták több, mint fele tartalmazott legalább kettőt a DON, aflatoxin, ZEA fumonizinek és OTA toxinok közül. Kimutatták, hogy a leggyakrabban együttesen előforduló mikotoxinok a DON és ZEA. AFB1-et gyakori együttes előfordulás jellemzi OTA-val, vagy ZEA-val, vagy mindkettővel (Ogunade et al., 2018a).

### Projekt#1: Anyatoxinok és metabolitok hatása az immunassay működésére

Csakúgy, mint bármely immunanalitikai módszer, a CFIA esetében is felmerül a keresztreaktivitás jelensége, amely a mérési pontosság jelentős csökkenését okozhatja. A keresztreaktivitás lényege, hogy az alkalmazott antitest nem kizárólag a célzott mikotoxinhoz kötődik, hanem szerkezetileg hasonló egyéb molekulákhoz is. Ennek következtében a mérési jel változhat, akár olyan analitok jelenléte miatt is, amelyek nem kívánt módon interferálnak a kimutatásban. Például a ZEA ELISA tesztek gyakran mutatnak keresztreakciót zearalenon-glikozidokkal és egyéb, szerkezetileg rokon metabolitokkal. Hasonló problémát jelenthetnek a fumonizinek és az OTA immunanalitikai vizsgálatait, ahol a természetes mátrixban előforduló kapcsolódó molekulák torzíthatják az eredményeket. A keresztreaktivitás mértéke az antitest specifitásától, az alkalmazott immunkémiai formától és a minta összetételétől függ. Ezért projektünk keretében toxinok, bomlástermékek és metabolitok alkalmazásával protokollt dolgoztunk ki; teszteltük a CFIA rendszerben alkalmazott antitestek specifitását. **A kidolgozott protokoll a későbbiekben alkalmazható lehet az új specifikusabb antitestek fejlesztésénél, és a legmegfelelőbb antitest kiválasztásában is.**

### Projekt#2: OTA és metabolitjai állati sejt kultúrákon

A mikotoxinok – különösen az ochratoxinok (OTA, OTB, OTC) és a citrinin (CIT) – világszerte jelentős élelmiszerbiztonsági és állategészségügyi kockázatot jelentenek. Az OTA nephrotoxikus, hepatotoxikus, immunotoxikus, genotoxikus és karcinogén hatású, az IARC 2B kategóriába sorolja mint lehetséges humán karcinogént. A CIT szintén vesekárosító, és krónikus expozíciója hozzájárulhat endémiás nefropátiák kialakulásához. A mikotoxinok gyakran együttesen fordulnak elő az élelmiszerláncban, ami fokozza a toxikus hatásokat (additív vagy szinergista interakciók). A metabolitok, mint az OTB, OTC és a CIT fő metabolitja, a dihidrocitrinon (DHC), szintén jelen lehetnek a szervezetben és befolyásolhatják a toxicitást.

A jelen projektünk célja kettős; (1) alap kutatás - **egyedi és kombinált citotoxikus, fejlődéstoxxikológiai és molekuláris hatásainak** komplex vizsgálata különböző biológiai rendszerekben; (2) alkalmazott kutatás – a hatások pontosabb megértése választ adhat arra a kérdésre, hogy a jövőben CFIA rendszerünket mely mikotoxin(ok)al érdemes kiegészíteni, érdemes-e az OTA; OTB és OTC toxin koncentrációkat individuálisan meghatározni, vagy elegendő lehet egy szumma-OT érték megállapítása.

### 3. CFIA módszer tesztelése állati eredetű minták mikotoxin meghatározására

A fonalgombák által termelt toxinok az egyszerű terményekből kiindulva a táplálékláncon keresztüljutva, jelentős veszélyt jelenthetnek az állatokra és az emberekre is egyaránt. Ebből adódóan az állati forrásból származó ételek, mint a hús, tej, tojás is jelentős veszélyt jelentenek (Kovács, 2018) az élelmiszer fogyasztókra.

A perzisztens szerves szennyezőanyagok (POPs) közé tartozó mikotoxinok (pl. aflatoxinok, ochratoxinok) szerteágazó bioakkumulatív és toxikológiai kockázatot jelentenek az állati és humán egészségre. A klímaváltozás (hőmérséklet-, CO<sub>2</sub>- és vízstressz-változások) módosítja a mikotoxin-termelő gombák ökológiáját, ami a szennyezések gyakoribbá válását és a co-expozíció esélyét növeli a takarmány- és élelmiszerláncban. Ennek nyomán az expozíció egyidejű, gyors, érzékeny, és lehetőleg több célpontot lefedő kimutatási módszereire van szükség, nemcsak a környezeti/élelmiszer mintákban, hanem az exponált szervezetben felhalmozódott mennyiségek vizsgálatára is. A leggyakoribb és legrelevánsabb mikotoxin az OTA, amelyet az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok termelnek. Az OTA nephrotoxikus, hepatotoxikus, teratogén, neuro és immunotoxikus hatású, és az IARC 2B (lehetséges humán karcinogén) kategóriába sorolt. A krónikus, de jogilag elhanyagolt alacsony expozíciós szintek is küszöbértéket érhetnek el a szervezetben a bioakkumuláció miatt, ezért a felhalmozódott tartalom megbízható mérése kiemelt feladat. A hivatalos monitoringban elterjedt HPLC FLD/LC MS/MS módszerek mellett az immunoassay alapú megoldások (ELISA; CFIA) költséghatékony, gyors alternatívát kínálnak, és potenciálisan multiplex mérésre is alkalmasak.

**A projekt célja olyan dedikált immunoassay alapú eljárások kidolgozása és összehasonlítása (ELISA, FCM), amelyek az exponált szervezetben felhalmozódott OTA mennyiségét megbízhatóan, gyorsan és költséghatékonyan képesek meghatározni, és eredményeik**

**összemérhető a laboratóriumi HPLC-FLD referenciával. A módszereket egerek plazmáján, valamint máj- és veseszövetén teszteltük.**

#### 4. CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben - gabonaalapú alkalmazások

A mikotoxinok által jelentett élelmiszer- és takarmánybiztonsági kockázat hatékony kezelése komplex, több szinten megvalósuló mikotoxin-menedzsmentet igényel. Ennek alapját a rendszeres kockázatelemzés és monitoring képezi, amely magában foglalja az alapanyagok, takarmányok és késztermékek folyamatos rendszerszintű analitikai ellenőrzését, valamint a földrajzi, klimatikus és mikroklimatikus tényezők figyelembevételét. Mivel a szennyezettség időben és térben erősen változó, és akár rövid idő alatt is jelentős kockázatnövekedést okozhat. A rendszeres analitikai ellenőrzés lehetővé teszi a kockázatok korai felismerését, az alapanyagok szelekcióját, valamint a megelőző és korrekciós intézkedések gyors bevezetését.

A megelőzés kulcsszerepet játszik mind a növénytermesztésben, mind a betakarítás utáni tárolás során. Az agrotechnikai intézkedések; a rezisztens fajták alkalmazása, a kellő mértékű szárítás, a megfelelő és kontrollált raktározási körülmények csökkentik a toxintermelő gombák elszaporodását. A takarmánybiztonság területén az alapanyag-kontroll, a toxinkötő adalékanyagok alkalmazása és a receptúrák optimalizálása járul hozzá a kitérttség mérsékléséhez.

E környezetben kiemelt szerepet kapnak a gyors immunanalitikai módszerek, különösen a kompetitív fluoreszcens CFIA, amelyek rövid mérési idővel, minimális mintapreparációval és helyszíni alkalmazhatósággal támogatják a döntéshozatalt. A CFIA tesztek alkalmasak nagy mintaszám gyors szűrésére, így ideális eszközt jelentenek a folyamatos mikotoxin-monitoring megvalósításához a termelési és takarmányozási lánc teljes hosszában. Bár a CFIA módszerek elsősorban szűrővizsgálatra szolgálnak, rendszeres alkalmazásuk jelentősen csökkenti a nem észlelt szennyezések kockázatát, és megbízható alapot teremt a célzott, műszeres megerősítő analízisekhez. Összességében a gyors immunanalitikai CFIA technológiák kulcsszerepet töltenek be a proaktív, megelőzés-orientált mikotoxin-menedzsmentben.

**Az alább ismertetett projekteknél célunk annak bizonyítása volt, hogy az általunk fejlesztett CFIA rendszer szervesen integrálható a komplex mikotoxin-menedzsment rendszerbe.**

##### Projekt#1: Mikotoxin térkép készítése kukorica minták mikotoxin adatai alapján

Napjainkban egyre erősödő törekvés, hogy naprakész, régió-specifikus adatokat állítsunk elő a toxigén gombák és mikotoxinok előfordulási gyakoriságáról és sokféleségéről Magyarországon, egy közép-európai országban, ahol jelenleg nem elégséges az átfogó a monitorozás az éghajlatváltozási forgatókönyvek alapján. Ezen alapadatok létrehozása elengedhetetlen a globális éghajlati trendek helyi hatásainak megértéséhez, a mikotoxinok szennyezésére vonatkozóan. Az éghajlatváltozás a hőmérséklet- és csapadékprofilok átrendezésével, az aszály- és hőstressz-epizódok gyakoribbá válásával módosítja a toxintermelő gombák szaporodását és toxintermelését. Ennek egyik lehetséges következménye a co-expozíciók gyakoribbá válása. Mindezek miatt olyan

vizsgálati módszerek fejlesztése és alkalmazása válik szükségessé, amelyek képesek a multi-mikotoxin hatás detektálására és monitorozására.

Munkánk során magyarországi kukoricamintákból határoztuk meg a legfontosabb mikotoxinok – úgy, mint aflatoxinok (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>), OTA, DON, T2-toxin, ZEA, fumonizin B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+B<sub>3</sub> – koncentrációját analitikai módszerrel és elemeztük ezen koncentrációértékek határértékekhez való viszonyát. A mérések kivitelezése MycoFoss<sup>TM</sup> készülékkel történt, amely képes az érdeklődésünk tárgyát képező hat mikotoxin egyidejű vizsgálatára. Legfőbb célunk: az ország különböző területeiről származó kukoricaminták mikotoxin koncentrációjának megállapítása. Az adatok feldolgozását követően (1) tisztán láthatóvá válik, az esetleges multi-mikotoxin hatás mértéke; (2) azok grafikai ábrázolásával 'mikotoxintérkép' elkészítése válik lehetségessé.

**Ez az információ kritikus fontosságú lehet, a hatékony lokalizált kockázatkezelés és szabályozási válaszok kidolgozásához.** Emellett a gazdákat, az élelmiszer-biztonsági hatóságokat és a döntéshozókat olyan adatokkal, ismeretekkel látja el, amelyek segítségével hatékonyabb megelőző módszereket alkalmazhatnak és védekezhetnek az új kockázattal szemben.

#### Projekt#2: Talajművelési technikák hatás a mikotoxin felhalmozódásra

A kukorica (*Zea mays* L.) egy fontos gabonaféle, amelyet világszerte különböző éghajlati viszonyok között termesztnek. A növény különböző részeit széles körben használják emberi táplálék, állati takarmány és ipari alapanyagként (Schollenberger et al., 2012). Az élelmiszerekben és takarmányokban található természetes toxinok, különösen a mikotoxinok, fitotoxinok és növényi toxinok egyre nagyobb kockázatot jelentenek. A *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok gyengíthetik a fertőzött növény abiotikus védekező képességét és gátolhatják a fehérjeszintézist (Chukwudi et al., 2021).

Európában csak korlátozott számú termék áll rendelkezésre a kukorica *Fusarium* 'ear rot' leküzdésére, emiatt a talajból fertőző *Fusarium*-fajok elleni védekezés elsődleges módszere a vetőmagkezelés. Bemutatott projektben az alkalmazott talajgazdálkodási rendszerek (csökkentett talajművelés, a talajkímélő talajművelés és a sávos talajművelés) mikotoxin termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A bemutatott kutatás célja különböző talajművelési technológiák hatásának értékelése volt silókukorica hibridek termesztése során, különös tekintettel a termőhelyi adottságokra, a meteorológiai feltételekre és a mikotoxin-szennyezettségre. **A szántóföldi tudományos kísérletben előállított, 'valódi' minták jó alapot szolgáltattak a referencia módszer és a CFIA alapú rendszer összehasonlítására, mellyel bizonyítható a módszer agrárkutatásban való létjogosultságát.**

#### Projekt#3: CFIA alkalmazása mesterségesen fertőzött kukorica hibridek mikotoxin tartalmának meghatározásában

A bemutatott módszertan egy komplex, laboratóriumi–mezőgazdasági kísérleti rendszerre épül, amelynek célja a *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok mennyiségi meghatározása kukoricában, különös tekintettel Bt és azokkal izogén nem-Bt hibridek összehasonlítására. A

vizsgálat jelentősége abban rejlik, hogy egyszerre értékeli a genetikai háttér (Bt transzgén), a mesterséges és természetes fertőzés, valamint a több toxint egyszerre mérő analitikai technológia hatásait.

A *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinok – különösen a fumonizinek, trichotecének és ZEA – jelentős élelmiszerbiztonsági kockázatot jelentenek. A kukorica gyakran fertőződik *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* és *F. sporotrichoides* fajokkal, amelyek különböző toxikus metabolitokat termelnek. A genetikailag módosított (GM) kukoricavonalak (MON 810, DAS-59122-7) Cry-toxinokat termelnek, amelyek csökkenthetik a rovarok által okozott sérüléseket, így közvetetten mérsékelhetik a gombafertőzést és a mikotoxin-termelést. A növénynevelésben a mikotoxinok kimutatására hagyományosan HPLC-MS/MS módszereket alkalmaznak, de ezek költségesek és időigényesek. Az immunoanalitikai technikák, különösen a CFIA, lehetővé teszik több mikotoxin egyidejű, gyors és érzékeny meghatározását, ami a területen nagy hozzáadott értékkel bírhat. **Hasonlóan a fent említett projekthez, itt is összehasonlító mérések elvégzése volt a cél, és annak bizonyítása, hogy az általunk kidolgozott módszer megfelel a növénynevelésben felállított jelentős elvárásoknak, alkalmazható ezen a területen.**

## b) Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktiválásán keresztül

A mikotoxinmentesítési technikák általánosságban pre- és post-harvest fázisokra oszthatók, amelyek a betakarítás előtti és utáni szakaszokra utalnak. Beszélhetünk ezeken felül még harvest fázisról is, amely magára a betakarításra utal (Ogunade et al., 2018a).

### Pre-harvest fázis

A pre-harvest fázis a megelőzést, vagyis a toxigén gomba fejlődésének megakadályozását célozza. Nagy jelentőséggel bír a GAP, vagyis a good agricultural practice. Fontos a környezeti stressz csökkentése a növényen. Ez magában foglalja a rovarok távoltartását, mivel azok vektorként szolgálhatnak a fumonizineknek, aflatoxinoknak. Gyakran alkalmaznak rezisztens magokat, így csökkentve a befertőződést (Agriopoulou et al., 2020).

### Harvest fázis

A korai betakarítás csökkenti a mikotoxin szennyeződés esélyét. A termés levágásának magassága is befolyásolhatja a fertőzöttséget a termőföld szennyezettsége miatt. Minél közelebb történik a szár levágása a talajhoz képest, annál valószínűbb, hogy a fonalagomba a raktárba kerül majd. Ezeken felül az azonnali raktározás segítheti a toxintermelő gombák távoltartását (Ogunade et al., 2018a).

### Post-harvest fázis

A különböző élelmiszerfeldolgozási folyamatok nem hatásosak a mikotoxinok lebontása szempontjából, mivel azok igen hőstabilnak bizonyulnak (Agriopoulou et al., 2020). Például AFB1

redukció történik 150-200 °C között átlagosan 79%-ban, de ebben az esetben már csökken az élelmiszer minősége (Rushing & Selim, 2019).

A mikotoxinok képződésének megakadályozását segítheti a rovarok távoltartása a learatott terménytől, mivel a rovarok életfolyamatai során víz keletkezik, ami hozzájárul a fonalas gombák növekedéséhez (Mutambuki & Likhayo, 2021).

Fontos a termény gyors szárítása, lehetőség szerint a 0,7 alatti vízaktivitás elérése, mivel ez már nem kedvez a fonalagombák életfolyamatának. A már fertőzött szemek szortírozása hatásos a termény többi rézének megőrzése érdekében. A silóban a környezet megváltoztatása, magas széndioxid szint, alacsony oxigén szint és alacsony pH létrehozásával is lassítható a penészek növekedése. *A. flavus* esetében például a növekedés szignifikánsan csökken  $a_w=0,92$ -n összehasonlítva  $a_w=0,95$ -tel. Kukorica esetében módosított összetételű levegő alkalmazásakor 25 és 50%-os CO<sub>2</sub>-n 20-35% gátolás következett be növekedés/CFU/g. 75%-os CO<sub>2</sub>-nek való kitettség több, mint 50%-ban gátolta a növekedést vízaktivitástól függetlenül. Ezen CO<sub>2</sub> arányok létrehozása és megtartása azonban bonyolult (Giorni et al., 2008). Ezen felül pedig a túlszártított termény kevesebbet ér, így az is fontos, hogy a nedvességtartalom ne legyen túl alacsony, vagyis ne essen 10% alá (Leslie et al., 2021., Aiko & Mehta, 2015).

### **A mikotoxin eltávolítási stratégiák**

A mikotoxinok eltávolítására különböző fizikai, biológiai és kémiai módszereket különböztetünk meg (Aiko & Mehta, 2015), azonban ezen stratégiák nagy része még nem alkalmazható mezőgazdasági léptékben, vagy nem elég hatékonyak (Ogunade et al., 2018a).

#### Antifungális szerek

Szerves, gyenge savakat, mint a szorbinsav, a benzoésav, vagy a propionsav, használnak mikotoxinok eltávolítására. Antimikrobiális hatása azonban csak a disszociálatlan formának van, ebből adódik a disszociációs állandó fontossága (Chulze, 2010). A disszociálatlan forma átjut a sejtmembránra, ahol felszabadítja annak H<sup>+</sup> ionjait, így acidifikálva a sejtmembránt (Muck et al., 2018). A *F. verticillioides* és *F. perforatum* fajok ellen azonban nem hatásos a szorbinsav és a propionsav (Chulze, 2010).

#### Ózon

Az ózon használata egyszerűnek tekinthető és az oxigénen kívül nincs melléktermék. Alkalmas AFB<sub>1</sub> és AFG<sub>1</sub> degradálására a C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> kettőskötésnek köszönhetően, illetve DON-ra is hatással van (Agriopoulou et al., 2020).

#### Adszorpciós szerek

Az adszorpciós szerek csökkentik a mikotoxinok bioavailibilitását. Hatásuk nagyban függ a környezettől és magától a mikotoxintól. Mivel az adszorpciós szereket az elfogyasztott takarmányba keverik, ezért az állat, annak szervezete és étrendje is fontos befolyásoló tényező. Ide sorolhatók a különböző agyagok, mint például az agyagásvány, a HSCAS (hydrated sodium calcium aluminosilicate) vagy a montmorillonite. Ebbe a kategóriába tartozik még az aktív szén

és a polyvinil pyrrolidone. Az élesztő alapú megkötő szereknél a  $\beta$ -glukán kerül hasznosításra, míg a klorofill alapú adszorpciós szer esetében az AFB1 síkban elhelyezkedő gyűrűje kötődik a klorofillinhez. Gyakori az adszorbensek kombinálása is, például a montmorillonite és az élesztő kombinálása mannán oligoszachariddal, amely jelentősen csökkenti a kérődzők tejébe történő aflatoxin kiválasztódást (Ogunade et al., 2018).

#### Sugárzás

Eredményesnek bizonyult a sugárral történő kezelés a mikotoxinok eltávolítása szempontjából. Sajnos azonban fizikai kémiai és biológiai szempontból is hatással van az élelmiszerre, így nem alkalmazható a terményen (Agriopoulou et al., 2020).

#### Cold Atmospheric Pressure Plazma

Különböző felületek fertőtlenítésében egyre elterjedtebb a cold atmospheric pressure plazma alkalmazása alacsony költsége miatt. Az élelmiszereknél egyelőre nem alkalmazható a lehetséges toxikus maradványok miatt (Agriopoulou et al., 2020).

#### Mikroorganizmusok

Mikotoxinok lebontására alkalmazott mikroorganizmusok környezetbarát, irreverzibilis reakciót biztosítanak, azonban nem költséghatékonyak. *Pleurotus spp.* képes 25 °C-on és pH= 4-5-ön AFB1 bontására. Ebben az esetben azonban a magas mikotoxin koncentráció limitáló tényező (Ogunade et al., 2018).

#### Baktériumok

*Flavobacterium aurantiacum* B-184 törzs képes az aflatoxinok irreverzibilis eltávolítására. Gyakran alkalmaznak tejsav baktériumokat, mint például - *Lactobacillus casei*, *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. rhamnosus*. *L. fermentum* képes az AFB1 98%-os, míg a T-2 toxin 84%-os bontására. Egyes törzsek, mint például *L. acidophilus* *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* nem csak élve, de hő által inaktivált formában is hatásosak. Esetükben az élő sejtek tudták a legtöbb aflatoxint semlegesíteni, nagyjából 30%-kal, ZEA-t 57, DON-t 37%-kal. OTA-t nem befolyásolta a baktériumok életképessége. ZEA és DON mikotoxinoknál degradáció valószínűsíthető, míg OTA és AFB1 esetében kötődéssel történhet a semlegesítés (Ragoubi et al., 2021).

#### Rekombináns vagy természetes enzimek:

Általánosságban elmondható, hogy igen nagy kihívást jelent az egységes enzimeloszlás és enzimaktivitás elérése, illetve a mikotoxinok együttes előfordulása is bonyolítja az alkalmazásukat. AFB1 semlegesítésére alkalmas 16  $\mu$ M-os koncentrációban az *Armillariella tabascens* által termelt enzim. *Rhodococcus erythropolis* által termelt enzim képes akár 68%-ban bontani az aflatoxint. Az *Acitenobacter* által termelt peroxidáz és a *Clonostachys spp* által termelt laktonhidroláz enzim képes a ZEA bontására. Utóbbi esetben a zhd101 gént kódoló régió klónozva lett, majd *Schizosaccharomyces pombe* és *Escherichia coli* mikroorganizmusok által lett nagyobb mennyiségben termeltetve. DON bontására képesek a glikozil-transzferázok, lipázok,

illetve a citokróm P450 rendszer is, a végtermék azonban gyakran visszaalakul DON-ná (Ogunade et al., 2018). A különböző peptidázok és amidázok képesek az OTA fenilalaninná és a jóval kevésbé toxikus ochratoxin  $\alpha$ -vá alakítására (Leslie et al., 2021). További nehézség, hogy a takarmány- és élelmiszerügyi szabályozások nem kedveznek az enzimek alkalmazásának (Agriopoulou et al., 2020).

Az alábbiakban részletesen bemutatásra kerülnek a **'Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktiválásán'** témakörben folytatott kutatómunka tudományos háttere.

## 1. Fonalas gombák izolálása és pontosabb megismerése

A szakszerű védekezés érdekében fontos a fajok és törzsek minél pontosabb ismerete; mely körülmények között a legaktívabb a fejlődésük és a metabolit termelésük, valamint melyek azok a kiváltó tényezők, amelyek fokozzák a mikotoxinok termelését. Az *A. flavus* optimális szaporodási körülményeivel számos kutatás foglalkozik, a növekedést befolyásoló tényezők közé tartozik a hőmérséklet, a páratartalom és az oxigén elérhetősége. Valamint megfigyelték, hogy az eltérő tápközegek, a különböző gabonafajták, vagy az egyazon gabona minta eltérő fizikai állapota erősen befolyásolhatja a termelt mikotoxinok mennyiségét (Inotai és mtsai. 2024). Érdekes más, kevésbé leírt fajok esetében is foglalkozni az optimumok vizsgálatával, és a lehetséges különbségekkel. Ezt bizonyítja Bata-Vadács és munkatársainak 2025-ös kutatása, ahol az *A. flavus* esetében oxigén jelenlétében a vizsgált pH tartományban nem változott a termelt aflatoxin B1 mennyisége, azonban az *A. creber* esetében a pH növekedésével jelentősen csökkent a sterigmatocisztin termelése.

**A vizsgálat célja a hazai gabonamintákból és humán tracheából izolált fonalagombák növekedési optimumának és toxintermelő képességének összehasonlítása, a multitoxin-hatás dokumentálása és a területi különbségek feltérképezése (Alföld, Északi-középhegység, Dunántúli dombság).**

## 2. Agardiffúziós és CLSI M38-A2 szabványon alapuló mikrodilúciós eljárás MIC protokollok összehasonlítása

Az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* opportunistá patogének és jelentős aflatoxin-termelők. Az *A. flavus* gyakori humán kórokozó is, míg az *A. parasiticus* regionálisan ritkább, de aflatoxin-termelő potenciálja miatt élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent. Hazánkban a *Fusarium* nemzetség tagjai a legelterjedtebb növényi patogének (Mesterházy et al., 2022), ezen felül gyakran előforduló humán patogének is (Georgiadou et al., 2014). Az antimikotikumok közül az azolok az ergoszterol-szintézis gátlásával hatnak; hosszú távú alkalmazásuk rezisztenciát és mellékhatásokat eredményezhet, ezért megbízható MIC-mérés szükséges.

A MIC az adott antifungális szer legkisebb koncentrációja, amelynek hatására a gomba növekedése gátolva van. Ez az érték kiemelt fontosságú az egyes antimikotikumok hatékonyságának vizsgálatakor és jellemzésekor. Előzetes szakirodalmi kutatásaink során azt figyeltük meg, hogy attól függően, hogy az adott humán és növény fertőzésre is képes gombát,

milyen oldalról közelítik meg, más módszert használnak a MIC érték meghatározására. A klinikai kutatások során egy standardizált, CLSI M38-A2 módszert használnak (Georgiadou et al., 2014; Mohaghegh et al., 2022)., míg az agráriumhoz köthető vizsgálatok során az úgynevezett agar hígítási módszert (Şehirli & Saydam, 2016; Spolti et al., 2012; Zhou et al., 2024). Előbbi, 96-lyukú plate segítségével, míg utóbbi Petri-csészékkel alkalmazható, emiatt a CLSI nagyobb ismétlésszámban végezhető egy időben.

**Munkánk célja két széles körben használt MIC-meghatározási eljárás – az agar hígítás és a CLSI M38-A2 mikrodilúciós protokoll – módszertani összevetése volt, a klinikumban alkalmazott vorikonazol (VOR) és az agráriumban használatos metkonazol (MET) összehasonlításával.** A motivációt az aflatoxin-kockázat növekedése (klímahatások), a rezisztencia mérséklése és a dózisoptimalizálás igénye adta.

### 3. Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata

A pre-harvest fázis során legelterjedtebben használt antifungális szerek az azolok, amelyek közé a MET is sorolható. Az azol típusú vegyületek a CYP51 elnevezésű, másnéven lanosterol 14  $\alpha$ -demetilázként ismert enzim működését gátolják, amely létfontosságú szerepet tölt be a gomba sejtfalszintézis során. A gombákban ezt az enzimet általában egy CYP51 gén kódolja, az aszkomikóták törzsében azonban gyakran előfordul, hogy több ilyen enzimet kódoló gén található meg. Az azolokkal szemben rezisztencia tud kialakulni mind a gombákban, mind a növényekben, mind pedig az emberben egyaránt (Williams et al., 2024). Ezek ugyanazon három mechanizmuson alapulnak: CYP51-es gén mutációja vagy overexpressziója, illetve az efflux pumpák overexpressziója, amelyek alkalmasak az azolok eltávolítására (Williams et al., 2024). A humán vonatkozás kiemelt jelentőségű, mivel, a VOR nevű triazol alkalmazása egy elterjedt kezelési mód a *Fusarium* fajok által okozott emberi megbetegedések során (Williams et al., 2024). Ezen tények hangsúlyozzák az azolrezisztencia fontosságát a One Health concept szemszögéből is (Williams et al., 2024); amely a környezeti, élelmiszerlánc- és humán eredetű gombák egységes kockázati értékelését helyezi előtérbe. A humán izolátumok bevonása jelentősen növeli a kutatás relevanciáját, és hozzájárul a fonalgombák komplex toxikológiai és patogenetikai szerepének jobb megértéséhez. Egy gyenge sav, a propionsav (PROP) is gyakran kerül alkalmazásra a mezőgazdaságban gombaellenes anyagként. Hatására oxidatív stressz alakul ki a fonalgombában, ami apoptózishoz vezet (Yun & Lee, 2016). Az előnyös tulajdonságai ellenére, alkalmazása kontraproduktív is lehet ugyanis a nem megfelelő alkalmazása fokozhatja a mikotoxin termelést (Scudamore et al., n.d.).

További potenciális gombaellenes hatóanyag a klór-dioxid nevű vegyület is. A klór-dioxid egy víztisztításra (Aieta & Berg, 1986), fogászati kezeléseknél (Mohammad 2004.) és felületi fertőtlenítőként régóta, nagy gyakorisággal alkalmazott vegyület. Antimikrobiális hatása mellett fontos előnye, hogy nem hagy toxikus bomlásterméket maga után (Yeshwanth, n.d.), emberre ártalmatlan. E lényeges tulajdonság mögötti egyik ok, hogy a klór-dioxid egy úgynevezett méretszelektív vegyület; a mikron nagyságú organizmusokkal szemben halálos, de nagyobb szervezetekre, mint a növények, állatok és emberek, nem jelent veszélyt. A fejlettebb szervezetek

keringése jelenti a másik okot, amiért a klór-dioxid csak mikroorganizmusokra ártalmas. A többsejtű organizmusok keringési rendszere képes glutationt szállítani a kezelés helyére, ami további védelmet biztosít a klór-dioxiddal szemben (Noszticzius et al., 2013).

A klór-dioxid a  $Fe^{2+}$  és  $Mn^{2+}$  ionok oxidációja révén fejt ki hatását, de a DNS vagy poliszaccharid molekulákat nem befolyásolja, ami tovább növeli a vegyület előnyös tulajdonságainak számát. Mindazonáltal, négy aminosavval lép reakcióba: a ciszteinnel, a tirozinnal, a triptofánnal és a metioninnal (Noszticzius Z, Rosivall L, 2010). Mivel ezek az aminosavak létfontosságúak az élőlényekben, így a mikrobiális szervezetekben is, nem tud rezisztencia kialakulni a klór-dioxiddal szemben (Noszticzius et al., 2013) . **A kísérletek során célul tűztük ki a klór-dioxid növekedésgátló hatásának vizsgálatát és más, ipari alkalmazásban lévő gombaellenes szerekkel történő összehasonlítását mikotoxin-termelő *Fusarium*, *Aspergillus* fajokon.**

## 2) Anyagok és módszerek

Terjedelmi korlátok miatt az anyagok és módszerek fejezet csak tudományos review jellegű, összefoglaló áttekintést ad. Nem módszertani jegyzőkönyvként, hanem értékelő, szintetizáló szemlélettel mutatja be a kísérleti rendszert, az alkalmazott analitikai módszereket és azok jelentőségét. A részletes leírások a tézis alapját képező publikációkban találhatóak meg.

### a) Mikotoxin analitika

#### 1. CFIA továbbfejlesztése

##### Projekt#1 : ELISA és aCFIA módszerek összehasonlító vizsgálata

A fair összehasonlítás érdekében mind az ELISA, mind a CFIA protokollját módosítottuk. Az inkubációs idők széles skáláját (2–60 perc) vizsgáltuk, miközben mindkét módszer esetében kötődési kinetikai méréseket végeztünk. ELISA-nál az optikai denzitást (OD), CFIA-nál pedig a relatív átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) követtük nyomon. A két eltérő mérési egység összehasonlíthatósága érdekében új, normalizált egységet vezettünk be (Equivalent Optical Reading Units – EORU), amely lehetővé tette az eredmények közös skálán történő értelmezését. A mérések három párhuzamos kísérletben, független ismétlésekkel zajlottak.

A CFIA módosítása során csökkentettük az egyidejűleg vizsgált mikotoxinok számát (multiplexről simplex vagy duplex konfigurációra), és megemeltük az Ag-PE konjugátum koncentrációját a kereskedelmi kithoz képest. Az ELISA esetében egy klasszikus, kétlépcsős eljárást alkalmaztunk, amely során külön inkubáció történt a monoklonális antitesttel és a HRP-toxin konjugátummal.

A T-2 toxin kötődési kinetikáját részletesen elemeztük. Emellett vizsgáltuk a simplex és duplex CFIA rendszerek közötti egyezést, amelyet Bland–Altman statisztikával értékeltünk. A gyorsított CFIA analitikájának egyik kulcseleme a kötődési kinetika extrapolációja volt: rövid (2–15 perces) inkubációk alapján becsültük a 45–60 perces végponti MFI-értékeket.

##### Projekt#2: MycoFoss – automatizált CFIA alapú módszer bemutatása

A vizsgálatban a Trilogy Analytical Laboratory-tól (Washington, USA), származó kukorica referencia mintákat használtunk. Az összehasonlításban a gyártó által, LC-MS/MS mérések alapján meghatározott referenciaértékeket vettük alapul.

Mintakészítés és mérés: MycoFoss™ műszer mintataró poharába 5 g, megfelelő szemcseméretű kukoricalisztet mértünk be. A készülék automatikus extrakciót végezett.



1. ábra: MycoFoss™ készülék és az eldobható mintatartó pohár

A készülék képes hat fő mikotoxin-csoport (DON, ZEA, aflatoxinok, fumonizinek, OTA és T-2 toxin) egyidejű kimutatására. A módszer a kompetitív immunassay és az FC elvét ötvözi, lehetővé téve a gyors ( $\approx 8$  perc/minta), multiplex jellegű méréseket. A fluoreszcens jel és a toxin koncentrációja közötti fordított arány biztosítja a kvantitatív meghatározást, míg a gyöngy-alapú rendszer garantálja az egyes toxinok egyértelmű elkülönítését. A vizsgálatot öt különböző műszerrel, duplikált mérésekben végeztük el.

### Projekt#3: CFIA módszer összehasonlítása UHPLC-MS/MS módszerrel

2023 februárjában, 18 kukoricaminta (9 kezeletlen és 9 *Fusarium graminearum* törzssel mesterségesen fertőzött) vizsgálatával teszteltünk a MycoFoss™ detektáló platformot. Feltételezhetően – a fertőzés terepi körülményeinek köszönhetően - valamennyi kezeletlen mintán is kimutatható volt valamely *Fusarium* törzs. A mintákat kézzel gyűjtöttük a gépi betakarítás előtt, hogy elkerüljük a kombájnok tisztító mechanizmusait, amelyek csökkenthetik a tényleges gombás szennyeződés mértékét.

Az UHPLC-MS/MS méréshez a gabonamintákat a mintaelőkészítésre vonatkozó kritériumoknak megfelelően készítettük el. A mérés elvégzéséhez akkreditált laboratórium (Bonafarm Takarmánylaboratórium, Nagyigmánd) szolgáltatását vettünk igénybe. Az alkalmazott műszer egy Agilent 1260 Infinity II HPLC volt, Ultivo QQQ MS rendszerrel összekapcsolva. Az analitikai módszert néhány meglévő módszer összevonásával és módosításával fejlesztették ki. A módosított rendszerrel 17 perc alatt 14 toxin meghatározható egy lépésben. Az elválasztáshoz Kinetex Biphenyl oszlopot használtak, amelyet SecurityGuard™ ULTRA Holder előoszlop előzött meg. A mobil fázist időprogramozott kettős gradiens eluens rendszerrel kezelték, H<sub>2</sub>O és MeOH felhasználásával.

MycoFoss™ mérést a Soft Flow Kft. laborjában végeztük el; az előzőekben előkészített, kukoricalisztból 5 g-ot mértünk eldobható mintatartó pohárba, és azt helyeztük a műszerbe. Az extrakciót és a mérést a műszer automatikusan elvégezte.

## 2. Multi-mikotoxin hatások vizsgálata

### Projekt#1: Anyatoxinok és metabolitok hatása az immunassay működésére

A vizsgálatban analitikai tisztaságú toxinokat és toxinszármazékokat használtunk. Tekintettel arra, hogy a CFIA rendszerben alkalmazott antitestek keresztreaktivására voltunk kíváncsiak ebben a konkrét rendszerben, a méréshez a MycoFoss módszerben alkalmazott komponenseket használtuk, a gyártó által megadott mennyiségben és térfogatban. A protokoll egyetlen módosításaként a toxin standardot a vizsgálni kívánt analit adott hígítására cseréltük. A mérést Attune NxT Flow Cytometer-en (Thermo Fischer Scientific) végeztük el.

A keresztreaktivitási értékeket a következő képlet alapján számítottuk ki:

$$\text{CR (\%)} = \text{CTOXIN} / \text{CTOXIN-DERIVATIVE} * 100$$

Ahol:

- CR a relatív keresztreaktivitás (vagy specifitás)

- CTOXIN -> IC 50 a fő céltoxin

/a nulla kontroll standard abszorpciójának 50%-os csökkenéséhez szükséges fő céltoxin koncentrációja (gátlás)

- CTOXIN-DERIVATIVE -> a toxin származékának IC 50 értéke

/a nulla kontroll standard abszorpciójának 50%-os csökkenéséhez szükséges toxin-származék koncentrációja

### Projekt#2: OTA és metabolitjai állati sejt kultúrákon

A vizsgálatok során szarvasmarha (MDBK) és kutya eredetű (MDCK) vesesejtvonalakat alkalmaztunk kétdimenziós (2D) sejt kultúrákban, amelyekben jól modellezhető a mikotoxinok nephrotoxikus hatásait. A sejtek kezelése szérumentes közegben történt, kizárva a szérumalbuminhoz való erős kötődésből eredő torzító hatásokat, amelyek az OTA és a CIT esetében különösen jelentősek.

A sejt vitalitást az intracelluláris ATP-szint meghatározásával értékeltük, ami érzékeny indikátora a sejtek metabolikus aktivitásának. A kombinációs kísérletekben az OTA-t állandó, mérsékelt citotoxicitást okozó koncentrációban alkalmaztuk, míg a többi mikotoxint szubtoxikus vagy toxikus dózistartományban adtuk hozzá, lehetővé téve az interakciók feltérképezését.

A hagyományos 2D sejt kultúrákat egy háromdimenziós (3D) MDCK spheroid modellel egészítettük ki, amely közelebb áll az in vivo szöveti szerkezethez és sejt kölcsönhatásokhoz. A 3D modell alkalmazása növeli az ökotoxikológiai és humán relevanciát, mivel a mikotoxinok hatásai eltérően érvényesülhetnek a sejtek térbeli szerveződése miatt.

A vizsgálat kiterjedt egy jól bevált in vivo alternatív modellre, a zebra danió (Danio rerio) embriókra is, beleértve vad típusú és transzgenikus vonalakat. Az embriotoxicitási vizsgálatok lehetővé tették a letalitási paraméterek meghatározását, valamint a szubletális fejlődési rendellenességek feltérképezését. A mikotoxinok kölcsönhatásainak számszerűsítésére a Chou–Talalay-féle kombinációs index (CI) módszert alkalmaztuk.

### 3. CFIA módszer tesztelése állati eredetű minták mikotoxin meghatározására

A vizsgálat során orvosilag ellenőrzött, felnőtt, hím CD1 egereket alkalmaztak, standardizált környezeti feltételek mellett. Az állatok étrendje és ivóvize ellenőrzött volt, az OTA háttérszennyezettség alacsony, de mérhető szinten jelen volt, ami jól tükrözi a reális környezeti expozíciót. Az OTA-t szájon át, gyomorszondás etetést útján juttatták be 1 mg/ttkg és 10 mg/ttkg dózisban, három egymást követő napon keresztül. A dózisek az alacsony tartományba estek, lehetővé téve a szubakut toxikus hatások és a szöveti akkumuláció vizsgálatát. A kísérleti elrendezés tartalmazott abszolút kontroll- és vivőanyag-kontroll csoportokat is, ami növelte az eredmények értelmezhetőségét. A kezelések után az állatokból vérmintákat, valamint főbb szerveket (máj, vese, lép) gyűjtöttek. A szervek tömegének mérése és az alapvető toxikológiai, morfológiai vizsgálatok lehetővé tették az OTA szervspecifikus hatásainak értékelését. A mintákat mélyfagyaszttva tárolták az analitikai mérésekig, minimalizálva a toxin lebomlását.

#### HPLC-FLD alapú OTA-meghatározás

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát fluoreszcens detektálással (HPLC-FLD) referenciamódszerként alkalmazták. Az eljárás magas érzékenységgel, kiváló linearitással és alacsony kimutatási határral rendelkezett. A módszer megbízhatóságát a magas visszanyerési arány ( $\approx 90\%$ ) és az alacsony intraassay variabilitás igazolta. A HPLC-FLD alkalmasnak bizonyult az OTA pontos kvantifikálására plazma- és szövetmintákban, ugyanakkor idő- és költségigényessége korlátozza rutinszerű alkalmazását.

#### ELISA-alapú immunoassay alkalmazása

Alternatív megoldásként egy kompetitív ELISA-módszert fejlesztettünk tovább, amely eredetileg élelmiszer-minták OTA-tartalmának meghatározására készült. A módszer előnye a viszonylagos egyszerűség, a magas áteresztőképesség és az alacsonyabb költség. Az egérmintákra adaptált eljárás megfelelő érzékenységet mutatott, ugyanakkor a visszanyerési arány alacsonyabb volt, mint a HPLC esetében, ami a biológiai mátrix komplexitásával magyarázható. Ennek ellenére az ELISA alkalmas lehet szűrő módszerként vagy nagy mintaszámú vizsgálatokban.

#### Áramlási citometrián alapuló multiplex immunoassay

A vizsgálat harmadik pillérét a CFIA képezte. Ez a módszer gyors, kis mintamennyiséget igényel, és potenciálisan alkalmas több mikotoxin egyidejű kimutatására. Az OTA meghatározása megfelelő pontosságot és reprodukálhatóságot mutatott, miközben a mérési idő jelentősen rövidebb volt a HPLC-nél. A módszer különösen ígéretes toxikológiai és biomonitoring alkalmazásokban, ahol multiplexitásra és gyors kiértékelésre van szükség.

#### Statisztikai értékelés és módszerek összehasonlítása

A statisztikai elemzés korszerű modelleket és poszthoc tesztek alkalmazott az expozíciós csoportok közötti különbségek értékelésére. A különböző analitikai módszerek közötti

korrelációvizsgálatok megerősítették, hogy az alternatív immunoassay-alapú megközelítések eredményei jól összevethetők a HPLC-FLD referenciamódszerrel, különösen a tendencia- és dózisfüggő változások tekintetében.

#### 4. CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben - gabonaalapú alkalmazások

##### Projekt#1: Mikotoxin térkép készítése kukorica minták mikotoxin adatai alapján

A kutatás során összesen 45, 2023-ban betakarított kukoricamintát elemeztünk, amelyek az ország földrajzilag jól elkülöníthető térségeit reprezentálták (Északi-középhegység, Dunántúl, Alföld, Nyírség). A mintavételezés magtári tételekből származott, 1 kg-os zsákokban, az EU mintavételi protokollnak megfelelően (EU 2023/2782).

A mintaelőkészítés során, homogenizálás után 100–110 g alminta őrlése történt meg KN 295 Knifetec készülékkel (5–10 s). Az eljárás összhangban állt mind a 2782/2023/EU rendelet, előírásaival. A MycoFoss™ 5 g lisztet igényel a standard extrakcióhoz. A minták hűtött tárolása 2–8 °C-on történt a mérésig.



2. ábra: MycoFoss™ mérésre előkészített minták

A kapott MFI értékek alapján a kiértékelés 4-paraméteres logisztikus görbével történt. Statisztika és adatvizsgálat: normalitás-vizsgálat, kategorizálás a 915/2023 EU rendelet szerinti élelmiszer-határértékekhez viszonyítva; eloszlás- és gyakoriságelemzés, korrelációk ( $R^2$ ) mikotoxin-párok között; térképi megjelenítés ArcGIS 10.8 szoftverrel, továbbá Kachlek és mtsai (2016) módszere alapján komplex veszélyességi besorolás.

##### Projekt#2: Talajművelési technológiák hatás a mikotoxin felhalmozódásra

A vizsgálat Tolna megyében, Dalmand térségében, a Dunántúli-dombság területén került kivitelezésre. A talaj fizikai és kémiai paraméterei – közepes humusztartalom (2,3%), enyhén savas pH (pH KCl = 6,6), jó foszfor- és kiemelkedő kálium-ellátottság – kedvező termesztési feltételeket biztosítottak. Az átlagos KA-érték (42) középkötött talajszerkezetre utalt.

A kísérletben két különböző éréscsoportba tartozó (FAO 350–400 és FAO 390–420) szemes kukorica hibridet vizsgáltunk négy eltérő talajművelési rendszerben: hagyományos szántás, csökkentett művelés, konzerváló talajművelés és sávos technológia. A rendszerek eltérő mértékű felszíni növényi maradványborítást biztosítottak (0→30%), amely fontos szerepet játszhat a talajnedvesség megőrzésében és a mikroklíma alakításában. A nagytáblás elrendezés és a parcellák megfelelő mérete biztosította az üzemi körülményekhez közeli vizsgálati feltételeket.

Az egységes tápanyagellátás és növényvédelmi technológia alkalmazása lehetővé tette a talajművelés hatásának elkülönítését. A startertrágyázás, a folyékony nitrogén-utánpótlás és a preemergens gyomirtás korszerű technológiai elemeket képviselt. A vetés és az állománysűrűség a hazai gyakorlatnak megfelelően került kialakításra.

A 2022-es év időjárása jelentősen eltért a sokéves átlagtól. A vegetációs időszak során a csapadékösszeg 112 mm-rel maradt el az átlagtól, míg a hőmérséklet átlagosan 1,2 °C-kal magasabb volt. Ezek a körülmények aszálystresszt és hőstresszt eredményeztek, amelyek köztudottan befolyásolják a kukorica termésképzését és a mikotoxinok képződésének kockázatát. A mikotoxin-vizsgálatokhoz reprezentatív mintavétel történt minden talajművelési rendszerben. A mikotoxin-tartalom meghatározására korszerű, nagy érzékenységgű analitikai módszerek kerültek alkalmazásra. A MycoFoss™ rendszer lehetővé tette a 6 legfontosabb mikotoxin gyors és egyidejű kimutatását. Ezt kiegészítette a fumonizin B1–B4 frakciók pontos meghatározása HPLC-ESI-MS módszerrel, izotóppal jelölt belső standard alkalmazásával, amely magas analitikai megbízhatóságot biztosított.

Az adatok statisztikai értékelése során a nem paraméteres eljárások domináltak, mivel az adatsorok többsége nem felelt meg a normalitás és varianciahomogenitás feltételeinek. A Kruskal–Wallis- és Mann–Whitney-próbák megfelelően támogatták a kezelések közötti különbségek vizsgálatát, míg a Pearson-féle korrelációelemzés az összefüggések feltárását szolgálta.

### Projekt#3: CFIA alkalmazása mesterségesen fertőzött kukorica hibridek mikotoxin tartalmának meghatározásában

A vizsgálat során a mesterséges fertőzéshez *Fusarium proliferatum* és *Fusarium verticillioides* törzseket használtuk, amelyek hazai kukoricatermő területekről származtak és megbízható taxonómiai azonosításon estek át (Izolálta és azonosította Szécsi Árpád; Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem jogelőd intézménye). A kísérlet során ugyanakkor bebizonyosodott, hogy a kukoricacsövek természetes úton is fertőzöttek voltak *F. graminearum* és *F. sporotrichioides* fajokkal, így az eredmények több *Fusarium* faj együttes mikotoxin-termelését tükrözik.

A kísérletbe két Bt kukoricavonal (MON 810 ; DAS-59122-7), valamint ezek közel izogén párjai kerültek bevonásra. A növényeket valós szántóföldi körülmények között, növényvédő szerek alkalmazása nélkül termesztették. A kontrollált kézi beporzás biztosította a genetikai homogenitást. A mintavétel az R4 fenológiai stádiumban történt, és standardizált méretű csőkeresztmetszeti korongokat alkalmaztak a kísérletekhez.

A kukoricacső-korongokat jól definiált koncentrációjú *Fusarium* mikrokonídium szuszpenzióval fertőzték, majd magas relatív páratartalom mellett, egyedi edényekben inkubálták. A kolonizáció

mértékét szigorúan ellenőrizték, és minden, nem kívánt fonalas gombával (*Aspergillus*, *Penicillium*) jelentősebben fertőzött mintát kizártak. Ez a megközelítés biztosította, hogy a mért mikotoxin-szintek döntően *Fusarium* eredetűek legyenek.

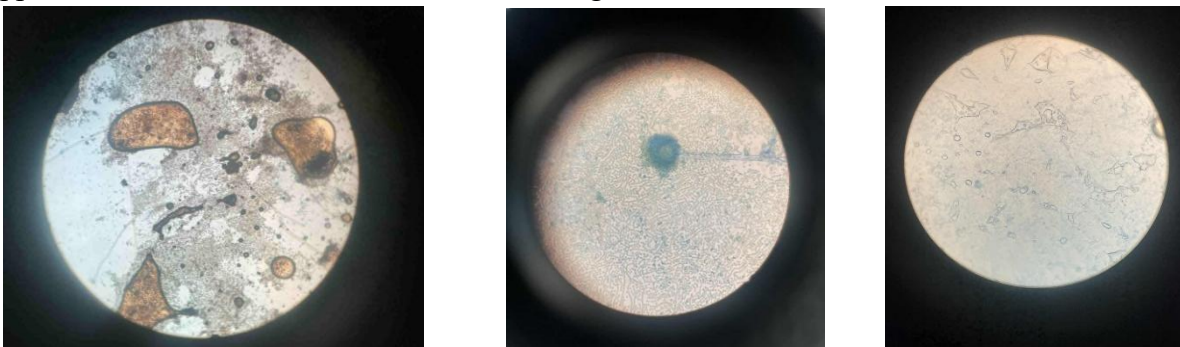
A mikotoxin-analízishez kizárólag a *Fusarium* micéliumot tartalmazó szöveteket dolgoztuk fel. Az extrakció acetonitril-víz eleggyel történt, homogenizálást, rázást és centrifugálást követően, ami jól bevált, reprodukálható eljárás mikotoxinok hatékony kinyerésére komplex biológiai mintákból. A mikotoxinok (FB1, DON, ZEA, T-2, AB1 és OTA) mennyiségi meghatározását a Fungi-Plex™ multiplex mikotoxin assay segítségével végeztük. A méréseket BD FACSAarray™ Bioanalyzer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) készüléken végeztük el. A különböző hígítások alkalmazása biztosította, hogy minden toxin a mérési tartományon belül kerüljön meghatározásra. A kapott áramlási citometriás adatokat dedikált szoftverrel dolgoztuk fel, a gyöngypopulációk elkülönítésével és a fluoreszcencia-intenzitás kvantifikálásával. Az adatok statisztikai értékelése során igazoltuk a normál eloszlást, majd egyfaktoros varianciaanalízist (ANOVA) és Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztunk 95%-os megbízhatósági szinten. Ez a statisztikai megközelítés lehetővé tette a különböző kukoricavonalak és kezelések közötti szignifikáns különbségek kimutatását.

### c) Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktiválásán keresztül

#### 1. Fonalas gombák izolálása és pontosabb megismerése

A vizsgálat során a fonalas gombák mezőgazdasági eredetű gabonamintákból, valamint humán klinikai mintákból történő izolálása, nemzetségszintű azonosítása valósult meg. Az így nyert 'saját izolátumok' és a hivatalos törzsgyűjteményi forrásokból származó fonalagombák mikotoxin-termelő képességének összehasonlító elemzését végeztük el munkánk során. A vizsgálatban különös hangsúlyt fektettünk a földrajzi eredet, a gombanemzetségek közötti különbségek, valamint a tárolási mód mikotoxin-termelésre gyakorolt hatásának értékelésére.

A vizsgálatba 20 kukoricaminta került bevonásra, amelyek a Soft Flow Kft. gyűjteményéből származtak. A minták Magyarország három eltérő agroökológiai régióját reprezentálták: Alföld, Északi-középhegység, Dunántúli-dombság. A mintavétel során törekedtünk a földrajzi és környezeti heterogenitás (éghajlat, talajminőség) biztosítására a reprezentativitás növelése érdekében. A kukoricamintákból összesen: 9 *Aspergillus* spp., 17 *Penicillium* spp., 12 *Fusarium* spp. izolátum került előállításra és további vizsgálatokba bevonásra.



3. ábra: Izolált *Aspergillus* spp. (balra), *Penicillium* spp. (középen) és *Fusarium* spp. (jobbra) mikroszkópos képe

Hivatalos törzsgyűjteményből származó referenciatörzsek: *Fusarium graminearum* FZL Fg2022/17 (Fumizol Kft., Szeged), *Aspergillus flavus* SZMC398 (Szegei Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény), *Aspergillus niger* DSM 22593, *Penicillium verrucosum* DSM 1836 (DSMZ, Németország). A mikotoxin-vizsgálataink kiterjedtek humán eredetű izolátumokra is, amelyek a PTE-ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai Intézetből származtak: *Aspergillus flavus* K13, *Aspergillus niger* K20.

Penészgombák izolálása és azonosítása során a mintákból 300 mg kukoricaőrleményt 30 ml 0,1% Tween 80-at tartalmazó fiziológiás sóoldatban szuszpendáltak (10 mg/ml). A spórák felszabadítását BIOSAN Bio Vortex V1 készülékkel, 1 perces vortexelés biztosította.

A kapott szuszpenziókból 32× és 64× hígítási lépcsőket készítettünk, amelyekből 50 µl-t oltottunk Bengálrózsát tartalmazó malátás agar (MEA) táptalajra. A Bengálrózsa (100 mg/L) alkalmazása a telepéret kontrollálását szolgálta. Az inkubáció 25 °C-on, 7 napig történt.

A tisztítási lépés során a telepeket Bengálrózsát nem tartalmazó MEA-ra oltottuk át, majd újabb 7 napos inkubáció következett. A nemzetségszintű azonosítást laktofenol-gyapotkék festéssel, fénymikroszkóp segítségével végeztük.

A mikotoxin-vizsgálatokhoz a gombákat burgonyakivonat-dextróz agaron (PDA), 30 °C-on, 7 napig tenyésztettük. A fertőzési modellhez gombánként 20 g finomra darált rizst használtunk, amelyhez 10 ml desztillált vizet adtak, majd autoklávoztuk. A PDA tenyészetekből 10 db, 1 cm átmérőjű agarkorongot készítettünk, amelyeket 6 ml 0,85%-os NaCl-oldatba helyeztük, és 20 percig inkubáltuk enyhe keverés mellett. Az így kapott szuszpenzióból 2,8 ml-t adtak a steril rizshez, majd 15 percig ráztatták (Thermo Scientific keverő). A fertőzött rizst 30 °C-on, 14 napig inkubálták. Ezt követően 0,5 g fertőzött rizst keverték 4,5 g toxinmentes, darált bolti rizshez, tízszeres hígítást létrehozva. A mikotoxinszintek meghatározása MycoFoss készülékkel történt.

A mikotoxin-adatokat nem paraméteres statisztikai módszerekkel értékelték. A három földrajzi régióból származó izolátumok toxin-szintjeit Kruskal–Wallis próbával hasonlították össze, majd szignifikáns eltérés esetén Mann–Whitney U-tesztet alkalmaztak. A kontroll mintákkal való összevetés szintén Mann–Whitney próbával történt,  $\alpha = 0,05$  szignifikanciaszinten.

## 2. Agardiffúziós és CLSI M38-A2 szabványon alapuló mikrodilúciós eljárás MIC protokollok összehasonlítása

A vizsgálatok során alkalmazott törzsek a Szegei Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből (SZMC) származtak: *Aspergillus flavus* ATCC 204304 (USA, Virginia); *Aspergillus parasiticus* SZMC 2473 (eredet: Japán) *Fusarium verticillioides* FZL Fv2022/1

A kísérletek előtt a törzsek PDA (Potato Dextrose Agar) táptalajra lettek kioltva, 7 napos, 25 °C-os inkubáció mellett. A vizsgálat két, azol típusú fungicidet alkalmaztunk: Metkonazol (Sigma-Aldrich, 37909) és Vorikonazol (Sigma-Aldrich, PHR1892). Az alkalmazott koncentrációtartományok a szakirodalomban közölt MIC-adatokra (Spolti et al., 2012; Paul et al., 2018) épültek, metkonazol esetén 10–0,078 µg/ml, vorikonazolnál 8–0,0625 µg/ml végkoncentrációkkal.

Az agarhígítási módszer során az antifungális szert közvetlenül a még folyékony PDA táptalajba kevertük. A Petri-csészékbe 25 ml táptalaj került, majd a megszilárdulás előtt 250 µl antifungális oldat hozzáadásával alakult ki a kívánt végkoncentráció. A gombanövekedés indításához 4 mm átmérőjű agar korongokat vágunk ki a 7 napos törzstenyészetből. Az inkubáció 25 °C-on, 8 napon át zajlott, a telepátmérők mérése két, egymásra merőleges tengely mentén, 2 napos időközökkel történt. A kontrollcsészékben csak DMSO-t tartalmazó PDA szerepelt, lehetővé téve az oldószerhatás kizárását. A MIC meghatározása a telepátmérő-növekedés százalékos csökkenése alapján történt, ahol 10% alatti növekedés jelentette a gátlási küszöböt.

Az említett számolási folyamat az alábbi képlettel írható le:

$$\text{Növekedés\%} = \frac{D_t - D_i}{D_c - D_i} \times 100$$

A képlet szemlélteti a gombatelep növekedését egy adott koncentrációjú antifungális oldat hatására a kontrollhoz viszonyítva, ahol:

- $D_t$ : A kezelt telep átmérője;
- $D_i$ : Az inokulált telep átmérője;
- $D_c$ : A kontroll telep átmérője

A mikrodilúciós vizsgálat a CLSI M38-A2 (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi) szabványon alapult, kiegészítve objektív, műszeres kiértékeléssel. Az alkalmazott tápoldat RPMI-1640 volt. A PDA-n nevelt törzsekből fiziológias sóoldattal spóraszuszpenzió készült. A koncentráció beállítása HITACHI U-2910 spektrofotométerrel, 530 nm-en, OD = 0,09–0,13 tartományban történt az *Aspergillus* nemzetség és OD= 0,15-0,17 a *Fusarium* nemzetség esetében, majd egy 50-szeres hígítás biztosította a CLSI által előírt inokulumszámot.

A vizsgálat 96-cellás mikrotiter lemezben (ThermoFisher, 92096) zajlott. Egy cellába: 100 µl antifungális oldat és 100 µl spóraszuszpenzió került, így jött létre a végleges koncentráció. Az inkubáció 35 °C-on, 8 napon át zajlott. A növekedést Thermo Scientific Multiskan Ex mikroplate olvasóval mértük 530 nm-en, 2 napos időközökkel. A MIC meghatározása itt is 10% alatti növekedésnél történt, a pozitív (DMSO-s) és negatív (RPMI) kontrollokhoz viszonyítva.

A két protokoll szoros összehangolása – azonos törzsek, koncentrációtartományok, inkubációs idő és párhuzamos indítás – lehetővé tette az eredmények közvetlen összehasonlíthatóságát.

### 3. Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata

A kísérletek során négy *Fusarium* faj – *F. Verticillioides* (FZL Fv2022/1), *F. Graminearum* (FZL Fg2022/17), *F. Proliferatum* (FZL Fp977/13/9), *F. sporotrichioides* (DSM62425) és *A. Flavus* (ATCC 204304) fonalasgombákat kezeltünk klór-dioxiddal, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk annak hatásosságát. Az ezt követő kísérletek során a klór-dioxid hatásosságát más, ipari alkalmazásban lévő gombaellenes szerekkel, metkonazollal és propionsavval hasonlítottuk össze. A kísérlet beállításhoz szükséges volt a CLSI M38-A2 protokoll módosítása. A minimál tápoldat alkalmasnak bizonyult a kísérletek elvégzésére, mivel a penészek megfelelő növekedésre voltak

képesek az RPMI-1640 tápoldattal összehasonlítva (az adatok nem kerültek feltüntetésre). Az oldatokat  $0.4 \times 10^4$  to  $5 \times 10^4$  CFU/ml szuszpenzióval inokuláltuk mikrotiter lemezen, majd a gombák szaporodását mikrotiterlemez-leolvasó (Thermo Fisher Scientific, Multiscan Ex) segítségével monitoroztuk 530 nm-es hullámhosszon 8 napon keresztül. A mikrotiter lemezek kiértékelése nem csak 48 órát követően történt, hanem 8 napon keresztül minden 24 órában. Ezen felül, a plate-ek megfigyelése nem szabadszemmel történt, hanem egy mikrotiter lemez-leolvasó (Thermo Fisher Scientific, Multiscan Ex) segítségével 530 nm-en. MIC<sub>90</sub> a leolvasott optikai denzitás (OD) értékek alapján került meghatározásra. A blank lyukakhoz tartozó OD értékek átlaga levonásra került a mintákat és a pozitív kontrollt tartalmazó lyukak OD értékéből. Az gombaellenes szerek egyes koncentrációihoz tartozó OD értékek átlaga a pozitív kontrollhoz tartozó OD értékek átlagának százalékos arányaként lett kifejezve. MIC<sub>90</sub> az a koncentrációként lett meghatározva, ahol ez az érték 10%, vagy az alatti.

$$\text{Növekedés\%} = \frac{(\text{ODt} - \text{ODb})}{(\text{ODc} - \text{ODb})} \times 100$$

A képlet szemlélteti a gombatelep növekedését egy adott koncentrációjú antifungális oldat hatására a kontrollhoz viszonyítva, százalékos értékben ahol:

ODt: Az adott koncentráción kezelt gomba OD értéke

ODb: blank minta OD értéke

ODc: kezeletlen, pozitív kontroll OD értéke

A részletesebb összehasonlíthatóság elérése érdekében, ahelyett, hogy azt a hígítási koncentrációt keresnénk meg, ahol a gomba növekedése 10% vagy az alatti, exakt MIC<sub>90</sub> értékeket határoztunk meg. Ezzel a módszerrel meg tudtuk határozni, hogy pontosan milyen koncentráción lenne a gomba szaporodása 90%-ban gátolva a kezeletlen kontrollhoz képest. Ennek eléréséhez trendvonalat illesztettünk a koncentrációfüggő görbe egyenes szakaszára. Az egyenes egyenlete alapján meghatározható volt, hogy az OD érték pontosan milyen koncentráció értéknél 10% ( $y=0.1$ ).

Minden eredmény (kivéve, ha más került feltüntetésre) négy biológiai és három technikai ismétlés alapján kerül értékelésre. A statisztikai analízist GraphPad Prism 8 alkalmazással végeztük. A statisztikai elemzések előtt normalitás tesztet végeztünk. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$  határoztuk meg.

A minimál tápoldat és az RPMI-1640 összehasonlítása egyutas ANOVA segítségével történt. A kísérlet időtartama szintén egyutas ANOVA alkalmazásával került meghatározásra annak a napnak a megtalálásához, ahonnan egy vizsgált gombafajhoz tartozó OD érték sem változik szignifikánsan. Annak érdekében, hogy az exakt MIC<sub>90</sub> értékek változását elemezzük, egyutas ANOVA-t végeztünk.

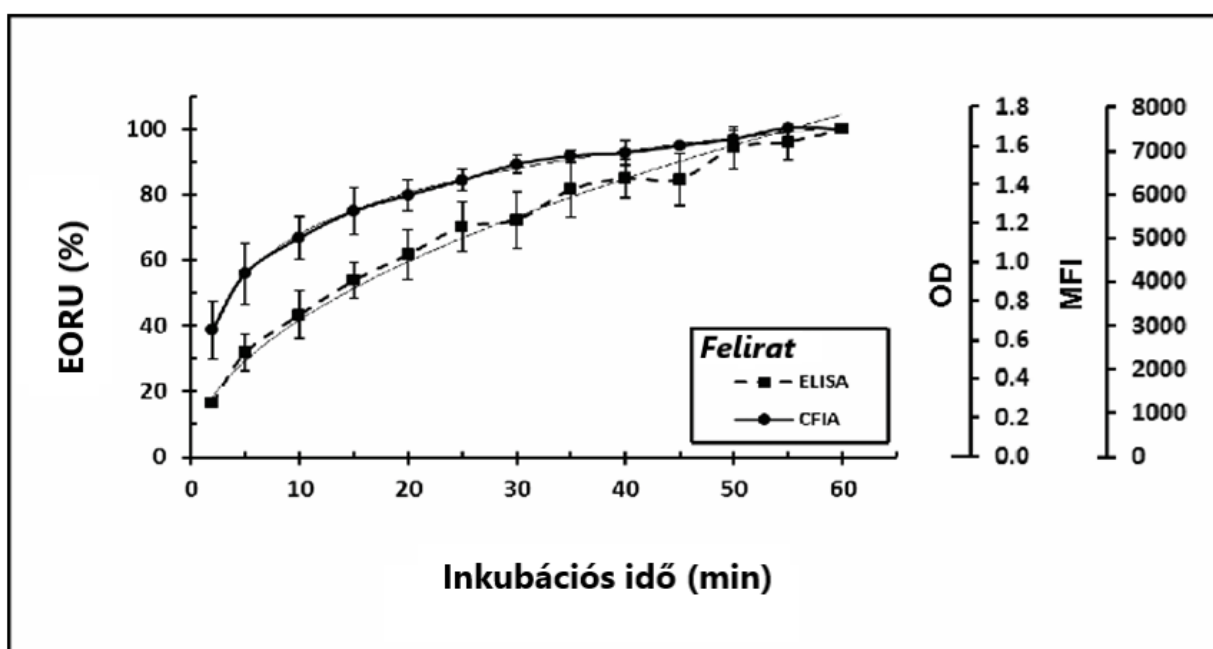
### 3)Eredmények és megvitatásuk

#### a) Mikotoxin analitika

##### 1. CFIA továbbfejlesztése

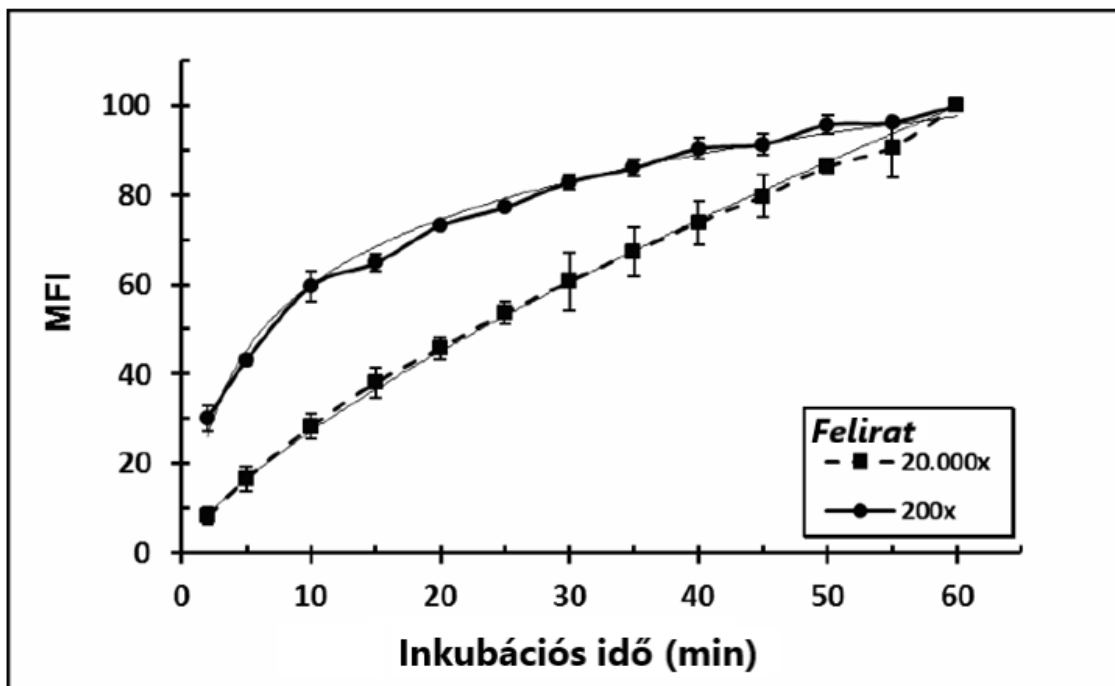
###### Projekt#1 : ELISA és aCFIA módszerek összehasonlító vizsgálata

A gyorsított inkubációs feltételek mellett az aCFIA és az ELISA között szignifikáns különbségeket figyelhetők meg a kötési sebességben. Az aCFIA esetében logaritmikus, míg az ELISA esetében hatványfüggvény írta le legjobban a kinetikai adatokat, mindkét módszernél kiváló illeszkedési együtthatóval (aCFIA:  $y = 16.781\ln(x) + 32.175$ ,  $R^2 = 0.992$ ; ELISA:  $y = 12.89x^{0.511}$ ,  $R^2 = 0.989$ ). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az aCFIA gyorsabb reakciókinetikát biztosít anélkül, hogy a mérési pontosság csökkenne.



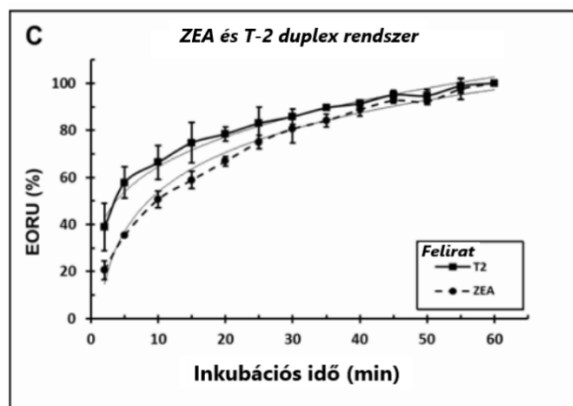
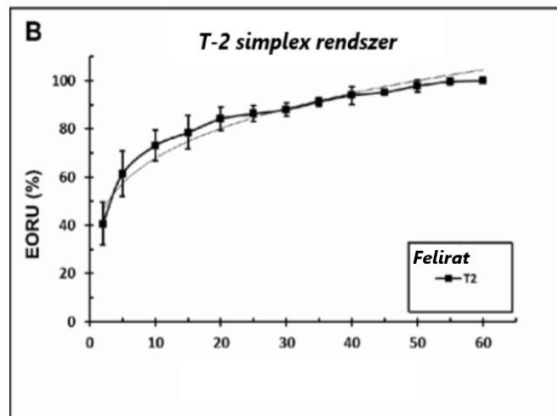
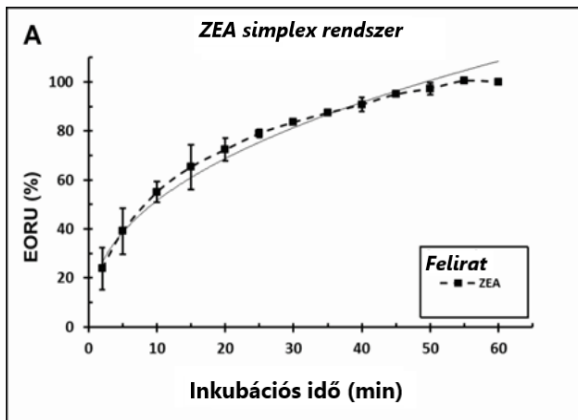
4. ábra: Az aCFIA és az ELISA kötődési kinetikájának összehasonlítása T-2 toxin esetében.

A multiplex vizsgálatok során jelentkező mátrixhatások minimalizálása érdekében széles hígítási tartományban végeztünk titrálást a konjugátummal. Az eredmények két jól elkülöníthető tartományt mutattak: alacsonyabb hígításoknál nemlineáris viselkedés volt megfigyelhető, míg 20 000-szeres hígításnál a rendszer lineárisra vált. Fontos megállapítás, hogy akár 4 000-szeres hígításig a nemlineáris görbe megmaradt, ami lehetővé teszi a mérsékelt hígítást multiplex rendszerekben a nem specifikus keresztreakciók csökkentésére, az analitikai teljesítmény romlása nélkül.



5. ábra: T-2 toxin egyedi vizsgálat Ag-PE titrálással 200 és 20 000 értékeken.

A ZEA és T-2 toxin meghatározása során a simplex és duplex mérési konfigurációk kötési kinetikái jól egyeztek a korábbi elméleti számításokkal. Simplexed vs. duplexed CFIA: ZEA és T-2 toxin esetében a duplex protokoll kinetikai paraméterei közel azonosak az egyszeres vizsgálatokkal (simplexed ZEA:  $y = 23.738\ln(x) + 3.0505$ ,  $R^2 = 0.9931$ ; simplexed T-2:  $y = 16.781\ln(x) + 32.175$ ,  $R^2 = 0.9924$ ; duplexed ZEA:  $y = 24.278\ln(x) - 2.1532$ ; duplexed T-2:  $y = 17.573\ln(x) + 27.064$ ;  $R^2 > 0.985$ ). Mindkét konfigurációban logaritmusos összefüggés írta le a kötési viselkedést, magas  $R^2$  értékekkel. A Bland–Altman analízis (BA bias plot) erős egyezést mutatott ( $p > 0.4$ ) a simplex és duplex mérések között, ami azt jelzi, hogy a multiplexálás nem jár számottevő pontosságvesztéssel. Az aCFIA eredményei összhangban voltak a korábban publikált kereskedelmi CFIA módszerekkel.

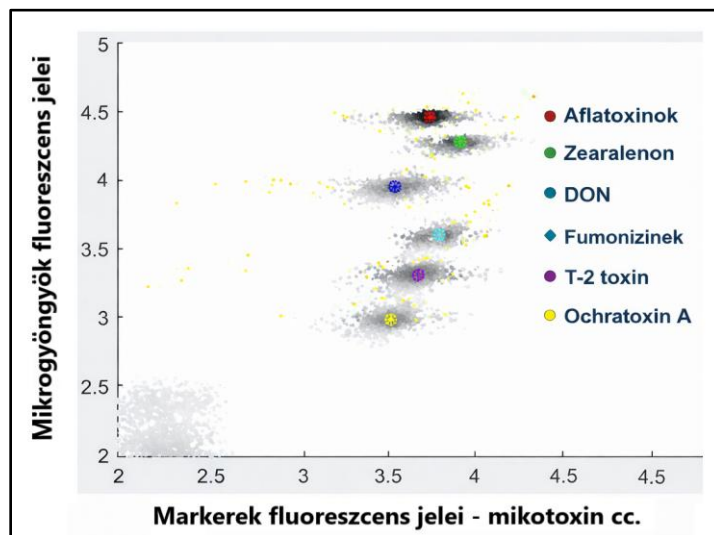


6. ábra: A T-2 és ZEA mikotoxinok aCFIA kötődési kinetikájának összehasonlítása egyedi és kombinált protokollok esetén.

Az aCFIA kötési kinetikáját négy mérési pont alapján határoztuk meg, és az MFI értékeket 45 és 60 perces végpontokra extrapoláltunk. A gyorsított, 15 perces inkubáció már elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy megbízható, négyparaméteres nemlineáris görbéket kapjunk mind T-2 toxinra, mind ZEA-ra. Duplex mérés esetén a mért és extrapolált MFI értékek közötti eltérés minimális volt, az összesített variációs együtthatók (CV%) alacsonyak maradtak, ami a módszer kiváló precizitását és prediktív képességét támasztja alá. (Extrapoláció: 4 pontból becsült MFI és a mért végpontok közti CV% < 3.5%; duplexben T-2 és ZEA  $\Delta$ CV 1.99% és 3.38%.)

Projekt#2: MycoFoss – Automatizált CFIA alapú módszer bemutatása

Az értékelés középpontjában a referenciaértékhez viszonyított pontosság, valamint az ismételhetőség (repeatability) állt.



7. ábra: Mikrogyöngyök és markerek fluoreszcens jelei a MycoFoss<sup>TM</sup> készülékben

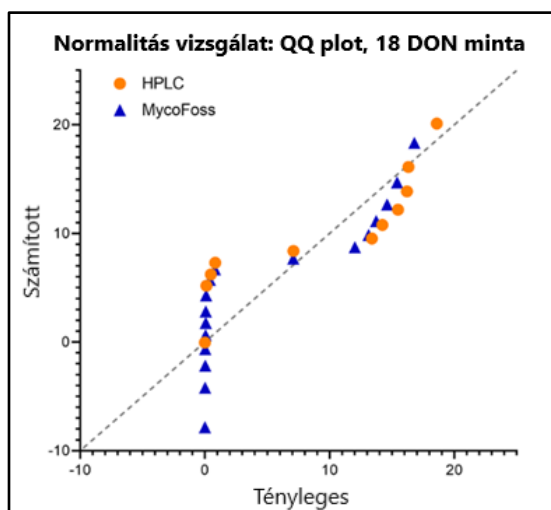
Az eredmények alapján a mikotoxinok túlnyomó többségénél megfelelő egyezés figyelhető meg a referenciaértékekkel. A T-2 toxin kivételével valamennyi mikotoxin esetében az egyedi mérések több mint 68%-a a referenciaérték  $\pm 30\%$ -os tartományán belül helyezkedett el. A T-2 toxin esetében ez az arány 66% volt, amely ugyan kissé elmarad az előírt specifikációtól, de csak marginális mértékben. A tágabb,  $\pm 60\%$ -os elfogadási tartomány tekintetében minden vizsgált mikotoxin – a fumonizineket kivéve – 95% feletti megfelelést mutatott. A fumonizinek esetében az elfogadási arány 87,1% volt, ami enyhe, de érzékelhető eltérést jelez a specifikált követelményektől. Az ismételhetőségi vizsgálatok eredményei összességében kedvezőnek tekinthetők. A DON, ZEA, fumonizinek, T-2 toxin és OTA relatív szórása (RSD) minden esetben 15% alatt maradt, ami megfelel a vonatkozó analitikai kritériumoknak. A teljes aflatoxin esetében az ismételhetőség 15,8% volt, ami kis mértékben meghaladja a közepes és magas koncentrációtartományra előírt  $<15\%$ -os határértéket, ugyanakkor megfelel az alacsony koncentrációtartományra vonatkozó,  $<20\%$ -os RSD-követelménynek. Elmondható, hogy a MycoFoss<sup>TM</sup> eredményei jól korrelálnak a referencia Trilogy/LC-MS/MS adatokkal, különösen közepes koncentrációk esetén.

Mikotoxin	Mérési tartomány (ppb)	Minták száma	Mérések száma	30%-on belüli eltérések (%)	60%-on belüli eltérések (%)	Ismételhetőség (%RSD)
Totál aflatoxin	2-100	14	108	72.2	96.3	15.8
DON	200-5000	13	88	80.7	97.7	6.4
Zearalenon	30-500	11	56	87.5	96.4	12.5
Fumonizin	500-5000	10	62	79.0	87.1	6.0
T-2 toxin	50-500	4	50	66.0	100.0	9.5
Ochratoxin	5-100	7	80	86.3	100.0	11.0

1. táblázat: MycoFoss adatok összefoglalása

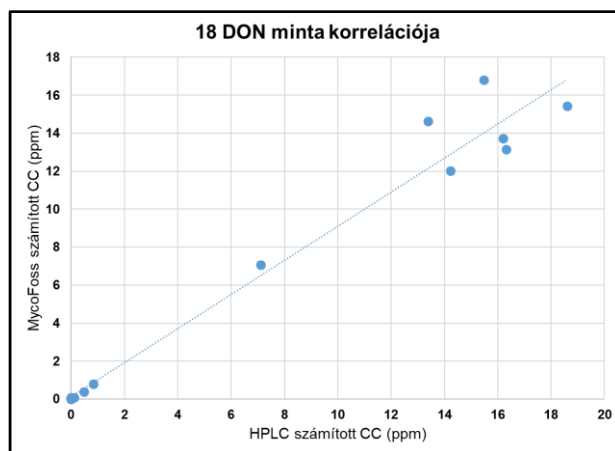
Projekt#3: CFIA módszer összehasonlítása HPLC-MS/MS módszerrel

A megfelelő statisztikai elemzések kiválasztása érdekében első lépésként a DON-koncentrációk eloszlását vizsgáltuk. Kvantilis–kvantilis (QQ) plot, valamint négy eltérő normalitásvizsgálat (D’Agostino–Pearson, Anderson–Darling, Shapiro–Wilk és Kolmogorov–Smirnov) került alkalmazásra. Bár önmagukban ezen tesztek nem alkalmasak a normalitás bizonyítására, együttes eredményeik és a QQ ábra egyértelműen arra utaltak, hogy az adatok nem követnek normál eloszlást. Ennek megfelelően nemparaméteres statisztikai módszereket alkalmaztak.



8. ábra: Normalitás ellenőrzése: 18 DON minta QQ-diagramja

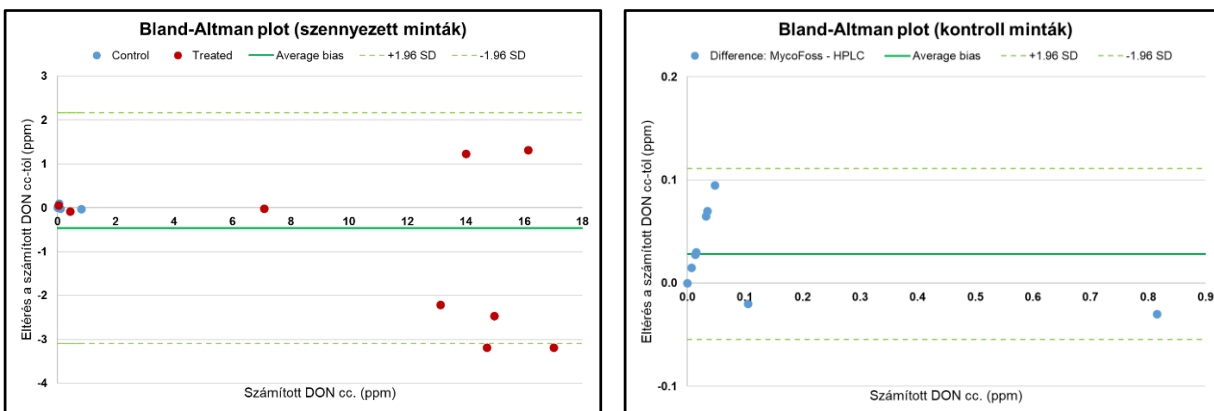
A két mérési módszer kapcsolatát Spearman-féle rangkorrelációval értékelték. Az  $r_s = 0,9189$  érték erős, pozitív korrelációt jelez a MycoFoss<sup>TM</sup> és az UPLC-MS/MS eredményei között. A nagyon alacsony P-érték ( $<0,0001$ ) alapján a korreláció statisztikailag szignifikáns, és nem a véletlen mintavételezés következménye.



9. ábra: 18 DON-minta korrelációja: MycoFoss™ vs. UPLC-MS/MS

A módszerek közötti különbségek vizsgálatára Wilcoxon-féle páros előjeles rangpróbát alkalmaztak. Az eredményül kapott  $P = 0,7909$  érték azt mutatja, hogy a két módszer által szolgáltatott adatok között nincs statisztikailag szignifikáns eltérés a szokásosan alkalmazott  $\alpha = 0,05$  szignifikanciaszint mellett.

A módszerek közötti egyezőség részletes értékelésére Bland–Altman ábrákat készítettek. Az elemzés alapján az alacsony és közepes DON-koncentráció-tartományban (0–10 ppm) a két módszer eredményei szoros egyezést mutattak. A magasabb koncentrációknál (>10 ppm) nagyobb eltérések voltak megfigyelhetők, amely részben a kezelt minták szélsőséges szennyezettségével, részben a MycoFoss™ módszer 5 ppm-es felső mennyiségi meghatározási határával magyarázható. Ennek ellenére a relatív különbségek még a magas tartományban is jellemzően 20%-on belül maradtak.



10. ábra: Bland-Altman plot – szennyezett és kontroll minták

A természetesen szennyezett minták esetében az eltérések kismértékűek voltak, míg a kezelt mintáknál – főként magas DON-szinteknél – nagyobb különbségek jelentkeztek. Az alacsony átlagos torzítás és az elfogadható egyezési határok alapján a két módszer eredményei összességében hasonlóknak és összehasonlíthatónak tekinthetők.

## 2. Multi-mikotoxin hatások vizsgálata

### Projekt#1: Anyatoxinok és metabolitok hatása az immunassay működésében

Az eredmények alapján elmondható, hogy a CFIA rendszerben alkalmazott monoklonális antitestek eltérő erősséggel kötik a vizsgált származékokat. Bizonyos származékok, még az 'anya toxinnál' is nagyobb affinitással kötődnek az antitesthez. Az aflatoxin rendszer esetében elmondható, hogy a AFM1 toxin jellemző kötéserőssége összevethető a AFB1-el. Ennek tükrében szerencsének mondható, hogy az AFM1 csupán a tejben található meg; ellenkező esetben erősen befolyásolná a mérés eredményét. DON esetében említésre méltó a 3-acetyl DON, mely a DON-t meghaladó affinitást mutatott. A fumonizin és a ZEA esetében is találunk egy-egy származékot, melyet erősen köt az alkalmazott antitest. Ezen metabolitok jelenléte könnyen eredményezhet false pozitív eredményeket.

Végül, de nem utolsó sorban érdemes megemlíteni a T2 rendszert. A T2 ellenes antitest gyakorlatilag nem köti a HT2 toxint. Emiatt ez az antitest nem alkalmas a legfrissebb EU-s irányelveknek megfelelő, a T2+HT2 szintek meghatározására.

Antitest	Antigén	Származék						
AFLA-mAb	Aflatoxin B1	Aflatoxin B2	Aflatoxin G1	Aflatoxin G2	Aflatoxin M1			
Keresztkötés (%)	100.0	80.1	76.2	31.3	102.6			
DON-mAb	DON	3-acetyl DON	15-acetyl DON	DON-3 glicoside	Nivalenol			
Keresztkötés (%)	100.0	159.1	1.2	22.3	0			
FUM-mAb	Fumonisin B1	Fumonisin B2	Fumonisin B3	Fumonisin B4				
Keresztkötés (%)	100.0	144.9	86.3	131.9				
OTA-mAb	Ochratoxin A	Ochratoxin B	Ochratoxin C					
Keresztkötés (%)	100.0	32.5	16.7					
T2-mAb	T2 toxin	HT2 toxin						
Keresztkötés (%)	100.0	2.4						
ZEA-mAb	Zearalenon	ZAN	$\alpha$ -zearalenol	$\beta$ -zearalenol	$\alpha$ -zearalanol	$\beta$ -zearalanol	ZEN-14-glikozid	ZEN-14-szulfát
Keresztkötés (%)	100.0	190.9	213.5	101.9	215.9	103.7	0.0	0.0

2. táblázat: Keresztreaktivitások

A fent említett keresztkötések pontos ismerete elengedhetetlen, az assayfejlesztésben -megfelelő pufferek, feltárások, detergens alkalmazásában. Az eredmények egyértelműen világossá tették, hogy az immunanalitika alkalmas lehet a 'pool toxinok', vagy a rejtett mikotoxinok vizsgálatára közép és hosszútávon.

### Projekt#2: OTA és metabolitjai állati sejt kultúrákon

Az OTA minden vizsgált vesesejt-modellben (MDBK és MDCK sejt vonalak) kifejezett, koncentrációfüggő citotoxicitást mutatott, alacsony értékekkel, megerősítve központi szerepét a mikotoxinok által kiváltott nephrotoxikus hatásokban. Az OTB toxicitása szignifikánsan alacsonyabb volt az OTA-hoz képest, míg az OTC a legtöbb modellben még az OTA-nál is erősebb citotoxikus hatást fejtett ki, különösen MDCK sejtekben. A CIT általánosan gyengébb toxicitást mutatott, és csak magasabb koncentrációk mellett csökkentette számottevően a sejtek életképességét, míg a DHC önmagában gyakorlatilag nem volt citotoxikus.

Fontos megfigyelés, hogy a 3D sejt kultúrák modellek több esetben csökkent érzékenységet mutattak a toxinokkal szemben a 2D rendszerekhez képest. Ez összhangban áll azzal, hogy a 3D modellek jobban tükrözik az in vivo szöveti architektúrát, a sejtek közötti kölcsönhatásokat,

valamint a diffúziós és metabolikus gradienseket, így toxikológiai szempontból fiziológiailag relevánsabb válaszokat adhatnak (Edmondson et al., 2014; Duval et al., 2017).

A mikotoxinok kombinált alkalmazása jelentősen módosította az OTA által kiváltott citotoxikus hatásokat. Több esetben additív vagy szinergista interakciók voltak kimutathatók, különösen OTC, CIT és DHC jelenlétében. Figyelemre méltó, hogy a DHC – annak ellenére, hogy önmagában alig volt toxikus – minden modellben jelentősen fokozta az OTA citotoxicitását. Ez rámutat arra, hogy az alacsony toxicitású metabolitok is súlyosbíthatják más mikotoxinok hatásait kombinált expozíció esetén.

A 3D MDCK modellben az interakciók mintázata különösen összetett volt, ami alátámasztja, hogy a hagyományos 2D rendszerek alulbecsülhetik vagy félreértelmezhetik a mikotoxin-keverékek valódi toxikológiai kockázatát.

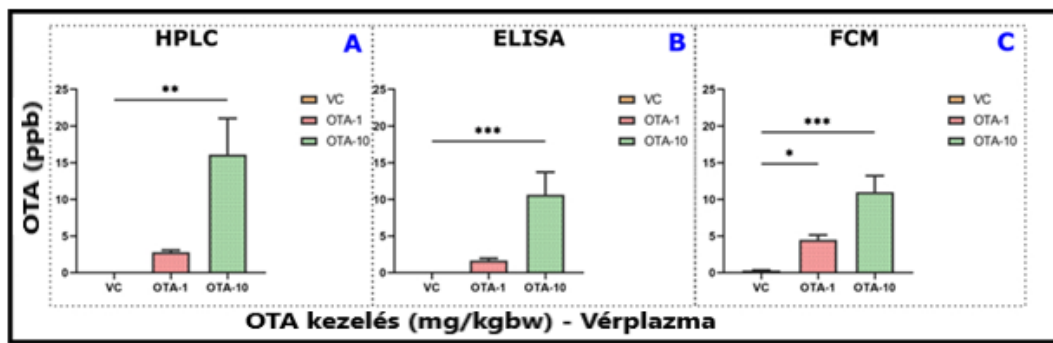
Az egyedi toxinok közül az OTC bizonyult a legtoxikusabbnak zebradánió embriókban, ezt követte az OTA, majd az OTB, míg a CIT és a DHC még magas koncentrációkban sem okoztak mortalitást. A kombinált expozíciók azonban drámai módon növelték a halálozást, gyakran teljes mortalitást eredményezve már szubtoxikus koncentrációk mellett is.

A letalitáson túl a kombinált kezelések súlyos szubletális fejlődési rendellenességeket idéztek elő, beleértve a testtengely görbületét, perikardiális ödémát, szikhólyag-eltéréseket és a szívfejlődés zavart. Ezek a hatások jóval kifejezettebbek voltak, mint az egyedi toxinok esetén, ami a keverékhatások biológiai jelentőségét hangsúlyozza.

A vizsgálatok kiterjedtek a miR-731 expressziójára is, amely ismert biomarkere az OTA-indukált vesekárosodásnak zebradánióban. Az egyedi kezelések nem módosították szignifikánsan a miR-731 szintjét, míg az OTA más mikotoxinokkal való kombinációja jelentős expresszió növekedést eredményezett. Ez a molekuláris változás jól korrelált a pronephros morfológiai károsodásával, amelyet transzgenikus zebradánió vonalban figyeltek meg. Az eredmények arra utalnak, hogy alacsony dóziszú, kombinált mikotoxin-expozíció is súlyos fejlődési és funkcionális veseelváltozásokat idézhet elő.

### 3. CFIA módszer tesztelése állati eredetű mikotoxin meghatározására

Vérplazma esetén a 10 mg/ttkg-os OTA dózis esetén mindhárom módszerrel egyértelmű és szignifikáns OTA-szint emelkedés volt kimutatható.

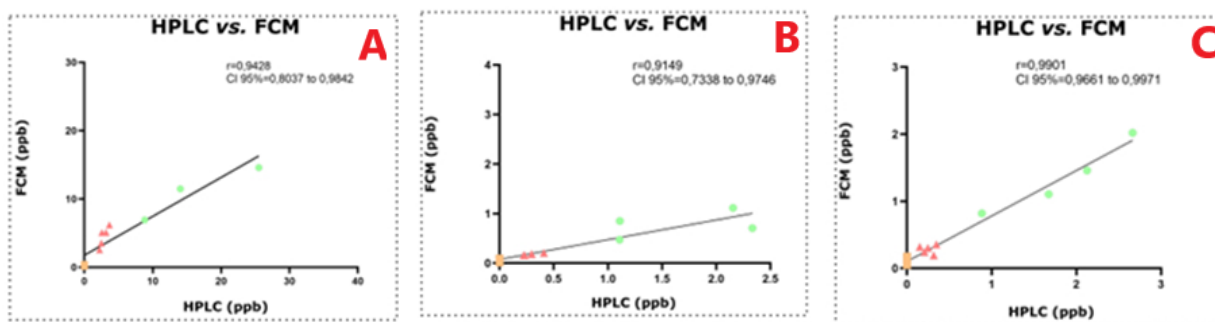


11. ábra: Az OTA felhalmozódásának becslése egerek vérplazmájában, HPLC, ELISA és CFIA módszerrel mérve.

Az 1 mg/ttkg-os kezelés csak mérsékelt, többnyire nem szignifikáns emelkedést eredményezett. Ez dóziszfüggő szisztémás expozícióra utal.

A vese OTA-terhelése szignifikánsan nőtt a magas dózisú csoportban, ugyanakkor az abszolút koncentrációk lényegesen alacsonyabbak voltak, mint a plazmában. Ez arra utal, hogy bár a vese az OTA egyik elsődleges célszerve, rövid távon nem feltétlenül mutat extrém felhalmozódást a keringéshez képest. A májban már az alacsony dózissnál is kimutatható volt az OTA jelenléte, míg a magas dózis egyértelmű, statisztikailag szignifikáns akkumulációt eredményezett. A máj OTA-szintjei a plazma és a vese értékei közé estek, ami a máj metabolikus és detoxifikációs szerepével magyarázható.

A vizsgálat egyik legfontosabb eredménye a három analitikai módszer összehasonlítása. A HPLC-FLD, ELISA és FCM/CFIA módszerek között minden vizsgált mintatípus esetében erős, pozitív és szignifikáns korreláció volt megfigyelhető.



12. ábra: Az OTA felhalmozódásának becslése egerek vérplazmájában (A); különböző szerveiben (máj: B; vese: C).

Vérplazmában rendkívül magas korrelációs együtthatók ( $r > 0,89$ ) igazolták az immunoassay-alapú módszerek megbízhatóságát. Májban és vesében szintén erős összefüggések mutatkoztak, különösen a HPLC-FLD és az CFIA között, ami az új CFIA-módszer kiemelkedő pontosságát hangsúlyozza. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az ELISA és különösen az CFIA életképes, gyorsabb és potenciálisan költséghatékony alternatívát jelenthetnek a hagyományos kromatográfias technikákkal szemben, elsősorban nagy mintaszámú toxikológiai vagy monitoring vizsgálatokban.

#### 4. CFIA helye és szerepe a hatékony mikotoxin-menedzsment rendszerben - gabonaalapú alkalmazások

##### Projekt#1: Mikotoxin térkép készítése kukorica minták mikotoxin adatai alapján

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a kukoricaminták döntő többsége multi-mikotoxin szennyezett volt. A 45 mintából 42 esetben mind a hat vizsgált mikotoxin kimutatható volt, míg a fennmaradó három mintában is több (három) toxin együttes jelenléte volt megfigyelhető. Teljesen mikotoxinmentes minta nem fordult elő, ami alátámasztja a multi-mikotoxin expozíció realitását a gyakorlatban, és felhívja a figyelmet az együttes hatások élelmiszer-biztonsági jelentőségére.

A határérték feletti előfordulások gyakorisága mikotoxinokként jelentős eltérést mutatott. Az OTA esetében a minták többsége meghaladta a megengedett koncentrációt, míg a fumonizin B1+B2+B3 esetén szintén számottevő volt a határérték feletti minták aránya. Ezzel szemben az aflatoxin B1, a DON, a T2-toxin és aZEA esetén a legtöbb minta a határérték alatti, illetve a LOQ alatti tartományba esett, bár egyes kiugró értékek ezeknél a toxinoknál is megjelentek.

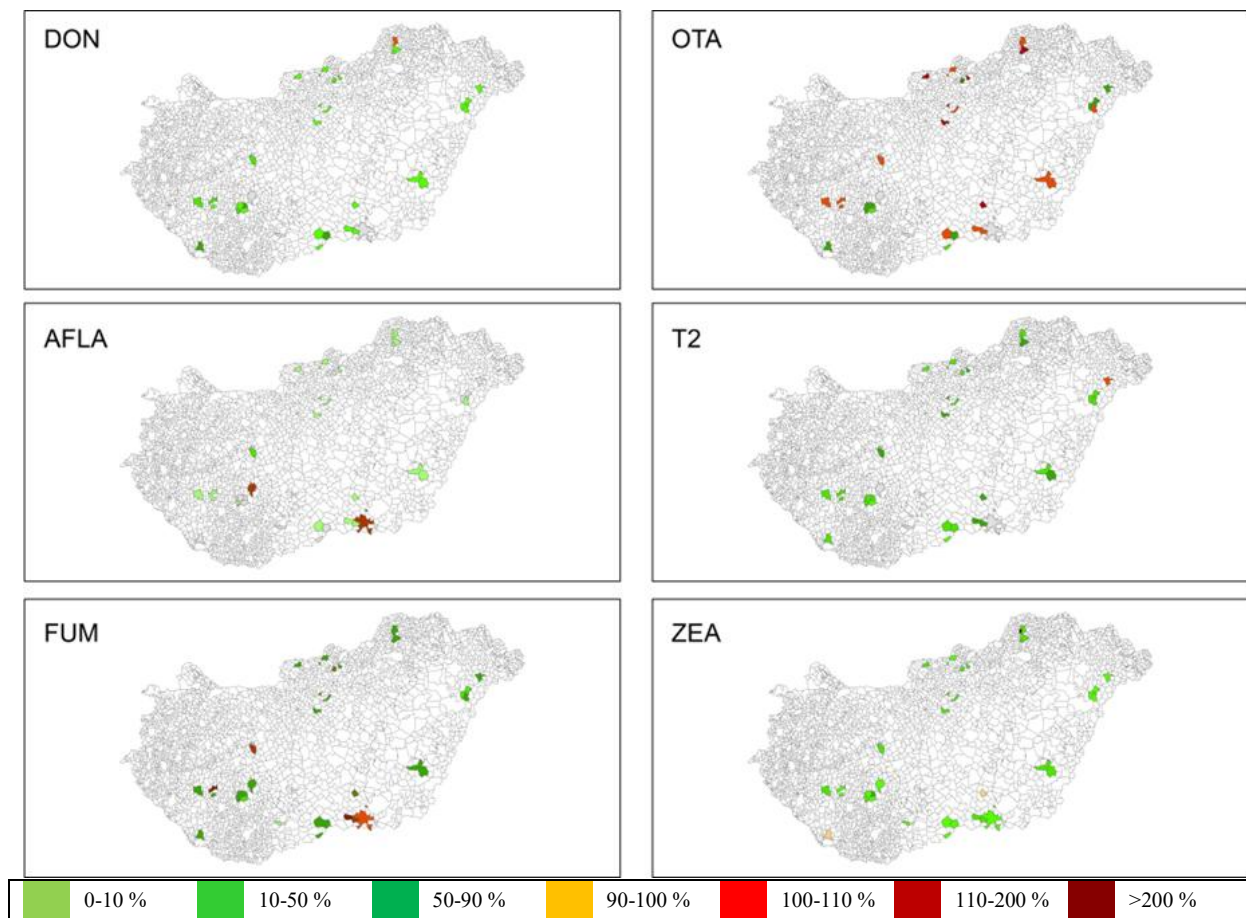
A mikotoxinok együttes előfordulását és koncentrációik közötti kapcsolatot korrelációs elemzéssel vizsgáltuk. Az illesztett regressziós modellekhez tartozó alacsony  $R^2$ -értékek (0,0006–0,3024) arra utalnak, hogy a vizsgált mikotoxinok között nem volt kimutatható szignifikáns lineáris kapcsolat. Ez azt jelzi, hogy a különböző toxinok felhalmozódása egymástól nagyrészt független folyamatok eredménye lehet, ami összhangban áll a különböző penészgombafajok eltérő ökológiai igényeivel.

A toxinonkénti elemzés során megállapítható volt, hogy:

- Aflatoxin B1 esetében a legtöbb minta alacsony, LOQ alatti koncentrációt mutatott, azonban a határérték feletti minták – alacsony számuk ellenére – fokozott figyelmet igényelnek kiemelt toxicitásuk miatt.
- OTA bizonyult a legkritikusabb mikotoxinnak, mivel a minták többsége határérték feletti koncentrációt tartalmazott.
- DON és T2-toxin esetében a minták túlnyomó többsége a biztonságos tartományba esett, de egyes minták határérték-közeli vagy azt meghaladó értékei kockázatot jelenthetnek.
- ZEA esetében egyetlen minta extrém, a határérték nyolcszorosát meghaladó koncentrációja különösen kiemelendő.
- Fumonizinek esetében az OTA után a legtöbb határérték feletti mintát azonosították.

Az eloszlásvizsgálatok alapján egyik mikotoxin esetében sem volt kimutatható klasszikus statisztikai eloszlás, ami a szennyeződés heterogén jellegére utal.

A térinformatikai elemzés rámutatott arra, hogy a minták többsége Magyarország déli és dunántúli régióiból származott. A regionális különbségek markánsak voltak: az *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxinok (pl. aflatoxinok, OTA) gyakoribb és magasabb koncentrációban fordultak elő, mint a *Fusarium*-fajokhoz köthető toxinok. Az azonos mintavételi helyről származó minták között is számottevő eltérések mutatkoztak, ami aláhúzza a mikotoxin-szennyezés lokális és időben változó jellegét.



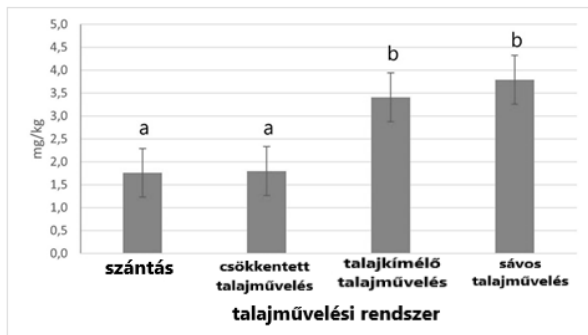
13. ábra: A minták származási helyei és a jellemző mikotoxin koncentrációk

A komplex veszélyességi értékelés alapján a minták túlnyomó többsége a veszélyes kategóriák valamelyikébe került. A legmagasabb kockázatot azok a minták jelentették, amelyekben több mikotoxin egyidejűleg magas koncentrációban volt jelen. A K23/25 azonosítójú minta bizonyult a legveszélyesebbnek, míg a K23/33 minta a legalacsonyabb kockázati besorolást kapta.

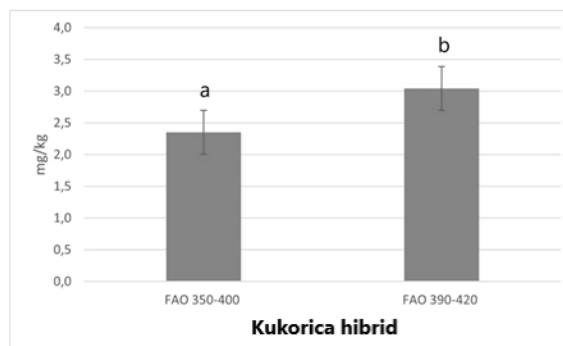
#### Projekt#2: Talajművelési technikák hatás a mikotoxin felhalmozódásra

Az eredmények alapján szignifikáns különbségek mutatkoztak a talajművelési rendszerek között a fumonizin koncentráció tekintetében. A hagyományos szántás és a csökkentett talajművelés esetében lényegesen alacsonyabb fumonizin szinteket mértek (1,76–1,8 mg/kg), mint a kímélő (conservation) és a sávós (strip tillage) művelési rendszerekben (3,41–3,8 mg/kg). Ugyanakkor statisztikailag nem volt kimutatható különbség sem a hagyományos és a csökkentett művelés, sem a kímélő és a sávós művelés között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a talaj bolygatásának mértéke közvetetten befolyásolhatja a *Fusarium* fajok fennmaradását és a fumonizin termelést.

A vizsgálat továbbá igazolta a genetikai háttér szerepét a fumonizin felhalmozódásban. A FAO 390–420 éréscsoportba tartozó hibrid szignifikánsan magasabb fumonizin koncentrációt mutatott (3,04 mg/kg), mint a FAO 350–400 hibrid (2,35 mg/kg), ami alátámasztja, hogy a hibridválasztás kulcsfontosságú tényező a mikotoxin-kockázat mérséklésében.

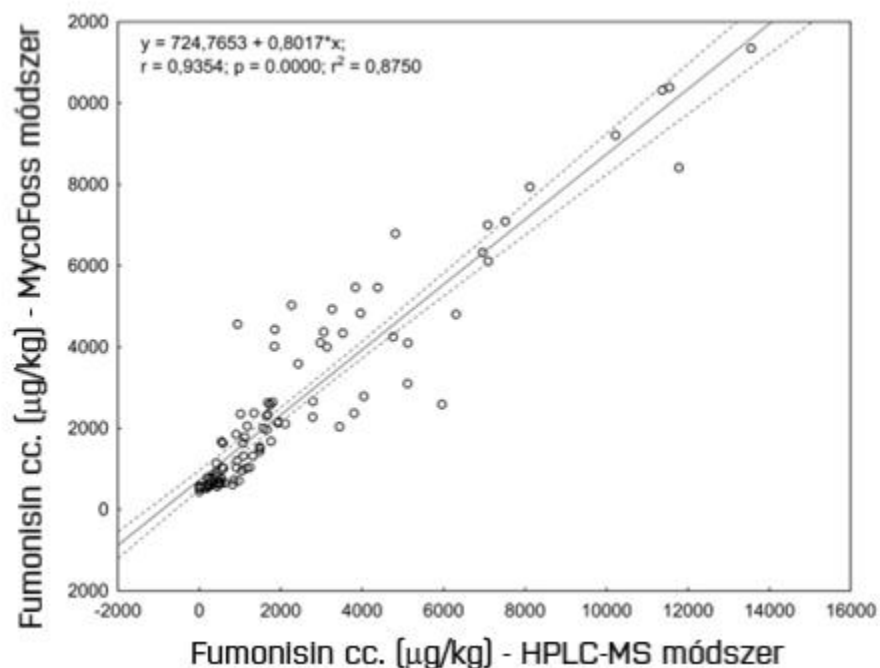


14/a. ábra: A fumonizin-szennyezettség szintje különböző talajművelési rendszerekben (mg/kg). A kisbetűk a Mann-Whitney U-teszt szerint szignifikáns különbségeket jelölnek ( $p < 0,05$ ).



14/b. ábra: A fumonizin-szennyezettség szintje különböző hibridekben (mg/kg). A kisbetűk a Mann-Whitney U-teszt szerint szignifikáns különbségeket jelölnek ( $p < 0,05$ ).

Az analitikai módszerek összehasonlítása során a HPLC-MS referenciaeljárás és a MycoFoss™ mérési technológia között rendkívül szoros lineáris összefüggést találtak mind az egyes fumonizin frakciók (FB1–FB4), mind az összes fumonizin tartalom esetében. Az összfumonizin tartalom tekintetében szignifikáns, erős kapcsolat igazolódott ( $r = 0,8644$ ), ami alátámasztja a két módszer közötti jó egyezést.



15. ábra: A teljes fumonizin-szint korrelációja a HPLC-MS és a MycoFoss™ eszközök között

A kapott eredmények összhangban állnak a nemzetközi szakirodalommal, amely szerint bár a HPLC-alapú módszerek továbbra is az arany standardnak tekinthetők pontosságuk és specificitásuk miatt, a gyors, költséghatékony és nagy mintaszám feldolgozására alkalmas technológiák megbízható alternatívát kínálnak. A MycoFoss™-hoz hasonló eszközök alkalmazása

különösen előnyös lehet a betakarítás alatti gyors döntéshozatalban, valamint a precíziós mezőgazdaságban, ahol a helyszíni, valós idejű mikotoxin-monitorozás egyre nagyobb jelentőséggel bír.

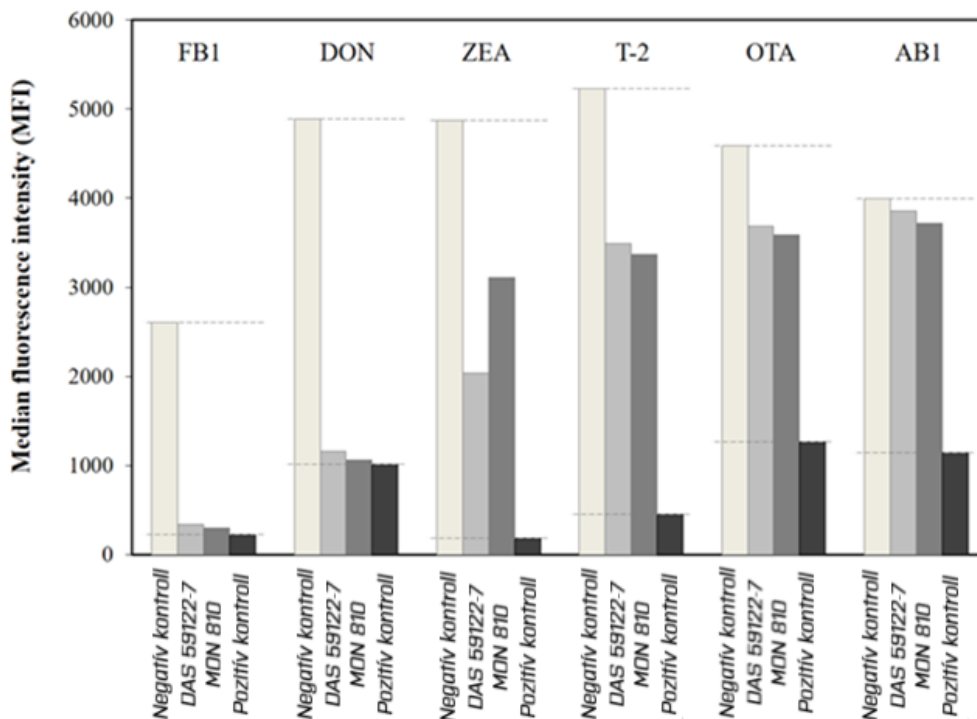
Projekt#3: CFIA alkalmazása mesterségesen fertőzött kukorica hibridek mikotoxin tartalmának meghatározására

A vizsgálatok megerősítették, hogy a *Fusarium* eredetű mikotoxinok közül a fumonizin B1 dominálta a toxinterhelést, míg a DON, ZEA és T-2 toxin kisebb, de toxikológiailag releváns mennyiségben volt jelen. Aflatoxin B1 és OTA hiánya összhangban állt a kórokozó fajösszetétellel, és egyben alátámasztotta az analitikai módszer szelektivitását és megbízhatóságát.

Az FB1-termelés jelentős mértékben függött a kukoricavonal genetikai hátterétől és a *Fusarium* fajkomplexumtól. A DAS-59122-7 izogén vonalakban mért magasabb fumonizin szintekhez képest a megfelelő Bt változatokban alacsonyabb koncentrációkat figyeltek meg, míg a MON 810 esetében a különbségek kevésbé voltak markánsak. Ezek az eredmények jól szemléltetik, hogy a módszer alkalmas volt mind nagy, mind mérsékelt eltérések kimutatására.

A DON esetében eltérő tendencia rajzolódott ki, mint a fumonizin esetében. A Cry1Ab toxint expresszáló MON 810 vonalakban mért magasabb DON-szintek rámutatnak arra, hogy a Bt genetikai események hatása toxin-specifikus lehet. A módszer érzékenysége lehetővé tette ennek a különbségnek a megbízható kimutatását még viszonylag szűk koncentrációtartományban is.

A ZEA és a T-2 toxin alacsonyabb, illetve közepes koncentrációban fordult elő, és ezek esetében nem volt kimutatható szignifikáns különbség sem a Bt és nem Bt kukoricák, sem a vizsgált *Fusarium* fajösszetételek között. Az eredmények azt mutatják, hogy a módszer ezen toxinok esetében is megfelelő érzékenységgel és reprodukálhatósággal rendelkezett a „nincs különbség” típusú következtetések megalapozásához.



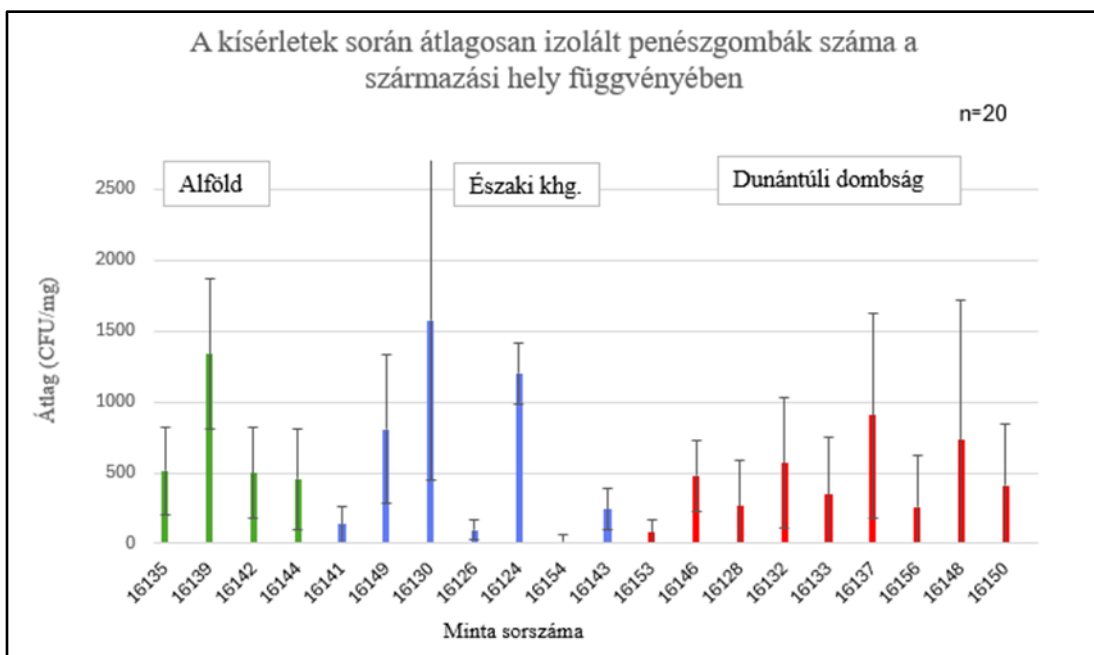
16. ábra: A Fungi-Plex™ multiplex áramlási citometriás meghatározás során kapott MFI értékek. Negatív kontrollok (fehér oszlopok), pozitív kontrollok (fekete oszlopok), valamint a DAS 59122-7 (világosszürke oszlopok) és MON 810 (sötét szürke oszlopok) genetikai események tipikus értékei kukoricában az FB1, DON, ZEA, T-2, OTA és ABI mikotoxinok esetében. A párhuzamos toxinmeghatározás lehetővé tette annak értékelését, hogy az egyes *Fusarium* fajok együttese miként befolyásolja a mikotoxin bioszintézist. Az eredmények szerint a fajok közötti kölcsönhatások toxin-specifikusan jelentkeztek, ami tovább erősíti a multiplex analitikai megközelítés jelentőségét az ilyen típusú vizsgálatokban.

## b) Toxinmentesítés a fonalas gombák inaktiválásán keresztül

### 1. Fonalgombák izolálása és pontosabb megismerése

A fonalgombák mennyisége régióként eltérő mintázatot mutatott.

- A **Dunántúli-dombság** mintái viszonylag homogén eloszlást mutattak, alacsonyabb átlagos CFU/mg értékekkel.
- Az **Északi-középhegységből** származó minták esetében jelentős heterogenitás volt megfigyelhető, egyes minták kiugróan magas gombaszámmal és nagy szórással.
- Az **Alföldi minták** esetében a fonalgombák mennyisége kiegyenlítettebb volt, ugyanakkor régiós átlagban itt mutatkozott a legmagasabb telepkezdés.



17. ábra: A kísérletek során átlagosan izolált penészgombák száma a származási hely függvényében

Minden vizsgált mintából sikerült fonalgombát izolálni, ami a gabonák általános mikrobiológiai érintettségére utal. Az irodalmi adatokkal összhangban a domináns nemzetségek: *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*

A legtöbb mintában legalább két különböző nemzetség együttes jelenléte volt kimutatható, ami fokozott mikotoxikológiai kockázatot jelez.

A MycoFoss mérések alapján mindhárom régió mintáiban elsősorban a fumonizin, ZEA, DON és aflatoxin volt jellemző.

- Az Alföldön a FUM átlagkoncentrációja volt a legmagasabb, OTA-termelés nem volt kimutatható.
- Az Északi-középhegység mintáiban az aflatoxin dominált, emellett a fumonizin és a T-2/HT-2 szintek is magasnak bizonyultak.
- A Dunántúli dombság esetében a toxintermelés döntően fumonizinre korlátozódott, a többi toxin alacsony vagy nem detektálható szinten volt jelen.

Fontos megfigyelés, hogy minden régióból származtak olyan izolátumok, amelyek legalább egy toxin esetében meghaladták az Európai Unió határértékeit.

A kiindulási kukoricaminták és a belőlük izolált fonalgombákkal fertőzött rizs mikotoxinszintjei nem minden esetben mutattak egyértelmű korrelációt. Előfordult, hogy:

- a kukoricában kimutatott toxinokat az izolátumok nem termelték,
- illetve fordítva, az izolált gombák olyan toxinokat állítottak elő, amelyek a kiindulási mintában nem voltak jelen.

Ez alátámasztja, hogy a toxintermelés erősen izolátum- és körülményfüggő.

A Kruskal–Wallis teszt alapján az aflatoxin, DON, ZEA, OTA és T-2/HT-2 esetében nem volt kimutatható szignifikáns különbség a három régió között. **Egyedül a fumonizin FUM mutatott szignifikáns területi eltérést**, amely az Alföld és a Dunántúli dombság összehasonlításakor volt egyértelmű.

A kontrollmintákkal történő összehasonlítás során mindhárom régió esetében a **fumonizin és a T-2/HT-2** szintjei mutattak következetesen szignifikáns eltérést, míg a többi toxin esetében nem volt statisztikailag igazolható különbség.

Az *A. flavus* (K13) és *A. niger* (K20) klinikai izolátumok mérhető mikotoxin termelést mutattak a rizs modellben. Az *Aspergillus flavus* izolátumok esetében az aflatoxin termelés volt domináns, amely több esetben meghaladta az Európai Unió által meghatározott határértékeket. Az *Aspergillus niger* törzsek esetében a toxintermelés jellemzően mérsékeltebb volt, azonban egyes mintákban kimutatható volt az OTA. Különösen fontos megfigyelés, hogy a humán izolátumok mikotoxintermelő képessége nem maradt el a környezeti izolátumokétól. Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a klinikai fertőzésekért felelős fonalagombák nemcsak invazív potenciállal rendelkeznek, hanem biokémiaiailag is aktív, toxintermelő szervezetek.

## 2. Agardiffúziós és CLSI M38-A2 szabványon alapuló mikrodilúciós eljárás MIC protokollok összehasonlítása

Mindkét *Aspergillus* faj esetében jól detektálható volt a gombanövekedés, valamint az antifungális szerek gátló hatása. A MIC értékek minden esetben meghatározhatók voltak az alkalmazott koncentrációtartományokon belül, és összhangban álltak a szakirodalomban korábban közölt adatokkal. Ugyanakkor jelentős módszertani különbségek mutatkoztak a kapott MIC értékekben, különösen *A. parasiticus* esetében, ahol az agarhígításos és a mikrodilúciós eljárás eredményei között nagyobb eltérés volt megfigyelhető.

Általánosságban elmondható, hogy az agarhígításos módszer magasabb MIC értékeket eredményezett, ami a módszer kisebb érzékenységeivel és vizuális leolvasásával magyarázható. Kivételt jelentett azonban az *A. flavus* és metkonazol kombinációja, ahol a CLSI mikrodilúciós technika szolgáltatott magasabb MIC értékeket, ami rámutat arra, hogy az egyes faj–hatóanyag kombinációk esetében a módszertani sajátosságok eltérően befolyásolhatják az eredményeket.

Az agarhígításos technika előnye, hogy lehetőséget biztosít a gombák antifungális szerek hatására bekövetkező morfológiai változásainak megfigyelésére, ugyanakkor számos korlátozó tényezővel bír. A telepátmérők szemmel történő leolvasása, a micélium táptalajba történő behatolása, valamint az *A. flavus* intenzív spóratermelése jelentősen rontotta a mérés pontosságát és reprodukálhatóságát. Emellett a kiindulási inokulum mennyisége is kritikus tényezőnek bizonyult, mivel az alul reprezentált gombamennyiség mesterségesen alacsony MIC értékeket eredményezhetett.

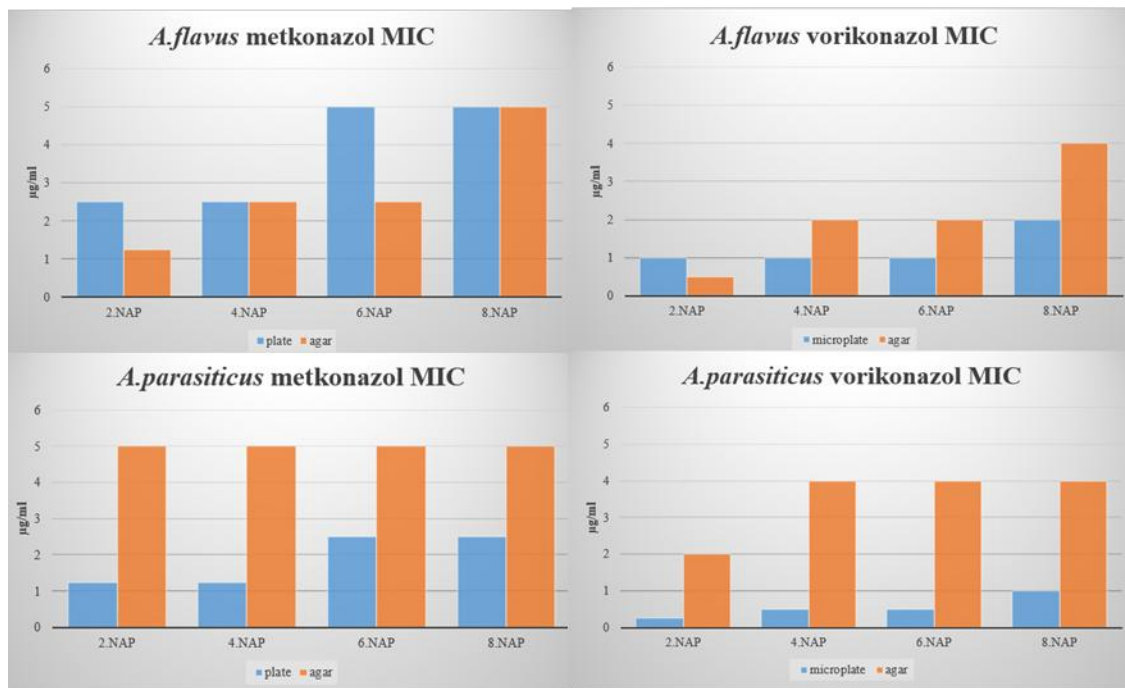


18. ábra: *A. parasiticus* morfológiai változása az antimikotikumok hatására (saját képek)

Ezzel szemben a CLSI mikrodilúciós módszer gyorsabb, standardizáltabb és érzékenyebb eljárásnak bizonyult. Az egységes spóraszuszpenzió alkalmazása javította az ismétlések összehasonlíthatóságát, míg a spektrofotometriás abszorbanciamérés csökkentette a szubjektív értékelésből fakadó hibákat. Ugyanakkor a szuszpenzió inhomogenitása, valamint a mikrotiter lemezek kezelése során fennálló kontaminációs kockázat a módszer potenciális hátrányait jelentette.

A vizsgált antifungális szerek összehasonlítása során megállapítható volt, hogy a vorikonazol mindkét *Aspergillus* faj esetében hatékonyabbnak bizonyult, mint a metkonazol. A két vegyület közötti szignifikáns különbség ( $p \leq 0,05$ ) azonban kizárólag a CLSI mikrodilúciós módszerrel volt kimutatható 5%-os szignifikanciaszint mellett, ami tovább erősíti e módszer nagyobb

érzékenységét. Az eltérő MIC értékek egyben rávilágítanak arra is, hogy az *A. flavus* és az *A. parasiticus* eltérő mértékben reagál azonos hatásmechanizmusú antifungális szerekre.



19. ábra: *A. flavus* és *A. parasiticus* átlagolt MIC eredményei metkonazol és vorikonazol esetében. Microplate – CLSI mikrodilúciós protokoll – agar hígítási módszer

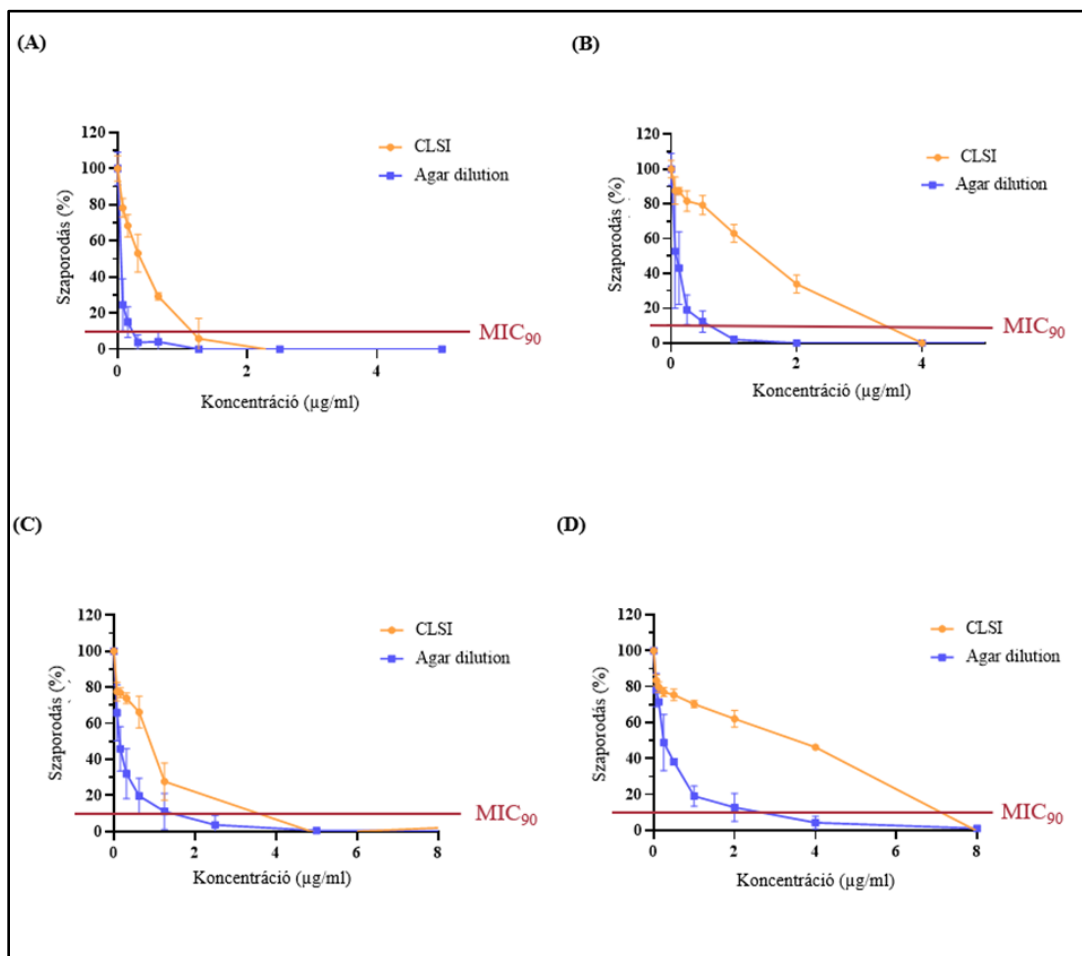
A különböző módszerek összehasonlítása során *F. verticillioides* törzset kezeltünk metkonazolla és vorikonazollal. Az 1. táblázatban összefoglalt eredmények mutatják, hogy a CLSI módszer magasabb MIC<sub>90</sub> értékeket eredményezett. Látható továbbá, hogy az érték emelkedik 48 órát követően, ami azt vetíti előre, hogy a gombák szaporodása 2 napot követően is folytatódik.

Vorikonazol	2 nap	4 nap	6 nap	8 nap
CLSI	4	8	8	8
Agarhígítás	1	1	4	4
Metkonazol	2 nap	4 nap	6 nap	8 nap
CLSI	1.25	1.25	1.25	2.5
Agarhígítás	0.313	0.625	1.25	1.25

3.táblázat: CLSI és agarhígítási módszer összehasonlítása. Az a legmagasabb koncentráció (µg/ml) érték került feltüntetésre, ahol *F. verticillioides* növekedése nem haladta meg a 10%-ot a kontrollhoz képest

Az táblázatban azok a legkisebb koncentrációértékek láthatóak, amelyek 90%-ban visszaszorítják a toxintermelő gombák növekedését. Annak érdekében, hogy ezt a jelenséget részletesebben is megvizsgáljuk, az egyes a különböző koncentrációjú antifungális szer következtében való növekedést százalékos értékben vizsgáltuk a kontrollhoz képest. Jól elkülöníthető, hogy az egyes

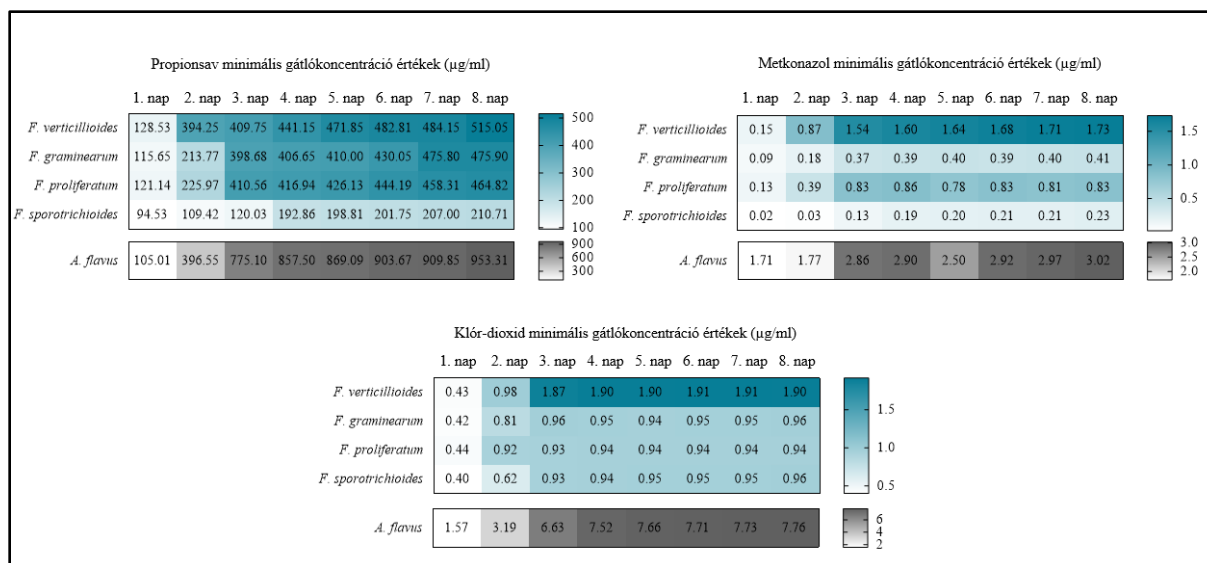
módszerek más koncentráción érik el a MIC<sub>90</sub> értéket reprezentáló határt. A CLSI esetében 48 órát és 8 napot követően is magasabb értékeket tapasztaltunk. Megfigyelhető továbbá az is, hogy 8 napot követően ez a határvonal metszése magasabb koncentráció értéknél található.



20. ábra: CLSI és agarhígításos módszerek összehasonlítása *Fusarium verticillioides* törzs 48 órás metkonazol (A) 48 órás vorikonazol (B) valamint 8 napos metkonazol (C) és 8 napos vorikonazol (D) kezelést követő szaporodásán keresztül. MIC<sub>90</sub> jelöli azt a koncentrációt, ahol a mikroorganizmus szaporodása 90%-ban gátlódik.

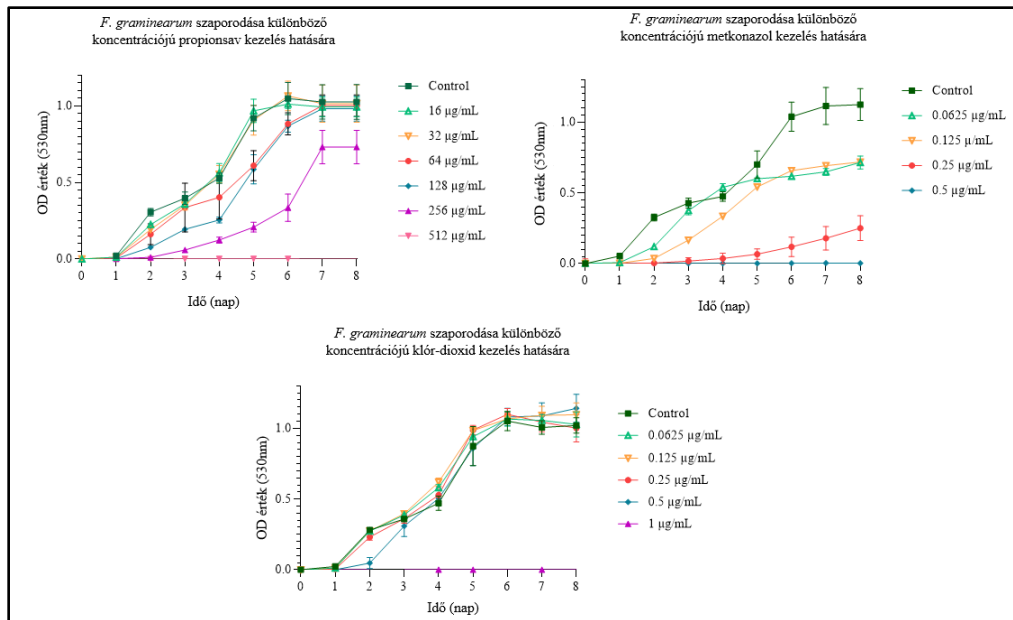
### 3. Klór-dioxid és egyéb antifungális szerek összehasonlító vizsgálata

A kísérletek során a CLSI M38-A2 módszertan módosítására volt szükség, mivel a vizsgált fonalgombák növekedését egy minimál tápoldatban értékelték, amely megfelelő alternatívának bizonyult az RPMI-1640 tápközeggel szemben. A MIC<sub>90</sub> értékeket 48 óra és 8 nap elteltével határozták meg, lehetővé téve az antifungális hatás időbeli változásának elemzését.



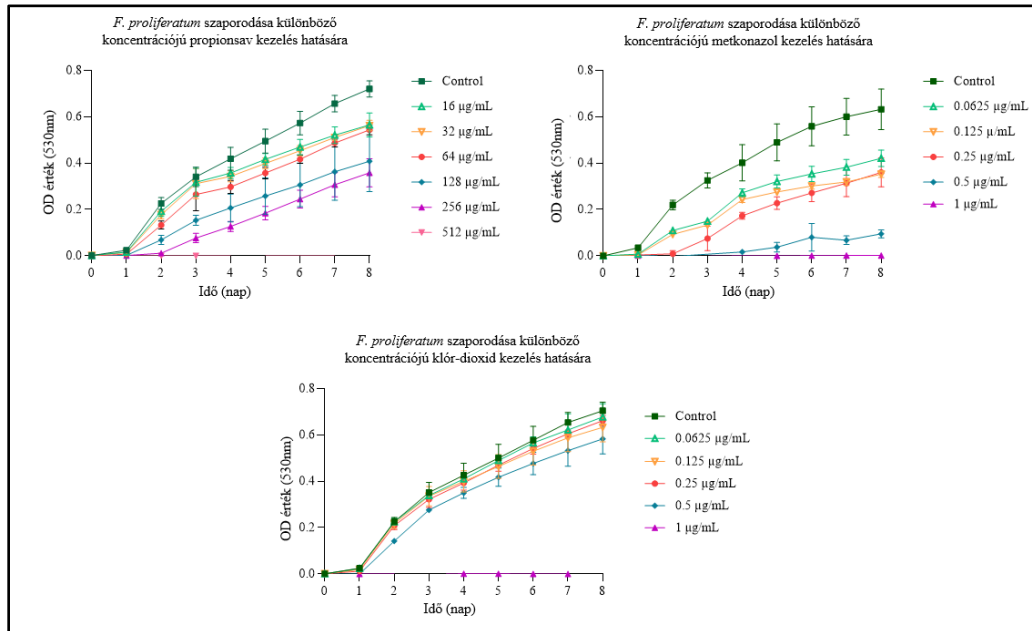
4. táblázat: Propionsav, metkonazol és klór-dioxid pontos MIC<sub>90</sub> értékei, és azok 8 napon keresztül történő változásai *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides* var. *minus* és *A. flavus* esetében

Az eredmények egyértelmű különbségeket mutattak az egyes szerek hatékonyságában. A propionsav esetében az exact MIC<sub>90</sub> értékek 109,42 -394,25 µg/ml közé estek 48 óra elteltével és 210,71-505,05 µg/ml 8 nap elteltével. Metkonazol esetében ezek az értékkel nagyságrenddel kisebbek voltak, 0.03-0,87 µg/ml 48 óra után és 0,23-1,73 µg/ml 8 napot követően. A klór-dioxid esetében az exact MIC<sub>90</sub> értékek 48 óra után 0,62 µg/ml és 0,98 µg/ml között, míg 8 nap után 0,96 µg/ml és 0,9 µg/ml között voltak. Összességében elmondható, hogy a propionsav esetében 8 napon keresztül emelkedtek az értékek. A metkonazol esetében 3 nap után csak csekély mértékű, a klór-dioxid esetében nem volt szignifikáns növekedés az exact MIC<sub>90</sub> értékeket figyelembe véve. Ezen jelenség pontosabb megismerése érdekében, megfigyeltük a fonalgombák növekedését adott koncentrációjú kezelés hatására 8 napon keresztül.



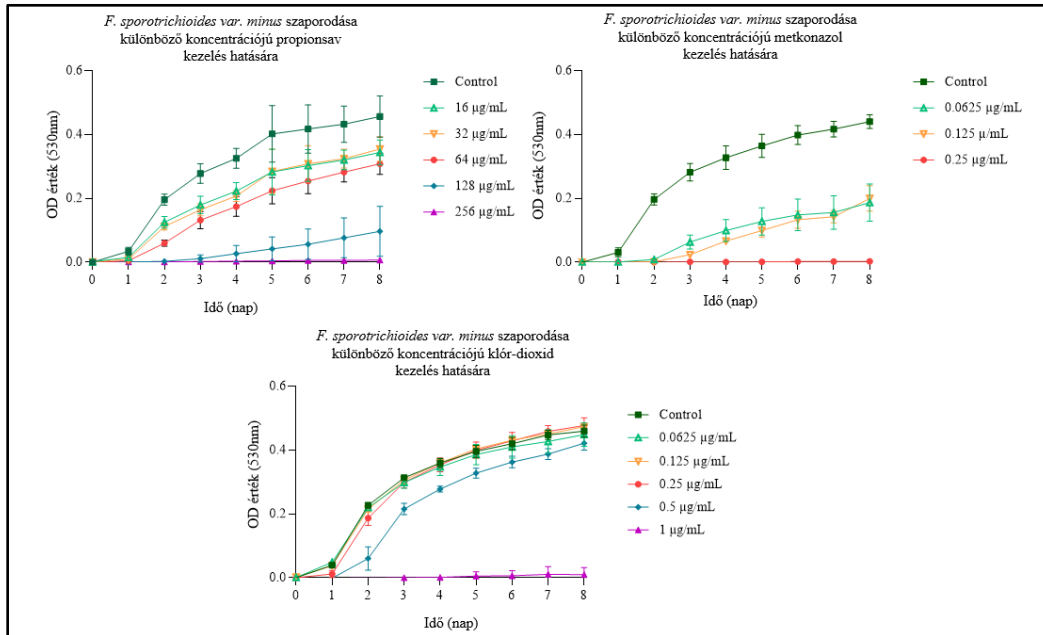
21. ábra: *F. graminearum* szaporodása (OD értékből származtatva) különböző koncentrációjú propionsav, metkonazol és klór-dioxid hatására 8 napos időszakon keresztül. A kiértékelés 24 óránként történt. Az adatok átlag +/- standard deviáció értékeként vannak ábrázolva.

A 21. ábra szemlélteti, hogy a *F. graminearum* szaporodását 512 µg/ml propionsav, 0,5 µg/ml metkonazol és 1 µg/ml klór-dioxid gátolja.



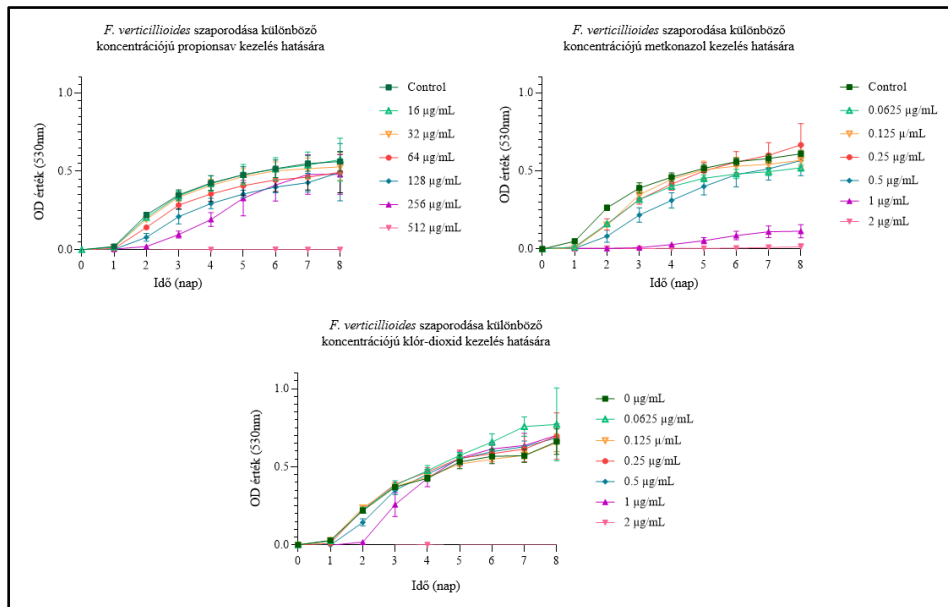
22. ábra: *F. proliferatum* szaporodása (OD értékből származtatva) különböző koncentrációjú propionsav, metkonazol és klór-dioxid hatására 8 napos időszakon keresztül. A kiértékelés 24 óránként történt. Az adatok átlag +/- standard deviáció értékeként vannak ábrázolva.

A 22. ábrán látható, hogy a *F. proliferatum* szaporodása 512 µg/ml propionsav, 1 µg/ml metkonazol és 1 µg/ml klór-dioxid hatására kerül gátlásra.



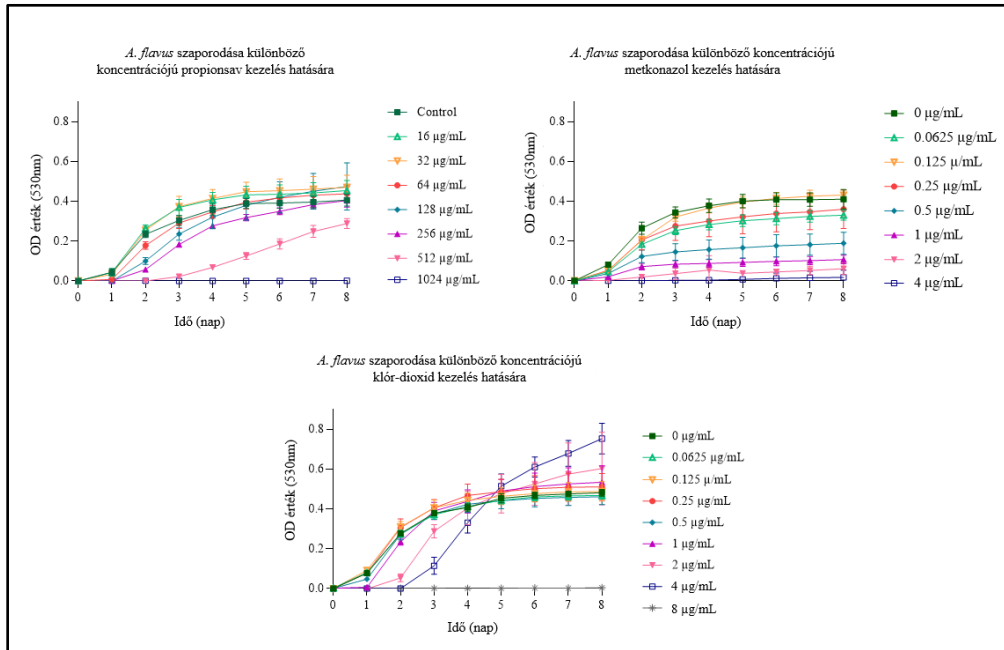
23. ábra: *F. sporotrichioides var. minus* szaporodása (OD értékből származtatva) különböző koncentrációjú propionsav, metkonazol és klór-dioxid hatására 8 napos időszakon keresztül. A kiértékelés 24 óránként történt. Az adatok átlag +/- standard deviáció értékeként vannak ábrázolva.

A *F. sporotrichioides var. minus* szaporodását 256 µg/ml propionsav, 0.25 µg/ml metkonazol és 2 µg/ml klór-dioxid kezelés gátolja (23. ábra).



24. ábra: *F. verticillioides* szaporodása (OD értékből származtatva) különböző koncentrációjú propionsav, metkonazol és klór-dioxid hatására 8 napos időszakon keresztül. A kiértékelés 24 óránként történt. Az adatok átlag +/- standard deviáció értékeként vannak ábrázolva.

A 24. ábrán látható, hogy a *F. verticillioides* szaporodása 512 µg/ml propionsav, 2 µg/ml metkonazol és 2 µg/ml klór-dioxid hatására kerül gátlásra.



25. ábra: *A. flavus* szaporodása (OD értékből származtatva) különböző koncentrációjú propionsav, metkonazol és klór-dioxid hatására 8 napos időszakon keresztül. A kiértékelés 24 óránként történt. Az adatok átlag +/- standard deviáció értékeként vannak ábrázolva.

A 25. ábra szemlélteti, hogy az *A. flavus* szaporodása 1024 µg/ml propionsav, 41 µg/ml metkonazol és 8 µg/ml klór-dioxid kezelés hatására kerül gátlásra.

Az egyik lényeges különbség a klór-dioxid esetében a többi antifungális szerrel szemben, hogy a gátlókoncentráció alatti koncentráció nem eredményez mérsékelt növekedést. Ez a részleges növekedés az alábbi esetekben figyelhető meg:

- *F. verticillioides*: metkonazol 1 µg/mL;
- *F. graminearum*: propionsav 256 µg/mL; metkonazol 0.0625; 0.125; 0.25 µg/mL.
- *F. proliferatum*: propionsav 16; 32; 64; 128; 256 µg/mL, metkonazol 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5 µg/mL;
- *F. sporotrichioides var. minus*: propionsav 16; 32; 64; 128 µg/mL; metkonazol 0.0625; 0.125 µg/mL;
- *A. flavus*: propionsav 512 µg/mL; metkonazol 0,625; 0,25; 0,5; 1; 2 µg/mL

Az egyik jelenség az *A. flavus* fonalagombán a legszembetűnőbb, de a *F. verticillioides* és *graminearum* fajoknál is megfigyelhető: A gátlókoncentráció alatti klór-dioxid koncentráció hatására fokozott micéliumtömeg figyelhető meg, ez mutatkozik meg a nagyobb OD értékeken. Az eredményekből látható, hogy az *A. flavus* magasabb MIC<sub>90</sub> értékekkel rendelkezik.

## 4) Diskuszió és következtetések

A bemutatott kutatómunka átfogó, több pillérrre épülő megközelítést alkalmaz a mikotoxinok által jelentett élelmiszer- és takarmánybiztonsági kockázatok kezelésére. Egyaránt integrálta a korszerű analitikai fejlesztéseket és a toxintermelő fonalas gombák mikrobiológiai inaktiválásának vizsgálatát. Az eredmények együttes értelmezése alátámasztja azt a szemléletváltást, miszerint a mikotoxin-probléma hatékony kezelése nem kizárólag a végtermék-ellenőrzésre, hanem a megelőzésre, a gyors döntéstámogatásra és a rendszerszintű monitoringra kell hogy épüljön.

A mikotoxin-analitikai vizsgálatok során a CFIA technológia továbbfejlesztése és validálása igazolta, hogy ez a módszer alkalmas a hagyományos ELISA-eljárásoknál gyorsabb és több mikotoxinra vonatkozó multiplex információt szolgáltató szűrővizsgálatok megvalósítására. A aCFIA protokoll kidolgozása demonstrálta, hogy a mérési idő jelentősen csökkenthető az analitikai teljesítmény érdemi romlása nélkül, ami a PON alkalmazások szempontjából kiemelt jelentőségű. A MycoFoss™ automatizált CFIA-platform UHPLC-MS/MS referencia-módszerrel történő összehasonlítása megerősítette, hogy megfelelő validáció mellett az FC-n alapuló immunoassay megbízható, nagy áteresztőképességű eszköze lehet a rutinszerű mikotoxin-monitoringnak, különösen gabona- és takarmánymátrixok esetében.

A mikrogyöngyös, FC-n alapuló immunanalitikai rendszer gyakorlati relevanciáját és módszertani robusztusságát jól mutatja, hogy a fejlesztett CFIA platform nem csupán kontrollált laboratóriumi körülmények között, hanem több, valódi alkalmazott agrárkutatói projektben is tesztelésre és validálásra került. Ezek a vizsgálatok lehetőséget teremtettek arra, hogy a módszer teljesítményét komplex, heterogén mintákon, valós környezeti és természetstechnológiai háttér mellett értékeljük. A különböző talajművelési rendszerek (csökkentett talajművelés, talajkímélő és sávós művelés) hatásának vizsgálata során a CFIA módszer alkalmasnak bizonyult a *Fusarium* fajok által termelt főbb mikotoxinok gyors és párhuzamos meghatározására szántóföldi kísérletekből származó kukoricamintákban. A módszer érzékenysége és áteresztőképessége lehetővé tette nagy mintaszám feldolgozását, ami kulcsfontosságú a különböző művelési technológiákból adódó, gyakran finom, de statisztikailag releváns különbségek kimutatásához. Az így nyert adatok hozzájárultak annak megértéséhez, hogy az agrotechnikai beavatkozások miként befolyásolják a toxintermelő gombák felszaporodását és a mikotoxin-felhalmozódás mértékét. A mikrogyöngyös rendszer további, kiemelt alkalmazási területe volt a kukorica hibridek – különösen Bt és izogén nem-Bt hibridek – mikotoxin-szennyezettségének összehasonlító vizsgálata mesterségesen és természetes módon fertőzött körülmények között. Ebben a komplex kísérleti rendszerben a CFIA módszer előnye különösen a multiplex mérési képességében mutatkozott meg, amely lehetővé tette több *Fusarium*-eredetű mikotoxin (pl. fumonizinek, trichotecének, ZEA) egyidejű értékelését. Ez a megközelítés jobban tükrözi a szántóföldi valóságot, ahol az egyes toxinok ritkán fordulnak elő izoláltan.

Ezen alkalmazott kutatói projektek során nyert tapasztalatok alapján megállapítható, hogy a CFIA rendszer nem csupán analitikai szűrőeszközként, hanem agrárkutatói döntéstámogató módszerként is életképes. A módszer gyorsasága, multiplexitása és viszonylag egyszerű mintapreparációja lehetővé teszi, hogy a mikotoxin-monitoring szerves részévé váljon a

növénynemesítési, természetstechnológiai és kockázatsökkentési vizsgálatoknak. Mindez különösen értékes olyan kutatási környezetben, ahol a nagy mintaszám és a komplex kísérleti faktorok (genotípus, környezet, agrotechnika) együttes kezelése elengedhetetlen.

A multi-mikotoxin hatások vizsgálata rámutatott arra, hogy a mikotoxinok együttes előfordulása nemcsak toxikológiai, hanem analitikai szempontból is kritikus tényező. Az anyatoxinok, metabolitok és bomlástermékek immunoassay-kre gyakorolt hatásának elemzése hangsúlyozta az antitest-specificitás és a keresztreaktivitás kontrolljának fontosságát, különösen multiplex rendszerek kialakításakor. Az ochratoxinok és a CIT sejtkultúras modelljein végzett vizsgálatok tovább erősítették azt az álláspontot, hogy a metabolitok biológiai aktivitása és kombinált hatása nem hagyható figyelmen kívül sem a kockázatbecslés, sem az analitikai módszerfejlesztés során. Ezek az eredmények tudományos alapot szolgáltatnak ahhoz a kérdéshez, hogy egyes toxinok esetében indokolt-e az individuális meghatározás, vagy elegendő lehet egy összegzett (pl. szumma-OTA) megközelítés.

Az állati eredetű mintákban végzett CFIA-alapú vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a mikotoxin-expozíció monitorozása nem korlátozódhat kizárólag a növényi alapanyagokra. Az OTA bioakkumulációjának kimutatása plazmában és szövetmintákban alátámasztotta, hogy az immunanalitikai módszerek megfelelő adaptációval alkalmasak lehetnek biomonitoring célokra is, költséghatékony alternatívát kínálva a klasszikus kromatográfiás technikákkal szemben.

Munkánk egyik magas prioritású célja egy olyan komplex, országos lefedettségű adatbázis kialakítása, amelyben a gabonaminták mikotoxin-terhelésének meghatározása párhuzamosan történt a toxintermelő fonalas gombák izolálásával és azonosításával. Ez a megközelítés túlmutat a hagyományos monitoring rendszereken, amelyek jellemzően kizárólag a toxinkoncentrációk mérésére szorítkoznak, és ritkán kapcsolják össze azokat a ténylegesen jelen lévő, aktív gombapopulációk vizsgálatával.

A toxinadatok és a mikrobiológiai izolátumok együttes értékelése lehetővé teszi, hogy ok-okozati összefüggéseket tárjunk fel a környezeti feltételek, a gombafajok/fajkomplexek jelenléte és a tényleges mikotoxin-felhalmozódás között. Ezáltal nem csupán a szennyezettség mértékéről, hanem annak biológiai hátteréről és potenciális jövőbeli kockázatáról is információ nyerhető. Az ilyen integrált adatstruktúra különösen értékes az éghajlatváltozással összefüggő gombaökológiai eltolódások és a regionális kockázati mintázatok hosszú távú értelmezésében.

A mikrobiológiai vizsgálatok során kiemelt hangsúlyt kapott a természetes környezetből, illetve – kiegészítő jelleggel – a humán szervezetből izolált fonalas gombatörzsek vizsgálata és összehasonlítása. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy a laboratóriumi referencia- vagy gyűjteményi törzsekkel szemben a természetes izolátumok valós környezeti szelekciós nyomás alatt állnak, és toxintermelési potenciáljuk, növekedési dinamikájuk, valamint stressztűrésük jelentősen eltérhet a standardizált törzsekétől. A vizsgálatok rámutattak arra, hogy azonos fajba tartozó törzsek között is jelentős különbségek mutatkozhatnak a toxintermelés mennyiségében és mintázatában, ami közvetlen hatással van a kockázatbecslésre és az analitikai eredmények értelmezésére. A humán eredetű izolátumok bevonása pedig tovább erősíti a munka translációs jelentőségét, mivel lehetőséget teremt annak vizsgálatára, hogy a környezeti és az emberi

szervezetben előforduló törzsek toxikológiai és fenotípusos tulajdonságai milyen mértékben térnek el egymástól.

A fonalas gombák elleni védekezés vizsgálata során különös figyelem irányult a fungicidek és alternatív antifungális hatóanyagok összehasonlító tesztelésére, ezen belül is a klór-dioxid hatékonyságának értékelésére. A klór-dioxid alkalmazása azért bír kiemelt jelentőséggel, mert széles spektrumú antimikrobiális hatása mellett eltérő hatásmechanizmussal rendelkezik a hagyományos fungicidekhez képest, és potenciálisan alkalmas lehet olyan rendszerekben is, ahol a rezisztencia kialakulása vagy a kémiai terhelés csökkentése kiemelt szempont.

A fungicid-hatásvizsgálatok során alkalmazott agardiffúziós és CLSI szabványon alapuló MIC módszerek összehasonlítása módszertani szempontból is fontos eredményeket szolgáltatott. Az eltérő mérési elvek és végpont-definíciók miatt a két megközelítés különböző érzékenységet és információtartalmat biztosít; ezek összevetése rámutatott arra, hogy az antifungális hatékonyság értékelése erősen módszerfüggő lehet. A standardizált MIC-eljárások alkalmazása elengedhetetlen az összehasonlíthatóság és reprodukálhatóság érdekében.

## 5)Összefoglalás

A gabonafélék toxikogén fonalas gombák általi szennyeződése és az ebből eredő mikotoxin-terhelés Magyarországon is súlyos élelmiszer-, takarmány- és közegészségügyi kockázatot jelent. A probléma komplexitását növeli, hogy a szennyezés jellemzően multi-mikotoxin jellegű, jelentős térbeli és időbeli variabilitással, valamint klimatikus, agrotechnikai és mikrobiológiai tényezők összetett kölcsönhatásával.

**Elsődleges célunk ezért egy komplex, innovatív stratégia kidolgozása a toxikogén fonalas gombák felszaporodásának és az általuk termelt toxikus szennyeződések csökkentésére a magyar gabonatermelésben.**

A megvalósításhoz deffiniált stratégiai pillérek:

a. Gyors, terepen alkalmazható mikotoxin-analitika (POCT / PON)

A hagyományos laboratóriumi módszerek mellett olyan gyors, költséghatékony és megbízható analitikai megoldások kerültek előtérbe, amelyek alkalmasak helyszíni döntéstámogatásra. A multiplex immunoassay-k, az aCFIA protokollok és az automatizált analitikai rendszerek (pl. MycoFoss™) bizonyították, hogy rövid analízisidő mellett is megfelelő pontosságot és reprodukálhatóságot biztosítanak. Ezek az eszközök kulcsszerepet tölthetnek be a betakarítási, tárolási és átvételi pontokon történő gyors kockázatelemzésben.

b. Előfordulási és kockázati adatbázis kiépítése

A hazai gabonaminták vizsgálata egyértelműen igazolta, hogy a mikotoxinszennyezés általános jelenség, teljesen negatív tételek ritkák. A fonalagombák széleskörű jelenléte és toxintermelő potenciálja indokolja egy országos, klimatikus és mikroklimatikus tényezőket is integráló adatbázis kialakítását, amely alapot ad prediktív modellezéshez és célzott megelőzési stratégiákhoz. Az eredmények alátámasztják a One Health szemlélet szükségességét, mivel a mikotoxin-expozíció humán-egészségügyi relevanciával is bír.

c. Antifungális hatóanyagok és alkalmazási protokollok fejlesztése

A fonalas gombák növekedésének és toxintermelésének gátlása kulcskérdés a kockázatcsökkentésben. A vizsgálatok kimutatták, hogy az antifungális hatékonyság nemcsak faj- és hatóanyag-függő, hanem az alkalmazott módszertantól és az időtényezőtől is jelentősen függ. Különösen fontos eredmény, hogy a klór-dioxid stabil gátlóhatást mutatott anélkül, hogy szub-inhibitori stressz révén fokozta volna a toxintermelést, ami ígéretes mezőgazdasági alkalmazási lehetőségeket vet fel. A hosszú távú cél a fertőzött terményeken is validált, gyakorlatban alkalmazható kezelési protokollok kidolgozása.

Várható hatás és hasznosíthatóság:

A három pillérré épülő komplex stratégia lehetővé teszi: (1) a mikotoxin-kockázat korai felismerését és gyors kezelését, (2) a megelőzésre épülő, tudásalapú döntéshozatalt, az élelmiszer- és takarmánybiztonság javítását, (3) valamint a mikotoxinok által okozott egészségügyi, társadalmi és gazdasági terhek csökkentését.

A program eredményei közvetlenül hasznosíthatók a mezőgazdasági gyakorlatban, a szabályozási és kockázatértékelési folyamatokban, valamint hosszú távon hozzájárulnak a fenntartható és biztonságos gabonatermeléshez.

## 6) Új tudományos eredmények

- 1. Multiplex, mikrogyöngyös immunanalitikai rendszer továbbfejlesztése és gyorsítása**  
Elsőként került bemutatásra és validálásra egy aCFIA, amely jelentősen csökkenti az inkubációs és teljes mérési időt, miközben megőrzi az analitikai érzékenységet és precizitást. Az eredmények igazolták, hogy a kötési kinetika optimalizálásával a multiplex immunoassay alkalmas PON alkalmazásokra is, ami új irányt nyit a mikotoxin-analitika decentralizálásában.
- 2. CFIA technológia analitikai egyenértékűségének bizonyítása referencia UHPLC-MS/MS módszerrel**  
Természetes gabonamintákon végzett összehasonlító vizsgálatok igazolták, hogy a CFIA-alapú MycoFoss™ rendszer DON meghatározására szoros korrelációt mutat a referencia UHPLC-MS/MS módszerrel, igazolva a mikrogyöngyös immunanalitikai technológia megbízhatóságát nagy mintaszámú, rutinszerű monitoring alkalmazásokban.
- 3. Az immunanalitikai mérési bizonytalanság forrásainak új szintű feltárása multi-mikotoxin környezetben**  
Újszerű módon került feltérképezésre, hogy anyatoxinok, metabolitok és bomlástermékek milyen mértékben befolyásolják a mikrogyöngyös immunoassay-k működését. A kidolgozott tesztelési protokoll új módszertani keretet ad az antitest-specifititás vizsgálatára, amely közvetlenül alkalmazható jövőbeli multiplex assay-k fejlesztésében.
- 4. Ochratoxin-származékok biológiai hatásainak komplex értékelése és analitikai implikációi**  
Sejtkultúrák vizsgálatokkal bizonyítást nyert, hogy az OTA mellett annak metabolitjai (OTB, OTC) és a citrinin metabolitjai biológiailag releváns citotoxikus és fejlődéstudológiai hatással rendelkeznek, ami tudományos alapot teremt arra, hogy az ochratoxin-analitikában indokolt lehet a származékok differenciált vagy összegzett (szumma-toxin) kezelése.
- 5. Immunanalitikai módszerek kiterjesztése állati biomonitoring alkalmazásokra**  
Elsőként került igazolásra, hogy a mikrogyöngyös CFIA módszer alkalmas állati eredetű mintákban (plazma, máj, vese) felhalmozódott OTA megbízható kimutatására, és eredményei összemérhetők HPLC-FLD referencia mérésekkel. Ez új perspektívát nyit az immunoassay alapú toxikológiai biomonitoring területén.
- 6. Országos lefedettségű, integrált mikotoxin-gomba adatbázis - modell**  
Új tudományos értéket képvisel egy olyan adatbázis létrehozása, amelyben ugyanazon minták esetében párhuzamosan történt mikotoxin-meghatározás és toxintermelő fonalas gombák izolálása. Ez a megközelítés lehetővé teszi a toxinadatok és a mikrobiológiai háttér ok-okozati összekapcsolását, ami túlmutat a hagyományos, kizárólag analitikai alapú monitoring rendszereken.

### **7. Természetes és humán eredetű fonalas gombatörzsek toxintermelési variabilitásának igazolása**

Bizonyítást nyert, hogy azonos fajba tartozó, de eltérő eredetű (környezeti vs. humán) izolátumok között jelentős különbségek mutatkoznak a toxintermelési potenciálban, ami alapvetően befolyásolja a kockázatbecslést és megkérdőjelezi a kizárólag referencia-törzseken alapuló extrapolációk általánosíthatóságát.

### **8. MIC-meghatározási módszerek összehasonlító értékelése fonalas gombák esetén**

Agardiffúziós és CLSI szabványon alapuló mikrodilúciós MIC módszerek összehasonlítása során igazolásra került, hogy a fungicid-hatásosság megítélése jelentősen módszerfüggő, ami tudományos alapot szolgáltat a módszerválasztás kritikus újragondolásához antifungális kutatásokban.

### **9. A CFIA rendszer agrárkutatói döntéstámogató szerepének igazolása**

Alkalmazott szántóföldi kísérletekben (talajművelési technikák, Bt és nem-Bt kukorica hibridek) bizonyításra került, hogy a mikrogyöngyös CFIA módszer nem csupán analitikai eszköz, hanem alkalmas komplex agronómiai kérdések megválaszolására és a mikotoxin-kockázat genetikai és technológiai tényezőinek feltárására.

## 7) Hivatkozások

1. Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Control Strategies : Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*, 86(9), 137.
2. Aieta, E. M., & Berg, J. D. (1986). A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *Journal / American Water Works Association*, 78(6), 62–72.  
<https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1986.tb05766.x>
3. Aiko, V., & Mehta, A. (2015). Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. *Journal of Biosciences*, 40(5), 943–954. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9569-6>
4. Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
5. Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., & Giraudi, G. (2016). Lateral flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins detection: A review. *Analytica Chimica Acta*, 772, 75–87.
6. Bánáti, H., Darvas, B., Fehér Tóth, S., Czéh, Á., & Székács, A. (2017). Determination of Mycotoxin Production of Fusarium Species in Genetically Modified Maize Varieties by Quantitative Flow Immunocytometry. *Toxins*, 9(2), 70.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9020070>
7. Beloglazova, N. V., & De Saeger, S. (2015). Flow cytometry based immunoassays for mycotoxin detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 1315–1329.
8. Beloglazova, N. V., De Boevre, M., Goryacheva, I. Y., Werbrouck, S., Guo, Y., & De Saeger, S. (2013). Multiplex immunoassays for mycotoxins in food and feed: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(9), 1524–1540.
9. Berthiller, F. et al. Masked mycotoxins: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57, 165–186.
10. Buehler, A. J., Evanowski, R. L., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8814–8825.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12635>
11. Chen, M., Liu, X., Yang, S., Chen, Z., Di, B., Liu, W., & Yan, H. (2022). HPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins in blood: toxicokinetics of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in rats. *Journal of Analytical Science and Technology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s40543-022-00336-3>
12. Chu, F. S. (1991). Immunoassays for analysis of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 54(4), 336–344.
13. Chukwudi, U. P.; Kutu, F. R.; & Mavengahama, S. (2021). Mycotoxins in maize and implications on food security: A Review. *Agricultural reviews*, 42(1), 42-49.
14. Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control*,

Exposure and Risk Assessment, 27(5), 651–657.

<https://doi.org/10.1080/19440040903573032>

15. Csenki, E., Mikulás, V., Freitag, S., Fomina, P., Hlavatsch, M., Femenias, A., Bosman, A.J., Ruggeri, F.S., Smirnova, M., Salentijn, G., Mizaikoff, B., Krska, R., Scholderer, J., Kohler, A., & Kasza, G. (2023). Stakeholder assessment for mycotoxin analysis: exploring the demand along the European food supply chain. *World Mycotoxin Journal*, 16(4), 287-299. <https://doi.org/10.1163/18750796-20232883>
16. Czeh, Á., Mandy, F., Fehér Tóth, S., Török, L., Mike, Z., Koszegi, B., & Lustyik, G. (2012). A flow cytometry based competitive fluorescent microsphere immunoassay (CFIA) system for detecting up to six mycotoxins. *Journal of Immunological Methods*, 384(1-2), 71–80. PubMed
17. Czeh, A., Schwartz, A., Mandy, F., Szoke, Z., Koszegi, B., Feher Toth, S., Nagyeri, G., Jakso, P., Katona, R. L., Kemeny, A., Woth, G., & Lustyik, G. (2013). Comparison and Evaluation of Seven Different Bench top Flow Cytometers With a Modified Six plexed Mycotoxin Kit. *Cytometry Part A*, 83(12), 1073–1084. PubMed
18. Doering, O., & Sorensen, A. (2018). The land that shapes and sustains us. *How to Feed the World*, 46–58. <https://doi.org/10.5822/978-1-61091-885-5>
19. European Commission. (2006). Commission Decision 2006/401/EC on screening and confirmatory methods for mycotoxins.
20. European Commission. (2021). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and contaminants.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2021). Global cereal production statistics
22. Fumagalli, F., Ottoboni, M., Pinotti, L., & Cheli, F. (2021). Integrated mycotoxin management system in the feed supply chain: Innovative approaches. *Toxins*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/toxins13080572>
23. Georgiadou, S. P., Velegraki, A., Arabatzis, M., Neonakis, I., Chatzipanagiotou, S., Dalekos, G. N., & Petinaki, E. (2014). Cluster of *Fusarium verticillioides* bloodstream infections among immunocompetent patients in an internal medicine department after reconstruction works in Larissa, Central Greece. *Journal of Hospital Infection*, 86(4), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.01.011>
24. Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., & Magan, N. (2008). Effect of aw and CO2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.051>
25. Gosling, J. P. (1990). A decade of development in immunoassay methodology. *Clinical Chemistry*, 36(8), 1408–1427.
26. Hernández, F.; Ibáñez, M.; Botero-Coy, A. M.; Bade, R. LC-QTOF-MS in food and environmental analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 63, 158–169.

27. Inotai K, Bata-Vidács I, Tóth Á, Kosztik J, Varga M, Szekeres A, Nagy I, Nagy I, Dobolyi C, Mörtl M, Székács A, Kukolya J. Glass bead system to study mycotoxin production of *Aspergillus* spp. on corn and rice starches. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2024 May 29;108(1):348. doi: 10.1007/s00253-024-13190-7. PMID: 38809353; PMCID: PMC11136776.
28. Kebarle, P.; Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase: the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1993, 65, 972A–986A.
29. Kormos, M. (2003). Mikotoxinok és hatásuk a humán táplálkozásban. *Tudományos közlemények*, 24, 76-82. <https://acta.bibl.u-szeged.hu/21247/> (2023. 01. 02.)
30. Kos, J.; Anić, M.; Radić, B.; Zadavec, M.; Janić Hajnal, E.; Pleadin, J. Climate Change—A Global Threat Resulting in Increasing Mycotoxin Occurrence. *Foods* 2023, 12, 2704. <https://doi.org/10.3390/foods12142704>
31. Kovács, M. (2018). Mikotoxinok hatása az életminőségünkre. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 22(2), 33–45. <https://doi.org/10.31914/aak.2273>
32. Kovács, M. (2018). Mikotoxinok hatása az életminőségünkre. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 22(2), 33–45. <https://doi.org/10.31914/aak.2273>
33. Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J. LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397, 943–951.
34. Krska, R., De Nijs, M., McNerney, O., et al. (2019). Rapid methods for food and feed contaminant analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 182–195.
35. Kulik, T., LŁojko, M., Jestoi, M., & Perkowski, J. (2012). Sublethal concentrations of azoles induce tri transcript levels and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*, 335(1), 58–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02637.x>
36. Leng, Y., Liu, X., Yu, J., & Xu, Z. (2020). Microsphere based flow cytometric immunoassays in food safety analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115802.
37. Leslie, J. F., Moretti, A., Mesterh, Á., Ameye, M., Audenaert, K., Singh, P. K., Richard-forget, F., Chulze, N., Ponte, E. M. Del, Chala, A., Battilani, P., & Logrieco, A. F. (2021). Other Small Grains. 1–48.
38. Luminex Corporation. (2018). xMAP® Technology Overview and Principles. Technical Note.
39. Makarov, A.; Scigelova, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 3938–3945.
40. Malachová, A. et al. Advanced LC–HRMS methods for multi-class mycotoxin determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406, 801–813
41. Maragos, C. M. (2018). Mycotoxin immunoassays: current status and future prospects. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 1–13.

42. Mesterházy, Szieberth, D., Szabó, B., Berényi, A., & Tóth, B. (2022). Mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) samples in Hungary, 2012–2017. *Cereal Research Communications*, 50(4), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s42976-022-00258-1>
43. Mohaghegh, F., Abtahi-Naeini, B., Nasri, E., Badiie, P., Morovati, H., Fakhim, H., Farmani, A., Meidani, M., Ranjbar-Mobarake, M., & Mohammadi, R. (2022). *Fusarium proliferatum*-induced chronic lip ulcer: successful treatment with itraconazole: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13256-022-03575-5>
44. Mohammad AR, Giannini PJ, Preshaw PM, Alliger H. Clinical and microbiological efficacy of chlorine dioxide in the management of chronic atrophic candidiasis: an open study. *Int Dent J.* 2004 Jun;54(3):154-8. doi: 10.1111/j.1875-595x.2004.tb00272.x. PMID: 15218896.
45. Moss, M. O. (1991). Mycotoxins in food: detection and control. *International Journal of Food Microbiology*, 12(3), 249–262
46. Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018a). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
47. Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018b). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
48. Mutambuki, K., & Likhayo, P. (2021). Efficacy of different hermetic bag storage technologies against insect pests and aflatoxin incidence in stored maize grain. *Bulletin of Entomological Research*, 111(4), 499–510. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000213>
49. Niessen, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000, 413–436.
50. Noszticzius Z, Rosivall L, W. M. (2010). Univerzális fegyver a mikrobák ellen? A hipertizta klór-dioxid. *TERMÉSZET VILÁGA* 141, 4(4), 154–157.
51. Noszticzius, Z., Wittmann, M., Kály-Kullai, K., Beregvári, Z., Kiss, I., Rosivall, L., & Szegedi, J. (2013). Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079157>
52. Ogunade, I. M., Martinez-Tuppiá, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018a). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034–4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>
53. Ogunade, I. M., Martinez-Tuppiá, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018b). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034–4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>

54. Peters, J., Bienenmann Ploum, M. E., De Rijk, T. C., & De Nijs, M. (2012). Development of a multiplex flow cytometric immunoassay for mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 5(2), 133–145.
55. Peters, J., et al. (2014). Screening of multiple mycotoxins in feed using a multiplex immunoassay. *Food Control*, 40, 281–287.
56. Pörtner HO, Scholes RJ, Arneth A, Barnes DKA, Burrows MT, Diamond SE, Duarte CM, Kiessling W, Leadley P, Managi S, McElwee P, Midgley G, Ngo HT, Obura D, Pascual U, Sankaran M, Shin YJ, Val AL. Overcoming the coupled climate and biodiversity crises and their societal impacts. *Science*. 2023 Apr 21;380(6642):eabl4881. doi: 10.1126/science.abl4881. Epub 2023 Apr 21. PMID: 37079687.
57. Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 569–582.
58. Ragoubi, C., Quintieri, L., Greco, D., Mehrez, A., Maatouk, I., Ascanio, V. D., Landoulsi, A., & Avantaggiato, G. (2021). *Application in Animal Liquid Feed*. 1–15.
59. Ragoubi, C., Quintieri, L., Greco, D., Mehrez, A., Maatouk, I., Ascanio, V. D., Landoulsi, A., & Avantaggiato, G. (2021). *Application in Animal Liquid Feed*. 1–15.
60. Rolland, N., Girard, V., Monnin, V., Arend, S., Perrin, G., Ballan, D., Beau, R., Collin, V., D'Arbaumont, M., Weill, A., Deniel, F., Tréguer, S., Pawtowski, A., Jany, J. L., & Mounier, J. (2024). Identification of Food Spoilage Fungi Using MALDI-TOF MS: Spectral Database Development and Application to Species Complex. *Journal of Fungi*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/jof10070456>
61. Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
62. Schollenberger, M.; Müller, H. M.; Ernst, K.; Sondermann, S.; Liebscher, M.; Schlecker, C.; Wischer, G.; Drochner, W.; Hartung, K.; & Piepho, H. P. (2012). Occurrence and distribution of 13 trichothecene toxins in naturally contaminated maize plants in Germany. *Toxins*, 4(10), <https://doi.org/10.3390/toxins4100778>, 778-787.
63. Schymanski, E. L. et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48, 2097–2098.
64. Scudamore, K. A., Banks, J. N., Rizvi, R., & Jennings, P. (n.d.). Formation of ochratoxin A and aflatoxins following the use of propionic acid as a grain preservative for storing damp barley.
65. Şehirli, S., & Saydam, C. (2016). The Effect of Acetic , Formic and Propionic Acids on Plant Pathogenic Fungi. 10(30), 129–137.
66. Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2016). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed. *Analytical Methods*, 8, 7483–7500.

67. Shephard, G. S. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*, 37, 2468–2477.
68. Shephard, G. S., Berthiller, F., Dorner, J., et al. (2013). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012–2013. *World Mycotoxin Journal*, 6(1), 3–30.
69. Spischka, B., et al. (2010). Multiplexed immunoassays for the determination of mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 263–275.
70. Spischka, B., et al. (2016). Performance evaluation of bead based flow cytometric assays for mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 455–462.
71. Spolti, P., de Jorge, B. C., & Del Ponte, E. M. (2012). Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 419–423. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000600007>
72. Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2649–2659.
73. Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 mycotoxins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21, 2664–2676
74. Szeitzné Szabó, M. (2007). Előszó. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 53 (2007/Ksz), 3-4. <https://eoq.hu/evik/evik07-k.pdf> (2022. 12. 07.)
75. Szeitzné Szabó, M. (2009). Bevezető. Gabonaalapú élelmiszerek fuzárium toxin szennyezettségének csökkentési lehetőségei, 27, 3. <https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/21384/FusariumKiadvany.pdf/dc80a529-a721-45fe-b285-65e21c91c75e> (2023. 10. 05.)
76. Trucksess, M. W. (2001). Thin-layer chromatographic methods for mycotoxins. *Journal of AOAC International*, 84(3), 591–599.
77. Trucksess, M. W., & Stack, M. E. (1995). Mycotoxins in food: TLC methods. *Journal of AOAC International*, 78(3), 689–700.
78. Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180.
79. Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 878, 1–19.
80. Van Weemen, B. K., & Schuurs, A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen–enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15(3), 232–236.
81. Visconti, A., Pascale, M., & Centonze, G. (2001). Determination of ochratoxin A in wine by immunoaffinity column clean-up and HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 888, 321–326.
82. Wang, Y., Ning, B., Peng, Y., et al. (2020). Recent advances in lateral flow immunoassay for mycotoxin detection. *Food Control*, 106, 106712.

83. Williams, C. C., Gregory, J. B., & Usher, J. (2024). Understanding the clinical and environmental drivers of antifungal resistance in the One Health context. In *Microbiology* (Reading, England) (Vol. 170, Issue 10). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001512>
84. Yeshwanth, M. (2024). A Review of Chlorine Dioxide: Efficacy, Applications and Health Implication in Disinfection. *Journal of Chemical Health Risks*. [www.jchr.org](http://www.jchr.org)
85. Yeshwanth, M. (n.d.). A Review of Chlorine Dioxide: Efficacy, Applications and Health Implication in Disinfection. *Journal of Chemical Health Risks*. [www.jchr.org](http://www.jchr.org)
86. Yun, J. E., & Lee, D. G. (2016). A novel fungal killing mechanism of propionic acid. *FEMS Yeast Research*, 16(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow089>
87. Zhou, F., Jiao, Y., Han, A., Zhou, X., Kong, J., Hu, H., Liu, R., & Li, C. (2024). Survey of prothioconazole sensitivity in *Fusarium pseudograminearum* isolates from Henan Province, China, and characterization of resistant laboratory mutants. *BMC Plant Biology*, 24(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04714-w>

## Egyéb

88. 1881/2006. (XII. 19.) A Bizottság 1881/2006/EK rendelete (2006. december 19.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/hu/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881> (2022. 10. 13.)
89. 2782/2023. (XII. 14.) A Bizottság (EU) 2023/2782 végrehajtási rendelete (2023. december 14.) az élelmiszerekben előforduló mikotoxinok szintjének ellenőrzésére szolgáló mintavételi és analitikai módszerek megállapításáról és a 401/2006/EK rendelet hatályon kívül helyezéséről. [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=OJ:L\\_202302782#ntr1-L\\_202302782HU.000501-E0001](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=OJ:L_202302782#ntr1-L_202302782HU.000501-E0001) (2024. 03. 18.)
90. 401/2006. (II. 23.) A Bizottság 401/2006/EK rendelete (2006. február 23.) az élelmiszerek mikotoxintartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=NL> (2024. 03. 18.)