



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ανάπτυξη οπτικών ανοσοαισθητήρων για την ταυτόχρονη  
ανίχνευση τοξικών ουσιών σε τρόφιμα**

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΠΑΓΚΑΛΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΜΑΡΤΙΟΣ 2019**



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Ανάπτυξη οπτικών ανοσοαισθητήρων για την ταυτόχρονη ανίχνευση τοξικών ουσιών σε τρόφιμα

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΠΑΓΚΑΛΗ**

**A.M.: 001121**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

**Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»**

**Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»**

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»**

**Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»**

**Κωνσταντίνος Μισιακός, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»**

**Ευάγγελος Μπακέας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ**

**Χρήστος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 01/03/2019**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε οπτικός βιοαισθητήρας τύπου Mach-Zehnder για τον προσδιορισμό χωρίς τη χρήση ιχνηθετών τεσσάρων μυκοτοξινών, ωχρατοξίνης A (OTA), αφλατοξίνης B1 (AFB1), φουμονισίνης B1 (FB1) και δεοξυνιβαλενόλης (DON), σε δείγματα μπύρας.

Ο αισθητήρας βασίστηκε σε μια συστοιχία από δέκα συμβολόμετρα Mach-Zehnder (MZI), κάθε ένα μονολιθικά ολοκληρωμένο με την αντίστοιχη ευρέος φάσματος πηγή φωτός, σε μια μόνο ψηφίδα πυριτίου. Ο προσδιορισμός πολλαπλών αναλυτών επετεύχθη με ακινητοποίηση διαφορετικών ειδικών δεσμευτικών αντιδραστηρίων (προϊόντα συζεύξεως μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης) στους διαφορετικούς αισθητήρες της ίδιας ψηφίδας. Η ανάλυση διεξήχθη με διαβίβαση, μέσω εξωτερικής αντλίας, πάνω από τις ψηφίδες, μιγμάτων βαθμονομητών ή δειγμάτων με διαλύματα των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, ακολουθούμενη από αντίδραση με διάλυμα αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Οι αντιδράσεις παρακολούθηθηκαν σε πραγματικό χρόνο με συνεχή καταγραφή των φασμάτων εξόδου, τα οποία στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διακριτό μετασχηματισμό Fourier για να μετατραπούν οι μετατοπίσεις του φάσματος σε μετατοπίσεις φάσεων.

Τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν για τις AFB1, FB1, DON και OTA σε μπύρα ήταν 0,8, 5,6, 20 και 2,0 ng/ml αντίστοιχα, ενώ η διάρκεια της ανάλυσης κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των AFB1, FB1 και DON ήταν 12 λεπτά, ενώ για τον μεμονωμένο προσδιορισμό της OTA 50 λεπτά. Οι τιμές ανάκτησης κυμάνθηκαν από 85 έως 116% σε δείγματα μπύρας με γνωστές συγκεντρώσεις των τεσσάρων μυκοτοξινών. Επιπλέον, αναλύθηκαν μπύρες διαφορετικών τύπων και προέλευσης με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που παρήχθησαν από καθιερωμένες εργαστηριακές μεθόδους, υποστηρίζοντας περαιτέρω την ακρίβεια του προτεινόμενου βιοαισθητήρα.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Οπτικοί βιοαισθητήρες χωρίς τη χρήση ιχνηθετών

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Αφλατοξίνη B1, Φουμονισίνη B1, Δεοξυνιβαλενόλη, Ωχρατοξίνη A, Μονολιθικά ολοκληρωμένο συμβολόμετρο τύπου Mach-Zehnder, Μπύρα



## ABSTRACT

In this thesis a label-free optical biosensor for the fast simultaneous determination of three mycotoxins, aflatoxin B1 (AFB1), fumonisin B1 (FB1) and deoxynivalenol (DON) and for the determination of ochratoxin A (OTA) in beer samples is presented.

The biosensor is based on an array of ten Mach-Zehnder interferometers (MZIs) monolithically integrated along with their respective broad-band silicon light sources onto a single chip (37mm<sup>2</sup>). Multi-analyte determination is accomplished by functionalizing the sensing arms of individual MZIs with mycotoxin-protein conjugates. Assay is performed by pumping over the chip mixtures of calibrators or samples with a mixture of specific monoclonal antibodies, followed by reaction with a secondary anti-mouse IgG antibody. An external miniaturized spectrometer was employed to continuously record the transmission spectra of each interferometer. Spectral shifts obtained due to immunoreactions were transformed to phase shifts through Discrete Fourier Transform.

The detection limits achieved for AFB1, FB1, DON and OTA were 0.8, 5.6, 20 and 2,0 ng/ml in beer, respectively, while the assay duration for AFB1, FB1, DON was 12 min and for OTA 50 min. Recovery values ranging from 85 to 116% were determined in beer samples spiked with known concentrations of the four mycotoxins. In addition, beers of different types and origin were analysed with the biosensor developed and the results were compared with those provided by established laboratory methods, further supporting the accuracy of the proposed device. The good analytical performance of the biosensor and the small size of the proposed chip provide for the development of a portable instrument for point-of-need determinations.

**SUBJECT AREA:** Optical label free biosensors

**KEYWORDS:** Aflatoxin B1, Fumonisin B1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Monolithically integrated Mach-Zehnder interferometers, Beer





***Στους γονείς μου Σπύρο και Διονυσία***



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	25
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ</b> .....	29
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά μυκοτοξινών.....	29
1.1.1 Αφλατοξίνες.....	31
1.1.2 Ωχρατοξίνες.....	33
1.1.3 Φουμονισίνες.....	34
1.1.4 Τριχοθηκίνες.....	35
1.2 Τοξικότητα και νομοθεσία μυκοτοξινών.....	36
1.3 Μυκοτοξίνες και μύρα.....	38
1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών σε τρόφιμα.....	42
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ</b> .....	53
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων.....	53
2.2 Είδη βιοαισθητήρων.....	54
2.2.1 Κατηγοριοποίηση βιοαισθητήρων βάσει του μορίου αναγνώρισης.....	55
2.2.2 Κατηγοριοποίηση βιοαισθητήρων βάσει του μεταλλάκτη σήματος.....	58
2.3 Είδη οπτικών βιοαισθητήρων που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών.....	61
2.3.1 Βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SRP).....	62
2.3.2 Συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες.....	63
2.3.3 Βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας ανακλαστικής συμβολής.....	65
2.3.4 Βιοαισθητήρες συντονισμού δακτυλίων.....	65
2.4 Μονολιθικά ολοκληρωμένος οπτοηλεκτρονικός βιοαισθητήρας τύπου Mach-Zehnder.....	66
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	71
<b>4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	75

4.1 Υλικά και όργανα.....	75
4.2 Σύνθεση του συζεύγματος OTA-OVA.....	76
4.3 Οργανολογία του μονολιθικά ολοκληρωμένου οπτοηλεκτρονικού βιοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder (BB-MZI).....	77
4.4 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	78
4.5 Προετοιμασία βαθμονομητών και δειγμάτων .....	78
4.6 Ακίνητοποίηση βιομορίων αναγνώρισης στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα BB-MZI .....	79
4.7 Μέθοδοι προσδιορισμού στον μονολιθικά ολοκληρωμένο οπτοηλεκτρονικό βιοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder.....	82
4.8 Μέθοδοι ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροπιλοδότησης (ELISA).....	85
<b>5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>87</b>
5.1 Βελτιστοποίηση των ενζυμοανοδοχημικών προσδιορισμών.....	87
5.1.1 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ανοσοαντιδραστηρίων.....	87
5.1.2 Βελτιστοποίηση της σύστασης ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	89
5.1.3 Βελτιστοποίηση της χρονικής διάρκειας των ανοσοαντιδράσεων.....	92
5.1.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ενζυμοανοδοχημικών προσδιορισμών στα φρεάτια μικροπιλοδότησης.....	96
5.2 Βελτιστοποίηση των ανοσοπροσδιορισμών στον αισθητήρα.....	99
5.2.1 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της OTA στον αισθητήρα.....	100
5.2.2 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της DON στον αισθητήρα.....	102
5.2.3 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της AFB1 στον αισθητήρα.....	104
5.2.4 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της FB1 στον αισθητήρα.....	106
5.3 Επιλογή μήτρας για την παρασκευή των βαθμονομητών.....	108
5.4 Βελτιστοποίηση του διαλύματος αναγέννησης.....	113

5.5 Τελικά πρωτόκολλα των ανοσοπροσδιορισμών που αναπτύχθηκαν στον αισθητήρα BB-MZI.....	118
5.5.1 Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοχημικού προσδιορισμού της OTA στον αισθητήρα .....	120
5.5.2 Αξιολόγηση της ειδικότητας των ανοσοχημικών προσδιορισμών των AFB1, FB1 και DON στον αισθητήρα BB-MZI.....	125
5.5.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοχημικών προσδιορισμών των AFB1, FB1 και DON σε αισθητήρες BB-MZI.....	129
5.6 Ανάλυση δειγμάτων μπίρας.....	135
<b>6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>139</b>
<b>7. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>145</b>
<b>8. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>149</b>
<b>9. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>153</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 5.1: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα για διαφορετικές συγκεντρώσεις μονοκλωνικού αντισώματος κατά της (α) OTA, (β), AFB1, (γ) FB1 και (δ) DON, όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα των συζευγμάτων OTA-OVA, AFB1-BSA, FB1-OVA και DON-OVA συγκέντρωσης 0,5 (μαύρη γραμμή), 1,0 (κόκκινη γραμμή), 2,0 (μπλε γραμμή) ή 5,0  $\mu\text{g/mL}$  (πράσινη γραμμή), αντίστοιχα, για την επικάλυψη των φρεατίων μικροπιλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναλήψεων  $\pm$  SD ..... 88
- Σχήμα 5.2: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης (α) 0,5, 1,0, και 5,0  $\text{ng/mL}$  για OTA, (β) 0,15, 0,5 και 1,0  $\text{ng/mL}$  για AFB1, (γ) 2,5, 10 και 25  $\text{ng/mL}$  για FB1, και (δ) 2,5, 12,5 και 62,5  $\text{ng/mL}$  για DON, που ελήφθησαν όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (κόκκινη γραμμή) ή Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 (μαύρη γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναλήψεων  $\pm$  SD ..... 90
- Σχήμα 5.3: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης της (α) OTA, (β) AFB1, (γ) FB1 και (δ) DON συναρτήσει της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων  $\pm$  SD ..... 93
- Σχήμα 5.4: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης προτύπων διαλυμάτων OTA συγκέντρωσης 0,5, 2,0, 10  $\text{ng/mL}$  (α), AFB1 συγκέντρωσης 0,125, 0,625, 1,25  $\text{ng/mL}$  (β), FB1 συγκέντρωσης 2,5, 10, 25  $\text{ng/mL}$  (γ) και DON συγκέντρωσης 6,25, 12,5, 31, 25, 62,5  $\text{ng/mL}$  (δ) που ελήφθησαν για χρόνους ανοσοαντίδρασης 60 (μαύρη γραμμή), 120 (κόκκινη γραμμή) και 180 λεπτά (μπλε γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων  $\pm$  SD ..... 94
- Σχήμα 5.5: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης του σήματος που λαμβάνονται από βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης της OTA χωρίς προεπώαση με το διάλυμα αντισώματος (στήλη 1) και από βαθμονομητή που περιέχει 1,0  $\text{ng/mL}$  OTA χωρίς προεπώαση (στήλη 2), με προεπώαση για 30 (στήλη 3), 60 (στήλη 4) ή 120 λεπτά (στήλη 5) με το αντίσωμα κατά της OTA. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων  $\pm$  SD ..... 95
- Σχήμα 5.6: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης ELISA για AFB1 (κόκκινη καμπύλη), OTA (πράσινη καμπύλη), FB1 (μπλε καμπύλη) και DON (μαύρη καμπύλη). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 4 επαναλήψεων  $\pm$  SD ..... 98
- Σχήμα 5.7: α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος OTA-OVA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της OTA στα σήματα που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ( $\square$ ) και για βαθμονομητή που περιέχει 2,5  $\text{ng/mL}$  OTA (ο) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100  $\mu\text{g/mL}$  συζεύγματος OTA-OVA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100  $\mu\text{g/mL}$  συζεύγματος OTA-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της OTA 2  $\mu\text{g/mL}$  και ακολούθησε 20 λεπτά αντίδρασης με διάλυμα 2<sup>ου</sup> αντισώματος συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$ . δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. που λαμβάνεται από αισθητήρες που είχαν επικαλυφθεί με 100  $\mu\text{g/mL}$  OTA-OVA και για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε μίγμα 1:1 του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης με διάλυμα αντισώματος κατά της OTA

4 µg/mL για 30 min. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι τιμές αντιστοιχούν στην μέση τιμή των σημάτων που ελήφθησαν από 7 MZI (3 φορές έκαστος) ± SD..... 101

Σχήμα 5.8: α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος DON-OVA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της DON στο σήμα που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και βαθμονομητή που περιέχει 17,5 ng/mL DON (ο) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος DON-OVA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος DON-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της DON συγκέντρωσης 1 µg/mL. δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος DON-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της DON συγκέντρωσης 1 µg/mL για 8 λεπτά. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD..... 103

Σχήμα 5.9: α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος AFB1-BSA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της AFB1 στο σήμα που λαμβάνεται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και έναν βαθμονομητή που περιέχει 1,25 ng/mL AFB1 (ο) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος AFB1-BSA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος AFB1-BSA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της AFB1 συγκέντρωσης 2 µg/mL. δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος AFB1-BSA, στους οποίους διαβιβάστηκε για 8 λεπτά διάλυμα αντισώματος κατά της AFB1 συγκέντρωσης 2 µg/mL. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD..... 105

Σχήμα 5.10: α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος FB1-OVA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της FB1 στο σήμα που λαμβάνεται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και έναν βαθμονομητή που περιέχει 6,25 ng/mL FB1 (□) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος FB1-OVA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος FB1-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της FB1 συγκέντρωσης 0,5 µg/mL. δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL συζεύγματος FB1-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε για 8 λεπτά διάλυμα αντισώματος κατά της FB1 συγκέντρωσης 0,5 µg/mL. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD..... 107

Σχήμα 5.11: Επίδραση της μήτρας του βαθμονομητή στο σήμα που λαμβάνεται κατά τους προσδιορισμούς των OTA (α), AFB1 (β), FB1 (γ) και DON (δ) για βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που έχει παρασκευαστεί σε μπίρα χωρίς αραίωση ή μπίρα αραιωμένη 2, 4, 8 και 16 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (assay buffer, PΔΑ), σε PΔΑ και σε PΔΑ που περιέχει 0,625% (ο/ο) αιθανόλη. Οι στήλες αντιστοιχούν στη μέση τιμή των αποκρίσεων 7 BB-MZIs ± SD..... 109



- Σχήμα 5.12: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης AFB1 (α), FB1 (β) και DON (γ) που έχουν ληφθεί από βαθμονομητές που παρασκευάστηκαν σε μπύρα αραιωμένη 8 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (μαύρη καμπύλη) ή ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,625% αιθανόλη (κόκκινη καμπύλη). Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή των αποκρίσεων 7 BB-MZIs (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD ..... 112
- Σχήμα 5.13: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης OTA που ελήφθησαν με βαθμονομητές που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (ΡΔΑ) που περιέχει 0,625% αιθανόλη (μπλε καμπύλη), σε ΡΔΑ που περιέχει 0,625% αιθανόλη και 8,75% μεθανόλη (κόκκινη καμπύλη), σε μπύρα αραιωμένη 8 φορές με ΡΔΑ (μαύρη καμπύλη) και σε μπύρα αραιωμένη 8 φορές με ΡΔΑ που περιέχει 8,75% μεθανόλη (πράσινη καμπύλη). Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή των αποκρίσεων 7 BB-MZI (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD ..... 113
- Σχήμα 5.14: Τιμές σήματος που λαμβάνονται από αισθητήρα τροποποιημένο με OTA-OVA για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) και τα σήματα που λαμβάνονται μετά από αναγέννηση για 1 λεπτό (λευκές στήλες), 2 λεπτά (μαύρες στήλες) ή 3 λεπτά (κόκκινες στήλες) και επακόλουθη διαβίβαση δευτέρου αντισώματος. Τα διαλύματα που δοκιμάστηκαν ήταν: ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης IgG (ομάδα στηλών 1), ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5 (ομάδα στηλών 2), NaOH 0,05 M (ομάδα στηλών 3), SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9 (ομάδα στηλών 4) και HCl 0,1 M (ομάδα στηλών 5) ..... 115
- Σχήμα 5.15: Εκατοστιαίο ποσοστό του σήματος που λαμβάνεται κατά την διαβίβαση διαλύματος δευτέρου αντισώματος μετά από αναγέννηση με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης IgG (λευκές στήλες), ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5 (μαύρες στήλες), 50 mM NaOH (κόκκινες στήλες), 100 mM HCl (μπλε στήλες) ή 0,5% (β/ο) SDS, pH 1,9 (κίτρινες στήλες) σε σχέση με το αρχικό σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) για AFB1, FB1 και DON ..... 116
- Σχήμα 5.16: Τιμές σήματος που λαμβάνονται για βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ανάλυσης/αναγέννησης για OTA (α), AFB1 (β), FB1 (γ) και DON (δ). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στις μέσες τιμές των μετρήσεων και οι διακεκομμένες μπλε στο μέσο όρο  $\pm$  2SD ..... 117
- Σχήμα 5.17: Χαρακτηριστικές αποκρίσεις των αισθητήρων μιας ψηφίδα όπου 7 στα 10 BB-MZIs έχουν επικαλυφθεί με OTA-OVA και τα υπόλοιπα 3 με OVA (τυφλό) κατά τη διέλευση: από την αρχή μέχρι το βέλος 1: ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης (ΡΔΑ), από το βέλος 1-2: μειγμάτων βαθμονομητών παρασκευασμένων σε μπύρα και αραιωμένων 8 φορές με ΡΔΑ με το αντίσωμα κατά της OTA (4  $\mu$ g/mL σε ΡΔΑ), από το βέλος 2 έως το τέλος: διάλυμα δευτέρου αντισώματος (10  $\mu$ g/mL σε ΡΔΑ). Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση απόκριση 7 BB-MZIs για την ειδική αντίδραση και 3 BB-MZIs για το τυφλό ..... 121
- Σχήμα 5.18: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης της OTA. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD ..... 123
- Σχήμα 5.19: (α) Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από ψηφίδα στην οποία 3 από τα 10 MZIs είχαν τροποποιηθεί με FB1-OVA (μπλε γραμμές), 3 με AFB1-BSA (κόκκινες γραμμές) και 3 με DON-OVA (μαύρες γραμμές) κατά τη διαβίβαση διαδοχικά πάνω από τον αισθητήρα διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος της FB1, της AFB1 και της DON, καθένα ακολουθούμενο από διάλυμα δεύτερου αντισώματος και

αναγέννηση (υποδεικνύεται από τις δύο διακεκομμένες κάθετες γραμμές). (β) Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από ψηφίδα στην οποία τα 9 MZIs έχουν τροποποιηθεί όπως στο (α) και ο ένας MZI με OVA (πράσινη γραμμή) όταν διαβιβάζεται μίγμα αντισωμάτων κατά των FB1, AFB1 και DON (βέλος 1 έως 2) ακολουθούμενο από διάλυμα δευτέρου αντισώματος (βέλος 2 έως τέλος).....	126
Σχήμα 5.20: Αποκρίσεις που λαμβάνονται σε πραγματικό χρόνο από αισθητήρες που έχουν τροποποιηθεί με τα προϊόντα σύζευξης μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης όταν αντιδρούν με διαλύματα βαθμονομητών που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις AFB1 (α), FB1 (β) και DON (γ). Το βέλος 1 υποδεικνύει το χρονικό σημείο της εισαγωγής του μείγματος βαθμονομητών/αντισώματος και το βέλος 2 την εισαγωγή του 2 <sup>ου</sup> αντισώματος.....	130
Σχήμα 5.21: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης AFB1 (κόκκινη καμπύλη), FB1 (μπλε καμπύλη) και DON (μαύρη καμπύλη) που λαμβάνονται με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 3 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD.....	131

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Οι χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών .....	32
Εικόνα 1.2: Χημική δομή ωχρατοξίνης A (OTA).....	34
Εικόνα 1.3: Χημική δομή φουμονισίνης B1 (FB1).....	35
Εικόνα 1.4: Χημική δομή δεοξυनिβαλενόλης (DON).....	36
Εικόνα 1.5: Κατάταξη επιβλαβών ουσιών ανάλογα με την επικινδυνότητα τους ως προς την οξεία και χρόνια δράση τους σε άνθρωπο και ζώα μετά την πρόσληψη τροφίμων που περιέχουν αυτές τις ουσίες.....	37
Εικόνα 1.6: Διάγραμμα ροής παραγωγής μπύρας.....	39
Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων διαχωρισμού δυο ουσιών A και B με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Βήμα 1ο: το δείγμα εφαρμόζεται στην πλάκα TLC με τη μορφή κηλίδας (στατική φάση) και η πλάκα τοποθετείται κάθετα σε δοχείο που περιέχει κατάλληλο διαλύτη. Βήμα 2ο: ο διαλύτης (κινητή φάση) ανέρχεται στην πλάκα με τριχοειδή κίνηση, παρασύροντας τις ουσίες του δείγματος. Βήμα 3ο: οι ουσίες A και B κινούνται στην πλάκα με διαφορετικούς ρυθμούς και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους.....	43
Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων της οργανολογίας μιας μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	44
Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων της οργανολογίας μιας μεθόδου αέριας χρωματογραφίας (GC).....	45
Εικόνα 1.10: Τα βασικά στάδια μιας ELISA ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών όπου (α) τα φρεάτια επικαλύπτονται με πρωτεϊνικό σύζευγμα της μυκοτοξίνης (στερεά φάση), β) προστίθεται το δείγμα και το επισημασμένο με ένζυμο αντίσωμα κατά της μυκοτοξίνης, γ) μέρος του επισημασμένου αντισώματος δεσμεύεται στα μόρια της στερεάς φάσης, ενώ τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνονται στο στάδιο της έκπλυσης και δ) προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα του ενζύμου για την ανάπτυξη έγχρωμου προϊόντος.....	49
Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της γενικής διάταξης ενός βιοαισθητήρα.....	53
Εικόνα 2.2: Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων σε επιφάνειες μέσω (α) φυσικής προσρόφησης, (β) απευθείας ομοιοπολικής σύνδεσης, (γ) εγκλεισμού, (δ) ομοιοπολικής σύνδεσης με δημιουργία διαμοριακών δεσμών ή (στ) δεσμών συγγενείας.....	56
Εικόνα 2.3: Σχηματική παράσταση ενός αισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) με χρήση οπτικού πρίσματος.....	63
Εικόνα 2.4: Σχηματική παράσταση (α) πλευρικής όψης και (β) κάτοψης ενός συμβολόμετρου Mach-Zehnder (MZI).....	64
Εικόνα 2.5: Σχηματική παράσταση συμβολόμετρου Young.....	64
Εικόνα 2.6: Σχηματική παράσταση βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανακλαστικής συμβολής μεταξύ υλικών διαφορετικού δείκτη διάθλασης (RI).....	65
Εικόνα 2.7: Σχηματική παράσταση βιοαισθητήρα συντονισμού οπτικού δακτυλίου.....	66
Εικόνα 2.8: (α) Φωτογραφία του αισθητήρα όπου φαίνεται το πραγματικό του μέγεθος σε σχέση με ένα νόμισμα των 5 λεπτών, και (β) εικόνα του αισθητήρα από οπτικό	

μικροσκόπιο όπου δείχνονται οι πηγές φωτός (LED), η περιοχή των 10 οπτικών κυματοδηγών και το περίγραμμα της περιοχής που καλύπτεται με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα .....	66
Εικόνα 2.9: Σχηματική παράσταση πλευρικής όψης μιας πλήρως ολοκληρωμένης σε ψηφίδα πυριτίου οπτοηλεκτρονικής πλατφόρμας, στην οποία φαίνονται η πηγή φωτός ευθυγραμμισμένη με τον οπτικό κυματοδηγό νιτριδίου του πυριτίου. Ο κυματοδηγός καλύπτεται από υμένιο διηλεκτρικού (διοξείδιο του πυριτίου), το οποίο απομακρύνεται από μια περιοχή δημιουργώντας τον αισθητήριο κλάδο στον οποίο μπορούν να ακινητοποιηθούν τα βιομόρια αναγνώρισης.....	67
Εικόνα 2.10: Τυπικό ημιτονοειδές φάσμα συμβολής που καταγράφεται στην έξοδο ενός BB-MZI (κόκκινη γραμμή) και η μετατόπιση των κορυφών του φάσματος που προκαλείται λόγω της βιοαντίδρασης (μπλε γραμμή).....	68
Εικόνα 2.11: Μικρορευστομηχανική κυψελίδα από πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) πάχους 800 μm με οπές εισόδου- εξόδου και τοιχώματα ύψους 75 μm από φωτοευαίσθητο υμένιο (μπλε χρώμα) τοποθετημένη σε ψηφίδα πυριτίου.....	70
Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων της οργανολογίας που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις στον αναπτυσθέντα βιοαισθητήρα.....	77
Εικόνα 4.2: Δομή των υδροφιλοποιημένων (αριστερά) και χημικά ενεργοποιημένων με σιλάνιο (δεξιά) επιφανειών.....	79
Εικόνα 4.3: Αυτόματη συσκευή εναπόθεσης μικροκυλίδων <i>BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer Bio-Rad Laboratories</i> .....	80
Εικόνα 4.4: Εικόνα του αισθητήρα που απεικονίζει τις περιοχές μετά την εναπόθεση των διαφορετικών συζευγμάτων πρωτεΐνης-μυκοτοξίνης καθώς και την περιοχή που έχει τροποποιηθεί με μη λειτουργική πρωτεΐνη (OVA) κατά τον προσδιορισμό της OTA (α) και κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των AFB1, FB1 και DON (β).....	81
Εικόνα 4.5: Ψηφίδα πυριτίου στην επιφάνεια της οποίας έχει τοποθετηθεί μικρορευστομηχανική κυψελίδα από πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) πάχους 800 μm η οποία φέρει οπές για την είσοδο/έξοδο των διαλυμάτων.....	82
Εικόνα 4.6: Εικόνες του ειδικού φορέα στον οποίο τοποθετείται η ψηφίδα (α) και της βάσης υποδοχής της ψηφίδας στην συσκευή μέτρησης στην οποία τοποθετείται ο φορέας της ψηφίδας και η οποία είναι ευθυγραμμισμένη με την οπτική ίνα που χρησιμοποιείται για τη συλλογή των φάσεων εξόδου (β).....	82
Εικόνα 4.7: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων ανάλυσης των μυκοτοξινών με τον αναπτυσθέντα αισθητήρα: α) στάδιο ειδικής ανοσοαντίδρασης κατά το οποίο τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του αισθητήρα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης ανταγωνίζονται με τα μόρια του αναλύτη στο δείγμα για δέσμευση από τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα (Υ), β) ενίσχυση σήματος ανοσοαντίδρασης με την προσθήκη αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού (Υ), γ) αναγέννηση της επιφάνειας του αισθητήρα κατά την οποία πραγματοποιείται αποδέσμευση του μονοκλωνικού αντισώματος από το ακινητοποιημένο αντιγόνο. Επεξήγηση συμβόλων: (○) πρωτεΐνη φορέας, (○) μυκοτοξίνη, (○) BSA.....	84
Εικόνα 4.8: Σχηματική απεικόνιση ανοσοανάλυσης ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης για την ανίχνευση μυκοτοξινών, όπου α) στάδιο ακινητοποίησης συζεύγματος μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης, β) στάδιο αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων πρόσδεσης πρωτεΐνης στην επιφάνεια των φρεατίων, γ) στάδιο ειδικής	

ανοσοαντίδρασης κατά το οποίο τα ακινητοποιημένα στα φρεάτια συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης ανταγωνίζονται με τα μόρια του αναλύτη στο δείγμα για δέσμευση από τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα, δ) στάδιο προσθήκης συζεύγματος υπεροξειδάσης-αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού, δ) στάδιο προσθήκης χρωμογόνου υποστρώματος του ενζύμου και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των φρεατίων στα 405 nm. Επεξήγηση συμβόλων: (ο) πρωτεΐνη φορέας, (ο) μυκοτοξίνη, (ο) BSA, (Υ) μονοκλωνικά αντισώματα κατά των μυκοτοξινών, (Υ) αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού, (ο) ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος..... 86



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Τα κυριότερα είδη μυκήτων που απαντώνται πιο συχνά σε τρόφιμα και ζωοτροφές και οι κυριότερες τοξίνες που παράγουν.....	30
Πίνακας 1.2: Πρόσθετα συστατικά που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή μπίρας και οι αντίστοιχες εμπορικές ονομασίες.....	40
Πίνακας 1.3: Μεταβολή συγκέντρωσης μυκοτοξινών κατά τη διαδικασία ζυθοποίησης.....	41
Πίνακας 1.4: Σύγκριση χρωματογραφικών τεχνικών για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε δείγματα μπίρας.....	47
Πίνακας 1.5: Σύγκριση μεθόδων ELISA και αισθητήρων για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε δείγματα μπίρας.....	50
Πίνακας 2.1: Κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων με βάση το είδος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης ή του μεταλλάκτη που χρησιμοποιείται.....	54
Πίνακας 5.1: Πρωτόκολλο ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού των μυκοτοξινών OTA, AFB1, FB1 & DON σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης.....	97
Πίνακας 5.2: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των προσδιορισμών ELISA των τεσσάρων μυκοτοξινών.....	99
Πίνακας 5.3: Πρωτόκολλο προσδιορισμού της OTA στον BB-MZI αισθητήρα.....	119
Πίνακας 5.4: Πρωτόκολλο προσδιορισμού των μυκοτοξινών AFB1, FB1 & DON στον BB-MZI αισθητήρα.....	120
Πίνακας 5.5: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της OTA στους αισθητήρες BB-MZI.....	124
Πίνακας 5.6: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των προσδιορισμών των μυκοτοξινών AFB1, FB1 & DON σε μπίρα με τον αισθητήρα BB-MZI.....	131
Πίνακας 5.7: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της AFB1 στον αισθητήρα BB-MZI.....	132
Πίνακας 5.8: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της FB1 στον αισθητήρα BB-MZI.....	133
Πίνακας 5.9: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της DON στον αισθητήρα BB-MZI.....	134
Πίνακας 5.10: Συγκεντρώσεις DON και FB1 που προσδιορίστηκαν σε 29 δείγματα μπίρας με τον αισθητήρα BB-MZI και την αντίστοιχη ELISA.....	136
Πίνακας 5.11: Συγκεντρώσεις των DON και FB1 που προσδιορίστηκαν σε δείγματα μπίρας με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα και με τις δυο μεθόδους σύγκρισης, LC-MS/MS και ELISA. Οι τιμές σε παρενθέσεις αντιστοιχούν στη συγκέντρωση του D3G που προσδιορίστηκε στα δείγματα με τη μέθοδο LC-MS/MS.....	137
Πίνακας 6: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	145
Πίνακας 7: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	149





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε κατά τα έτη 2012-2018 στο εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων–Ανοσοαισθητήρων, του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ), του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής με τίτλο «Ανάπτυξη οπτικών ανοσοαισθητήρων για την ταυτόχρονη ανίχνευση τοξικών ουσιών σε τρόφιμα», σε συνεργασία με το Τμήμα Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δρ. Αναστάσιου Οικονόμου.

Με την ολοκλήρωση της διατριβής θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ σε όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την προσπάθεια και με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας.

Πιο συγκεκριμένα, ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Αναστάσιο Οικονόμου, που στήριξε την προσπάθεια μου σε δύσκολες στιγμές, με καθοδήγησε και με βοήθησε με πολύτιμες υποδείξεις.

Ο πρώτος άνθρωπος που οφείλω να ευχαριστήσω από το εργαστήριο είναι ο Δρ. Σωτήριος Κακαμπάκος. Τον ευχαριστώ θερμά γιατί χωρίς την πολύτιμη καθοδήγησή του ως προς την ερευνητική πορεία της εργασίας δεν θα είχε ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη. Όλα αυτά τα χρόνια που ήμουν στο εργαστήριο μου πρόσφερε την ευκαιρία να αναπτύξω επιστημονικό τρόπο σκέψης και να αποκτήσω ερευνητικές γνώσεις και εμπειρίες.

Από καρδιάς θέλω να ευχαριστήσω την Δρ. Παναγιώτα Πέτρου για τη πολύτιμη βοήθεια της στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη στήριξη που μου προσέφερε σε ορισμένες δύσκολες στιγμές, που αναπόφευκτα παρουσιάζονται κατά τη διάρκεια ενός διδακτορικού, καθώς και για την αμέριστη υποστήριξη της, χωρίς την οποία δε θα είχαν προκύψει τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής.

Από το Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Μισιακό για την κατασκευή της διάταξης του αισθητήρα. Τον ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία μας, για τις πολύτιμες συμβουλές και για την καθοδήγησή του.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, στον αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Ευάγγελο Μπακέα και στους επίκουρους καθηγητές Δρ. Χρήστο Κόκκινο και Δρ. Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» για την παροχή της εργαστηριακής υποδομής κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης και την Ευρωπαϊκή Ένωση για τη χρηματοδότηση μέρους της παρούσας διατριβής μέσω του προγράμματος «FOODSNIFFER», καθώς επίσης και όλους τους συνεργαζόμενους φορείς.

Στον Δρ. Ιωάννη Ράππη από το I.N.N εκφράζω τις ευχαριστίες μου για τη συμμετοχή του στην κατασκευή της μετρικής διάταξης, την πολύτιμη βοήθεια του και την άψογη συνεργασία μας. Επιπλέον ευχαριστώ τους συνεργάτες Αθανάσιο Μποτσιάλα για την συνεχή βοήθεια ως προς τα τεχνικά ζητήματα του αισθητήρα και Αλέξανδρο Σαλαπάτα για την κατασκευή του κατάλληλου λογισμικού για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τον Jeroen Peters από το RIKILT Wageningen UR ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία μας και για τη συμβολή του στην παρούσα διατριβή.

Αισθάνομαι δε την ανάγκη να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου, ιδιαίτερα τον Δρ. Ίωνα-Ιωάννη Χριστοφίδη, τους συνεργαζόμενους ερευνητές Δρες. Μιχαηλία Αγγελοπούλου, Γεώργιο Κουκουβίνο, Αθανασία Μπούρκουλα και Αιμιλία Ψαρούλη, καθώς επίσης και όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές (M.Sc) Νατάσα Κανιούρα, Ελευθερία Σταύρα, Ζωή Τσιάλλα και Δήμητρα Τσουνίδη, για την άψογη συνεργασία μας και το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο, βαθύ και θερμό ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου που χωρίς την αγάπη και τη συμπαράστασή τους, η εκπόνηση και η ολοκλήρωση της διατριβής μου δε θα ήταν ποτέ δυνατή: στους γονείς μου Σπύρο και Διονυσία, στις αδερφές μου Ανδρονίκη και Μαρία και κυρίως στον σύντροφο της ζωής μου Νικόλαο Συνοδινό.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

### 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται και εκκρίνονται ως δευτερογενείς τοξικοί μεταβολίτες από διάφορους μύκητες, οι οποίοι ανήκουν κυρίως στα είδη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium* [1]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί περισσότερες από 400 μυκοτοξίνες, αλλά μόνο μερικές από αυτές ανιχνεύονται με μεγάλη συχνότητα σε διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές, σε υψηλές συγκεντρώσεις (Πίνακας 1.1). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν, μεταξύ άλλων, οι αφλατοξίνες, οι φουμονισίνες, οι τριχοθηκίνες και οι ωχρατοξίνες [2].

Οι μυκοτοξίνες εντοπίζονται σε πολλές κατηγορίες τροφίμων, κυρίως σε δημητριακά, ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά, όσπρια, κακάο, φρούτα και λαχανικά. Παράλληλα εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω της βιοσυσσώρευσης τους σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως τα αυγά, το γάλα και το κρέας ζώων που τρέφονται με μολυσμένες ζωοτροφές, ενώ εντοπίζονται και σε επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως αρτοπαρασκευάσματα, κρασιά και μπίρες μέσω της χρήσης μολυσμένων πρώτων υλών [1,2].

Οι μύκητες είναι μικροοργανισμοί που προσβάλουν συχνότερα τρόφιμα με περιορισμένη περιεκτικότητα σε νερό. Όντας πιο ανεκτικοί σε μειωμένη περιεκτικότητα νερού στο υπόστρωμα σε σχέση με τα βακτήρια, έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα τρόφιμα. Πέραν των αλλοιώσεων που προκαλεί η παρουσία του μύκητα στα τρόφιμα, ενέχει τον κίνδυνο μόλυνσης αυτών με τις μυκοτοξίνες που μπορεί να παράγει. Ο κίνδυνος είναι ιδιαίτερα αυξημένος λόγω του γεγονότος ότι η μη ορατή εμφάνιση του μύκητα σε ένα τρόφιμο δεν αποκλείει την παρουσία μυκοτοξινών, αφού οι τοξίνες είναι άχρωμες, άοσμες και μπορούν να παραμείνουν στα τρόφιμα και μετά την απομάκρυνση του μύκητα [3].

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να παραχθούν και να αναπτυχθούν σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας ενός τροφίμου, τόσο κατά τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας του στους αγρούς, όπου ανιχνεύονται κυρίως αφλατοξίνες, φουμονισίνες και τριχοθηκίνες, όσο και κατά την αποθήκευση του μετά τη συγκομιδή μέχρι και την τελική φάση της συσκευασίας, όπου παράγονται κυρίως αφλατοξίνες και ωχρατοξίνες [4].

Οι μύκητες που προσβάλλουν τα σιτηρά στο χωράφι, κυρίως είδη του γένους *Aspergillus* και *Fusarium*, επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και μπορούν να παραμείνουν βιώσιμοι για πολλούς μήνες κατά την αποθήκευση, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στους αποθηκευτικούς χώρους. Ο χρόνος επιβίωσης τους είναι μεγαλύτερος σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε χαμηλά επίπεδα υγρασίας. Συνεπώς, ο κίνδυνος μόλυνση των σιτηρών με μυκοτοξίνες είναι αυξημένος είτε πριν τη συγκομιδή, είτε κατά το στάδιο της αποθήκευσης/ξήρανσης [5].

**Πίνακας 1.1: Τα κυριότερα είδη μυκήτων που απαντώνται πιο συχνά σε τρόφιμα και ζωοτροφές και οι κυριότερες τοξίνες που παράγουν**

<b>Είδη μυκήτων</b>	<b>Παραγόμενες τοξίνες</b>
<p><i>Aspergillus</i> (<i>A. flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>, <i>A. ochraceus</i>, <i>A. carbonarius</i>, <i>A. versicolor</i>, <i>A. nomius</i>, <i>A. niger</i>)</p>	<p>Aflatoxins, Ochratoxin, Gliotoxin, Citrinin, Fumitoxins, Patulin, Sterigmatocystin, Cyclopiazonic Acid, Mevinolin</p>
<p><i>Fusarium</i> (<i>F. verticillioides</i>, <i>F. graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. cerealis</i>, <i>F. tricinctum</i>, <i>F. proliferatum</i>, <i>F. acuminatum</i>)</p>	<p>Fumonisin, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Nivalenol, Moniliformin, Beauvericin, Diacetoxyscirpenol, Fusaric Acid, Fusarochromanone, Fusaproliferin</p>
<p><i>Penicillium</i> (<i>P. viridicatum</i>, <i>P. ochraceus</i>, <i>P. verrucosum</i>)</p>	<p>Ochratoxin, PR Toxin, Patulin, Citrinin, Penicillic Acid, Mycophenolic Acid, Cyclopiazonic Acid</p>

Πέραν του ότι τρόφιμα όπως τα σιτηρά, αποθηκεύονται συχνά για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις ως χύδην φορτία. Στο στάδιο αυτό, τα τρόφιμα μπορούν επίσης να μολυνθούν με μυκοτοξίνες από τα μέσα μεταφοράς και αποθήκευσης [6]. Τα πιο σημαντικά είδη μυκήτων που προσβάλλουν τα τρόφιμα κατά το στάδιο της αποθήκευσης είναι είδη του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* [7]. Καθώς τα αποθηκευμένα τρόφιμα στερούνται τους αμυντικούς μηχανισμούς που διαθέτουν τα φυτά, οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν ανεμπόδιστα, προκαλώντας αλλοιώσεις που εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο συντελεστής ενεργού ύδατος ( $a_w$ ), που ορίζεται ως η ποσότητα του νερού που είναι διαθέσιμη στους μικροοργανισμούς για μεταβολική δραστηριότητα, η θερμοκρασία και η σύνθεση του αέρα [8]. Οι ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξη των μυκήτων και κατ' επέκταση των μυκοτοξινών κατά το στάδιο της αποθήκευσης είναι η υψηλή υγρασία, συνήθως πάνω από 70% και θερμοκρασία μεταξύ 20–30 °C, μπορούν όμως να επιζήσουν και σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 0-60 °C.

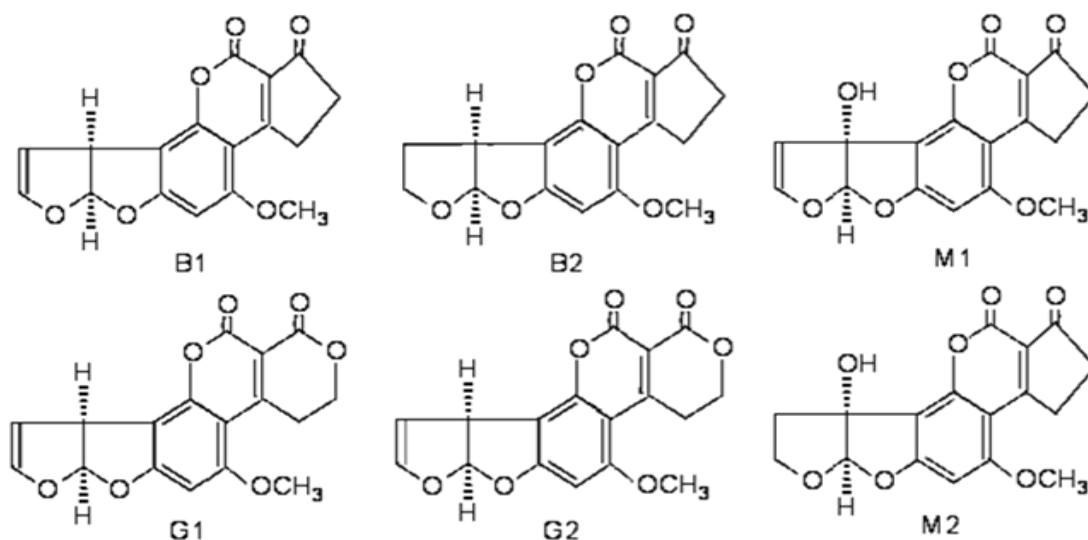
Τέλος, εφόσον οι μυκοτοξίνες είναι παρούσες στα τρόφιμα από προσβολή που έγινε στον αγρό από τους μύκητες που τις παράγουν, τότε θα παραμείνουν σε αυτά και θα μεταφερθούν και στα προϊόντα τους, αφού οι μυκοτοξίνες δε διασπώνται κατά τη θέρμανση ή μέσω άλλων διαδικασιών επεξεργασίας ενός τροφίμου.

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) περίπου το 25% των καλλιεργειών μολύνονται ετησίως με μυκοτοξίνες σε παγκόσμιο επίπεδο, τα οποία το 22% αφορά φουμονισίνες και το 56% αφλατοξίνες [4], ενώ ακολουθούν επιμολύνσεις με ωχρατοξίνες και τριχοθηκίνες. Στα υποκεφάλαια που ακολουθούν γίνεται μια σύντομη περιγραφή των κυριότερων τάξεων των μυκοτοξινών που απαντώνται στα τρόφιμα [4].

### **1.1.1 Αφλατοξίνες**

Οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* και *A. niger*). Ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1961 στην Αγγλία [9], όταν ζωοτροφές που είχαν προσβληθεί από το μύκητα *A.*

*flavus* προκάλεσαν το θάνατο σε 100.000 γαλοπούλες. Κατηγοριοποιούνται ως B (B1 και B2) ή G (G1 και G2), για το μπλε (Blue) και το πράσινο (Green), αντίστοιχα, βάσει του φυσικού φθορισμού που εκπέμπουν κατά την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ υπάρχουν και δύο πρόσθετα μεταβολικά προϊόντα των αφλατοξινών, οι M1 και M2, οι οποίες απομονώθηκαν για πρώτη φορά από γάλα (Milk) θηλαστικών που κατανάλωσαν τροφές που περιείχαν αφλατοξίνη, ως εκ τούτου και η κατηγοριοποίηση ως M. Οι αφλατοξίνες B2 και G2 αποτελούν τα διυδρόξυ παράγωγα των B1 και G1, αντιστοίχως, ενώ η αφλατοξίνη M1 είναι η 4-υδρόξυ αφλατοξίνη B1 και η αφλατοξίνη M2 είναι η 4-διυδρόξυ αφλατοξίνη B2 [10]. Στην εικόνα 1.1 παρουσιάζεται η χημική δομή των αφλατοξινών.



**Εικόνα 1.1: Οι χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών**

Οι αφλατοξίνες ανιχνεύονται πολύ συχνά σε αποξηραμένα φρούτα, ξηρούς καρπούς, καλαμπόκι, βαμβακόσπορο, φιστίκια, καρύδια και μπαχαρικά. Σύμφωνα με έρευνες, η αρχική ποσότητα των αφλατοξινών μειώνεται κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας που υφίστανται τα τρόφιμα πριν φτάσουν στον καταναλωτή με αποτέλεσμα περίπου το 40-50% της αρχικής ποσότητας να απομακρύνεται [11].

Οι αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 έχουν καταταχθεί από τη Διεθνή Επιτροπή Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency for Research on Cancer,



IARC) στις καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 1, ενώ οι αφλατοξίνη M1 στις πιθανόν καρκινογόνες ουσίες της ομάδας 2B [12,13]. Με βάση πειραματικά δεδομένα, η καρκινογόνος δράση της M1 είναι 10 φορές μικρότερη σε σχέση με αυτή της B1 [13].

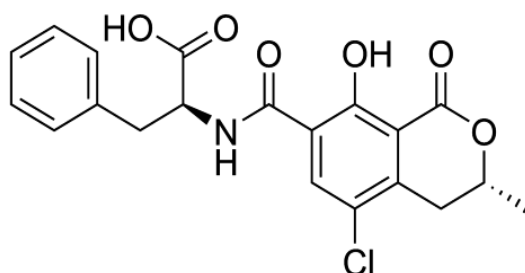
Η τοξικότητα της ομάδας αυτής των μυκοτοξινών μπορεί να διακριθεί σε οξεία και σε χρόνια. Η οξεία τοξικότητα, λόγω κατανάλωσης μεγάλης ποσότητας αφλατοξίνης άπαξ ή σε σύντομο χρονικό διάστημα, περιλαμβάνει κοιλιακό άλγος, πνευμονικό ή εγκεφαλικό οίδημα, καταστροφή του ήπατος, ανορεξία, φωτοευαισθησία, ίκτερο, ή/και διάρροια [14]. Η χρόνια τοξικότητα είναι αυτή που εμφανίζεται συχνότερα λόγω κατανάλωσης μικρών ποσοτήτων αφλατοξινών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από την ηλικία, το φύλλο, την διατροφή και το μέγεθος της έκθεσης [15]. Στις ασθένειες για τις οποίες ενοχοποιούνται οι αφλατοξίνες λόγω χρόνιας τοξικότητας περιλαμβάνονται: α) καρκίνος του ήπατος, όπου υπάρχουν δεδομένα ότι ο ιός της ηπατίτιδα Β και ο ιός της ηπατίτιδας C λειτουργούν συνεργιστικά μαζί με τις αφλατοξίνες στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος (Hepatocellular carcinoma, HCC) [16], β) επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα και συγκεκριμένα, στους αρένας έχει παρατηρηθεί καθυστερημένη ή ελαττωματική ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος, γενετικές ανωμαλίες στα σπερματικά κύτταρα και μειωμένη συγκέντρωση τεστοστερόνης [17], γ) επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως μειωμένη δραστηριότητα των Τ και Β λεμφοκυττάρων καθώς και παρεμπόδιση της φαγοκύτωσης [18], δ) ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, λόγω έκθεσης σε αφλατοξίνες, όχι όμως από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων αλλά μέσω της αναπνευστικής οδού [19].

### 1.1.2 Ωχρατοξίνες

Οι ωχρατοξίνες παράγονται κυρίως από μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *P. verrucosum*). Τα είδη που παράγουν ωχρατοξίνη θεωρούνται μύκητες αποθήκης, έτσι οι ωχρατοξίνες παράγονται κάτω από ορισμένες συνθήκες αποθήκευσης και συνήθως δεν ανιχνεύονται πριν τη συγκομιδή [20]. Εντοπίζονται σε μεγάλη

ποικιλία τροφίμων όπως κριθάρι, σιτάρι, βρώμη, αποξηραμένα φρούτα, τροφές που παράγονται από δημητριακά, κρέας πουλερικών, καφέ και κρασί. Οι ωχρατοξίνες κατηγοριοποιούνται σε τρεις μεγάλες ομάδες, Α, Β και C, που διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ τους ως προς τις χημικές τους δομές. Αυτές οι διαφορές ωστόσο, διαφοροποιούν σημαντικά τα αντίστοιχα τοξικά τους δυναμικά, με την ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) να είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη και με τη μεγαλύτερη τοξικότητα. Στην εικόνα 1.2 παρουσιάζεται η χημική δομή της ωχρατοξίνης Α.

Η ωχρατοξίνη Α ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στη Νότιο Αφρική ως δευτερογενής μεταβολίτης του *Aspergillus ochraceus* [21]. Έχει συνδεθεί με την Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια γνωστή στη βιβλιογραφία ως BEN και την ανάπτυξη όγκων στην ουροδόχο κύστη [22]. Η ΟΤΑ δρα επίσης στον ανθρώπινο οργανισμό ως αναστολέας του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, έχει εμβρυοτοξική, νευροτοξική και νεφροτοξική δράση [23] και έχει καταχωρηθεί από την IARC (1993) ως πιθανή καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο και τα ζώα (Ομάδα 2B) [12].



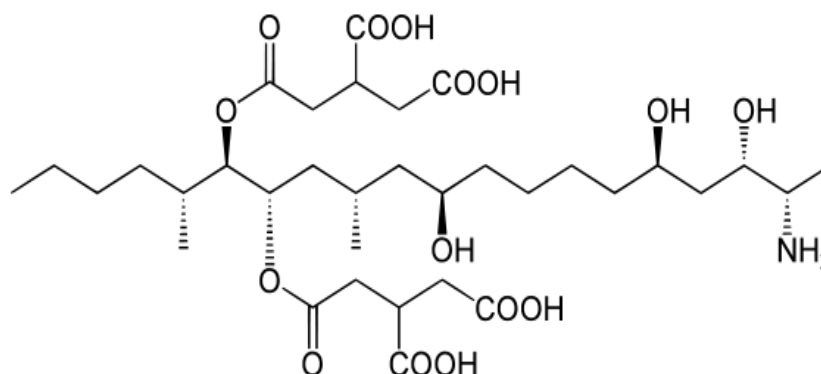
Εικόνα 1.2: Χημική δομή ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ)

### 1.1.3 Φουμονισίνες

Η πρώτη φουμονισίνη απομονώθηκε το 1988 από τον μύκητα *Fusarium verticillioides* [24] και έκτοτε έχουν χαρακτηριστεί τουλάχιστον 18 φουμονισίνες. Παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*) και συνιστούν μια ομάδα δομικά παρόμοιων ενώσεων που ταξινομούνται σε τέσσερις υποομάδες, τις Α, Β, C και Ρ. Η φουμονισίνη Β1 (FB1) αντιπροσωπεύει περίπου το 80% των φουμονισινών που απαντώνται σε μολυσμένες τροφές [25] και ανιχνεύεται πολύ συχνά σε

καλαμπόκι, δημητριακά και σιτηρά, όπου αναπτύσσεται κυρίως κατά την καλλιέργειά τους [26].

Η φουμονισίνη Β1 (Εικόνα 1.3) είναι παρόμοιας τοξικότητας με την ωχρατοξίνη Α και έχει επίσης ταξινομηθεί ως πιθανή καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο και τα ζώα (Ομάδα 2B, IARC, 1993, 2002) [12,13]. Οι φουμονισίνες ενοχοποιούνται ότι προκαλούν καρκίνο του οισοφάγου [27], καρκίνο του ήπατος [28], νευρολογικά και καρδιαγγειακά προβλήματα [29].

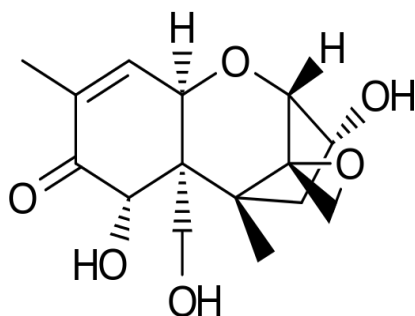


Εικόνα 1.3: Χημική δομή φουμονισίνης Β1 (FB1)

#### 1.1.4 Τριχοθηκίνες

Οι τριχοθηκίνες ή τριχοθηκένια παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, και *F. cerealis*). Η πρώτη τριχοθηκίνη ανακαλύφθηκε το 1949 [30] και απομονώθηκε από τον μύκητα *Trichothecium roseum*, από τον οποίο προήλθε και το όνομα τριχοθηκίνη. Σήμερα, οι τριχοθηκίνες αποτελούν μια ομάδα 190 περίπου ενώσεων, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν καταταχθεί σε τέσσερις υποομάδες (τύπου Α, Β, C και D). Οι κυριότερες υποομάδες είναι οι τύπου Α, οι οποίες είναι οι τοξικότερες, με χαρακτηριστικότερες τις μυκοτοξίνες HT-2 και T2 καθώς και οι τύπου Β, που είναι οι πολυπληθέστερες με κυριότερο εκπρόσωπο τη δεοξυνιβαλενόλη (DON) [31]. Η δεοξυνιβαλενόλη (Εικόνα 1.4) είναι η συχνότερα ανιχνευόμενη τριχοθηκίνη και παράγεται από τα είδη *F. graminearum*, *F. culmorum*, και *F. cerealis* [32]. Ανιχνεύεται συνήθως σε δημητριακά όπως σιτάρι, καλαμπόκι, ρύζι, κριθάρι και βρώμη [33].

Η DON είναι ευρύτερα γνωστή και ως βομιτοξίνη (vomitoxin), εξαιτίας του κυρίου συμπτώματος (έμετος) που προκαλείται στα οικόσιτα ζώα, κυρίως στους χοίρους, από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν αυτή τη μυκοτοξίνη [34]. Η τοξική δράση της DON σχετίζεται με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών και DNA, την παρεμπόδιση των μιτοχονδριακών λειτουργιών καθώς και την παρεμπόδιση διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου και των μεμβρανών [35]. Τα κύρια συμπτώματα από την οξεία τοξικότητα είναι γαστρικές διαταραχές, αδιαθεσία, διάρροια, έμετος και ανορεξία. Σε περιπτώσεις χρόνιας τοξικότητας, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν απώλεια βάρους, ανορεξία και σε ακραίες περιπτώσεις τον θάνατο του οργανισμού. Το 1993 η IARC εκτίμησε ότι η δεοξυनिβαλενόλη ανήκει στην ομάδα 3, δηλαδή χαρακτηρίστηκε ως μη καρκινογόνο μόριο για τους ανθρώπους [12].



Εικόνα 1.4: Χημική δομή δεοξυनिβαλενόλης (DON)

## 1.2 Τοξικότητα και νομοθεσία μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες είναι ιδιαίτερα τοξικές για τον άνθρωπο και τα ζώα, είτε μέσω της οξείας είτε της χρόνιας δράσης τους, μετά από κατανάλωση τροφίμων που τις περιέχουν. Η συνεχής και μακροχρόνια έκθεση του ανθρώπου και των ζώων σε μυκοτοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε μυκοτοξίκωση (mycotoxicosis). Η μυκοτοξίκωση είναι μια παθολογική κατάσταση που εκδηλώνεται με μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων όπως αναπνευστική δυσχέρεια, αναφυλαξία, αλλεργίες, ναυτία, διάρροια, οξείς κοιλιακοί πόνοι, καρδιακή αρρυθμία, προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα, καρκίνοι έως και θάνατο σε ακραίες περιπτώσεις [36]. Σε αντίθεση με τις βακτηριακές τοξίνες, οι μυκοτοξίνες δεν είναι πρωτεΐνες, επομένως, δεν αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Επίσης, ανεξάρτητα από την

τοξικότητα μεμονωμένων ουσιών, μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι, η τοξικότητα ενισχύεται σημαντικά όταν συνυπάρχουν περισσότερες από μία μυκοτοξίνες στο ίδιο δείγμα [37-39].

Η χρόνια τοξικότητα είναι αυτή που εμφανίζεται συχνότερα, λόγω κατανάλωσης μικρών ποσοτήτων μυκοτοξινών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μέσω της χρόνιας τοξικής τους δράση, οι μυκοτοξίνες κατατάσσονται στην πρώτη θέση ως προς την επικινδυνότητα μετά από χρόνια έκθεση ανθρώπων και ζώων σε διάφορες επιβλαβείς ουσίες, ενώ ως προς την οξεία δράση τους, βρίσκονται στην τρίτη θέση μετά από τους μικροβιολογικούς παράγοντες και τις φυκοτοξίνες (Εικόνα 1.5).



**Εικόνα 1.5: Κατάταξη επιβλαβών ουσιών ανάλογα με την επικινδυνότητά τους ως προς την οξεία και χρόνια δράση τους σε άνθρωπο και ζώα μετά την πρόσληψη τροφίμων που περιέχουν αυτές τις ουσίες**

Για την προστασία του ανθρώπου και των ζώων από την οξεία ή τη χρόνια έκθεση σε μία ή περισσότερες μυκοτοξίνες, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (ΕΕ) έχει θεσπίσει από το 2006 μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις κυριότερες μυκοτοξίνες σε διάφορα τρόφιμα [40].

Έτσι λοιπόν, με βάση τον κανονισμό της ΕΕ τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια των αφλατοξινών σε διάφορα τρόφιμα, όπως αράπικα φιστίκια, ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς, δημητριακά και καρυκείματα, κυμαίνονται από 2 μg/kg έως

8 µg/kg για την αφλατοξίνη B1 και από 4 µg/kg έως 15 µg/kg για το σύνολο των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2, ενώ στις παιδικές και βρεφικές τροφές το όριο για την AFB1 είναι 0,10 µg/kg.

Όσον αφορά τον κανονισμό της ΕΕ για την ΟΤΑ, τα ανώτερα επιτρεπτά όρια κυμαίνονται από 2 µg/kg έως 10 µg/kg για τρόφιμα όπως δημητριακά, σταφίδες, κόκκοι καφέ, οίνοι και χυμό σταφυλιού, ενώ το όριο για μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά καθώς και για παιδικές και βρεφικές τροφές είναι 0,50 µg/kg.

Για τις φουμονισίνες τα όρια που έχουν τεθεί από την ΕΕ αφορούν το άθροισμα των B1 και B2 και κυμαίνονται από 400 µg/kg έως 2000 µg/kg για αραβόσιτο και διάφορα τρόφιμα που παράγονται με βάση κυρίως τον αραβόσιτο, ενώ για παιδικές και βρεφικές τροφές το όριο είναι 200 µg/kg.

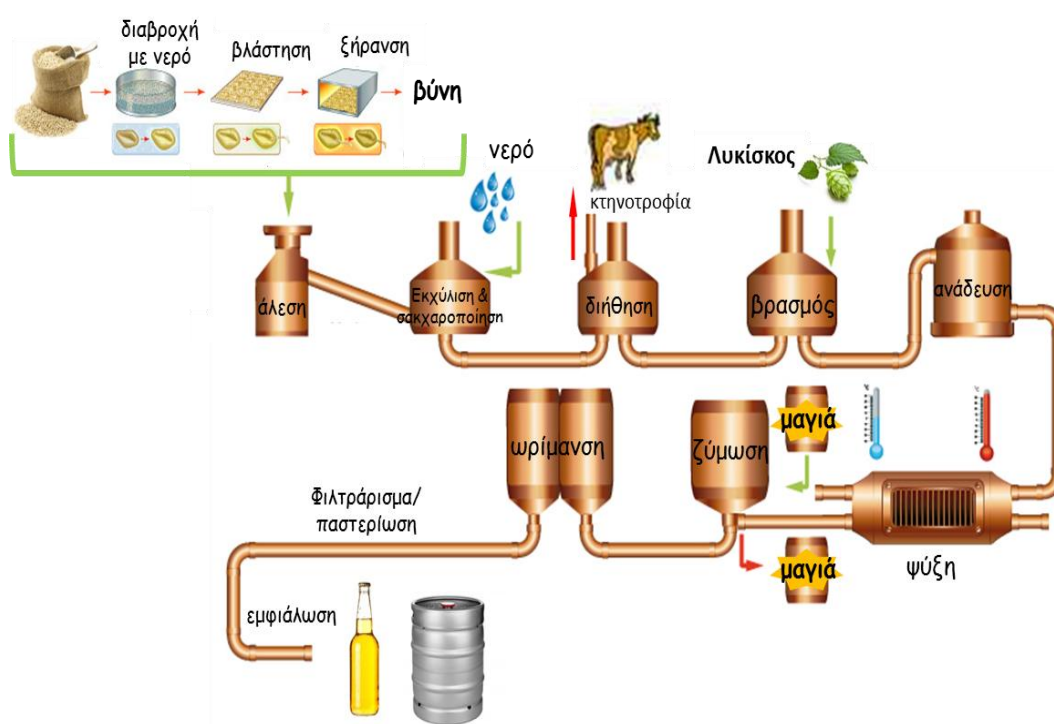
Τέλος, τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης που αφορούν την DON κυμαίνονται από 500 µg/kg έως 1750 µg/kg σε ψωμί, ζυμαρικά, δημητριακά και αραβόσιτο, ενώ για δημητριακά και προϊόντα βρεφικής κατανάλωσης το όριο είναι 200 µg/kg.

### **1.3 Μυκοτοξίνες και μπίρα**

Η μπίρα, ένα από τα πιο δημοφιλή ποτά σε όλο τον κόσμο, είναι το προϊόν που προκύπτει από τη βλάστηση και ξήρανση των σιτηρών για παραγωγή βύνης και εν συνεχεία ζύμωση του αμύλου της βύνης.

Για την παραγωγή κάθε τύπου μπίρας τα απαραίτητα βασικά συστατικά είναι το νερό, η βύνη (malt), ο λυκίσκος και η μαγιά (Εικόνα 1.6). Η βύνη παράγεται από κόκκους σιτηρών που έχουν βλαστήσει υπό συγκεκριμένες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Η βύνη κριθαριού είναι η πιο διαδεδομένη στην ζυθοποίηση, αλλά συχνά χρησιμοποιείται βύνη και από άλλα σιτηρά, όπως σιτάρι, βρώμη, σίκαλη, καλαμπόκι, σόργο ή ρύζι. Η βύνη αποτελεί μια πλούσια πηγή αμυλάσης, η οποία διασπά το άμυλο του κριθαριού και άλλων πρόσθετων δημητριακών για να παραχθούν απλούστερα σάκχαρα που μεταβολίζονται από τη ζύμη κατά το στάδιο της ζύμωσης και ταυτόχρονα καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη γεύση και το χρώμα της μπίρας. Μετά το

στάδιο της βλάστησης, η βύνη αλέθεται και εκχυλίζεται με ζεστό νερό σε μια διαδικασία που ονομάζεται πολτοποίηση (mashing). Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα ένζυμα που προέρχονται από τη βύνη έχουν την υψηλότερη δραστηριότητα και διασπούν τους πολυσακχαρίτες σε μονο- και δισακχαρίτες. Το τελικό εκχύλισμα βύνης διηθείται για να διαχωρισθεί το υγρό τμήμα που ονομάζεται ζυθογλεύκος από τα στερεά μέρη. Τα στερεά υπολείμματα, ένα παραπροϊόν που λαμβάνεται στο στάδιο αυτό, χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή.



**Εικόνα 1.6: Διάγραμμα ροής παραγωγής μπύρας**

Ο ζυθογλεύκος στη συνέχεια βράζει παρουσία του λυκίσκου. Ο λυκίσκος είναι φυτό που καλλιεργείται σε ψυχρά κλίματα και το άνθος του χρησιμοποιείται στη ζυθοποίηση για να δώσει πικράδα, γεύση και άρωμα στη μπύρα, αλλά και ως φυσικό συντηρητικό χάρη στις αντιβιοτικές του ιδιότητες.

Στη συνέχεια, μετά από ψύξη και κατάλληλο αερισμό, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός της ζύμης. Η ζύμη ή αλλιώς μαγιά (yeast) είναι ο

μικροοργανισμός που ευθύνεται για την αλκοολική ζύμωση της μπίρας. Συγκεκριμένα, η μαγιά καταναλώνει τα σάκχαρα του γλεύκος, παράγει αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, μετατρέποντας έτσι το γλεύκος σε μπίρα. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες μαγιάς είναι οι αφροζύμες (ale), που ζυμώνουν το γλεύκος στην επιφάνεια σε θερμοκρασίες 18-23°C και οι βυθοζύμες (lager), που ζυμώνουν στον πυθμένα σε θερμοκρασίες 6-12°C. Ο τύπος μαγιάς και η θερμοκρασία ζύμωσης καθορίζουν την κατηγορία της μπίρας που θα παραχθεί (ale ή lager). Κατά το τελικό στάδιο παραγωγής πραγματοποιείται ωρίμανση της μπίρας, περαιτέρω προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα και εμφιάλωση ή συσκευασία.

**Πίνακας 1.2: Πρόσθετα συστατικά που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή μπίρας και οι αντίστοιχες εμπορικές ονομασίες**

Πρόσθετα Συστατικά	Εμπορική ονομασία μπίρας
Φρούτα	Mild Ale fruity, English brown ale, Scottish ale, Leipziger Gose weisse, Hefeweizen weisse, Belgian wheat, Steam lager, Fruit Lambic, Non Lambic fruit beers
Βότανα	Irish ale, Kruidenbier, Herb & Spice beers
Μπαχαρικά/ Καρυκεύματα	Belgian ale, Bière de Garde Ale, Special Ale, Leipziger Gose weisse, Chili-beer, Kruidenbier, Faro, Herb & Spice beers
Μέλι	Honey beers
Ζάχαρη	English brown ale, Adelaide sparkling ale, Faro
Αλάτι	Leipziger Gose weisse

Πέρα από τα βασικά συστατικά στην παραγωγή της μπίρας προστίθενται και διάφορα άλλα υλικά για να δώσουν στο τελικό προϊόν ιδιαίτερο άρωμα και γεύση, όπως για παράδειγμα φρούτα, βότανα, μπαχαρικά, καρυκεύματα, μέλι, ζάχαρη, ακόμα και αλάτι. Με τον τρόπο αυτό, παρασκευάζονται, παγκοσμίως περισσότεροι από 40.000 τύποι μπίρας (Πίνακας 1.2).



**Πίνακας 1.3: Μεταβολή συγκέντρωσης μυκοτοξινών κατά τη διαδικασία ζυθοποίησης**

Παραγωγική διαδικασία μπύρας	Πιθανή μεταβολή συγκέντρωσης μυκοτοξινών	Αίτιο μεταβολής συγκέντρωσης μυκοτοξινών
διαλογή κόκκων σιτηρών	μείωση	απομάκρυνση μολυσμένων κόκκων και σκόνης
εμποτισμός	μείωση	απομάκρυνση υδατοδιαλυτών τοξινών
βλάστηση	καμία επίδραση	καταστολή ανάπτυξης τοξικογόνων μυκήτων
	αύξηση	ανάπτυξη μυκήτων και παραγωγή μυκοτοξινών
ξήρανση	μείωση	απελευθέρωση συζυγών μορφών
	αύξηση	παραγωγή μυκοτοξινών κατά τις πρώτες ώρες
πολτοποίηση	αύξηση	ενζυματική απελευθέρωση τοξινών από συζεύγματα μυκοτοξινών-πρωτεϊνών
		προσθήκη μολυσμένων πρώτων υλών
βρασμός	καμία επίδραση	μυκοτοξίνες σταθερές
ζύμωση	αύξηση	διάσπαση συζυγών μορφών
	μείωση	απορρόφηση σε κύτταρα ζύμης ή βιομετατροπή
τελική μπύρα	καμία επίδραση	μυκοτοξίνες σταθερές

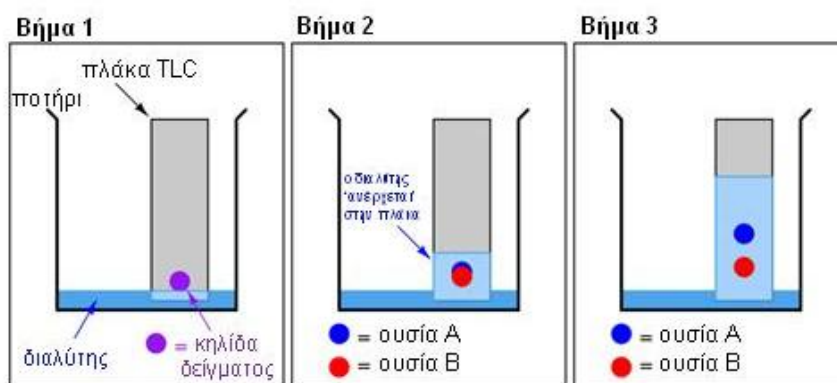
Όπως έχει προαναφερθεί τα σιτηρά και τα δημητριακά είναι τρόφιμα εξαιρετικά ευάλωτα στην επιμόλυνση από μυκοτοξίνες, κυρίως λόγω της ανάπτυξης μυκήτων κατά την καλλιέργεια και αποθήκευση τους. Παράλληλα, το γεγονός ότι οι μυκοτοξίνες διατηρούνται ή/και παράγονται κατά τα διάφορα στάδια παρασκευής ζύθου [41-48], όπως προκύπτει και στον πίνακα 1.3, προκαλεί σημαντική ανησυχία για τις πιθανές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, δεδομένου ότι η μπύρα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

(WHO) είναι το αλκοολούχο ποτό με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως [49].

Λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα μυκοτοξινών που ανιχνεύτηκαν σε αρκετές μπύρες που παράγονται σε όλη την υδρόγειο, ο κίνδυνος, τουλάχιστον για τους λάτρεις της μπύρας, θα μπορούσε να είναι σημαντικός. Για τον λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό των επιπέδων μυκοτοξινών σε όλα τα στάδια παραγωγής και εμφιάλωσης του προϊόντος. Η πλειονότητα των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τα επίπεδα μυκοτοξινών σε μπύρες βασίζονται κυρίως σε μεθόδους LC-MS/MS [44-47] ή ενζυμικούς ανοσοπροσδιορισμούς [48]. Για να μπορέσουμε όμως να ελέγξουμε την παρουσία πολλαπλών μυκοτοξινών στα διάφορα στάδια παρασκευής της μπύρας καθώς και σε μπύρες που παράγονται από μικρές ζυθοποιίες, συσκευές μικρού μεγέθους που να μπορούν να εφαρμοστούν στα σημεία ελέγχου θα ήταν εξαιρετικά ωφέλιμες.

#### **1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών σε τρόφιμα**

Η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών βασιζόταν σε Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) [49-51]. Η TLC εκτελείται σε πλάκες υάλου, πλαστικού ή μετάλλου, οι οποίες επικαλύπτονται με μια λεπτή στρώση προσροφητικού υλικού, συνήθως διοξειδίου του πυριτίου, οξειδίου του αργιλίου ή κυτταρίνης, η οποία αποτελεί τη στατική φάση. Το δείγμα εφαρμόζεται με τη μορφή κηλίδας στο κάτω άκρο της πλάκας και στην συνέχεια ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών, που αποτελεί την κινητή φάση, ανέρχεται στην πλάκα με τριχοειδή κίνηση, παρασύροντας τις ουσίες του δείγματος. Καθώς διαφορετικές ουσίες κινούνται στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα, με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους (Εικόνα 1.7). Η ανίχνευση των ουσιών μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα και γρήγορα με χρήση διαφόρων χρωστικών ή φθορίζουσών ουσιών.

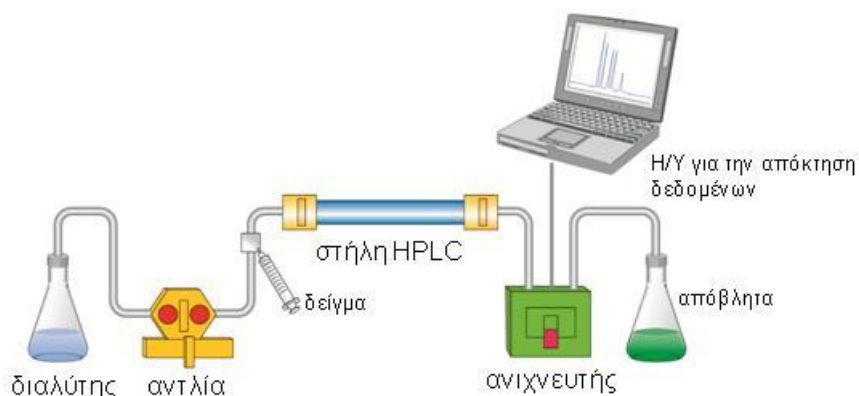


**Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων διαχωρισμού δυο ουσιών Α και Β με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Βήμα 1<sup>ο</sup>: το δείγμα εφαρμόζεται στην πλάκα TLC με τη μορφή κηλίδας (στατική φάση) και η πλάκα τοποθετείται κάθετα σε δοχείο που περιέχει κατάλληλο διαλύτη. Βήμα 2<sup>ο</sup>: ο διαλύτης (κινητή φάση) ανέρχεται στην πλάκα με τριχοειδή κίνηση, παρασύροντας τις ουσίες του δείγματος. Βήμα 3<sup>ο</sup>: οι ουσίες Α και Β κινούνται στην πλάκα με διαφορετικούς ρυθμούς και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους**

Παρόλο που η TLC χαρακτηρίζεται συχνά από χαμηλή ευαισθησία (τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονται συνήθως στα 10-100 ng/mL), επαναληψιμότητα και ικανότητα αυτοματισμού σε σύγκριση με άλλες μεθόδους υγρής χρωματογραφίας [50], εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανάλυσης αρκετών μυκοτοξινών καθώς επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα, με χαμηλό λειτουργικό κόστος και ικανοποιητική ακρίβεια [52-54].

Σήμερα η πλειονότητα των μεθόδων ανάλυσης των μυκοτοξινών βασίζεται σε ενόργανες χρωματογραφικές τεχνικές [55,56]. Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) εφαρμόζεται κατά κόρον για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μυκοτοξινών σε διάφορα δείγματα [9-16]. Στηρίζεται στη χρήση αντλιών προκειμένου να διαβιβαστεί ένας υγρός διαλύτης (κινητή φάση), στη ροή του οποίου εισάγεται το δείγμα, υπό πίεση μέσω μιας στήλης, η οποία έχει πληρωθεί με κατάλληλο προσροφητικό υλικό (στατική φάση). Κάθε συστατικό του δείγματος αλληλεπιδρά διαφορετικά με το προσροφητικό υλικό, με αποτέλεσμα οι ταχύτητες ροής για τα διάφορα συστατικά του

δείγματος να είναι διαφορετικές και με αυτόν τον τρόπο να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους καθώς εξέρχονται από τη στήλη (Εικόνα 1.8).



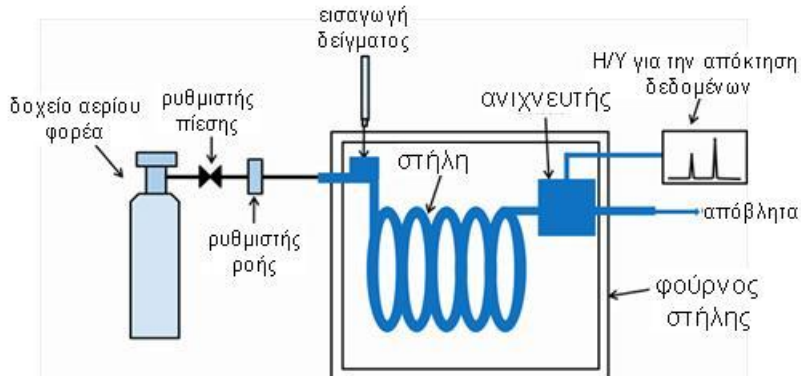
**Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων της οργανολογίας μιας μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)**

Για την ανίχνευση των ουσιών στην έξοδο της στήλης χρησιμοποιούνται συνήθως ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) [57,58] ή φθορισμού (FD) [59-64], οι οποίοι βασίζονται στη παρουσία χρωμοφόρου ομάδας στα προς ανάλυση μόρια. Πολλές μυκοτοξίνες έχουν φυσικό φθορισμό (π.χ. OTA, AFB1) και μπορούν να ανιχνευθούν απευθείας με ανιχνευτή φθορισμού στην έξοδο της στήλης HPLC [65], ενώ άλλες, όπως οι φουμονισίνες, στερούνται κατάλληλης χρωμοφόρου ομάδας και ο προσδιορισμός τους απαιτεί παραγοντοποίηση με κατάλληλα αντιδραστήρια, όπως ο-φθαλδιαλδεΰδη ή 9-(φθορενυλομεθυλο) χλωροφορμικό οξύ [66-68]. Ωστόσο, η μέθοδος ανίχνευσης που χρησιμοποιείται από τα περισσότερα εργαστήρια παγκοσμίως για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών είναι η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS), η οποία αυξάνει τη δυναμική διαχωρισμού και ταυτοποίησης του συστήματος της HPLC [69-75].

Πλέον οι μέθοδοι HPLC-FD και LC-MS χρησιμοποιούνται όχι μόνο ως αναλυτικό σύστημα για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών σε διάφορα δείγματα [76], αλλά αποτελούν τις μεθόδους αναφοράς με τις οποίες συγκρίνονται όλες οι νέες μέθοδοι [77].

Η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) είναι μια ακόμα αναλυτική μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και την

ποσοτικοποίηση των μυκοτοξινών σε δείγματα τροφίμων [78-84]. Στην GC, η κινητή φάση είναι ένα αέριο, συνήθως αδρανές όπως το ήλιο ή το άζωτο, ενώ η στατική φάση είναι ένα λεπτό στρώμα υγρού ή πολυμερούς που έχει προσροφηθεί στο στερεό υπόστρωμα με το οποίο έχει πληρωθεί η στήλη (Εικόνα 1.9). Οι ενώσεις που αναλύονται, αφού το δείγμα εξαερωθεί, αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση στα τοιχώματα της στήλης με αποτέλεσμα κάθε ένωση να εκλούεται από την στήλη σε διαφορετικό χρόνο.



**Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων της οργάνολογίας μιας μεθόδου αέριας χρωματογραφίας (GC)**

Για την ανίχνευση των εκλούομένων ουσιών χρησιμοποιούνται φασματογράφοι μάζας (MS) [78-82], ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (FID) [83] ή ανιχνευτές φασματοσκοπίας υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) [84]. Λόγω του γεγονότος ότι οι περισσότερες μυκοτοξίνες δεν είναι πτητικές πρέπει να παραγοντοποιηθούν πριν την ανάλυση με GC [85]. Για τον λόγο αυτόν έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές για την παραγοντοποίηση των μυκοτοξινών, οι οποίες περιλαμβάνουν χημικές αντιδράσεις όπως σιλανοποίηση (silylation) ή πολυφθοροακυλίωση (polyfluoroacylation), προκειμένου να ληφθεί πτητική ένωση [86,87].

Οι περισσότερες μέθοδοι που βασίζονται σε χρωματογραφικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών περιλαμβάνουν προκατεργασία των δειγμάτων προκειμένου να μειωθεί η επίδραση της μήτρας και να επιτευχθεί σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία ανίχνευσης, καθώς και να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις του πληρωτικού υλικού της στήλης. Συνήθως η προκατεργασία των δειγμάτων περιλαμβάνει υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid

extraction, LLE), αξιοποιώντας την διαφορετική διαλυτότητα της τοξίνης μεταξύ της υδατικής και μιας μη αναμίξιμης οργανικής φάσης, ή εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) όπου χρησιμοποιούνται στήλες πληρωμένες με κατάλληλο προσροφητικό υλικό. Μια μεγάλη ποικιλία προσροφητικών υλικών έχει χρησιμοποιηθεί ως στερεά φάση σε στήλες SPE, όπως πηκτή πυριτίου (silica gel), υλικά ανταλλαγής ιόντων (Immunoaffinity column, IAC) [70], μικροΐνες (hollow microfibers) [73] ή υλικά χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης όπως υλικά με ομάδες οκταδεκυλοσιλανίου (C-18) [74,75]. Το επιπλέον αυτό στάδιο προκατεργασίας του δείγματος αυξάνει την πολυπλοκότητα της μεθόδου, αλλά και την χρονική διάρκεια και το κόστος της ανάλυσης.

Στον πίνακα 1.4 παρουσιάζονται μερικές από τις μεθόδους που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία σχετικά με τον προσδιορισμό μυκοτοξινών σε δείγματα μπύρας χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές. Η πλειοψηφία των αναφορών αφορά μεθόδους υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας και στο σύνολό τους απαιτούν κάποιο είδος προκατεργασίας του δείγματος πριν από το στάδιο της ανάλυσης.

Συνοπτικά, οι χρωματογραφικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης πολλαπλών αναλυτών σε σύνθετα δείγματα. Ωστόσο μπορούν να εφαρμοστούν μόνο σε εργαστηριακό περιβάλλον, από εξειδικευμένο προσωπικό και ως εκ τούτου δεν είναι κατάλληλες για επιτόπιους προσδιορισμούς.

Η ανάγκη για απλούστερες και λιγότερο χρονοβόρες και ακριβές μεθόδους ανάλυσης των μυκοτοξινών οδήγησε στην ανάπτυξη άλλων αναλυτικών μεθοδολογιών, όπως οι ανοσοχημικές τεχνικές και οι βιοαισθητήρες, καθώς αυτές συχνά εφαρμόζονται για άμεσες μετρήσεις με ελάχιστη προκατεργασία του δείγματος και παρέχουν αυξημένη δυνατότητα για μετρήσεις πεδίου μέσω σμίκρυνσης της απαιτούμενης οργανολογίας.

**Πίνακας 2.4: Σύγκριση χρωματογραφικών τεχνικών για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε δείγματα μπίρας**

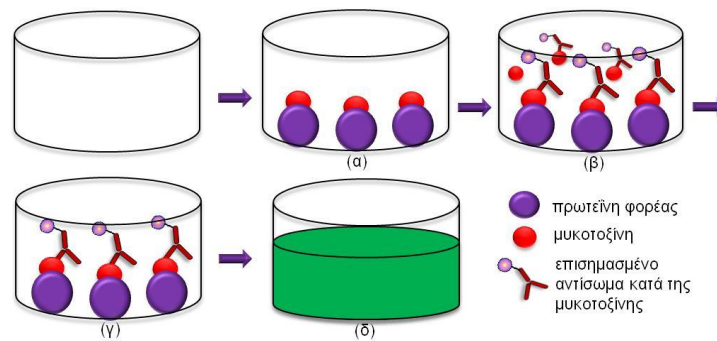
Μυκοτοξίνη	Μήτρα δείγματος	Μέθοδος προκατεργασίας δείγματος	Μέθοδος ανίχνευσης	Ευαισθησία μεθόδου	Αναφορά
OTA	μπύρα, κρασί	δ/α	TLC - φθορισμός	LOD 0.1 μg/mL	Caputo et al. [54]
OTA	σιτάρι, καφέ, μπίρα	SPE	HPLC -ESI-MS/MS	LOD 12 ng/L	Becker et al. [69]
αφλατοξίνες	διάφορα δημητριακά, μπίρα	IAC	HPLC-MS	LOD 1.5-4.7 ng/L	Benesova et al. [70]
OTA/ T-2	αλκοολούχα ποτά	μικροΐνες	UHPLC -MS	LOQ 0.02-0.09 ng/mL	Romero-Gonzalez et al. [73]
διάφορες	μπύρα	C18-SPE	UHPLC-MS	LOQ < 0.5 ng/mL	Romero-Gonzalez et al. [74]
διάφορες	μπύρα	C18-SPE	UHPLC -MS/MS	LOQ 0.25-5.0 ng/mL	Tamura et al. [75]
OTA	μπύρα	LLE	HPLC-FD	LOD 0.005 ng/mL	Medina et al. [88]
OTA	διάφορα, μπίρα	IAC	HPLC-FD	LOD 0.001–0.0544 ng/mL	Belakova et al. [89]
OTA	μπύρα	IAC	HPLC-MS	LOD 0.4 ng/mL	Reinsch et al. [90]
διάφορες	μπύρα, κρασί	SPE	UHPLC -MS/MS	LOD 0.1–10 ng/mL	Al-Taher et al. [91]
διάφορες	μπύρα	LLE	GC-MS/MS	LOD 0.05- 8 ng/mL	Rodríguez-Carrasco et al. [43]
διάφορες	μπύρα	LLE	UHPLC-MS	LOD 1- 8 ng/mL	Zachariasova et al. [44]
DON	μπύρα	LLE	UHPLC-MS/MS	LOD 0.05 ng/mL	Varga et al. [45]
FB1 DON	μπύρα	SPE IAC	HPLC-FD HPLC-UV	LOD 6.6 ng/mL 67 ng/mL	Piacentini et al. [46]
διάφορες	μπύρα	C18-SPE	UHPLC -MS/MS	LOD 0.02 ng/mL	Vishwanath et al. [92]
διάφορες	δημητριακά, μπίρα	LE-C 18-SPE	LCMS/MS	LOD 0.5 ng/mL	Vendl et al. [93]
δ/α: δεν αναφέρεται					

Οι μέθοδοι ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA) για την ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι πολύ δημοφιλείς λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα και της ευκολίας εφαρμογής τους [94-96]. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην ικανότητα ενός συγκεκριμένου αντισώματος να αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη μυκοτοξίνη ή τάξη μυκοτοξινών σε δείγματα που μπορεί να περιέχουν και άλλες μυκοτοξίνες.

Οι εμπορικά διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίες ενζυμικών ανοσοπροσδιορισμών (kits) για την ανίχνευση μυκοτοξινών βασίζονται συνήθως σε ανταγωνιστικού τύπου προσδιορισμούς, όπου ως αντιδραστήρια στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται είτε τα ειδικά αντισώματα, είτε πρωτεϊνικά συζεύγματα των μυκοτοξινών και ως αντιδραστήρια ανίχνευσης χρησιμοποιούνται συζεύγματα ενζύμου-μυκοτοξίνης ή ενζύμου- ειδικού αντισώματος, αντίστοιχα [97-98]. Τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται και στις δυο περιπτώσεις στη στερεά φάση αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με χρωμογόνο υπόστρωμα του ενζύμου προκειμένου να ληφθεί ένα μετρήσιμο αποτέλεσμα με μέτρηση του σήματος της οπτικής απορρόφησης, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης. Τα βασικά στάδια μιας ELISA ανταγωνιστικού τύπου όπου ως αντιδραστήριο στερεάς φάσης χρησιμοποιείται πρωτεϊνικό σύζευγμα μυκοτοξίνης παρουσιάζονται στην εικόνα 1.10.

Υπάρχουν πολλά εμπορικά διαθέσιμα ELISA kit για την ανίχνευση των μυκοτοξινών τα οποία παρέχουν ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα και είναι απλά στη χρήση τους [99,100]. Το μειονέκτημα αυτών των kits έγκειται στο γεγονός ότι είναι για μία μόνο χρήση και στοχεύουν στον προσδιορισμό ενός μόνο αναλύτη, το οποίο αυξάνει το κόστος της ανάλυσης. Επιπλέον, η ανταγωνιστικού τύπου ELISA μειονεκτεί ως προς το εύρος της δυναμικής περιοχής, η οποία εξαρτάται από τα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται [94].





**Εικόνα 1.10: Τα βασικά στάδια μιας ELISA ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών όπου (α) τα φρεάτια επικαλύπτονται με πρωτεϊνικό σύζευγμα της μυκοτοξίνης (στερεά φάση), β) προστίθεται το δείγμα και το επισημασμένο με ένζυμο αντίσωμα κατά της μυκοτοξίνης, γ) μέρος του επισημασμένου αντισώματος δεσμεύεται στα μόρια της στερεάς φάσης, ενώ τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνονται στο στάδιο της έκπλυσης και δ) προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα του ενζύμου για την ανάπτυξη έγχρωμου προϊόντος**

Παράλληλα με τις κλασικές μεθόδους ενζυμοανοσοχημικών ανοσοπροσδιορισμών [47,101], στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ανοσοχημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες χημειοφωταύγειας [102], ή με αντικατάσταση του ένζυμου με φθορίζουσες κβαντικές κουκίδες [103] με στόχο την βελτίωση της αναλυτικής ευαισθησίας ή της δυναμικής περιοχής του ανοσοπροσδιορισμού. Για την ανάλυση πολλαπλών αναλυτών έχουν αναπτυχθεί επίσης ανοσοχημικές τεχνικές που βασίζονται στη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων ως στερεά φάση, τα οποία τροποποιούνται με κατάλληλα αντισώματα και φέρουν στο εσωτερικό τους σήμανση με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες [104], ενώ για ποιοτικά ή ημι-ποσοτικά αποτέλεσμα συνήθως χρησιμοποιούνται ταινίες ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής (immuno-chromatography strips) [105,106] ή στήλες χρωματογραφίας συγγενείας [107], οι οποίες έχουν τα πλεονεκτήματα του σύντομου χρόνου ανάλυσης και της άμεσης ανάγνωσης χωρίς την ανάγκη επιπλέον οργανολογίας.

Οι ανοσοχημικές τεχνικές είναι γενικά εξαιρετικά αξιόπιστες όσον αφορά στον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών, αλλά οι περισσότερες από αυτές είναι αρκετά χρονοβόρες και απαιτούν ειδική οργανολογία για την ανάγνωση των φρεατίων μικροτιποδότησης, με αποτέλεσμα να μην είναι κατάλληλες για

μετρήσεις πεδίου. Η χρήση όμως των αντισωμάτων ως στοιχεία αναγνώρισης με επαφή με ένα σύστημα μεταγωγής του σήματος αποτέλεσε την βασική αρχή πάνω στην οποία στηρίχθηκε η κατασκευή και ανάπτυξη των ανοσοαισθητήρων για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών.

**Πίνακας 1.5: Σύγκριση μεθόδων ELISA και αισθητήρων για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε δείγματα μπύρας**

Μυκοτοξίνη	Μήτρα δείγματος	Μέθοδος προσδιορισμού/ ανίχνευσης	Ευαισθησία μεθόδου	Χρόνος ανάλυσης	Αναφορά
DON	μπύρα	ELISA/ οπτικά	LOD 2.1 ng/mL	δ/α	Bauer et al. [47]
AFB1/ OTA	κρασί, μπύρα	ανταγωνιστική ELISA/ οπτικά	LOD 0.19-0.035 ng/mL	>3 ώρες	Soares et al. [99]
OTA	μπύρα	ανταγωνιστική ELISA/ οπτικά	LOD 1.75 ng/mL	>21 ώρες	Wang et al. [106]
OTA	μπύρα, καφές	ακίνητοποιημένη υπεροξειδάση σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια/ αμπερομετρικά	LOD 0.1-5 ng/mL	δ/α	Alonso-Lomillo et al. [111]
OTA	μπύρα	ανταγωνιστική ανοσοανάλυση σε μαγνητικά σφαιρίδια/ χρωματομετρικά	LOD 0.05 ng/mL	20 λεπτά	Rhouati et al. [112]
φουμονισίνες	μπύρα	ανταγωνιστική μαγνητική ανοσοανάλυση/ ηλεκτροχημικά	LOD 0.33 ng/mL	30 λεπτά	Jodra et al. [113]
DON & OTA	μπύρα	ανταγωνιστική ανοσοανάλυση/ SPR	LOD 17 & 7 ng/mL	15 λεπτά	Joshi et al. [115]

Τα τελευταία χρόνια το πεδίο των βιοαισθητήρων έχει γνωρίσει ραγδαία ανάπτυξη και αυτό οφείλεται κυρίως στην εξέλιξη των τεχνικών κατασκευής τους, στη βελτίωση των συστημάτων μεταγωγής σήματος και στην όλο και αυξανόμενη ανάγκη για την πραγματοποίηση αναλύσεων εκτός των

εργαστηριακών χώρων [108-112]. Έτσι έχει αναφερθεί η ανάπτυξη και εφαρμογή ανοσοαισθητήρων που βασίζονται στις αρχές της ηλεκτροχημικής [111,113] ή οπτικής μεταγωγής σήματος [114-115] για την ανίχνευση μυκοτοξινών σε διάφορα είδη τροφίμων με εξαιρετικές αναλυτικές επιδόσεις.

Στον πίνακα 1.6 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των ανοσοαισθητήρων που έχουν παρουσιαστεί στην βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών σε δείγματα μπίρας. Όπως παρατηρούμε, οι περισσότεροι από αυτούς τους αισθητήρες αφορούν τον προσδιορισμό ενός μόνο αναλύτη, ενώ πολύ λίγοι αφορούν τον προσδιορισμό πολλαπλών αναλυτών [113,115]. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί παρέχεται μια πιο εκτενής περιγραφή των κυριότερων ειδών αισθητήρων.

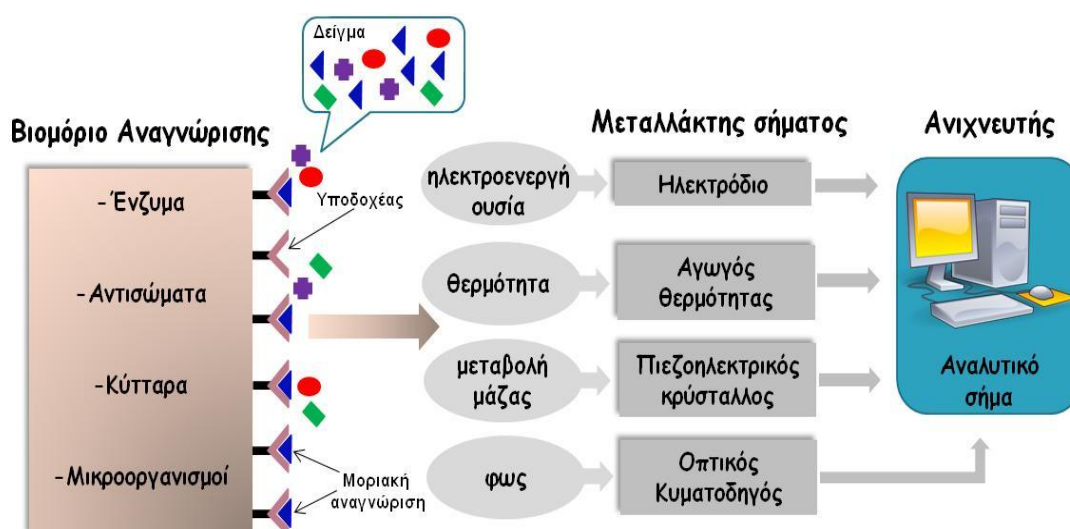


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

#### 2.1 Γενικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων

Βιοαισθητήρες ονομάζονται οι ολοκληρωμένες διατάξεις που παρέχουν αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας βιομόρια αναγνώρισης σε άμεση χωρική επαφή με έναν μεταλλάκτη σήματος [116,117]. Τα βιομόρια αναγνώρισης, ακινητοποιημένα και ενσωματωμένα σε συγκεκριμένο τμήμα του αισθητήρα, αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με την προς ανάλυση ουσία (δείγμα), προκαλώντας μεταβολή μιας φυσικοχημικής παραμέτρου όπως θερμότητα, φως, ήχος, πίεση ή μαγνητισμός. Τη μεταβολή αυτή, ο μεταλλάκτης μετατρέπει σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης της προς ανάλυση ουσίας, το οποίο μέσω του ανιχνευτή καταλήγει στη μονάδα επεξεργασίας (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της γενικής διάταξης ενός βιοαισθητήρα

Η ιδιαιτερότητα των βιοαισθητήρων συγκριτικά με άλλες αναλυτικές συσκευές έγκειται στο γεγονός ότι συνδυάζουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων με την επιλεκτικότητα των βιολογικών μηχανισμών αναγνώρισης. Έχουν την δυνατότητα να παρέχουν μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο, προσδιορισμούς

χωρίς τη χρήση ιχνηθετών (label-free determinations) και κατά περίπτωση ταυτόχρονο προσδιορισμό αναλυτών στο ίδιο δείγμα (multi-analyte determinations). Κυρίως όμως, παρέχουν αυξημένες δυνατότητες σμίκρυνσης της απαιτούμενης οργανολογίας και ως εκ τούτου προσφέρονται για την κατασκευή φορητών διατάξεων για τη μεταφορά κλασσικών αναλυτικών τεχνικών από το χώρο του εργαστηρίου στο πεδίο (Point of Need application, PoN). Επίσης σημαντικό πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων είναι η απλοποίηση της διαδικασίας της ανάλυσης σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν συνήθεις αναλύσεις και από μη εξειδικευμένο προσωπικό.

## 2.2 Είδη βιοαισθητήρων

Οι Clark και Lyons με την δημοσίευσή τους το 1962 υπήρξαν οι πρώτοι που ανέφεραν την κατασκευή ενός ενζυμικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό γλυκόζης, χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο οξειδίου σε συνδυασμό με ημιπερατές μεμβράνες για τον εγκλεισμό οξειδάσης της γλυκόζης [118]. Έκτοτε οι εξελίξεις στον τομέα τόσο της βιοαναλυτικής χημείας όσο και της μικροηλεκτρονικής τεχνολογίας οδήγησαν στη δημιουργία πληθώρα βιοαισθητήρων και πλέον στις μέρες μας διατίθεται ένα ευρύ φάσμα βιολογικών μορίων αναγνώρισης, καθώς επίσης και μεγάλη ποικιλία μεταλλακτών σήματος. Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι διάφορες κατηγορίες αισθητήρων με βάση είτε το είδος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης είτε το είδος του μεταλλάκτη σήματος.

**Πίνακας 2.1: Κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων με βάση το είδος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης ή του μεταλλάκτη που χρησιμοποιείται**

<b>Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης</b>	<b>Προσδιοριζόμενη ουσία</b>
Βιοαισθητήρες κατάλυσης - Ενζυμικοί - Κυττάρων-ιστών-μικροοργανισμών	υπόστρωμα ενζύμου ειδικές κυτταρικές πρωτεΐνες
Βιοαισθητήρες συγγένειας - DNA, RNA - Ανοσοχημικοί	συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων αντισώματα, αντιγόνα

Τύπος μεταλλάκτη	Μετρούμενη παράμετρος
Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες	φορτίο, τάση, ρεύμα, ηλεκτρικό πεδίο, ηλεκτρική αγωγιμότητα, διηλεκτρική σταθερά
Πιεζοηλεκτρικοί ή Ακουστικοί αισθητήρες	κύματα (πλάτος, φάση, πόλωση), φάσμα, ταχύτητα κύματος
Θερμιδομετρικοί αισθητήρες	θερμοκρασία, ειδική θερμότητα, θερμική αγωγιμότητα
Οπτικοί αισθητήρες	οπτικές ιδιότητες (απορρόφηση, εκπομπή, ανάκλαση, διάθλαση)

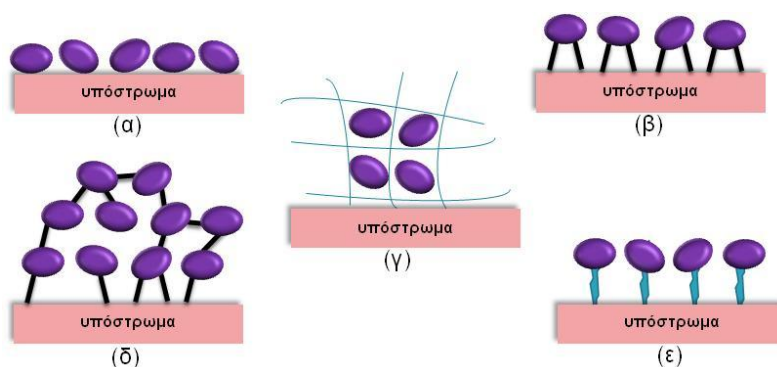
### 2.2.1 Κατηγοριοποίηση βιοαισθητήρων βάσει του μορίου αναγνώρισης

Βασικό στάδιο για την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα είναι η επιλογή του κατάλληλου μορίου αναγνώρισης που έχει την απαιτούμενη συγγένεια και εκλεκτικότητα με την προς ανάλυση ουσία, ώστε να επιτευχθούν η απαιτούμενη ευαισθησία και η ειδικότητα της ανάλυσης. Το κατάλληλο βιομόριο αναγνώρισης ακινητοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα, πολύ κοντά ή σε επαφή με τον μεταλλάκτη σήματος. Η ακινητοποίηση των βιομορίων θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να μην υπάρχει κατά το δυνατόν απώλεια της δραστηκότητάς τους ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να την διατηρεί για επαρκές χρονικό διάστημα μετά την ακινητοποίηση, ώστε ο αισθητήρας να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επαρκές διάστημα μετά την παρασκευή του. Τα αποτελέσματα από την τροποποίηση θα πρέπει να είναι επαναλήψιμα και ιδανικά να εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα [119-122].

Οι τεχνικές ακινητοποίησης των βιομορίων αναγνώρισης περιλαμβάνουν τις φυσικές μεθόδους, όπου η ακινητοποίηση γίνεται χωρίς τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών, μέσω φυσικής προσρόφησης ή εγκλεισμού, τις χημικές μεθόδους, όπου μεταξύ βιομορίων αναγνώρισης και της επιφάνειας του αισθητήρα σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί και τις υβριδικές τεχνικές, οι οποίες είναι συνδυασμός φυσικών και χημικών τεχνικών (Εικόνα 2.2).

Η ακινητοποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης στην επιφάνεια του αισθητήρα επιτυγχάνεται εφόσον υπάρχει συγγένεια μεταξύ του υλικού της επιφάνειας

και του βιομορίου και λαμβάνει χώρα μέσω ασθενών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δυνάμεων van der Waals, δεσμών υδρογόνου και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 2.2α) [120]. Ένας άλλος τρόπος φυσικής ακινητοποίησης είναι ο εγκλεισμός του βιομορίου αναγνώρισης εντός της τρισδιάστατης δομής πολυμερικών υλικών, κατά τη διάρκεια πολυμερισμού που μπορεί να λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του μεταλλάκτη. Το πολυακρυλαμίδιο, τα ελαστομερή, το άμυλο, το άγαρ, είναι κάποια από τα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιούνται (Εικόνα 2.2γ) [121].



**Εικόνα 2.2: Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων σε επιφάνειες μέσω (α) φυσικής προσρόφησης, (β) απευθείας ομοιοπολικής σύνδεσης, (γ) εγκλεισμού, (δ) ομοιοπολικής σύνδεσης με δημιουργία διαμοριακών δεσμών ή (στ) δεσμών συγγενείας**

Στις χημικές μεθόδους ακινητοποίησης τα βιομόρια προσδένονται στην επιφάνεια του αισθητήρα με ομοιοπολικούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ δραστικών ομάδων της επιφάνειας του αισθητήρα και δραστικών ομάδων των βιομορίων (Εικόνα 2.2β) [119,122]. Μία διαδεδομένη μέθοδος χημικής ακινητοποίησης βιομορίων αναγνώρισης περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός διακλαδισμένου πολυμερούς που προκύπτει από την αντίδραση των βιομορίων με ένα διλειτουργικό αντιδραστήριο όπως είναι η γλουταραλδεΐδη (Εικόνα 2.2δ). Η γλουταραλδεΐδη δημιουργεί διαμοριακές διασταυρούμενες συνδέσεις τόσο μεταξύ των βιομορίων αναγνώρισης όσο και μεταξύ ενός βιομορίου και ενός άλλου πρωτεϊνικού μορίου, όπως η αλβουμίνη, αλλά και μεταξύ του βιομορίου και δραστικών ομάδων στην επιφάνεια του αισθητήρα [120].



Μια άλλη επίσης διαδεδομένη μέθοδος χημικής ακινητοποίησης βιομορίων αναγνώρισης βασίζεται στη δημιουργία δεσμών συγγένειας μεταξύ μιας λειτουργικής ομάδας ή μορίου του υποστρώματος (π.χ. αβιδίνη, λεκτίνη, μέταλλο χηλικές ενώσεις) και μιας ειδικής ομάδας που φέρει το βιομόριο (π.χ. βιοτίνη, υδατάνθρακες, ιστιδίνη). Οι αλληλεπιδράσεις συγγένειας επιτρέπουν τη δημιουργία εξαιρετικά διατεταγμένων δομών στο υπόστρωμα του βιοαισθητήρα (Εικόνα 2.2ε) [122].

Γενικά, η μέθοδος ακινητοποίησης που επιλέγεται εξαρτάται τόσο από το βιομόριο αναγνώρισης όσο και από το υλικό της επιφάνειας του αισθητήρα και θα πρέπει να επιλέγεται με γνώμονα τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα από βιολογικά μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο γενικές ομάδες, τη βιοκαταλυτική ομάδα και την ομάδα αντίδρασης συγγένειας [123,124]. Στη βιοκαταλυτική ομάδα ανήκουν μόρια όπως ένζυμα, ολόκληρα κύτταρα, μιτοχόνδρια και ιστοί και η παράμετρος που ανιχνεύεται βασίζεται στην αλλαγή της συγκέντρωσης ενός συστατικού ως αποτέλεσμα μιας καταλυτικής αντίδρασης. Για παράδειγμα μετρώντας τη συγκέντρωση του προϊόντος μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορούμε να παρακολουθήσουμε την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Στην ομάδα των αντιδράσεων συγγένειας ανήκουν τα νουκλεϊκά οξέα, τα αντισώματα και οι κυτταρικοί υποδοχείς και στην περίπτωση αυτή καταγράφεται η εκλεκτική σύνδεση της προς ανάλυση ουσίας στο ακινητοποιημένο στον αισθητήρα βιομόριο. Έτσι, για παράδειγμα όταν χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς αντισώματα, η απευθείας ανίχνευση της αντίδρασης δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να γίνει μέσω φυσικοχημικών μεταβολών στην επιφάνεια του αισθητήρα, όπως μεταβολές του δείκτη διάθλασης του διαλύματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δέσμευσης. Σε κάθε περίπτωση, ο βιοαισθητήρας αξιοποιεί τη δυνατότητα εκλεκτικής σύνδεσης που χαρακτηρίζει τα βιομόρια.

Έτσι λοιπόν, ανάλογα με το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, οι βιοαισθητήρες κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Ενζυμικοί βιοαισθητήρες: Στην κατηγορία αυτή ως μόρια αναγνώρισης χρησιμοποιούνται ένζυμα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του αισθητήρα για τον προσδιορισμό των αντίστοιχων υποστρωμάτων ή ενεργοποιητών/παρεμποδιστών των ακινητοποιημένων ενζύμων.
- Βιοαισθητήρες κυττάρων– ιστών– μικροοργανισμών: Στους αισθητήρες αυτούς ο προσδιορισμός βασίζεται συνήθως στον μεταβολισμό της προσδιοριζόμενης ουσίας από τα αντίστοιχα κύτταρα ή μικροοργανισμούς.
- Βιοαισθητήρες DNA: Οι βιοαισθητήρες αυτοί βασίζονται στην αλληλεπίδραση νουκλεϊνικών οξέων στο προς ανάλυση δείγμα με συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων ακινητοποιημένες στην επιφάνεια των αισθητήρων.
- Ανοσοχημικοί βιοαισθητήρες ή Ανοσοαισθητήρες: Ως βιομόριο αναγνώρισης χρησιμοποιείται κάποιο αντίσωμα ή αντιγόνο. Ο προσδιορισμός μπορεί να γίνει είτε με μέτρηση κάποιας παραμέτρου που σχετίζεται με την ίδια την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, όπως η μεταβολή του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητήρα λόγω της μεταβολής του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας, είτε με παρακολούθηση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος με χρήση επισημασμένων μορίων. Οι ανοσοαισθητήρες βασίζονται στις ίδιες αρχές με τους κλασσικούς ανοσοπροσδιορισμούς και ως εκ τούτου η ευαισθησία και η εξειδίκευσή τους εξαρτάται από το αντίσωμα που χρησιμοποιείται και τη αναλυτική ευαισθησία του συστήματος ανίχνευσης.

### **2.2.2 Κατηγοριοποίηση βιοαισθητήρων βάσει του μεταλλάκτη σήματος**

Μια άλλη κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων γίνεται με βάση τη μετρούμενη φυσικοχημική παράμετρο που παρακολουθείται και ως εκ τούτου βάσει του μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται. Με τον τρόπο αυτό οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, πιεζοηλεκτρικούς, οπτικούς και θερμοδομετρικούς.

### A) Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Η λειτουργία τους βασίζεται στη μέτρηση ενός ηλεκτρικού μεγέθους, όπως το δυναμικό, το ρεύμα ή το φορτίο. Συνήθως το στοιχείο αναγνώρισης είναι ένα ένζυμο ή ένα αντίσωμα και ο μεταλλάκτης ένα ηλεκτρόδιο [113,125-129]. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες χαρακτηρίζονται από χαμηλού κόστους οργανολογία και αυξημένη δυνατότητα σμίκρυνσης. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι είναι οι αμπερομετρικοί, οι ποτενσιομετρικοί και οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες.

- Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες: Στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες μετρείται η ένταση ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου εργασίας. Υπό μια σταθερά εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού το ηλεκτρόδιο μετρά το ρεύμα που παράγεται κατά τη διάρκεια μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας [111,130,131]. Ο πρώτος βιοαισθητήρας γλυκόζης που αναπτύχθηκε από τον Clark βασίζεται σε αυτή την αρχή λειτουργίας [118].
- Ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες: Βασίζονται στη μέτρηση διαφοράς δυναμικού. Συνήθως το βασικό στοιχείο αναγνώρισης είναι μια εκλεκτική μεμβράνη ιόντων, η οποία δημιουργεί διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της, όταν καθεμία από τις πλευρές έλθει σε επαφή με ηλεκτρολυτικά διαλύματα που περιέχουν το ιόν για το οποίο η συγκεκριμένη μεμβράνη είναι εκλεκτική [132].
- Αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες: Οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής της αγωγιμότητας λόγω μεταβολής της συγκέντρωσης ιονικών ενώσεων [133].

### B) Πιεζοηλεκτρικοί ή Ακουστικοί βιοαισθητήρες

Οι Πιεζοηλεκτρικοί ή Ακουστικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην αλλαγή της συχνότητας συντονισμού ενός κύματος, το οποίο διαδίδεται μέσω ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού. Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο περιγράφει την ιδιότητα συγκεκριμένων κρυσταλλικών υλικών να δονούνται σε συγκεκριμένη συχνότητα όταν εφαρμοστεί σε αυτά μια διαφορά δυναμικού [134,135].

Βασιζόμενοι σε αυτή την αρχή είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για να μετρήσουν αλλαγές στη μάζα, στο ιξώδες ή στην πυκνότητα στην επιφάνεια του αισθητήρα. Οι πιεζοηλεκτρικοί μετατροπείς διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τους μετατροπείς διάδοσης μαζικού ακουστικού κύματος (Bulk Acoustic Wave, BAW) ή επιφανειακού ακουστικού κύματος (Surface Acoustic Wave, SAW). Στους πρώτους, ένας κρυσταλλικός συντονιστής, συνήθως χαλαζίας (quartz), συνδέεται με έναν ενισχυτή για το σχηματισμό ενός ταλαντωτή, του οποίου η συχνότητα συντονισμού είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων των μορίων που εφάπτονται σ' αυτόν. Οι δεύτεροι βασίζονται στη διάδοση ενός SAW κατά μήκος ενός υποστρώματος, του οποίου οι ιδιότητες καθώς και οι μεταβολές που συμβαίνουν στην επιφάνεια του επηρεάζουν τις απώλειες διάδοσης και τη φασική ταχύτητα του κύματος [136-138].

#### Γ) Θερμιδομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι θερμιδομετρικοί βιοαισθητήρες μετρούν τη θερμότητα μιας βιοχημικής αντίδρασης. Αυτές οι συσκευές μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τον τρόπο που μεταφέρεται η θερμότητα. Ο πιο συνηθισμένος θερμιδομετρικός μετατροπέας είναι ο ισοπεριβολικός (isoperibol), που μετρά τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αντιδρώντος βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης θερμικά μονωμένου και ενός ισοθερμικού καλύμματος που το περιβάλλει [139].

#### Δ) Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην επίδραση μιας βιολογικής μεταβολής σε ένα ή περισσότερα από τα βασικά χαρακτηριστικά της οπτικής ακτινοβολίας (απορρόφηση, ανάκλαση, διάθλαση, σκέδαση, φθορισμό/ φωσφορισμό) κατά την πρόσδεση της προς ανίχνευση ουσίας στο ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του αισθητήρα βιομόριο αναγνώρισης. Η ανάπτυξη των οπτικών βιοαισθητήρων συνδυάστηκε με τις εξελίξεις στον τομέα των οπτικών κυματοδηγών- οπτικών ινών στους οποίους και βασίστηκαν οι πρώτοι οπτικοί αισθητήρες [140-141].

Η ανίχνευση των βιοαντιδράσεων στους οπτικούς βιοαισθητήρες μπορεί είτε να βασίζεται στη χρήση ιχνηθετών (συνήθως φθορίζόντων ουσιών) [142], είτε

να πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση ιχνηθετών (label-free) [143]. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες φθορίζουσες ουσίες τα μόρια στόχος ή τα βιομόρια αναγνώρισης επισημαίνονται με αυτές τις ουσίες και η ένταση του φθορισμού που ανιχνεύεται υποδεικνύει την παρουσία των μορίων-στόχων και την αλληλεπίδραση τους με τα βιομόρια αναγνώρισης. Παρότι η ανίχνευση που βασίζεται σε ιχνηθέτες φθορισμού είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, η διαδικασία της επισήμανσης μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα του σημασμένου βιομορίου, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει το κόστος της ανάλυσης [144]. Αντιθέτως, όταν η ανίχνευση πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση ιχνηθετών, τα μόρια-στόχοι ή τα βιομόρια αναγνώρισης δεν επισημαίνονται και ανιχνεύονται στη φυσική τους κατάσταση. Επιπλέον, αυτός ο τρόπος ανίχνευσης επιτρέπει την παρακολούθηση της κινητικής των βιοαντιδράσεων και συνήθως υπερτερεί των μεθόδων που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες τόσο ως προς τον χρόνο όσο και ως προς το κόστος της ανάλυσης [145].

Καθώς ο αισθητήρας που αναπτύσσεται στην παρούσα διατριβή ανήκει στην κατηγορία των οπτικών αισθητήρων που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες ακολουθεί μια πιο διεξοδική περιγραφή των αρχών λειτουργίας των βιοαισθητήρων που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών.

### **2.3 Είδη οπτικών βιοαισθητήρων που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών**

Στην κατηγορία των οπτικών βιοαισθητήρων που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών περιλαμβάνονται αισθητήρες που βασίζονται σε διάφορες μεθόδους ανίχνευσης όπως μεταβολές του δείκτη διάθλασης (Refractive Index, RI), μεταβολές της οπτικής απορρόφησης, καθώς επίσης και στη φασματοσκοπία Raman [146]. Ένεκα που η αισθητήρια διάταξη της παρούσας διατριβής εμπίπτει στη κατηγορία της ανίχνευσης χωρίς την χρήση ιχνηθετών με βάση το δείκτη διάθλασης, παρακάτω παρατίθενται οι βασικότεροι βιοαισθητήρες που εμπίπτουν στην κατηγορία αυτή.

Σε έναν οπτικό βιοαισθητήρα στον οποίο η ανίχνευση βασίζεται σε μεταβολές του RI, τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του αισθητήρα βιομόρια

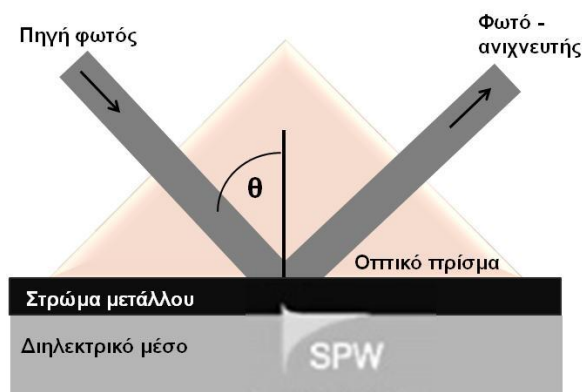
αναγνώρισης, όπως αντισώματα ή ολιγονουκλεοτίδια αντιδρούν με τα μόρια-στόχο αυξάνοντας το πάχος ή/και την πυκνότητα της στοιβάδας πολύ κοντά στην επιφάνεια του αισθητήρα. Καθώς το φως διατρέχει τον οπτικό κυματοδηγό δημιουργεί ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μέσω της ολικής εσωτερικής ανάκλασης, η ένταση του οποίου μειώνεται εκθετικά με την απόσταση του μέσου πάνω από την επιφάνεια του κυματοδηγού (evanescent wave field). Συνήθως η ένταση του πεδίου εκτείνεται σε μια απόσταση που κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως μερικές εκατοντάδες νανόμετρα, ανάλογα με το υλικό και τη γεωμετρία του κυματοδηγού και είναι πολύ ευαίσθητο στις αλλαγές του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του κυματοδηγού.

Ως εκ τούτου, αλλαγές του RI που προκαλούνται από τη δέσμευση του αναλύτη στην επιφάνεια του κυματοδηγού ανιχνεύονται μέσω αλληλεπίδρασης με αυτό το πεδίο και καταγράφονται ως μεταβολές στην ένταση, τη φάση ή την πόλωση του κυματοδηγούμενου φωτός, ενώ μόρια που δεν δεσμεύονται στα βιομόρια αναγνώρισης και βρίσκονται στο μέσο μακριά από την επιφάνεια του κυματοδηγού συνεισφέρουν πολύ λίγο στο σήμα [147]. Οι πιο διαδεδομένοι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε αυτό το φαινόμενο είναι οι βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SRP), οι συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες, οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας ανακλαστικής συμβολής και οι βιοαισθητήρες συντονισμού δακτυλίων, οι αρχές λειτουργίας των οποίων αναλύονται στις επόμενες ενότητες.

### **2.3.1 Βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SRP)**

Οι βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1983 από τους Liedberg et al. [148]. Οι βιοαισθητήρες αυτού του τύπου βασίζονται στη διέγερση των επιφανειακών πλασμονίων ενός μετάλλου λόγω ταλάντωσης της πυκνότητας του φορτίου που λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια δύο μέσων με διηλεκτρικές σταθερές αντίθετων σημείων, όπως είναι το μέταλλο (χρυσός ή άργυρος) και ένα διηλεκτρικό υλικό στο οποίο είναι ακινητοποιημένα τα βιομόρια αναγνώρισης (Εικόνα 2.3). Αποτέλεσμα αυτής της ταλάντωσης είναι η δημιουργία ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος το οποίο διαδίδεται κατά μήκος

της διεπιφάνειας. Η διέγερση των πλασμονίων επιτυγχάνεται με χρήση ενός οπτικού πρίσματος, μίας οπτικής ίνας ή άλλου οπτικού κυματοδηγού για τη καθοδήγηση της οπτικής δέσμης στη μεσεπιφάνεια μετάλλου/διηλεκτρικού. Η ανίχνευση της αλλαγής στο συντονισμό των επιφανειακών πλασμονίων που προκαλείται από τη δέσμευση των μορίων-στόχων στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα επιτυγχάνεται παρακολουθώντας τη γωνία συντονισμού  $\theta$  [149-152].



Εικόνα 2.3: Σχηματική παράσταση ενός αισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) με χρήση οπτικού πρίσματος

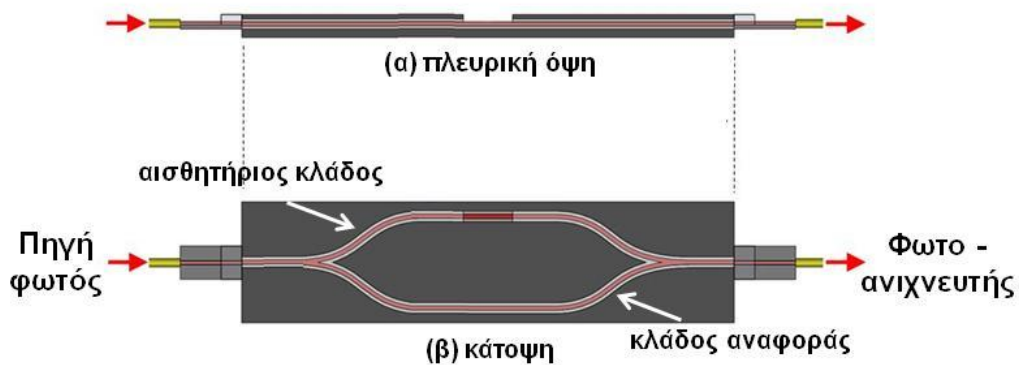
### 2.3.2 Συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι κυριότερες διατάξεις συμβολομετρικών αισθητήρων είναι τα συμβολόμετρα Mach-Zehnder και Young.

#### ➤ Συμβολόμετρο Mach-Zehnder

Το συμβολόμετρο τύπου Mach-Zehnder αποτελείται από έναν οπτικό κυματοδηγό που διαχωρίζεται σε δύο κλάδους, τον αισθητήριο κλάδο και τον κλάδο αναφοράς, οι οποίοι μετά από ορισμένη απόσταση επανενώνονται (Εικόνα 2.4). Ο αισθητήριος κλάδος τροποποιείται με κατάλληλο βιομόριο αναγνώρισης, ενώ ο κλάδος αναφοράς είναι καλυμμένος με ένα προστατευτικό στρώμα διηλεκτρικού υλικού. Κατά τη δέσμευση του αναλύτη από το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του αισθητήριου κλάδου βιομόριο αναγνώρισης προκαλείται μεταβολή του φαινομένου δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητήριου κλάδου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η φάση του κυματοδηγούμενου μέσα από αυτόν φωτός σε σχέση με τον κλάδο

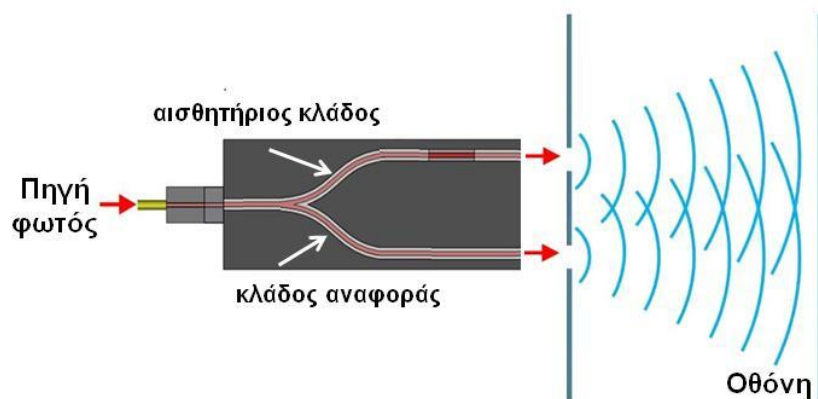
αναφοράς. Έτσι κατά τη συμβολή των δύο κλάδων δημιουργείται ένα ημιτονοειδές φάσμα συμβολής το οποίο μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της βιοαντίδρασης λόγω της μεταβολής του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητήριου κλάδου [153-155].



Εικόνα 2.4: Σχηματική παράσταση (α) πλευρικής όψης και (β) κάτοψης ενός συμβολόμετρου Mach-Zehnder (MZI)

➤ Συμβολόμετρο Young

Το συμβολόμετρο Young αποτελεί παραλλαγή του συμβολομέτρου Mach-Zehnder. Στο συμβολόμετρο Young το φως που εξέρχεται από τους δύο κλάδους συμβάλλει εκτός του κυματοδηγού δημιουργώντας κροσσούς συμβολής, οι οποίοι καταγράφονται σε μια οθόνη ανίχνευσης (Εικόνα 2.5). Η απόκλιση μεταξύ των δύο οπτικών δεσμών που προκαλείται από τις μεταβολές που έχουν λάβει χώρα στον αισθητήριο κλάδο έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των κροσσών συμβολής [156-158].

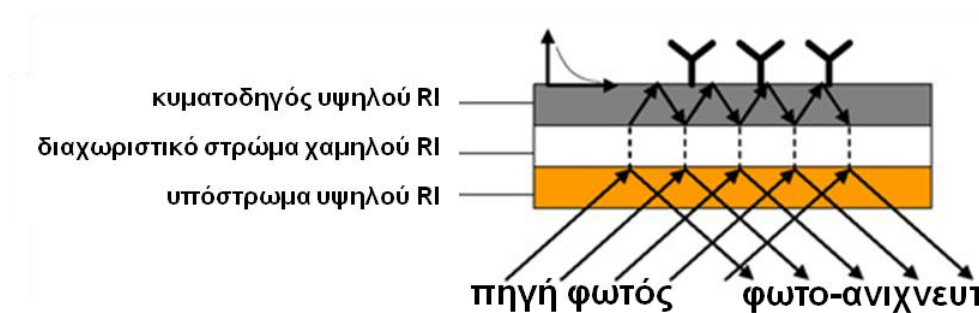


Εικόνα 2.5: Σχηματική παράσταση συμβολομέτρου Young



### 2.3.3 Βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας ανακλαστικής συμβολής

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.6, στη φασματοσκοπία ανακλαστικής συμβολής (Reflectometric Interference Spectroscopy, RIfS) ο κυματοδηγός υψηλού RI και το υπόστρωμα υψηλού RI διαχωρίζονται από ένα διηλεκτρικό στρώμα χαμηλού δείκτη. Η δέσμη φωτός ανακλάται μερικώς σε κάθε διεπιφάνεια και υπό κατάλληλη γωνία μπορεί να συζευχθεί με το στρώμα του κυματοδηγού υψηλού RI. Κατά την έξοδο του φωτός από τον κυματοδηγό λαμβάνει χώρα καταστρεπτική ή ενισχυτική συμβολή η οποία εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης του φωτός, το μήκος κύματος, το φυσικό πάχος του διαχωριστικού στρώματος και το δείκτη διάθλασής του. Έτσι στην έξοδο του κυματοδηγού καταγράφεται ένα φάσμα συμβολής, το οποίο μεταβάλλεται όταν το μόριο-στόχος αντιδράσει με το ακινητοποιημένο βιομόριο αναγνώρισης λόγω μεταβολής του δείκτη διάθλασης [159-161].

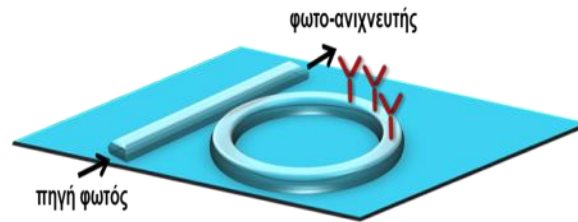


Εικόνα 2.6: Σχηματική παράσταση βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανακλαστικής συμβολής μεταξύ υλικών διαφορετικού δείκτη διάθλασης (RI)

### 2.3.4 Βιοαισθητήρες συντονισμού δακτυλίων

Σε έναν αισθητήρα συντονισμού δακτυλίων (Εικόνα 2.7) το φως διαδίδεται με τη μορφή κυμάτων whispering-gallery modes (WGMs) που προκύπτουν από την ολική εσωτερική ανάκλαση του φωτός κατά μήκος μιας κοίλης επιφάνειας, μεταξύ δυο μέσων, ενός υψηλού και ενός χαμηλού δείκτη διάθλασης. Η πρόσδεση των μορίων στην επιφάνεια του δακτυλίου έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του δείκτη διάθλασης του υπερκείμενου στρώματος και την μετατόπιση των κορυφών συντονισμού. Σε αντίθεση με τους ευθείς κυματοδηγούς, το πραγματικό μήκος αλληλεπίδρασης φωτός-αναλυτή ενός αισθητήρα συντονισμού δακτυλίων δεν προσδιορίζεται πλέον από το φυσικό

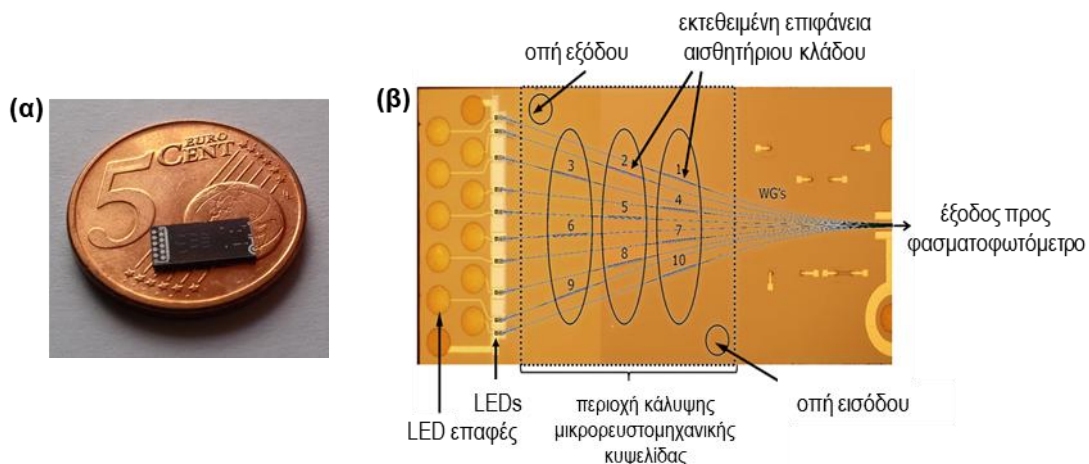
μέγεθος του αισθητήρα, αλλά από τον αριθμό των περιστροφών του φωτός στον κυματοδηγό στη μονάδα του χρόνου [162-164].



Εικόνα 2.7: Σχηματική παράσταση βιοαισθητήρα συντονισμού οπτικού δακτυλίου

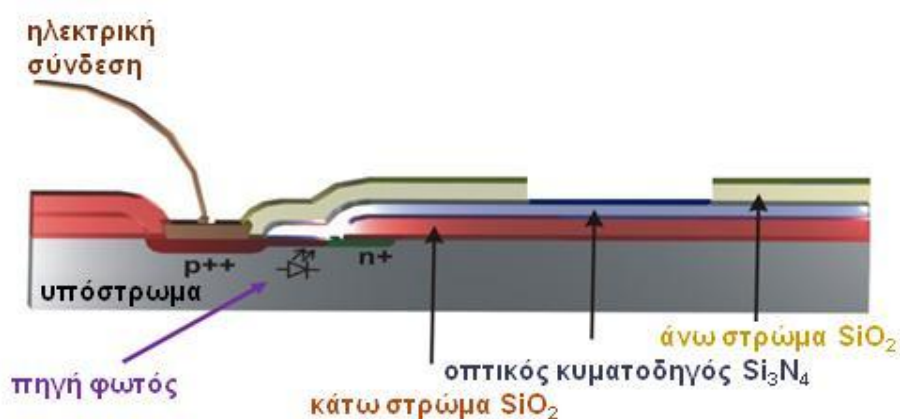
## 2.4 Μονολιθικά ολοκληρωμένος οπτοηλεκτρονικός βιοαισθητήρας τύπου Mach-Zehnder

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκε οπτικός ανοσοαισθητήρας, ο οποίος έχει κατασκευαστεί εξ' ολοκλήρου με τεχνολογία ολοκληρωμένων κυκλωμάτων στον καθαρό χώρο του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας (I.N.N.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Δρ. Κ. Μισιακός, Δρ. Ι. Ράπτης, Δρ. Ε. Μακαρώνα), με ολοκλήρωση στην ίδια ψηφίδα πυριτίου όλων των οπτικών και ηλεκτρικών εξαρτημάτων. Βασίζεται στη συμβολομετρία Mach-Zehnder και δεν απαιτεί τη χρήση ιχνηθετημένων μορίων για την παρακολούθηση των βιομοριακών αντιδράσεων [165-167].



Εικόνα 2.8: (α) Φωτογραφία του αισθητήρα όπου φαίνεται το πραγματικό του μέγεθος σε σχέση με ένα νόμισμα των 5 λεπτών και (β) εικόνα του αισθητήρα από οπτικό μικροσκόπιο όπου δείχνονται οι πηγές φωτός (LED), η περιοχή των 10 οπτικών κυματοδηγών και το περίγραμμα της περιοχής που καλύπτεται με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα

Πιο αναλυτικά, ο οπτικός αισθητήρας έχει κατασκευαστεί με τεχνικές μικροεπεξεργασίας πυριτίου, οι οποίες επιτρέπουν τη δημιουργία συστοιχιών πανομοιότυπων αισθητήρων στην ίδια ψηφίδα. Με τον τρόπο αυτό σε μια ψηφίδα πυριτίου εμβαδού  $37 \text{ mm}^2$  (Εικόνα 2.8α) ολοκληρώνονται δέκα πανομοιότυποι αισθητήρες, κάθε ένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τον οπτικό κυματοδηγό συζευγμένο με την αντίστοιχη πηγή φωτός (Εικόνα 2.8β). Η πηγή φωτός (LED) είναι μια δίοδος χιονοστιβάδας πυριτίου που εκπέμπει φως στην περιοχή του ορατού-εγγύς υπέρυθρου (500-1000 nm) όταν πολωθεί αντίστροφα πέραν του σημείου κατάρρευσής της. Οι δέκα μονολιθικά ολοκληρωμένες πηγές φωτός ενεργοποιούνται/ απενεργοποιούνται διαδοχικά μέσω ενός εξωτερικού πολυπλέκτη.

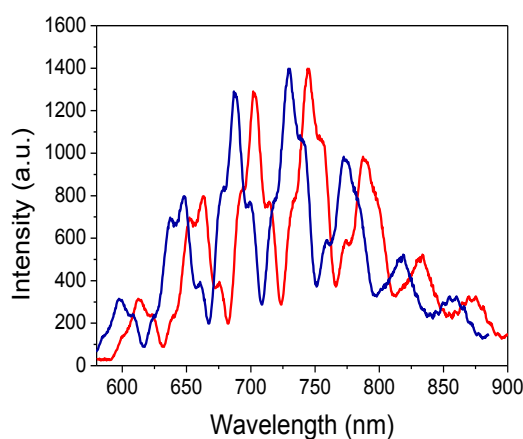


**Εικόνα 2.9:** Σχηματική παράσταση πλευρικής όψης μιας πλήρως ολοκληρωμένης σε ψηφίδα πυριτίου οπτοηλεκτρονικής πλατφόρμας, στην οποία φαίνονται η πηγή φωτός ευθυγραμμισμένη με τον οπτικό κυματοδηγό νιτριδίου του πυριτίου. Ο κυματοδηγός καλύπτεται από υμένιο διοξειδίου του πυριτίου, το οποίο απομακρύνεται από μια περιοχή δημιουργώντας τον αισθητήριο κλάδο στον οποίο μπορούν να ακινητοποιηθούν τα βιομόρια αναγνώρισης

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.9, κάθε πηγή φωτός είναι ευθυγραμμισμένη με έναν επίπεδο οπτικό κυματοδηγό, ο οποίος κατασκευάζεται από νιτρίδιο του πυριτίου ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) και έχει σχηματιστεί σε συμβολόμετρο Mach-Zehnder (MZI). Οι οπτικοί κυματοδηγοί, που έχουν πλάτος  $1,25 \mu\text{m}$  και πάχος  $150 \text{ nm}$ , καλύπτονται από ένα υμένιο διοξειδίου του πυριτίου πάχους  $2 \mu\text{m}$ , το οποίο απομακρύνεται από μια περιοχή πάνω από τον έναν κλάδο της συστοιχίας κάθε Mach-Zehnder για να δημιουργηθεί ο αισθητήριος κλάδος. Ιδιαίτερη

προσοχή έχει δοθεί κατά το σχεδιασμό των αισθητήρων έτσι ώστε η διάταξη των 10 MZIs στην ψηφίδα να ελαχιστοποιεί τις οπτικές απώλειες λόγω κύρτωσης των οπτικών κυματοδηγών [168].

Κάθε αλλαγή του δείκτη διάθλασης του μέσου στην επιφάνεια του αισθητήριου κλάδου προκαλεί μια φασματική μετατόπιση διαφορετική για κάθε μήκος κύματος στο ημιτονοειδές φάσμα εξόδου. Η βασική διαφορά του αισθητήρα που μελετάται με τους κλασσικούς αισθητήρες Mach-Zehnder είναι ότι η πηγή φωτός δεν είναι μονοχρωματική αλλά ευρέως φάσματος δημιουργώντας τα ευρέως φάσματος συμβολόμετρα Mach-Zehnder ή αλλιώς BB-MZI (Broad-Band Mach-Zehnder Interferometer). Η χρήση των BB-MZI έναντι των κλασσικών αισθητήρων Mach-Zehnder αναμένεται να αυξήσει την ευαισθησία ανίχνευσης, δεδομένου ότι η φασματική μετατόπιση λόγω της βιοαντίδρασης που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του αισθητήριου κλάδου είναι διαφορετική για κάθε μήκος κύματος προκαλώντας μια διαφορετική αλλαγή φάσης για κάθε μήκος κύματος [169]. Αυτό με τη σειρά του μεταφράζεται όχι μόνο ως μεταβολή της έντασης αλλά και ως μετατόπιση των κορυφών του φάσματος που καταγράφεται στην έξοδο του MZI (Εικόνα 2.10).



**Εικόνα 2.10: Τυπικό ημιτονοειδές φάσμα συμβολής που καταγράφεται στην έξοδο ενός BB-MZI (κόκκινη γραμμή) και η μετατόπιση των κορυφών του φάσματος που προκαλείται λόγω της βιοαντίδρασης (μπλε γραμμή)**

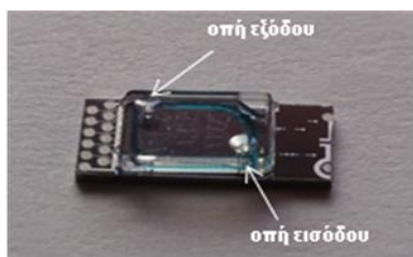
Η καταγραφή του σήματος πραγματοποιείται μέσω ενός εξωτερικού φασματοφωτομέτρου, όπου καταγράφεται συνεχώς το φάσμα και μετά από

κατάλληλη μαθηματική επεξεργασία (Fourier Transform) λαμβάνεται η μεταβολή της φάσης του κυματοδηγούμενου φωτός κατά την διάρκεια της αντίδρασης στις δύο πολώσεις, TE (Transverse Electric mode) και TM (Transverse Magnetic mode) [169].

Επιπλέον, η ολοκλήρωση πολλαπλών αισθητήρων στην ίδια ψηφίδα παρέχει την δυνατότητα προσδιορισμού πολλαπλών αναλυτών στο ίδιο δείγμα με ακινητοποίηση διαφορετικών ειδικών βιομορίων αναγνώρισης (π.χ. αντισωμάτων) στους διαφορετικούς αισθητήρες της ίδιας ψηφίδας. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ρομποτικού συστήματος εναπόθεσης μικροκηλίδων μέσω κατάλληλου προγραμματισμού του οργάνου για την επίτευξη πλήρους επικάλυψης των κυματοδηγών παρά τη μη γραμμική τους διάταξη [170].

Για την διεξαγωγή των αντιδράσεων και την παρακολούθησή τους σε πραγματικό χρόνο στην επιφάνεια του αισθητήρα προσαρμόζεται μικρορευστομηχανική κυψελίδα μέτρησης (fluidic module) ώστε να είναι δυνατή η διέλευση των προς ανάλυση διαλυμάτων πάνω από την επιφάνεια των αισθητήριων κλάδων των MZI, στην οποία έχουν ακινητοποιηθεί τα βιομόρια αναγνώρισης. Η μικρορευστομηχανική κυψελίδα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.11, αποτελείται από ένα κάλυμμα από πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) πάχους 800 μm που φέρει οπές εισόδου και εξόδου των υγρών καθώς και ένα κανάλι ροής ύψους 75 μm για την παροχή των υγρών. Το κανάλι, τα τοιχώματα του οποίου εμφανίζονται μπλε στην εικόνα, έχει σχηματιστεί φωτολιθογραφικά σε ένα κολλώδες φωτοευαίσθητο υμένιο πάχους 75 μm (Pyralux PC1015, Dupont), το οποίο παρέχει και το μέσο σφράγισης της περιοχής γύρω από το κανάλι. Η μικρορευστομηχανική κυψελίδα τοποθετείται πάνω στον αισθητήρα ασκώντας πίεση ώστε να επιτευχθεί η συγκόλληση του φωτοευαίσθητου υμενίου. Ο συνδυασμός της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας με τον αισθητήρα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα, παρέχοντας έτσι μια πρακτική λύση για την ανάπτυξη φορητών βιοαναλυτικών συσκευών. Επιπλέον, η εφαρμογή μηχανικών μεθόδων για την κατασκευή της κυψελίδας παρέχει

ευελιξία σε σχέση με τα υλικά και το σχεδιασμό της κατά την ανάπτυξη της συσκευής.



**Εικόνα 2.11: Μικρορευστομηχανική κυψελίδα από πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) πάχους 800  $\mu\text{m}$  με οπές εισόδου- εξόδου και τοιχώματα ύψους 75  $\mu\text{m}$  από φωτοευαίσθητο υμένιο (μπλε χρώμα) τοποθετημένη σε ψηφίδα πυριτίου**

Οι αισθητήρες μετά την προσαρμογή της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας τοποθετούνται σε ειδική βάση, η οποία με τη σειρά της τοποθετείται στην ειδική κεφαλή της μετρικής διάταξης του οργάνου, που περιλαμβάνει τις ηλεκτρικές διατάξεις για την συλλογή και επεξεργασία του σήματος μέσω κατάλληλα σχεδιασμένου λογισμικού.

Ο ολοκληρωμένος οπτοηλεκτρονικός βιοαισθητήρας BB-MZI έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση νοθείας κασικίσιου γάλακτος με αγελαδινό και για τον προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε δείγματα ανθρώπινου ορού με εξαιρετικές αναλυτικές επιδόσεις [171,172].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΣΚΟΠΟΣ

Οι μυκοτοξίνες είναι χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που παράγονται από διάφορες οικογένειες μυκήτων ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Υπάρχουν αρκετές ομάδες μυκοτοξινών οι κυριότερες από τις οποίες είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι φουμονισίνες, οι τριχοθηκίνες, η πατουλίνη, η κιτρινίνη, τα αλκαλοειδή εργοτίνης και η ζεαραλενόνη. Λόγω της σταθερότητας τους, μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στους ανθρώπους, με επιπτώσεις που μπορεί να είναι οξείες ή μακροχρόνιες καθώς οι ενώσεις αυτές έχουν, η καθεμία σε διαφορετικό βαθμό, ηπατοτοξικές, ανοσοκατασταλτικές, μεταλλαξιγόνες ή/και καρκινογόνες δράσεις. Για τον λόγο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει θεσπίσει αυστηρούς κανόνες όσον αφορά τα ανώτερα επιτρεπτά όρια διαφόρων μυκοτοξινών σε πολλές κατηγορίες τροφίμων αλλά και τους τρόπους ελέγχου της παρουσίας αυτών των ουσιών. Στις κατηγορίες των τροφίμων που μπορούν να προσβληθούν από μύκητες και επομένως να παρουσιάσουν υψηλές συγκεντρώσεις μυκοτοξινών περιλαμβάνονται τα δημητριακά και τα προϊόντα κατεργασίας αυτών όπως η μπίρα.

Οι μέθοδοι που συνήθως εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι κυρίως χρωματογραφικές. Η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για την ανίχνευση αυτών των ουσιών. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία αλλά και στην καθημερινή πρακτική έχουν προταθεί και άλλες μέθοδοι προσδιορισμού των μυκοτοξινών στα τρόφιμα, κυρίως ανοσοχημικές (π.χ., ELISA). Όλες αυτές οι μέθοδοι είναι κατάλληλες για χρήση σε εργαστηριακούς χώρους, από άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό, έχουν υψηλό κόστος και μεγάλους χρόνους ανάλυσης με αποτέλεσμα να μεσολαβεί ένα χρονικό διάστημα αρκετών ημερών μεταξύ της δειγματοληψίας και της ανάλυσης του δείγματος δημιουργώντας πρόβλημα στην αλυσίδα εφοδιασμού των τροφίμων ειδικά

όσον αφορά μη επεξεργασμένα φρέσκα τρόφιμα. Αποτέλεσμα αυτών των περιορισμών είναι ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των τροφίμων που καταναλώνεται έχει ελεγχθεί διεξοδικά πριν από την κυκλοφορία τους στην αγορά.

Λύση σε αυτό το πρόβλημα μπορεί να δοθεί από τον συνδυασμό της σύγχρονης βιοαναλυτικής χημείας με τη μικροηλεκτρονική τεχνολογία για την ανάπτυξη φορητών συσκευών ή μικροδιατάξεων που είναι κατάλληλες για την πραγματοποίηση αναλύσεων εκτός του αναλυτικού εργαστηρίου, όπως π.χ. σε τόπους συλλογής και αποθήκευσης τροφίμων (point-of-need). Οι διατάξεις αυτές βασίζονται στη χρήση βιοαισθητήρων για την μετατροπή μιας βιομοριακής αλληλεπίδρασης σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Στην παρούσα διατριβή, αναπτύχθηκε οπτικός ανοσοαισθητήρας για τον χωρίς τη χρήση ιχνηθετών προσδιορισμό τεσσάρων μυκοτοξινών, της αφλατοξίνης B1, της ωχρατοξίνης A, της φουμονισίνης B1 και της δεοξυνιβαλενόλης, σε δείγματα μπύρας μέσω ανοσοπροσδιορισμών ανταγωνιστικού τύπου. Για την ανάπτυξη του ανοσοαισθητήρα επιλέχθηκε να αξιοποιηθεί οπτοηλεκτρονική ψηφίδα πυριτίου, η οποία έχει αναπτυχθεί από το εργαστήριο Οπτικών Αισθητήρων του Ι.Ν.Ν. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων-Ανοσοαισθητήρων του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. και η οποία περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 2.4. Στην ψηφίδα ολοκληρώνονται μονολιθικά δέκα συμβολόμετρα Mach-Zehnder με τις αντίστοιχες πηγές φωτός ευρέως φάσματος (BB-MZI) και πραγματοποιείται καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του φάσματος συμβολής από εξωτερικό φασματοφωτόμετρο. Για τον προσδιορισμό στους αισθητήριους κλάδους των BB-MZI ακινητοποιήθηκαν συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης και ακολούθησε εισαγωγή μιγμάτων βαθμονομητών ή δειγμάτων με το αντίστοιχο αντίσωμα έναντι της κάθε μυκοτοξίνης. Εφαρμόστηκε ένα επιπλέον στάδιο αντίδρασης με δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αντιδρά με το ακινητοποιημένο ειδικό αντίσωμα με αποτέλεσμα την αύξηση του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας στον αισθητήριο κλάδο των BB-MZI και κατά συνέπεια της μεταβολής του δείκτη διάθλασης και της απόκρισης του αισθητήρα. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, αναπτύχθηκαν αρχικά ενζυμικοί ανοσοχημικοί



προσδιορισμοί σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης μέσω των οποίων βελτιστοποιήθηκαν κάποιες από τις παραμέτρους των ανοσοχημικών προσδιορισμών όπως η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων ανάλυσης, αποκλεισμού, κλπ.

Ακολούθως, βελτιστοποιήθηκαν όλες οι παράμετροι του προσδιορισμού (π.χ. συγκέντρωση συζεύγματος μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης, συγκέντρωση αντισωμάτων, διάρκεια ανοσοαντίδρασης, κ.α.) καθεμιάς από τις τέσσερις μυκοτοξίνες αναφορικά με τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου στον αισθητήρα. Αξιολογήθηκε η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των ανοσοπροσδιορισμών με τη χρήση δειγμάτων εμπλουτισμένων με την αντίστοιχη μυκοτοξίνη που παρασκευάστηκαν σε μπίρες διαφορετικών τύπων (lager, pilsner, ale, μαύρες). Επιπλέον, διερευνήθηκε η δυνατότητα αναγέννησης και επαναχρησιμοποίησης των βιοενεργοποιημένων αισθητήρων, προκειμένου να μειωθεί το κόστος της ανάλυσης. Κατά τη βελτιστοποίηση των προσδιορισμών των μεμονωμένων μυκοτοξινών επιλέχθηκαν, όπου ήταν δυνατόν, κοινές συνθήκες ώστε να καταστεί δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός περισσοτέρων της μίας μυκοτοξινών στην ίδια ψηφίδα. Τέλος, η ικανότητα του βιοαισθητήρα να ανιχνεύει τις μυκοτοξίνες-στόχους αξιολογήθηκε με ανάλυση δειγμάτων μπίρας, διαφορετικών τύπων και προέλευσης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που ελήφθησαν για τα ίδια δείγματα με καθιερωμένες μεθόδους ανάλυσης μυκοτοξινών.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1 Υλικά και όργανα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού κατά της αφλατοξίνης B1 και της δεοξυनिβαλενόλης, το υλικό αναφοράς για την ωχρατοξίνη A για την παρασκευή βαθμονομητών καθώς και τα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης για την αφλατοξίνη B1, τη δεοξυनिβαλενόλη και τη φουμονισίνη B1 (AFB1-BSA, DON-OVA και FB1-OVA) ελήφθησαν από την Aokin AG (Βερολίνο, Γερμανία). Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της φουμονισίνης B1 καθώς και τα υλικά αναφοράς για αφλατοξίνη B1 (AFB1), φουμονισίνη B1 (FB1) και δεοξυनिβαλενόλη (DON) για την παρασκευή βαθμονομητών παρασχέθηκαν ευγενικά από το RIKILT (Wageningen, Ολλανδία). Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της ωχρατοξίνης A ήταν από τη Soft Flow Hungary Ltd (Ουγγαρία). Το συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα αίγας κατά του Fc τμήματος των γ-σφαιρινών ποντικού (anti-mouse IgG-HRP), το N-υδρόξυ σουλφο ηλεκτριμίδιο (sulfo-NHS), το υδροχλωρικό N-(3-διμεθυλαμινοπροπυλ)-N-αιθυλ-καρβοδιιμίδιο (EDC), η ωαλβουμίνη (OVA), το 2,2-άζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS), το (3-αμινοπροπυλ)τριαθοξυσιλάνιο (APTES) και η υψηλής καθαρότητας μεθανόλη (CHROMASOLV® για HPLC, >99,9%) ελήφθησαν από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Η αλβουμίνη ορού βοός (BSA) αγοράστηκε από την Acros Organics (Geel, Βέλγιο). Το καθαρισμένο με χρωματογραφία συγγενείας αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού και το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) ήταν από την Merck Millipore (Darmstadt, Γερμανία), ενώ η απόλυτη αιθανόλη από την Carlo Erba SpA (Μιλάνο, Ιταλία). Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας ήταν από την Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA). Τα φρεάτια μικροπιλοδότησης πολυστυρενίου οκτώ φρεατίων αγοράστηκαν από

την Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Γερμανία). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης ήταν δις απεσταγμένο.

Για την απαέρωση δειγμάτων μπίρας χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων Elmasonic S30H από την Elma Schmidbauer GmbH (Singen, Γερμανία). Οι μετρήσεις οπτικής απορρόφησης στα φρεάτια μικροπιλοδότησης διεξήχθησαν με την συσκευή Victor31420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Milano, Ιταλία) σε μήκος κύματος 405 nm. Η αυτόματη συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer που χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση των συζευγμάτων πρωτεΐνης- μυκοτοξίνης στην επιφάνεια του αισθητήρα ήταν από Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

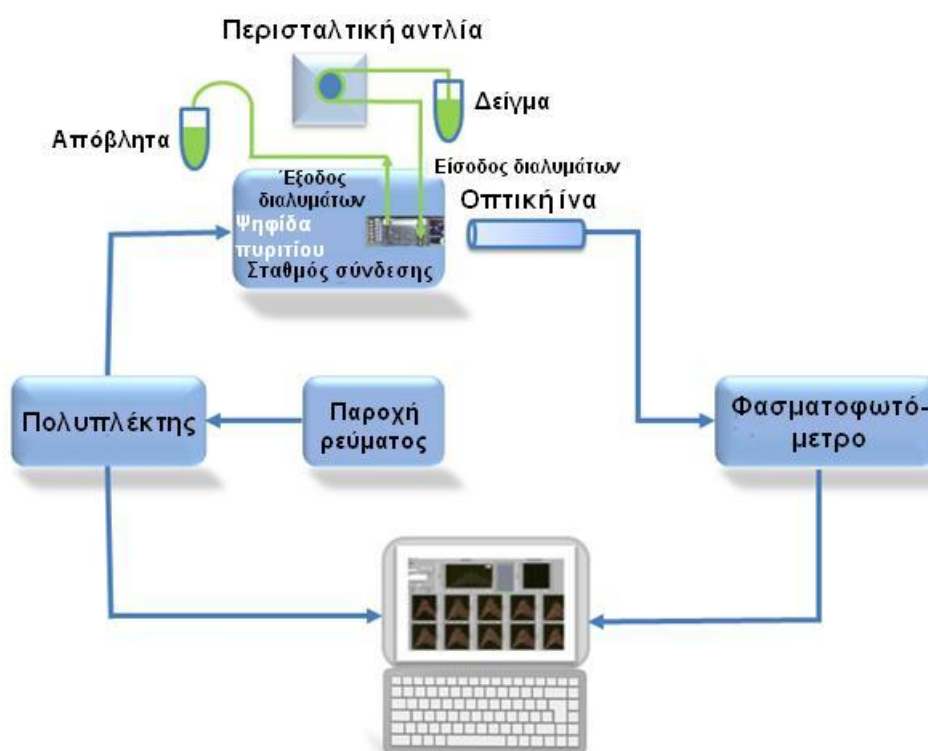
#### **4.2 Σύνθεση του συζεύγματος OTA-OVA**

Η σύνθεση του συζεύγματος ωχρατοξίνης A με ωαλβουμίνη (OTA-OVA) διεξήχθη ως εξής: Αρχικά 7,0 mg sulfo-NHS και 3,6 mg EDC διαλύθηκαν σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 8,5. Σε αυτό το διάλυμα, προστέθηκαν 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος OTA συγκέντρωσης 50 mg/mL που παρασκευάστηκε σε DMSO και το μίγμα επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά την επώαση, προστέθηκε 1 mL διαλύματος OVA 2 mg/mL σε 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,5 και το μίγμα επώαστηκε για 18 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 8,5, που περιείχε 0,05 mg/mL  $\text{NaN}_3$  και φυλάχθηκε στους 4°C. Η γραμμομοριακή αναλογία OTA προς OVA υπολογίστηκε μετρώντας την απορρόφηση του συζεύγματος OTA-OVA στα 280 και 380 nm, τα οποία είναι τα χαρακτηριστικά μήκη κύματος απορρόφησης των OVA και OTA αντιστοίχως. Λαμβάνοντας υπόψη τους συντελεστές μοριακής απορρόφησης  $30590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  για την OVA στα 280 nm και  $5680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  για την OTA στα 380 nm, προσδιορίστηκε μία μοριακή αναλογία 1:1.

### 4.3 Οργανολογία του μονολιθικά ολοκληρωμένου οπτοηλεκτρονικού βιοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder (BB-MZI)

Οι ψηφίδες νιτριδίου του πυριτίου, καθεμία από τις οποίες περιελάμβανε μια σειρά από 10 ολοκληρωμένα MZIs και τις αντίστοιχες πηγές φωτός (LED), κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο Νανοτεχνολογίας Μικροσυστημάτων (N-MEMS) του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" [110-114].

Η συσκευή μέτρησης περιελάμβανε μια βάση υποδοχής της ψηφίδας που υποστήριζε τόσο τις ρευστομηχανικές όσο και τις ηλεκτρικές συνδέσεις (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση των βασικών τμημάτων της οργανολογίας που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις στον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα

Για τη συλλογή φασμάτων εκπομπής και τη μεταφορά τους σε εξωτερικό φασματοφωτόμετρο μικρού μεγέθους (QE65000, Ocean Optics, Dunedin, FL) χρησιμοποιήθηκε οπτική ίνα ευθυγραμμισμένη με τη βάση υποδοχής. Η λειτουργία του φασματοφωτομέτρου ήταν συγχρονισμένη με ειδικό ηλεκτρικό

πολυπλέκτη ο οποίος ενεργοποιούσε/απενεργοποιούσε διαδοχικά τις 10 πηγές φωτός της ψηφίδας ανά 1 δευτερόλεπτο. Με τον τρόπο αυτό, το φάσμα από καθένα MZI της ψηφίδας καταγραφόταν κάθε 10 δευτερόλεπτα από τον Η/Υ που ελέγχει τη συσκευή μέτρησης μέσω μιας ειδικής εφαρμογής Labview. Το λογισμικό επιτρέπει την περαιτέρω επεξεργασία του σήματος με Διακριτό Μετασχηματισμό Fourier (Discrete Fourier Transform) ώστε να μετατραπούν οι μετατοπίσεις που παρατηρούνται στο φάσμα σε μετατοπίσεις φάσης, τόσο στην TE όσο και στην TM πόλωση.

#### **4.4 Ρυθμιστικά διαλύματα**

Για την παρασκευή των διαλυμάτων των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης για εναπόθεση στις ψηφίδες χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 0,05 M, pH 9,2. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμησης της επιφάνειας ήταν 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5 που περιείχε 1% (β/ο) BSA. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ήταν 0,01 M Tris-HCl, pH 8,25, που περιείχε 0,9% NaCl. Το ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (ρ.δ.α.) ήταν 0,05 M Tris-HCl, pH 7,8, που περιείχε 9 g/L NaCl, 5 g/L BSA και 0,5 g/L NaN<sub>3</sub>.

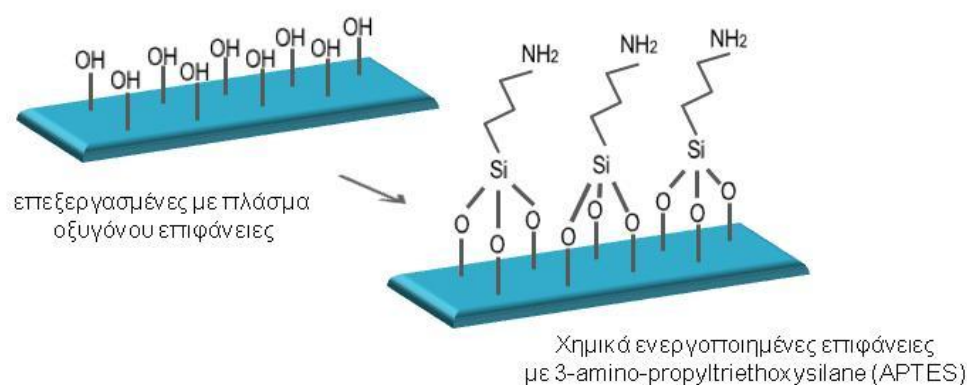
#### **4.5 Προετοιμασία βαθμονομητών και δειγμάτων**

Παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mg/mL σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης 80% για τις AFB1 και DON, σε 10% υδατικό διάλυμα μεθανόλης για την FB1 και σε υψηλής καθαρότητας μεθανόλη για την OTA, τα οποία φυλάχθηκαν σε κλάσματα στους -20°C. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν βαθμονομητές με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,156 έως 5,0 ng/mL για AFB1, από 0,625 έως 25 ng/mL για FB1, από 2,5 έως 125 ng/mL για DON σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,625% (ο/ο) απόλυτη αιθανόλη, καθώς και βαθμονομητές με συγκεντρώσεις από 0,625 έως 12,5 ng/mL για OTA σε μπύρα απαλλαγμένη από OTA αραιωμένη 8 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης που περιέχει 8,75% (ο/ο) απόλυτη μεθανόλη. Όλοι οι βαθμονομητές διατηρήθηκαν στους 4°C για διάστημα έως και 2 μήνες.

Τα δείγματα μπίρας απαερώθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά και αραιώθηκαν, πριν από την ανάλυση, 8 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης.

#### 4.6 Ακίνητοποίηση βιομορίων αναγνώρισης στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα BB-MZI

Η μέθοδος επικάλυψης των αισθητήρων με βιομόρια αναγνώρισης περιελάμβανε τόσο την χημική ενεργοποίηση της επιφάνειας των κυματοδηγών με σιλανοποίηση (Εικόνα 4.2) όσο και την εναπόθεση των διαλυμάτων των βιομορίων στους κυματοδηγούς με τη χρήση ρομποτικού συστήματος εναπόθεσης μικροκηλίδων.



**Εικόνα 4.2: Δομή των υδροφιλοποιημένων (αριστερά) και χημικά ενεργοποιημένων με σιλάνιο (δεξιά) επιφανειών**

Οι ψηφίδες, που περιελάμβαναν τα 10 ολοκληρωμένα MZIs, αρχικά υδροφιλοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα εγχάραξης ενεργών ιόντων μέσω κατεργασίας σε πλάσμα  $O_2$  για 30s υπό πίεση 10 mTorr. Η κατεργασία με πλάσμα είναι μια διεργασία που αποσκοπεί στον καθαρισμό των ψηφίδων και στον εμπλουτισμό της επιφάνειας τους με ελεύθερες υδροξυλομάδες (σιλανόλες). Στη συνέχεια οι ψηφίδες βυθίστηκαν για 2 λεπτά σε υδατικό διάλυμα (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυ-σιλανίου (APTES) συγκέντρωσης 0,5% (o/o). Στο στάδιο αυτό τα μόρια του σιλανίου σχηματίζουν στην επιφάνεια των ψηφίδων δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανόλες που έχουν δημιουργηθεί στο στάδιο της υδροφιλοποίησης. Ακολούθησε ήπια έκπλυση με νερό, ξήρανση με

ρεύμα αζώτου και θέρμανση στους 120°C για 20 min για τη σταθεροποίηση του υμενίου του σιλανίου. Κατά το στάδιο της θέρμανσης λαμβάνει χώρα σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των μορίων του APTES και της επιφάνειας μέσω συμπύκνωσης & απομάκρυνσης μορίων νερού.

Οι τροποποιημένες με APTES ψηφίδες πυριτίου χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω προσρόφησης. Στις ψηφίδες εναποτέθηκαν κηλίδες διαλύματος των συζευγμάτων μυκοτοξινών-πρωτεϊνών (AFB1-BSA, OTA-OVA, FB1-OVA και DON-OVA) συγκέντρωσης 100 µg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα εναπόθεσης χρησιμοποιώντας την αυτόματη συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer (Εικόνα 4.3).

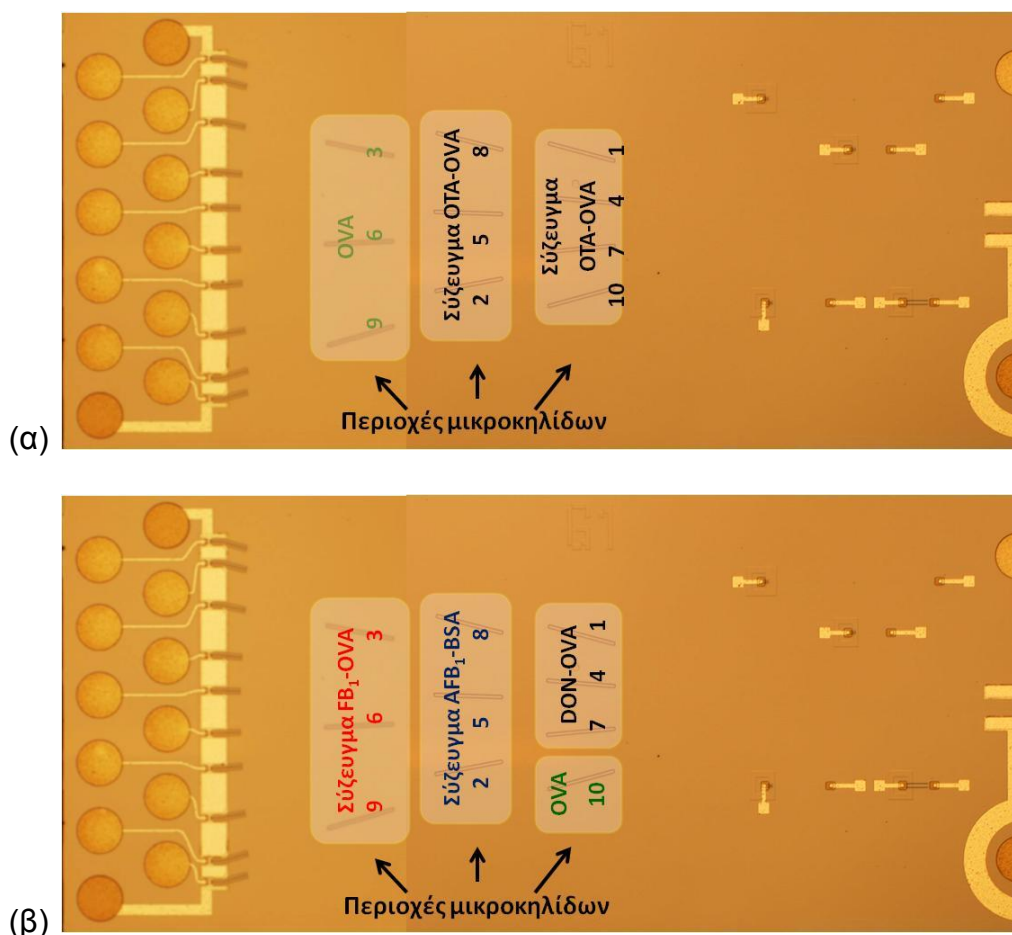


**Εικόνα 4.3: Αυτόματη συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων *BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer Bio-Rad Laboratories***

Σύμφωνα με το σχήμα που απεικονίζεται στην εικόνα 4.4α, για τον προσδιορισμό της OTA, επτά από τους δέκα BB-MZIs επικαλύφθηκαν με διάλυμα OTA-OVA 100 µg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης ενώ οι εναπομείναντες τρεις MZIs με διάλυμα ωαλβουμίνης (OVA) ίδιας συγκέντρωσης για να χρησιμεύσει ως τυφλό. Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών AFB1, FB1 και DON τρεις από τους δέκα BB-MZIs επικαλύφθηκαν με κάθε ένα από τα τρία συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης, ενώ το εναπομείναν ένα MZI επικαλύφθηκε με διάλυμα ωαλβουμίνης (100 µg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης) για να χρησιμεύσει ως τυφλό (Εικόνα 4.4β). Η κάλυψη των απεικονιζόμενων περιοχών της ψηφίδας με τα διαφορετικά διαλύματα πραγματοποιήθηκε με εναπόθεση πολλαπλών επικαλυπτόμενων κηλίδων (καθεμιά διαμέτρου ~ 400 µικρών). Κατά τη



διάρκεια της κάλυψης, η υγρασία του θαλάμου ρυθμίστηκε στο 75% και η θερμοκρασία στους 15°C για να αποφευχθεί η ξήρανση του εναποτιθέμενου διαλύματος. Μετά την κάλυψη, οι ψηφίδες επωάστηκαν ολονυχτίως σε θερμοκρασία δωματίου (RT) υπό συνθήκες ελεγχόμενης υγρασίας (75%). Ακολούθως εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, βυθίστηκαν σε διάλυμα αποκλεισμού για 1 ώρα και πάλι εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και απεσταγμένο νερό και ξηράνθηκαν με ρεύμα N<sub>2</sub>. Οι στεγνές βιοψηφίδες χρησιμοποιήθηκαν είτε αμέσως είτε φυλάχθηκαν σε ξηραντήρα στους 4°C μέχρι τη χρήση τους.



**Εικόνα 4.4:** Εικόνα του αισθητήρα που απεικονίζει τις περιοχές μετά την εναπόθεση των διαφορετικών συζευγμάτων πρωτεΐνης-μυκοτοξίνης καθώς και την περιοχή που έχει τροποποιηθεί με μη λειτουργική πρωτεΐνη (OVA) κατά τον προσδιορισμό της ΟΤΑ (α) και κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> και DON (β)

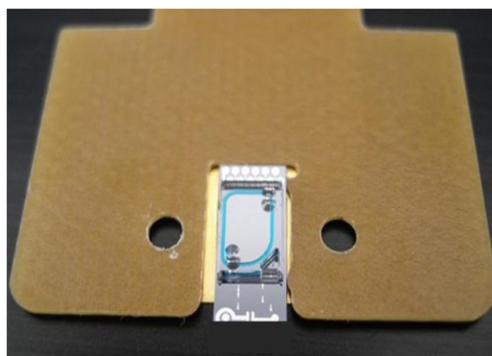
#### 4.7 Μέθοδοι προσδιορισμού στον μονολιθικά ολοκληρωμένο οπτοηλεκτρονικό βιοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder

Για την ανάλυση, εφαρμόζεται στην επιφάνεια της ψηφίδας μικρορευστομηχανική κυψελίδα από PMMA (Εικόνα 4.5). Η μικρορευστομηχανική κυψελίδα εφαρμόζει στεγανά στην επιφάνεια της ψηφίδας και περικλείει τις περιοχές των αισθητήριων κλάδων και των 10 MZI που έχουν βιοενεργοποιηθεί, επιτρέποντας τη συνεχή διέλευση διαλυμάτων μέσω των οπών εισόδου-εξόδου από την επιφάνεια της ψηφίδας με την βοήθεια εξωτερικής αντλίας.

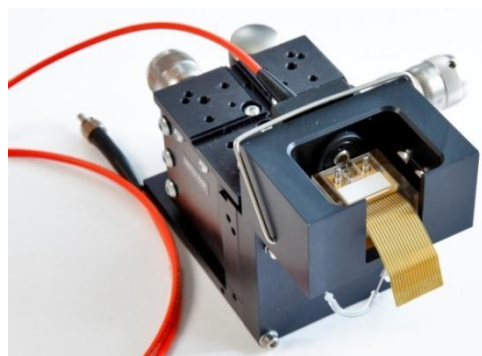


Εικόνα 4.5: Ψηφίδα πυριτίου στην επιφάνεια της οποίας έχει τοποθετηθεί μικρορευστομηχανική κυψελίδα από πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) πάχους 800  $\mu\text{m}$  η οποία φέρει οπές για την είσοδο/έξοδο των διαλυμάτων

α)



β)

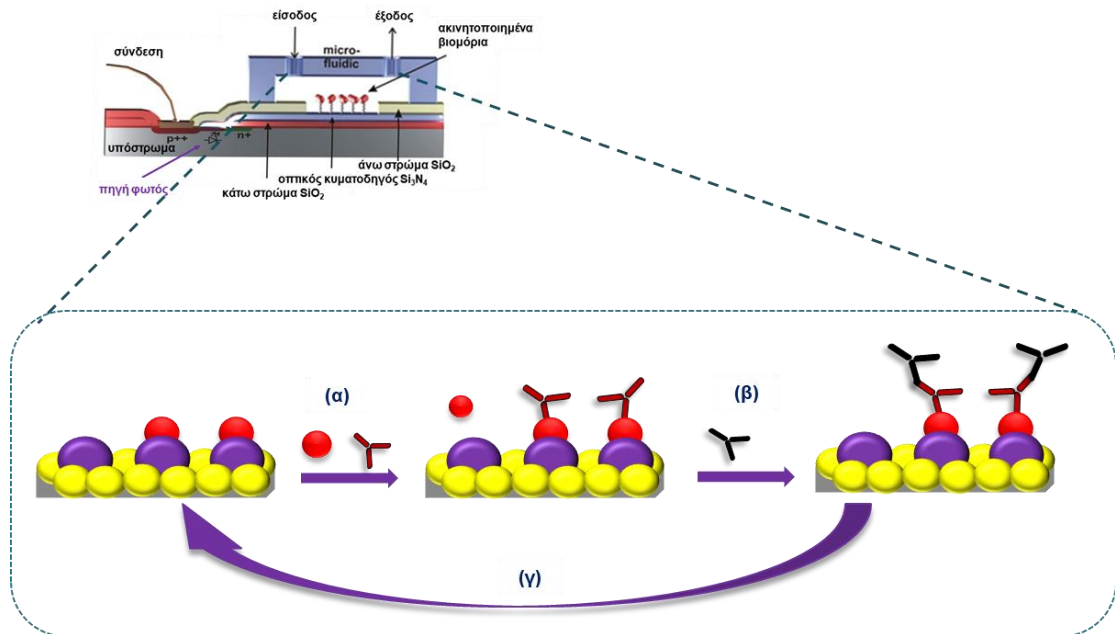


Εικόνα 4.6: Εικόνες του ειδικού φορέα στον οποίο τοποθετείται η ψηφίδα (α) και της βάσης υποδοχής της ψηφίδας στη συσκευή μέτρησης στην οποία τοποθετείται ο φορέας της ψηφίδας και η οποία είναι ευθυγραμμισμένη με την οπτική ίνα που χρησιμοποιείται για τη συλλογή των φασμάτων εξόδου (β)

Η ψηφίδα με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα τοποθετείται σε ειδικό φορέα (Εικόνα 4.6α) και κατόπιν στην ειδική βάση υποδοχής της συσκευής μέτρησης, η οποία εξασφαλίζει τις ρευστομηχανικές και ηλεκτρικές συνδέσεις (Εικόνα 4.6β).

Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών AFB1, FB1 και DON, αρχικά, οι βαθμονομητές ή τα αραιωμένα δείγματα μπύρας αναμίχθηκαν σε ίσους όγκους με διάλυμα που περιείχε τα τρία μονοκλωνικά αντισώματα κατά της AFB1 (6  $\mu\text{g/mL}$ ), της FB1 (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) και της DON (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ), σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης. Ο αισθητήρας εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης και κατόπιν διαβιβάστηκαν πάνω από τη ψηφίδα τα μίγματα των βαθμονομητών ή των δειγμάτων με τα αντισώματα για 8 λεπτά με ταχύτητα 40  $\mu\text{L/λεπτό}$ . Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος αίγας κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης για 4 λεπτά με την ίδια ταχύτητα ροής. Ακολούθησε αναγέννηση της ψηφίδας με διέλυση διαλύματος 0,5% (β/ο) SDS, pH 1,9, επί 2 λεπτά και κατόπιν εξισορρόπηση με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (Εικόνα 4.7).

Για τον προσδιορισμό της OTA, οι βαθμονομητές ή τα δείγματα αραιώθηκαν 8 φορές με 0,05 M Tris-HCl, pH 7,8, που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl, 0,5% (β/ο) BSA και 10% (ο/ο) μεθανόλη (ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως δείγματος). Έπειτα, αναμίχθηκαν σε ίσους όγκους με διάλυμα αντισώματος κατά της OTA (4  $\mu\text{g/mL}$ ) σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης και τα μίγματα προ-επωάστηκαν για 1 ώρα σε RT. Ο βιοαισθητήρας εξισορροπήθηκε διαβιβάζοντας ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης και μετά την ολοκλήρωση του σταδίου προ-επώσεως τα μίγματα των βαθμονομητών ή των δειγμάτων με το αντίσωμα διαβιβάστηκαν στον αισθητήρα για 30 λεπτά με ταχύτητα ροής 40  $\mu\text{L/λεπτό}$ . Έπειτα, διαβιβάστηκε διάλυμα αίγας κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης για 20 λεπτά με την ίδια ταχύτητα ροής. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αναγέννηση του αισθητήρα με έγχυση διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 0,1 M για 3 λεπτά ακολουθούμενη από εξισορρόπηση του αισθητήρα με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης.



**Εικόνα 4.7:** Σχηματική απεικόνιση των σταδίων ανάλυσης των μυκοτοξινών με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα: α) στάδιο ειδικής ανοσοαντίδρασης κατά το οποίο τα ακίνητοποιημένα στην επιφάνεια του αισθητήρα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης ανταγωνίζονται με τα μόρια του αναλύτη στο δείγμα για δέσμευση από τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα (Y), β) ενίσχυση σήματος ανοσοαντίδρασης με την προσθήκη αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού (Y), γ) αναγέννηση της επιφάνειας του αισθητήρα κατά την οποία πραγματοποιείται αποδέσμευση του μονοκλωνικού αντισώματος από το ακίνητοποιημένο αντιγόνο. Επεξήγηση συμβόλων: (O) πρωτεΐνη φορέας, (O) μυκοτοξίνη, (O) BSA

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, τα φάσματα εξόδου που συλλέχθηκαν από τα 10 MZI της ψηφίδας υποβάλλονται σε Διακριτό Μετασχηματισμό Fourier (Discrete Fourier Transform) [114]. Έτσι κάθε φάσμα μετασχηματίζεται σε δυο οξείες κορυφές που αντιστοιχούν στις πολώσεις TE και TM, η μεταβολή της φάσης των οποίων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αποτελεί και το παρακολουθούμενο σε πραγματικό χρόνο σήμα. Παρόλο που ελήφθησαν οι μετατοπίσεις φάσεων και για τις δύο πολώσεις, όλα τα γραφήματα που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή αναφέρονται σε μετατοπίσεις φάσης στην πόλωση TE. Έτσι, για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης, η μετατόπιση φάσης σε ακτίνια που αντιστοιχούσε στα διαλύματα των διαφορετικών βαθμονομητών ( $S_x$ ) εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό της απόκρισης του μηδενικού βαθμονομητή ( $S_0$ )

έναντι της συγκέντρωσης των βαθμονομητών σε λογαριθμική κλίμακα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, MA, Η.Π.Α.).

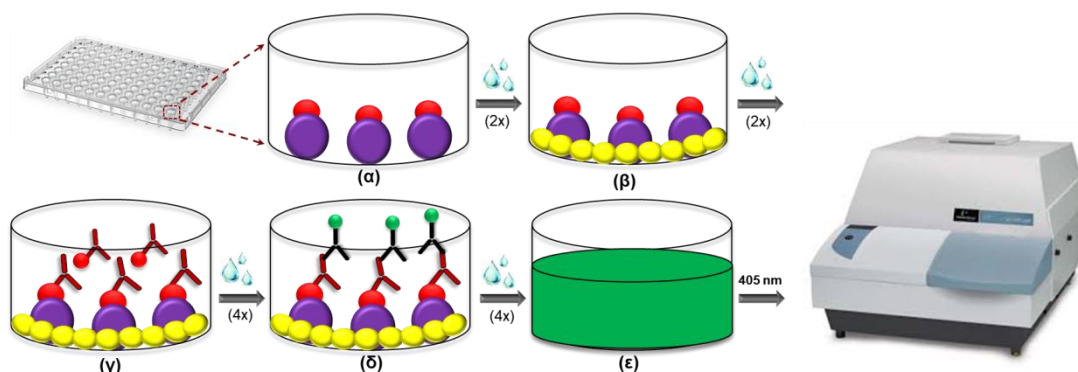
#### **4.8 Μέθοδοι ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης (ELISA)**

Τα φρεάτια μικροτιπλοδότησης επικαλύφθηκαν με 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος καθενός από τα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης (500 ng/mL AFB1-BSA, 100 ng/mL FB1-OVA, 500 ng/mL DON-OVA και 4  $\mu\text{g/mL}$  OTA-OVA σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης) και επώαστηκαν ολονύχτια σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Τα φρεάτια στη συνέχεια εκπλύθηκαν δύο φορές με 300  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και οι ελεύθερες θέσεις πρόσδεσης πρωτεΐνης της επιφάνειας καλύφθηκαν μέσω επώασης με 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος αποκλεισμού για 1 ώρα σε RT. Στη συνέχεια εκπλύθηκαν δύο φορές όπως προηγουμένως.

Για τον προσδιορισμό των AFB1, FB1 και DON, προστέθηκαν ανά φρεάτιο 50  $\mu\text{L}$  βαθμονομητών ή δειγμάτων μπύρας απαερωμένων και αραιωμένων 8 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης και 50  $\mu\text{L}$  από το αντίστοιχο διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος (Mab) (200 ng/mL anti-AFB1 Mab, 60 ng/mL anti-FB1 Mab και 100 ng/mL anti-DON Mab σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης) και επώαστηκαν για 1 ώρα υπό ανάδευση. Για τον προσδιορισμό της OTA, οι βαθμονομητές ή τα 8-φορές αραιωμένα με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης δείγματα μπύρας αναμείχθηκαν με ίσο όγκο διαλύματος αντισώματος κατά της OTA συγκέντρωσης 200 ng/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης. Τα μίγματα αυτά επώαστηκαν για 60 λεπτά σε RT και στη συνέχεια προστέθηκαν ανά φρεάτιο 100  $\mu\text{L}$  κάθε μίγματος και επώαστηκαν για 2 ώρες υπό ανάδευση.

Μετά από το στάδιο αυτό, τα φρεάτια πλύθηκαν 4 φορές με 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος έκπλυσης και ακολούθησε προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος συζεύγματος υπεροξειδάσης της ραπανίδος (HRP) με αντίσωμα αίγας κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 1  $\mu\text{g/mL}$  σε 0,15 M Tris-HCl, pH 8,25, που περιείχε 0,5% ( $\beta/o$ ) BSA και επώαση για 40 λεπτά υπό ανάδευση. Ακολούθως τα φρεάτια εκπλύθηκαν 4 φορές με 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος έκπλυσης και προστέθηκαν ανά φρεάτιο 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος της

υπεροξειδάσης (0,03% (ο/ο) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 0,0019 mM ABTS σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 0,1 M, pH 4,5). Μετά από επώαση 30 λεπτών, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των φρεατίων στα 405 nm. Η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.7 για την μέθοδο προσδιορισμού μυκοτοξινών με τον αισθητήρα. Στην εικόνα 4.8. παρουσιάζονται σχηματικά τα βασικά στάδια του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού των μυκοτοξινών.



**Εικόνα 4.8:** Σχηματική απεικόνιση ανοσοανάλυσης ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης για την ανίχνευση μυκοτοξινών, όπου α) στάδιο ακινητοποίησης συζεύγματος μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης, β) στάδιο αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων πρόσδεσης πρωτεΐνης στην επιφάνεια των φρεατίων, γ) στάδιο ειδικής ανοσοαντίδρασης κατά το οποίο τα ακινητοποιημένα στα φρεάτια συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης ανταγωνίζονται με τα μόρια του αναλύτη στο δείγμα για δέσμευση από τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα, δ) στάδιο προσθήκης συζεύγματος υπεροξειδάσης-αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού, δ) στάδιο προσθήκης χρωμογόνου υποστρώματος του ενζύμου και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των φρεατίων στα 405 nm. Επεξήγηση συμβόλων: (ο) πρωτεΐνη φορέας, (ο) μυκοτοξίνη, (ο) BSA, (Y) μονοκλωνικό αντίσωμα κατά των μυκοτοξινών, (Y) αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού, (ο) ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 5.1 Βελτιστοποίηση των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών

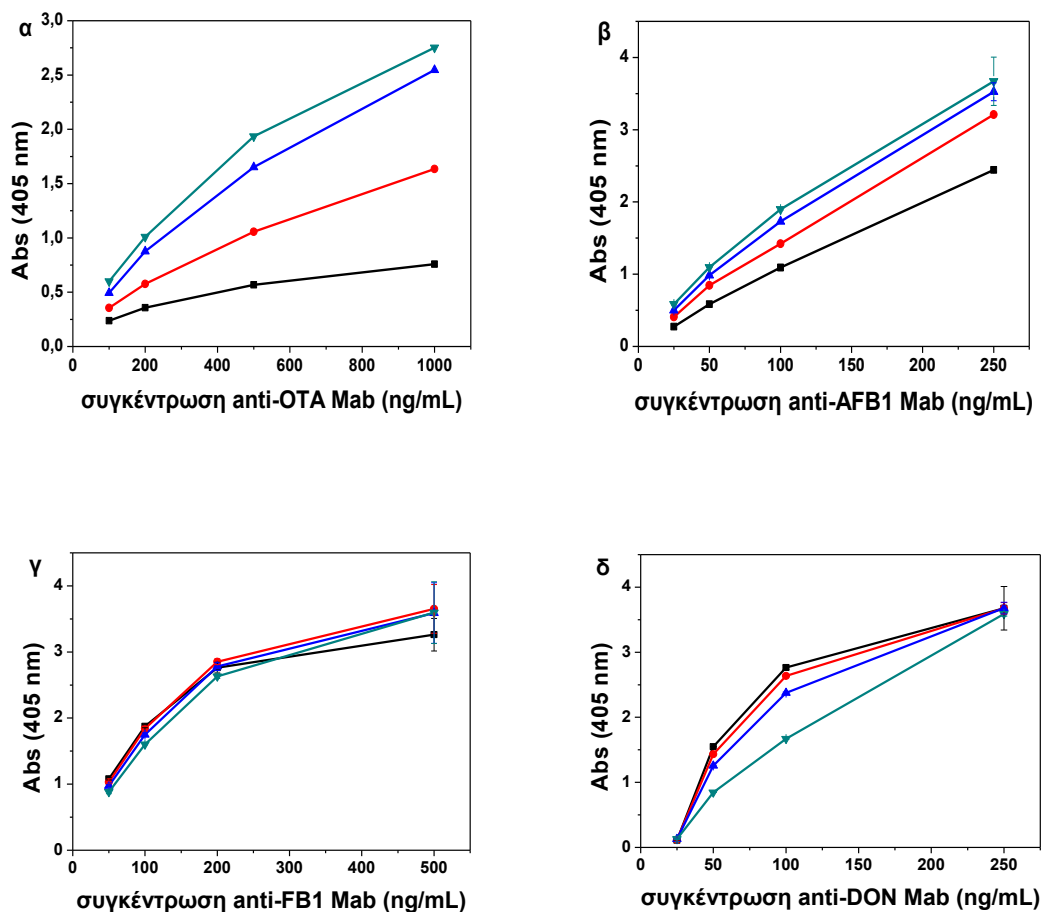
Ο ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός των μυκοτοξινών σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης βασίζεται στην έμμεση ανταγωνιστικού τύπου ELISA. Η ανταγωνιστική ανοσοαντίδραση πραγματοποιείται μεταξύ των ακινητοποιημένων στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης μορίων μυκοτοξίνης με τη μορφή συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης με τα μόρια της μυκοτοξίνης στους βαθμονομητές ή στα δείγματα για δέσμευση από το ειδικό κατά της μυκοτοξίνης μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού. Τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται στη στερεά φάση αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση της ραπανάδος (anti-mouse IgG-HRP) και η ανίχνευση πραγματοποιείται με την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος του ενζύμου ( $H_2O_2/ABTS$ ) προκειμένου να ληφθεί ένα μετρήσιμο σήμα μέσω της μέτρησης της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm των φρεατίων μικροτιπλοδότησης.

Κατά την ανάπτυξη των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης ως προς τη σύσταση των διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων (ρυθμιστικά διαλύματα ακινητοποίησης, αποκλεισμού και ανοσοανάλυσης), τη συγκέντρωση των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης για την επικάλυψη των φρεατίων μικροτιπλοδότησης, τη συγκέντρωση των αντισωμάτων και τη διάρκεια της ανάλυσης, με σκοπό την επίτευξη υψηλού σήματος μηδενικού βαθμονομητή και ευαισθησίας του προσδιορισμού όπως αυτή προσδιορίζεται μέσω της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης και το όριο ανίχνευσης.

##### 5.1.1 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ανοσοαντιδραστηρίων

Η συγκέντρωση των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης που χρησιμοποιείτε για την επικάλυψη των φρεατίων μικροτιπλοδότησης και η

συγκέντρωση των ειδικών κατά των μυκοτοξινών μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν τόσο το απόλυτο σήμα όσο και την ευαισθησία μιας ανοσοαντίδρασης ανταγωνιστικού τύπου.



**Σχήμα 5.1:** Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα για διαφορετικές συγκεντρώσεις μονοκλωνικού αντισώματος κατά της (α) OTA, (β), AFB1, (γ) FB1 και (δ) DON, όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα των συζευγμάτων OTA-OVA, AFB1-BSA, FB1-OVA και DON-OVA συγκέντρωσης 0,5 (μαύρη γραμμή), 1,0 (κόκκινη γραμμή), 2,0 (μπλε γραμμή) ή 5,0 μg/mL (πράσινη γραμμή), αντίστοιχα, για την επικάλυψη των φρεατίων μικροτιτλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναλήψεων  $\pm$  SD

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων συζεύγματος μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης και των αντίστοιχων ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων για την επιλογή του βέλτιστου συνδυασμού με



κριτήριο το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης για καθέναν από τους προσδιορισμούς (Σχήμα 5.1). Στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί εκείνοι που παρείχαν τιμές οπτικής απορρόφησης ίσες ή μεγαλύτερες από 1 για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και προσδιορίστηκε ο συνδυασμός που παρείχε την μεγαλύτερη ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης μέσω του προσδιορισμού έκτος από το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και το σήμα που αντιστοιχεί σε διαλύματα συγκεκριμένης συγκέντρωσης της κάθε μυκοτοξίνης.

Διαπιστώθηκε ότι χρησιμοποιώντας φρεάτια μικροτιπλοδότησης επικαλυμμένα με OTA-OVA 4  $\mu\text{g/mL}$ , AFB1-BSA 500  $\text{ng/mL}$ , FB1-OVA 100  $\text{ng/mL}$  και DON-OVA 500  $\text{ng/mL}$  και συγκέντρωση μονοκλωνικού αντισώματος κατά της OTA 200  $\text{ng/mL}$ , κατά της AFB1 200  $\text{ng/mL}$ , κατά της FB1 60  $\text{ng/mL}$  και κατά της DON 100  $\text{ng/mL}$ , αντίστοιχα, επιτεύχθηκαν ικανοποιητικά αναλυτικά σήματα και ευαισθησία ανίχνευσης. Χρησιμοποιώντας τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των ανοσοαντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια πειράματα βελτιστοποίησης της σύστασης των ρυθμιστικών διαλυμάτων και της χρονικής διάρκειας των ανοσοαντιδράσεων.

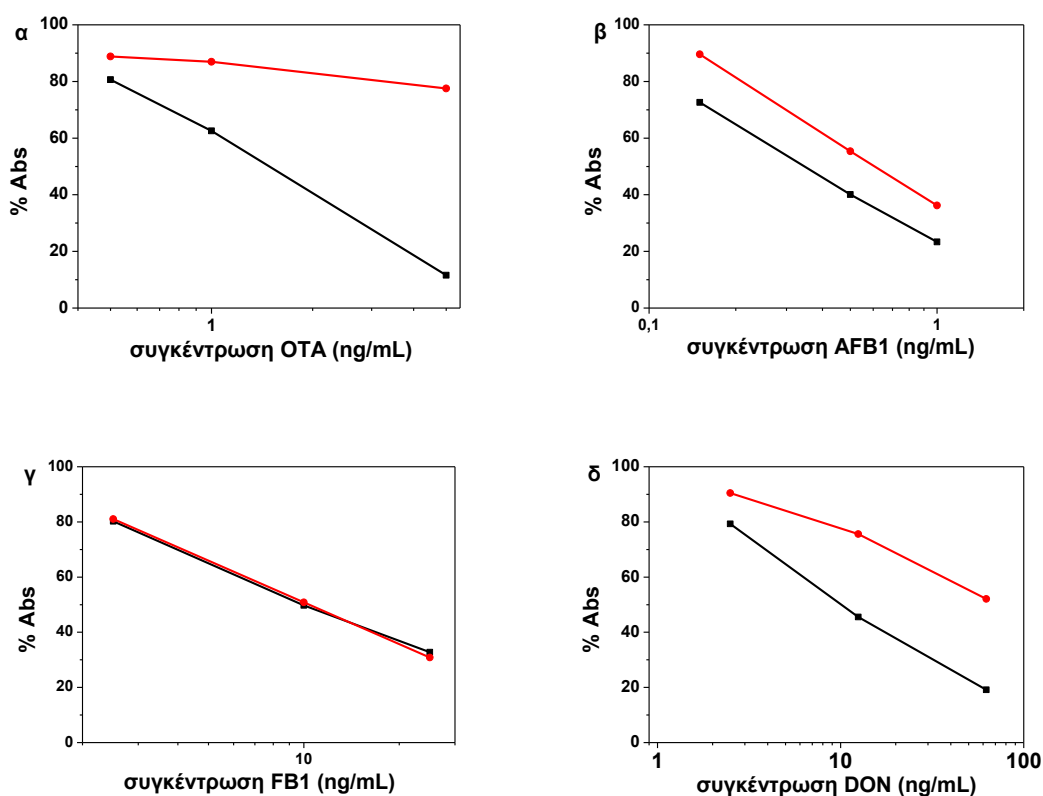
### **5.1.2 Βελτιστοποίηση της σύστασης ρυθμιστικών διαλυμάτων**

Χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις των ανοσοαντιδραστηρίων που επιλέχθηκαν παραπάνω, βελτιστοποιήθηκε η σύσταση των διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Πιο συγκεκριμένα ως προς το ρυθμιστικό διάλυμα της ανοσοαντίδρασης δοκιμάστηκε είτε διάλυμα Tris-HCl, 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl είτε διάλυμα φωσφορικών (PBS) 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl. Και στις δύο περιπτώσεις, για την ακινητοποίηση των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,25, ενώ ως διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών, 0,1 M, pH 8,5, που περιείχε 1% (β/ο) BSA. Η επιλογή της βέλτιστης σύστασης του διαλύματος ανοσοαντίδρασης βασίστηκε στην τιμή

του σήματος που ελήφθη τόσο για τα πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης όσο και για τα διαλύματα διαφόρων βαθμονομητών για κάθε μυκοτοξίνη.

Στο σχήμα 5.2 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0,5, 1,0 και 5,0 ng/mL για OTA, 0,15, 0,5 και 1,0 ng/mL για AFB1, 2,5, 10 και 25 ng/mL για FB1 και 2,5, 12,5, 62,5 ng/mL για DON, που ελήφθησαν με τα δύο ρυθμιστικά διαλύματα.



**Σχήμα 5.2:** Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης (α) 0,5, 1,0, και 5,0 ng/mL για OTA, (β) 0,15, 0,5 και 1,0 ng/mL για AFB1, (γ) 2,5, 10 και 25 ng/mL για FB1, και (δ) 2,5, 12,5 και 62,5 ng/mL για DON, που ελήφθησαν όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (κόκκινη γραμμή) ή Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 (μαύρη γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναλήψεων  $\pm$  SD

Το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης για όλες τις μυκοτοξίνες είχε παρόμοια τιμή και για τα δυο ρυθμιστικά διαλύματα. Όμως με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-

HCl 50 mM, pH 7,8 επιτεύχθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης για τους προσδιορισμούς των OTA, AFB1 και DON σε σχέση με το διάλυμα PBS 50 mM, pH 7,4, ενώ για τον προσδιορισμό της FB1 και τα δύο διαλύματα παρείχαν πανομοιότυπες καμπύλες βαθμονόμησης. Ως εκ τούτου επιλέχθηκε το διάλυμα Tris-HCl, 50 mM, που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl, για περαιτέρω βελτιστοποίηση. Αρχικά διερευνήθηκε το pH του διαλύματος ανοσοαντίδρασης για εύρος τιμών από 7,2 έως 8,0. Διαπιστώθηκε ότι το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και για τις τέσσερις μυκοτοξίνες ήταν παρόμοιο για όλο το εύρος των τιμών pH του ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης που ελέγχθηκε. Επίσης, η μεταβολή του pH του διαλύματος ανοσοαντίδρασης δεν επηρέασε την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης AFB1 και FB1, ενώ η ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης βελτιώθηκε για τους προσδιορισμούς των OTA και DON για τους οποίους χαμηλότερα ποσοστά εκτόπισης κατά ~5-10% παρατηρήθηκαν όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αυξήθηκε από 7,2 σε 7,8. Για το λόγο αυτό το pH του διαλύματος ανοσοαντίδρασης καθορίστηκε στο 7,8. Ελέγχθηκε επίσης η περιεκτικότητα του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε BSA για συγκεντρώσεις από 0,2 έως 2% και διαπιστώθηκε ότι το σήμα για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ήταν στατιστικά το ίδιο για όλες τις συγκεντρώσεις BSA που δοκιμάστηκαν. Επίσης όσον αφορά το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (σήμα που προσδιορίστηκε από φρεάτια που είχαν επικαλυφθεί με την φέρουσα πρωτεΐνη αντί του συζεύγματος μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης) παρατηρήθηκε μικρή αύξηση για συγκεντρώσεις BSA μικρότερες από 0,5% (ο/ο) και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η συγκέντρωση αυτή για το τελικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης.

Χρησιμοποιώντας το διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl ως ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης ελέγχθηκε η σύσταση των διαλυμάτων ακινητοποίησης των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης στα φρεάτια μικροπιλοδότησης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο ρυθμιστικά διαλύματα: ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,25 και PBS 50 mM, pH 7,4. Διαπιστώθηκε ότι και τα δύο διαλύματα παρείχαν παρόμοιες τιμές αναλυτικού σήματος τόσο για τον

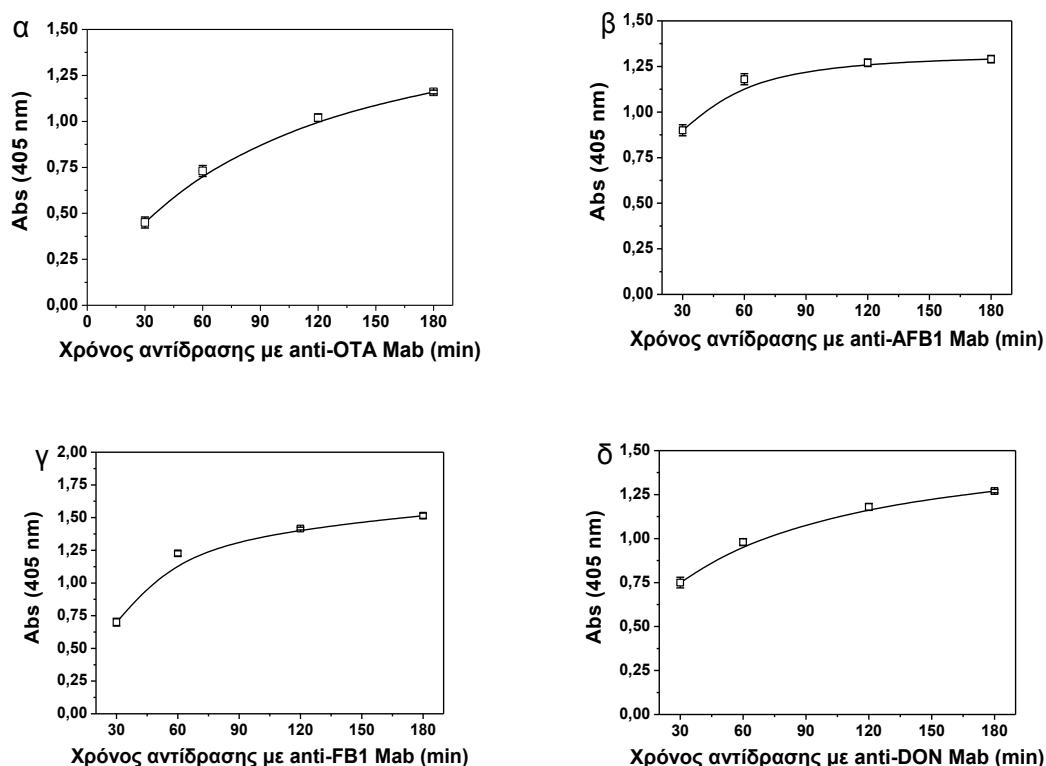
βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωση όσο και για τους υπόλοιπους βαθμονομητές. Επιλέγοντας το διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,25, ως ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης των συζευγμάτων μυκοτοξίνης- πρωτεΐνης μελετήθηκε στην συνέχεια η σύσταση του διαλύματος αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων στα φρεάτια μικροτιποδοτήσης. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5, το οποίο περιείχε είτε BSA είτε άπαχο γάλα σε σκόνη σε περιεκτικότητα από 0,5 έως 3% (β/ο). Διαπιστώθηκε ότι τα διαλύματα που περιείχαν BSA ως πρωτεΐνη αποκλεισμού παρείχαν χαμηλότερες τιμές μη ειδικής δέσμησης σε σχέση με τα διαλύματα που περιείχαν άπαχο γάλα. Επίσης το σήμα μη ειδικής δέσμησης μειωνόταν κατά την αύξηση της περιεκτικότητας του διαλύματος αποκλεισμού σε BSA από 0,5 σε 1%, αλλά περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας σε BSA δεν επέφερε κάποια σημαντική αλλαγή ούτε στο ειδικό ούτε στο σήμα μη ειδικής δέσμησης. Για τον λόγο αυτό ως διάλυμα αποκλεισμού επιλέχθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5, το οποίο περιείχε 1% (β/ο) BSA. Τέλος, βελτιστοποιήθηκε η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης του 2<sup>ου</sup> αντισώματος με σύγκριση διαλύματος Tris- HCl 0,15 M, pH 8,25 και διαλύματος φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, τα οποία περιείχαν 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl. Διαπιστώθηκε ότι ενώ το σήμα για το βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ήταν στατιστικά το ίδιο και για τα δυο διαλύματα, το σήμα μη ειδικής δέσμησης ήταν σημαντικά αυξημένο (σχεδόν τριπλάσιο) όταν χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα των φωσφορικών έναντι του διαλύματος Tris- HCl. Έτσι επιλέχθηκε το διάλυμα Tris-HCl 0,15 M, pH 8,25, 0,9% (β/ο) NaCl, 0,5% (β/ο) BSA ως ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης του 2<sup>ου</sup> αντισώματος.

### **5.1.3 Βελτιστοποίηση της χρονικής διάρκειας των ανοσοαντιδράσεων**

Χρησιμοποιώντας τα ρυθμιστικά διαλύματα για τα διάφορα στάδια της ανοσοαντίδρασης που επιλέχθηκαν, μελετήθηκε η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης. Για το σκοπό αυτό, διαλύματα βαθμονόμησης διαφορετικής συγκέντρωσης της κάθε μυκοτοξίνης αναμίχθηκαν σε κατ' όγκο αναλογία 1:1 με το διάλυμα του αντίστοιχου αντισώματος και επωάστηκαν για 30, 60, 120 και 180 λεπτά σε φρεάτια μικροτιποδοτήσης επικαλυμμένα με τα

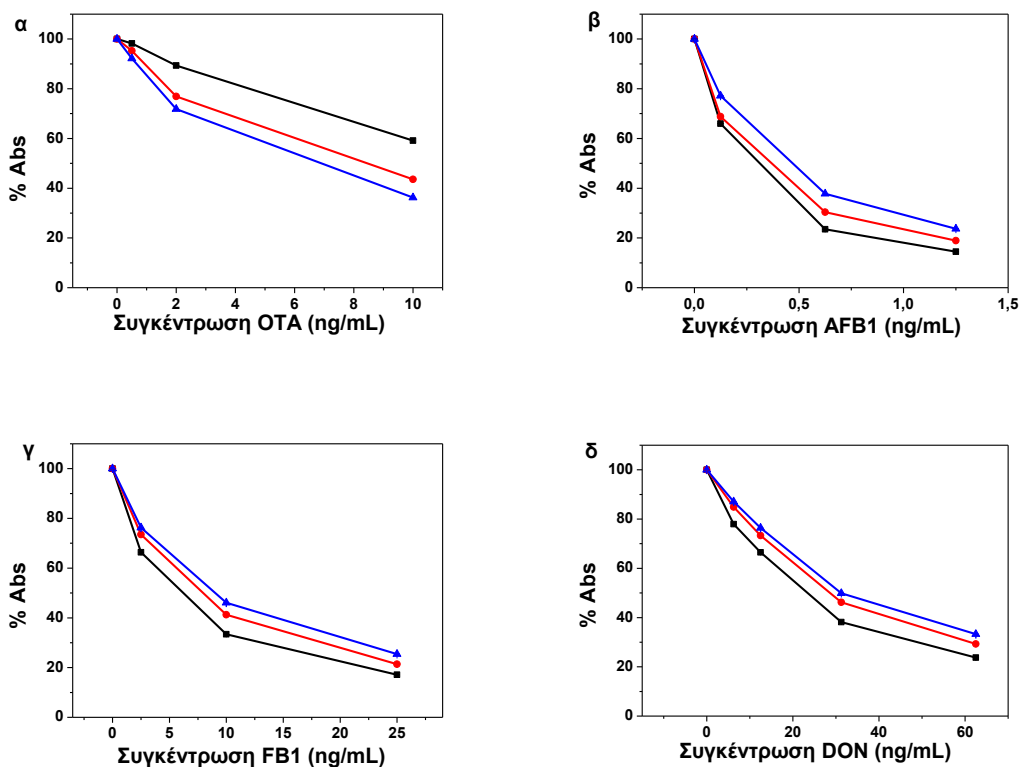
αντίστοιχα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης και τα απόλυτα σήματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο σχήμα 5.3.

Από το σχήμα 5.3 προκύπτει ότι αύξηση του χρόνου ανοσοαντίδρασης οδηγεί σε αύξηση του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης με μέγιστες τιμές να λαμβάνονται για χρονική διάρκεια ανοσοαντίδρασης μεγαλύτερη ή ίση των 120 λεπτών. Ωστόσο, από το ίδιο σχήμα προκύπτει ότι για χρόνο ανοσοαντίδρασης 60 λεπτών λαμβάνονται τιμές απορρόφησης περίπου ίσες με το 80% της μέγιστης τιμής για τους προσδιορισμούς των AFB1, FB1 και DON, ενώ αντίστοιχα για τον προσδιορισμό της OTA το 80% της μέγιστης τιμής απορρόφησης λαμβάνεται για χρόνο ανοσοαντίδρασης 120 λεπτών.



**Σχήμα 5.3: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης της (α) OTA, (β) AFB1, (γ) FB1 και (δ) DON συναρτήσει της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων  $\pm$  SD**

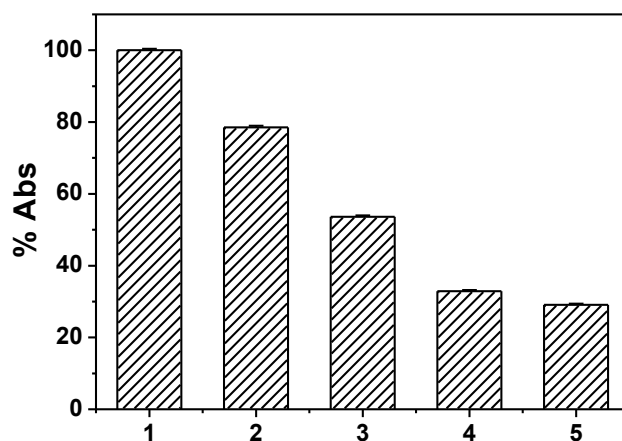
Στο σχήμα 5.4 παρουσιάζονται οι τιμές της επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για βαθμονομητές OTA συγκέντρωσης 0,5, 2,0 και 10 ng/mL, AFB1 0,031, 0,125, 0,625 και 1,25 ng/mL, FB1 2,5, 10,0 και 25 ng/mL και DON 6,25, 12,5, 31,25 και 62,5 ng/mL, για χρονική διάρκεια ανοσοαντίδρασης 60, 120 και 180 λεπτά. Από το σχήμα προκύπτει ότι για τους προσδιορισμούς των AFB1, FB1 και DON επιτυγχάνεται υψηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης καθώς μειώνεται ο χρόνος της ανοσοανάλυσης από 180 σε 60 λεπτά, ενώ για τον προσδιορισμό της OTA η ευαισθησία ανίχνευσης βελτιώνεται σημαντικά καθώς αυξάνεται ο χρόνος της ανάλυσης από 60 σε 120 λεπτά, ενώ μικρή βελτίωση επιτυγχάνεται για περαιτέρω αύξηση της διάρκειας της ανάλυσης στα 180 λεπτά.



**Σχήμα 5.4:** Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης προτύπων διαλυμάτων OTA συγκέντρωσης 0,5, 2,0, 10 ng/mL (α), AFB1 συγκέντρωσης 0,125, 0,625, 1,25 ng/mL (β), FB1 συγκέντρωσης 2,5, 10, 25 ng/mL (γ) και DON συγκέντρωσης 6,25, 12,5, 31,25, 62,5 ng/mL (δ) που ελήφθησαν για χρόνους ανοσοαντίδρασης 60 (μαύρη γραμμή), 120 (κόκκινη γραμμή) και 180 λεπτά (μπλε γραμμή). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων  $\pm$  SD

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν τα 60 λεπτά ως χρόνος ανοσοαντίδρασης για τους προσδιορισμούς των AFB1, FB1 και DON και τα 120 λεπτά για τον προσδιορισμό της OTA, έτσι ώστε να συνδυαστεί ο μικρότερος δυνατός χρόνος ανάλυσης με την υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης.

Μια άλλη παράμετρος που ελέγχθηκε ήταν η επίδραση της προ-επώασης των βαθμονομητών με το ειδικό κατά της μυκοτοξίνης αντίσωμα στην ευαισθησία του προσδιορισμού. Για το σκοπό αυτό, διαλύματα βαθμονομητών αναμίχθηκαν σε κατ' όγκο αναλογία 1:1 με το διάλυμα του αντισώματος και επωάστηκαν για 30, 60 και 120 λεπτά πριν από την προσθήκη των μιγμάτων στα φρεάτια μικροπιλοδότησης. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που ελήφθησαν για τον ίδιο βαθμονομητή χωρίς το στάδιο της προ-επώασης, δηλαδή την ανάμιξη των διαλυμάτων αμέσως πριν την εισαγωγή τους στα φρεάτια. Τα σήματα που ελήφθησαν με τον εκάστοτε βαθμονομητή εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό ποσοστά των σημάτων των αντίστοιχων βαθμονομητών μηδενικής συγκέντρωσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η προ-επώαση δεν επηρέασε το σήμα του μηδενικού βαθμονομητή για καμία από τις τέσσερις μυκοτοξίνες.



**Σχήμα 5.5:** Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης του σήματος που λαμβάνονται από βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης της OTA χωρίς προεπώαση με το διάλυμα αντισώματος (στήλη 1) και από βαθμονομητή που περιέχει 1,0 ng/mL OTA χωρίς προ-επώαση (στήλη 2), με προεπώαση για 30 (στήλη 3), 60 (στήλη 4) ή 120 λεπτά (στήλη 5) με το αντίσωμα κατά της OTA. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων  $\pm$  SD

Στο σχήμα 5.5 παρουσιάζονται η επί τοις εκατό ποσοστιαία εκτόπιση των σημάτων που ελήφθησαν για έναν βαθμονομητή που περιέχει 1,0 ng/mL OTA ως προς το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, χωρίς προ-επώαση όσο και με προ-επώαση για 30, 60 και 120 λεπτά.

Όπως είναι προφανές από τα επί τοις εκατό ποσοστά που αντιστοιχούν στον βαθμονομητή που περιέχει 1,0 ng/mL OTA, το στάδιο της προ-επώασης βελτίωσε σημαντικά την ευαισθησία του προσδιορισμού. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά εκτόπισης που επιτεύχθηκαν μετά από επώαση του βαθμονομητή με το διάλυμα του αντισώματος κατά της OTA για 30, 60 και 120 λεπτά ήταν 55,6%, 32,9% και 29,1%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με ποσοστό εκτόπισης 78,5% που ελήφθη χωρίς προ-επώαση. Με άλλα λόγια, επιτυγχάνεται σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης όταν πραγματοποιείται προ-επώαση των βαθμονομητών με το αντίσωμα κατά της OTA για 60 λεπτά, ενώ επιπλέον προ-επώαση έως και 120 λεπτά δεν οδηγεί σε περαιτέρω βελτίωση. Έτσι, για να βελτιωθεί η ευαισθησία της ανάλυσης χωρίς να αυξηθεί υπερβολικά ο χρόνος της ανάλυσης, υιοθετήθηκε ένα στάδιο προ-επώασης 60 λεπτών στο τελικό πρωτόκολλο προσδιορισμού της OTA.

Σε αντίστοιχα πειράματα για τους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς των AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> και DON διαπιστώθηκε ότι το στάδιο της προ-επώασης των βαθμονομητών με το αντίσωμα κατά της μυκοτοξίνης δεν επηρέασε την ευαισθησία του προσδιορισμού (κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση αναλύτη) και πιο συγκεκριμένα για χρόνους προ-επώασης 15, 30 και 60 λεπτών δεν επετεύχθη καμία βελτίωση στην ευαισθησία της ανάλυσης. Για το λόγο αυτό δεν υιοθετήθηκε στάδιο προ-επώασης στα τελικά πρωτόκολλα προσδιορισμού των AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> και DON.

#### **5.1.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών στα φρεάτια μικροτιλοδότησης**

Με βάση τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης των διαφόρων παραμέτρων, καταρτίστηκε το τελικό πρωτόκολλο των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών των μυκοτοξινών OTA, AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> και DON σε φρεάτια

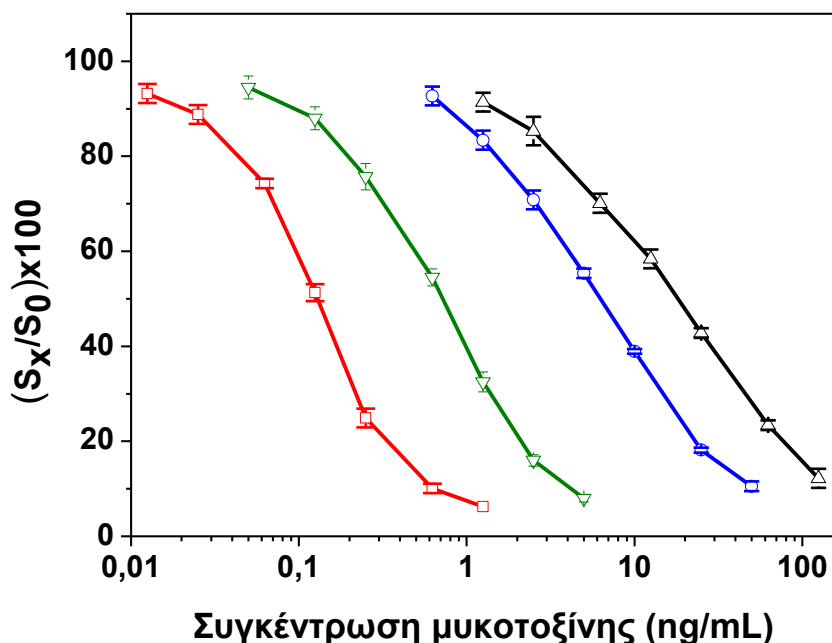


μικροτιπλοδότησης το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 4.8 και παρουσιάζεται συνοπτικά στον πίνακα 5.1.

**Πίνακας 5.1: Πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού των μυκοτοξινών OTA, AFB1, FB1 & DON σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης**

Στάδια	Συνθήκες	Χρονική διάρκεια
Ακίνητοποίηση συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης	100 μL/φρεάτιο: OTA-OVA 4 μg/mL, AFB1-BSA 500 ng/mL, FB1-OVA 100 ng/mL, DON-OVA 500 ng/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα ακίνητοποίησης	18-22 ώρες
Έκπλυση	2x300 μL/φρεάτιο: διάλυμα Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, 0,9% NaCl	-
Επικάλυψη κενών θέσεων των φρεατίων	300 μL/φρεάτιο: 1% (β/ο) BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού	60 λεπτά
Έκπλυση	2x300 μL/φρεάτιο: διάλυμα Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, 0,9% NaCl	-
Προεπάωση	μίγμα ίσης αναλογίας όγκων προτύπων διαλυμάτων OTA και διαλύματος αντισώματος κατά της OTA σε ΡΔΑ	60 λεπτά
Ανάλυση	100 μL/φρεάτιο: μίγμα 1:1 προτύπων διαλυμάτων και διαλυμάτων αντισωμάτων κατά των μυκοτοξινών σε ΡΔΑ τελικές συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά της: AFB1 100 ng/mL, FB1 30 ng/mL, DON 50 ng/mL	60 λεπτά
	100 μL/φρεάτιο: προ-επωασμένο μίγμα προτύπων διαλυμάτων OTA και διαλύματος αντισώματος κατά της OTA τελική συγκέντρωση αντισώματος κατά της OTA 100 ng/mL	120 λεπτά
Έκπλυση	4x300 μL/φρεάτιο: διάλυμα Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, 0,9% NaCl	-
Ανίχνευση	100 μL/φρεάτιο: διάλυμα συζεύγματος υπεροξειδάσης με αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 1 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα 2 <sup>ου</sup> αντισώματος	40 λεπτά
Έκπλυση	4x300 μL/φρεάτιο: διάλυμα Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25, 0,9% NaCl	-
Χρωμογόνο υπόστρωμα	100 μL/φρεάτιο: ABTS/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών 0,1 M, pH 4,5	30 λεπτά

Οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε μυκοτοξίνη που ελήφθησαν με τα τελικά πρωτόκολλα των ενζυμικών ανοσοπροσδιορισμών παρουσιάζονται στο σχήμα 5.6.



Σχήμα 5.6: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης ELISA για AFB1 (κόκκινη καμπύλη), OTA (πράσινη καμπύλη), FB1 (μπλε καμπύλη) και DON (μαύρη καμπύλη). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 4 επαναλήψεων  $\pm$  SD

Το όριο ανίχνευσης προσδιορισμού (LOD) υπολογίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή 20 επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης αφαιρώντας την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη 3 φορές ( $-3 \times SD$ ). Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, αφαιρώντας την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη 6 φορές ( $-6 \times SD$ ,  $n=20$ ).

Τα LODs των ανοσοχημικών προσδιορισμών ELISA ήταν 0,005, 0,05, 0,6 και 1,6 ng/mL για τις AFB1, OTA, FB1 και DON αντίστοιχως, σε ρυθμιστικό διάλυμα. Τα LOQs ήταν 0,02, 0,1, 1,2 και 3,0 ng/mL για τις AFB1, OTA, FB1 και DON αντίστοιχα. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των μεθόδων ELISA που αναπτύχθηκαν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των προσδιορισμών ELISA των τεσσάρων μυκοτοξινών**

<b>Μυκοτοξίνες</b>	<b>LOD (ng/mL)</b>	<b>LOQ (ng/mL)</b>	<b>Δυναμική περιοχή (ng/mL)</b>
OTA	0,05	0,10	0,1-5,0
AFB1	0,005	0,02	0,02-1,25
FB1	0,6	1,2	1,2-50
DON	1,6	3,0	3,0-125

## **5.2 Βελτιστοποίηση των ανοσοπροσδιορισμών στον αισθητήρα**

Ο ανοσοχημικός προσδιορισμός μυκοτοξινών με τον αναπτυσχθέντα οπτικό αισθητήρα βασίζεται σε ανοσοανάλυση ανταγωνιστικού τύπου που συνιστάται από δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η ανταγωνιστική ανοσοαντίδραση μεταξύ των ακινητοποιημένων στην επιφάνεια του αισθητήρα συζευγμάτων πρωτεΐνης-μυκοτοξίνης με τα μόρια των μυκοτοξινών στους βαθμονομητές ή τα δείγματα για δέσμευση από τα ειδικά κατά της κάθε μυκοτοξίνης μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού και στο δεύτερο λαμβάνει χώρα ανοσοαντίδραση μεταξύ των ανοσοπροσοροφημένων μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού και του αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού (δεύτερο αντίσωμα). Η δεύτερη ανοσοαντίδραση εισήχθη ως βήμα ενίσχυσης του σήματος προκειμένου να επεκταθεί το δυναμικό εύρος των προσδιορισμών και να μειωθεί η διάρκεια της ανάλυσης.

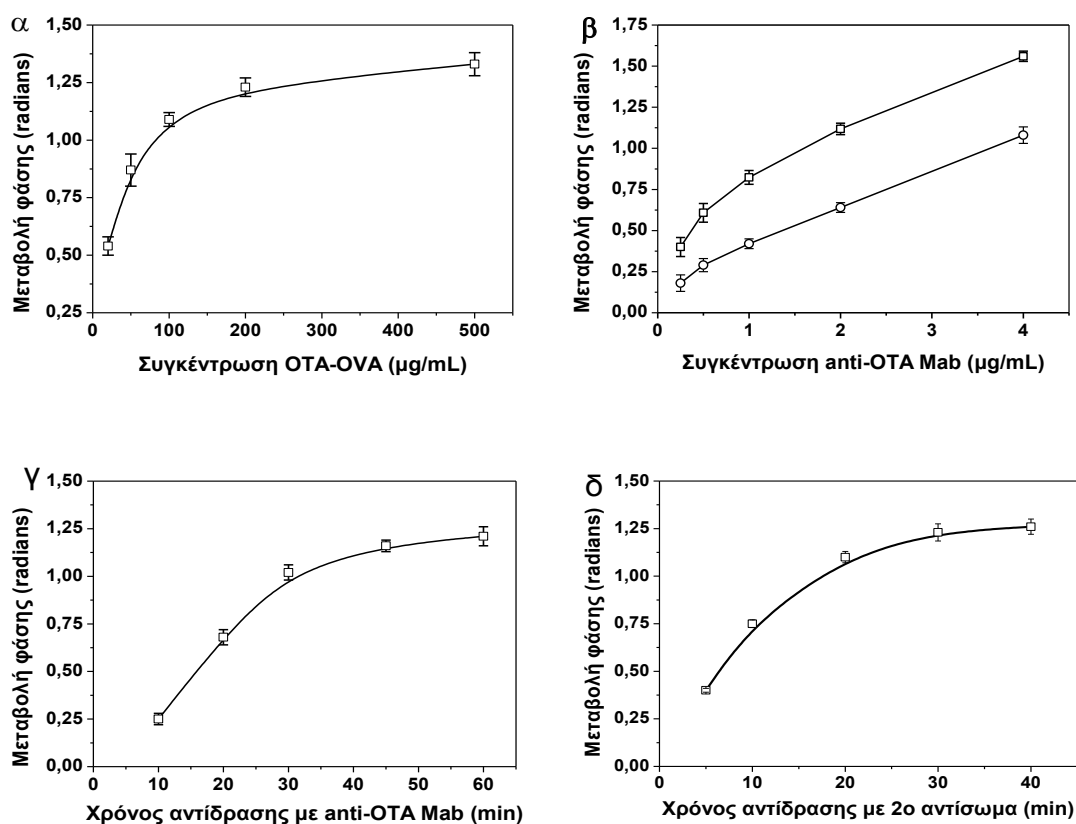
Η επιλογή της σύστασης των διαφόρων ρυθμιστικών διαλυμάτων (ρυθμιστικά διαλύματα ακινητοποίησης, αποκλεισμού και ανοσοανάλυσης) πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης, ενώ η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης, της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων καθώς και της διάρκειας των σταδίων της ανοσοαντίδρασης, πραγματοποιήθηκε στον αισθητήρα BB-MZI.

### 5.2.1 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της ΟΤΑ στον αισθητήρα

Για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης ΟΤΑ-OVA για την επικάλυψη των BB-MZI, διαφορετικοί αισθητήρες στην ίδια ψηφίδα επικαλύφθηκαν με διαλύματα ΟΤΑ-OVA, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 20 έως 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.7α, τιμές μέγιστου για το σήμα μηδενικού βαθμονομητή ελήφθησαν για συγκεντρώσεις ΟΤΑ-OVA ίσες ή μεγαλύτερες από 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Επιπλέον, όταν η συγκέντρωση ΟΤΑ-OVA στο διάλυμα επικάλυψης ήταν ίση ή μεγαλύτερη από 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στο συντελεστή διακύμανσης των μετρήσεων που λαμβάνονταν από τους διαφορετικούς αισθητήρες μιας ψηφίδας. Έτσι, η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε για περαιτέρω πειράματα.

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που βελτιστοποιήθηκε ήταν η συγκέντρωση του αντισώματος κατά της ΟΤΑ. Στο σχήμα 5.7β παρέχονται οι τιμές που αντιστοιχούν στον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, καθώς και τα σήματα που αντιστοιχούν σε ένα βαθμονομητή που περιέχει 2,5  $\text{ng}/\text{mL}$  ΟΤΑ. Όπως φαίνεται και στο σχήμα, αμφότερα τα σήματα αυξήθηκαν με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της ΟΤΑ από 0,25 έως 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ωστόσο, η αναλογία του σήματος που ελήφθη για το διάλυμα του βαθμονομητή συγκέντρωσης 2,5  $\text{ng}/\text{mL}$  σε ΟΤΑ ως προς το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης αυξήθηκε επίσης με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντισώματος, μειώνοντας την ευαισθησία του προσδιορισμού. Συνεπώς προκειμένου να επιτευχθεί συνδυασμός υψηλού σήματος βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και ευαισθησίας του ανοσοπροσδιορισμού επιλέχθηκε συγκέντρωση αντισώματος 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , η οποία παρείχε σήμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ίσο περίπου με 1 rad και ποσοστό εκτόπισης για τον βαθμονομητή που περιείχε 2,5  $\text{ng}/\text{mL}$  ΟΤΑ 57% σε σχέση με τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. Σημειώνεται, ότι οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντισώματος παρείχαν ελαφρώς υψηλότερη ευαισθησία με εκτόπιση περίπου 45-50% για τον βαθμονομητή των 2,5  $\text{ng}/\text{mL}$ , ωστόσο σε αυτή την περίπτωση τα σήματα που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης κυμαίνονταν από 0,4 έως 0,8

με συντελεστές διακύμανσης μεγαλύτερους από 10%, επηρεάζοντας αρνητικά την ευαισθησία και το δυναμικό εύρος του προσδιορισμού.



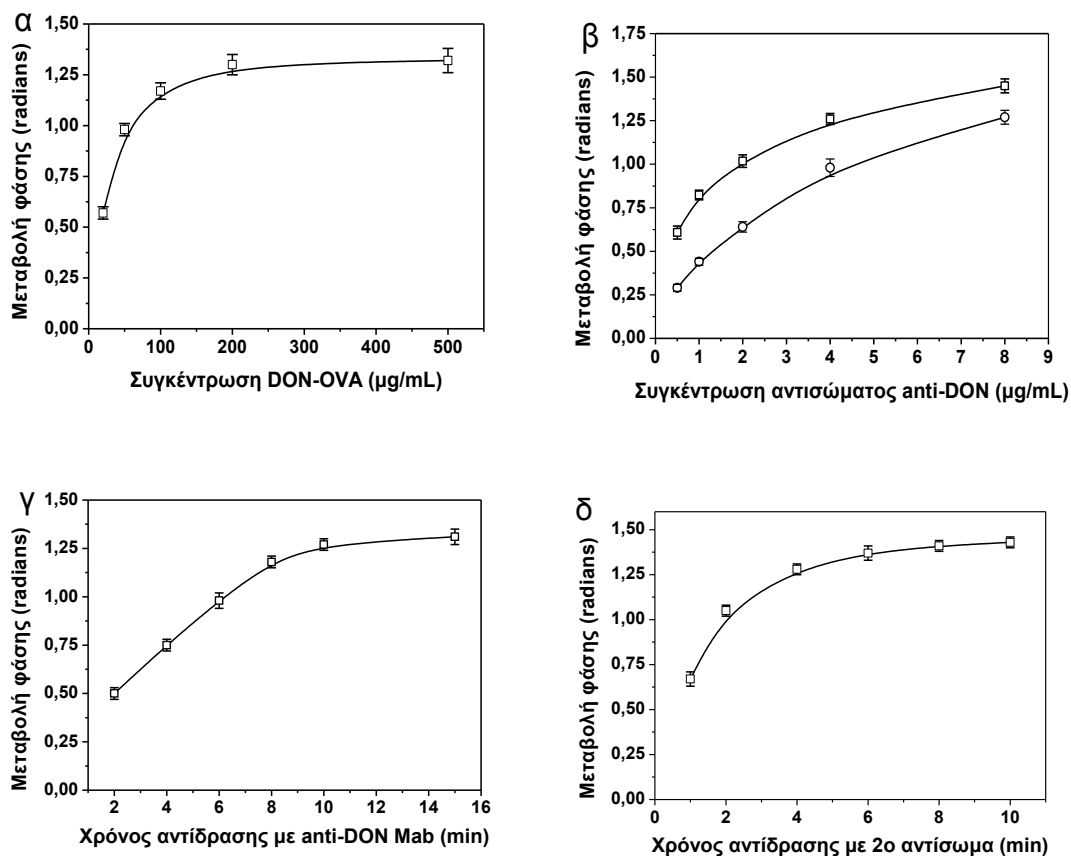
**Σχήμα 5.7:** α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος OTA-OVA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της OTA στα σήματα που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και για βαθμονομητή που περιέχει 2,5 ng/mL OTA (○) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος OTA-OVA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος OTA-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της OTA 2 μg/mL και ακολούθησε 20 λεπτά αντίδρασης με διάλυμα 2<sup>ου</sup> αντισώματος συγκέντρωσης 10 μg/mL. δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, που λαμβάνεται από αισθητήρες που είχαν επικαλυφθεί με 100 μg/mL OTA-OVA και για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε μίγμα 1:1 του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης με διάλυμα αντισώματος κατά της OTA 4 μg/mL για 30 min. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι τιμές αντιστοιχούν στην μέση τιμή των σημάτων που ελήφθησαν από 7 MZI (3 φορές έκαστος) ± SD

Χρησιμοποιώντας αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 µg/mL OTA-OVA και συγκέντρωση αντισώματος κατά της OTA 2 µg/mL (τελική συγκέντρωση στο διάλυμα) πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης της διάρκειας των ανοσοαντιδράσεων, δηλαδή η διάρκεια της αντίδρασης του αντισώματος κατά της OTA με τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του αισθητήρα μόρια OTA, καθώς επίσης και η διάρκεια της αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με το ανοσοπροσροφημένο στην επιφάνεια αντίσωμα κατά της OTA.

Όπως προκύπτει από το σχήμα 5.7γ, το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης αυξανόταν με την αύξηση του χρόνου της ανοσοαντίδρασης και μέγιστες τιμές οροφής ελήφθησαν για διάρκεια αντίδρασης ίση ή μεγαλύτερη των 60 λεπτών. Ωστόσο, περισσότερο από το 80% της μέγιστης τιμής σήματος ελήφθη για διάρκεια αντίδρασης ίση με 30 λεπτά. Έτσι, για να διατηρηθεί ο χρόνος ανάλυσης όσο το δυνατόν μικρότερος, επιλέχθηκε ως χρόνος αντίδρασης τα 30 λεπτά. Ομοίως, για την αντίδραση με το δεύτερο αντίσωμα, επιλέχθηκε η χρονική διάρκεια της αντίδρασης να είναι 20 λεπτά, εφόσον παρατηρήθηκε μόνο μια σχετικά μικρή αύξηση σήματος βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (περίπου 15%), όταν ο χρόνος αντίδρασης αυξήθηκε έως τα 40 λεπτά (βλέπε σχήμα 5.7δ).

### **5.2.2 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της DON στον αισθητήρα**

Στο σχήμα 5.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης διαφόρων παραμέτρων του προσδιορισμού της DON στον αισθητήρα BB-MZI. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του συζεύγματος DON-OVA που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των MZIs, μέγιστες τιμές οροφής για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ελήφθησαν για συγκέντρωση DON-OVA ίση ή μεγαλύτερη από 200 µg/mL (Σχήμα 5.8α). Δεδομένου όμως ότι περισσότερο από το 90% της μέγιστης τιμής επιτυγχάνεται για συγκέντρωση DON-OVA 100 µg/mL, η συγκέντρωση αυτή τελικά επιλέχθηκε για την επικάλυψη των MZI.



**Σχήμα 5.8:** α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος DON-OVA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της DON στο σήμα που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και βαθμονομητή που περιέχει 17,5 ng/mL DON (ο) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος DON-OVA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος DON-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της DON συγκέντρωσης 1 μg/mL. δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος DON-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της DON συγκέντρωσης 1 μg/mL για 8 λεπτά. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD

Για να επιλεγεί η συγκέντρωση του αντισώματος κατά της DON, προσδιορίστηκαν οι τιμές που λαμβάνονται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και ένα βαθμονομητή που περιέχει 17,5 ng/mL DON για

διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος κατά της DON. Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.8β και τα δύο σήματα αυξάνονταν καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του αντισώματος κατά της DON. Ωστόσο, ο λόγος του σήματος που αντιστοιχεί στον βαθμονομητή που περιέχει 17,5 ng/mL DON ως προς το σήμα που λαμβάνεται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, ο οποίος αποτελεί ένδειξη της ευαισθησίας της ανάλυσης, μειώθηκε όταν οι συγκεντρώσεις του αντισώματος αυξήθηκαν από 1 µg/mL σε 2 µg/mL ή υψηλότερες συγκεντρώσεις. Έτσι, προκειμένου να συνδυαστεί το υψηλό σήμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης με τη μεγαλύτερη ευαισθησία προσδιορισμού, επιλέχθηκε συγκέντρωση αντισώματος κατά της DON 1 µg/mL.

Η διάρκεια των δύο σταδίων του ανοσοπροσδιορισμού βελτιστοποιήθηκε επίσης με κριτήριο τις μέγιστες τιμές σήματος δηλαδή το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν 8 λεπτά για το πρώτο στάδιο ανοσοαντίδρασης και 4 λεπτά για το δεύτερο, δεδομένου ότι περισσότερο από το 85% του μέγιστου σήματος ελήφθη για αυτούς τους χρόνους ανάλυσης (Σχήμα 5.8 γ-δ).

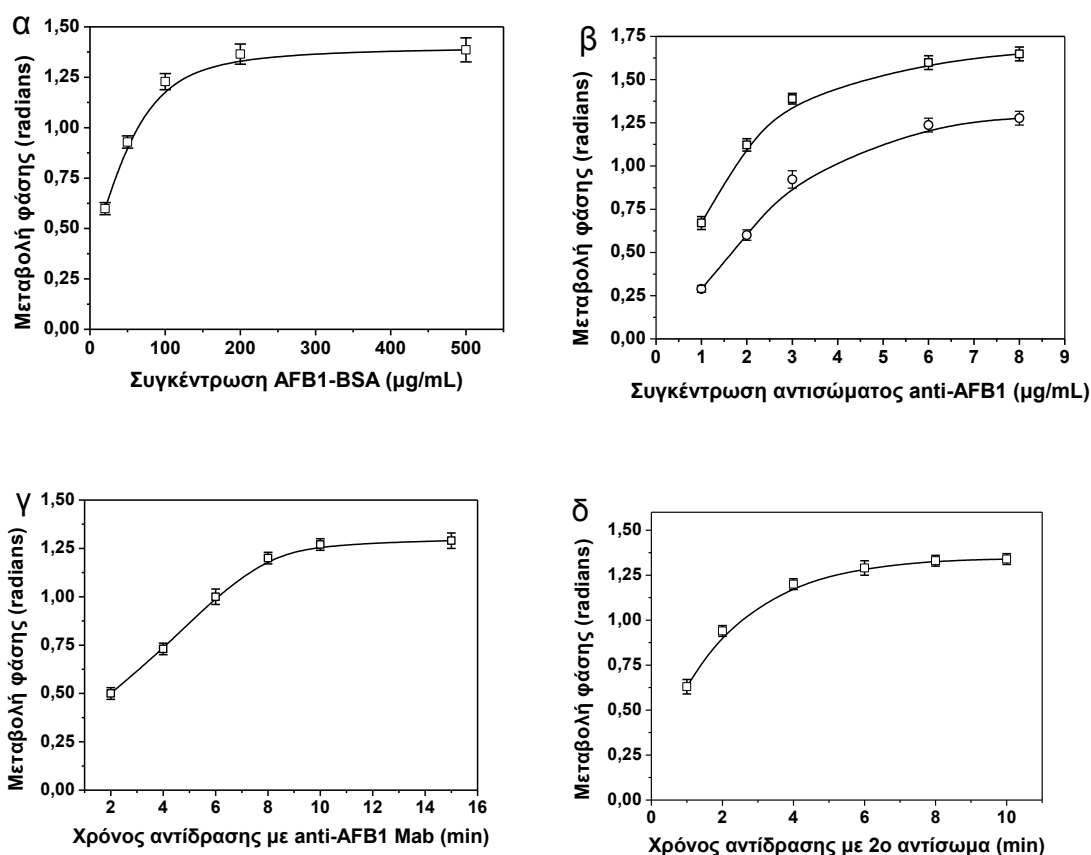
### **5.2.3 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της AFB1 στον αισθητήρα**

Στο σχήμα 5.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων του ανοσοπροσδιορισμού της AFB1 στον αισθητήρα BB-MZI. Ως προς τη συγκέντρωση του συζεύγματος AFB1-BSA που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των MZIs, μέγιστες τιμές οροφής για το σήμα που αντιστοιχεί στον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ελήφθησαν για συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη από 100 µg/mL (Σχήμα 5.9α). Δεδομένου όμως ότι το 90% της μέγιστης τιμής επιτυγχάνεται για AFB1-BSA συγκέντρωσης 100 µg/mL, η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο.

Για να επιλεγεί η συγκέντρωση του αντισώματος κατά της AFB1, προσδιορίστηκαν οι αποκρίσεις που παρέχονται για τον βαθμονομητή



μηδενικής συγκέντρωσης και ένα βαθμονομητή που περιέχει 1,25 ng/mL AFB1 για διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος κατά της AFB1.



**Σχήμα 5.9:** α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος AFB1-BSA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της AFB1 στο σήμα που λαμβάνεται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και έναν βαθμονομητή που περιέχει 1,25 ng/mL AFB1 (ο) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος AFB1-BSA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος AFB1-BSA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της AFB1 συγκέντρωσης 2 μg/mL. δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100 μg/mL συζεύγματος AFB1-BSA, στους οποίους διαβιβάστηκε για 8 λεπτά διάλυμα αντισώματος κατά της AFB1 συγκέντρωσης 2 μg/mL. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD

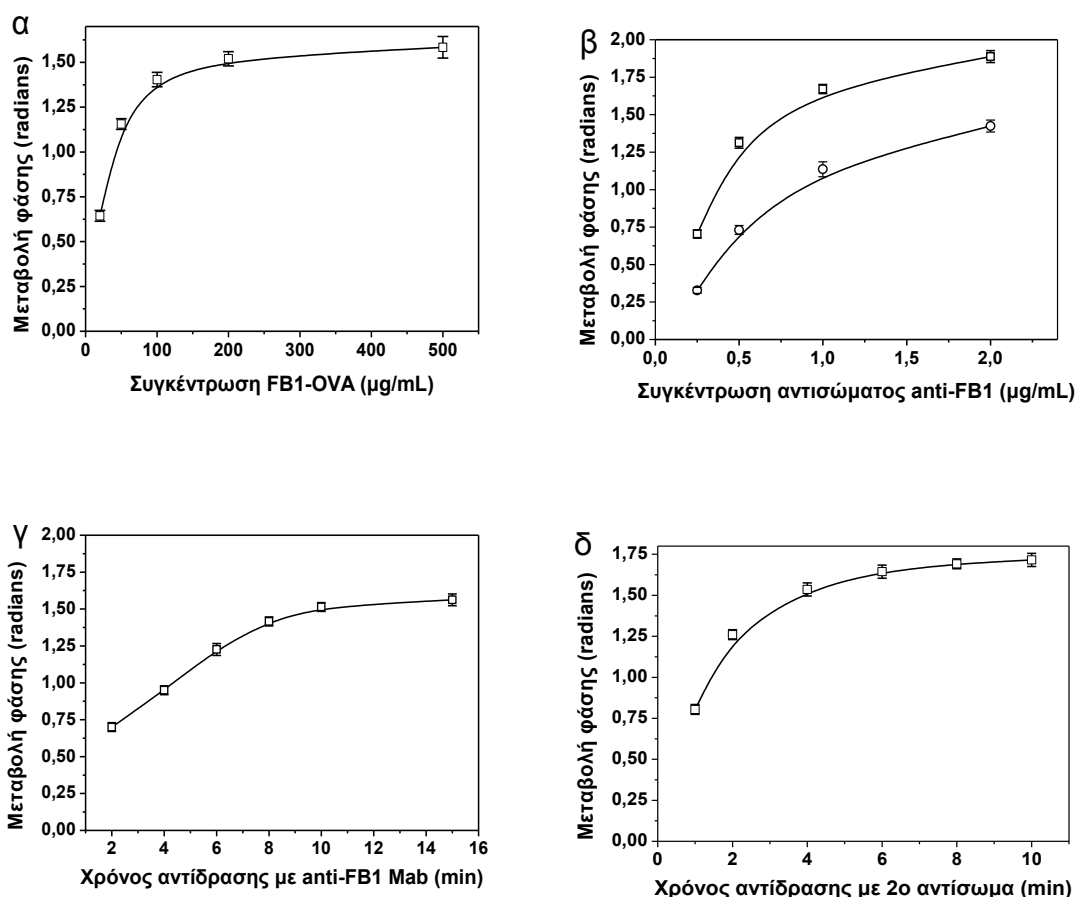
Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.9β και τα δύο σήματα αυξάνονταν καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του αντισώματος κατά της AFB1. Ωστόσο, ο λόγος του σήματος που αντιστοιχεί σε βαθμονομητή που περιείχε 1,25 ng/mL AFB1 ως προς το σήμα που αντιστοιχεί στον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης μειώθηκε όταν οι συγκεντρώσεις του αντισώματος αυξήθηκαν από 2 µg/mL σε 3 µg/mL ή υψηλότερες τιμές. Έτσι, για να επιτευχθεί το υψηλότερο σήμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης σε συνδυασμό με υψηλή ευαισθησία, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 2 µg/mL για το αντίσωμα κατά της AFB1.

Η διάρκεια των δύο σταδίων ανοσοπροσδιορισμού βελτιστοποιήθηκε επίσης σε σχέση με τις μέγιστες τιμές σήματος για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν 8 λεπτά για το πρώτο στάδιο της ανοσοαντίδρασης και 4 λεπτά για το δεύτερο, δεδομένου ότι περισσότερο από το 85% του μέγιστου σήματος ελήφθη για αυτόν τον συνδυασμό χρόνων αντίδρασης (Σχήμα 5.9 γ και δ).

#### **5.2.4 Βελτιστοποίηση του ανοσοπροσδιορισμού της FB1 στον αισθητήρα**

Στο σχήμα 5.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης διαφόρων παραμέτρων του ανοσοχημικού προσδιορισμού της FB1 στον αισθητήρα BB-MZI. Η συγκέντρωση του συζεύγματος FB1-OVA που επιλέχθηκε για την επικάλυψη των MZIs ήταν 100 µg/mL, δεδομένου ότι μέγιστες τιμές σήματος ελήφθησαν για συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη από 200 µg/mL και περισσότερο από το 90% της μέγιστης τιμής οροφής επιτυγχάνεται για αυτή τη συγκέντρωση (Σχήμα 5.10α). Για να επιλεγεί η συγκέντρωση του αντισώματος, προσδιορίστηκαν οι τιμές που λαμβάνονται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και ένα βαθμονομητή που περιείχε 6,25 ng/mL FB1, για διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντισώματος κατά της FB1. Όπως προκύπτει από το σχήμα 5.10β, υψηλό σήμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης σε συνδυασμό με υψηλή ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης όπως αυτή εκφράζεται από την ποσοστιαία

πτώση του σήματος παρουσία του αναλύτη επιτυγχάνεται για συγκέντρωση αντισώματος κατά της FB1 ίση με 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .



Σχήμα 5.10: α) Επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος FB1-OVA στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. β) Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της FB1 στο σήμα που λαμβάνεται για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (□) και έναν βαθμονομητή που περιέχει 6,25 ng/mL FB1 (○) από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100  $\mu\text{g/mL}$  συζεύγματος FB1-OVA. γ) Επίδραση της διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100  $\mu\text{g/mL}$  συζεύγματος FB1-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε διάλυμα αντισώματος κατά της FB1 συγκέντρωσης 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . δ) Επίδραση της διάρκειας της αντίδρασης με το δεύτερο αντίσωμα στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που λαμβάνεται από αισθητήρες επικαλυμμένους με 100  $\mu\text{g/mL}$  συζεύγματος FB1-OVA στους οποίους διαβιβάστηκε για 8 λεπτά διάλυμα αντισώματος κατά της FB1 συγκέντρωσης 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD

Όσον αφορά την διάρκεια των δύο σταδίων του ανοσοπροσδιορισμού, επιλέχθηκαν 8 λεπτά για το πρώτο στάδιο και 4 λεπτά για το δεύτερο, αφού όπως προκύπτει από τα σχήματα 5.10γ και 5.10δ, αντίστοιχα, για αυτούς τους χρόνους επιτυγχάνεται σήμα μεγαλύτερο από 90% του σήματος οροφής.

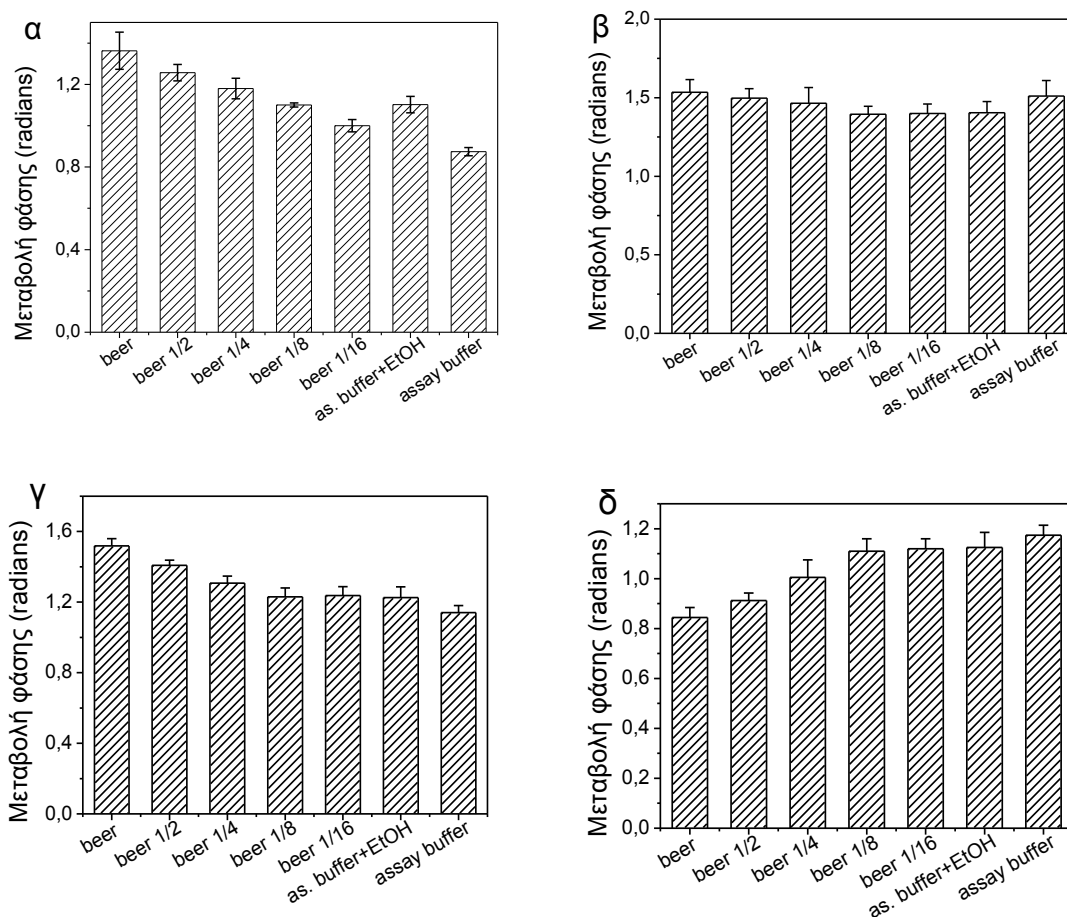
### **5.3 Επιλογή μήτρας για την παρασκευή των βαθμονομητών**

Η μπίρα είναι ένα περίπλοκο δείγμα, το οποίο εκτός των άλλων συστατικών περιέχει σημαντική ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, έχει pH περίπου 4,5 γεγονός που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την δεσμευτική ικανότητα του αντισώματος και κατά συνέπεια την ευαισθησία του ανοσοπροσδιορισμού. Συνήθως η επίδραση της μήτρας της μπίρας περιορίζεται με την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα, δηλαδή με απαέρωση της μπίρας η οποία συνοδεύεται με αραίωση με το επιλεγμένο ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης ώστε να ρυθμιστεί και το pH του δείγματος σε τιμές που δεν επηρεάζουν αρνητικά το αντίσωμα της ανάλυσης.

Όσον αφορά την απαέρωση των δειγμάτων μπίρας βρέθηκε ότι κατεργασία για 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων απομακρύνει το διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι δεν δημιουργούνται περαιτέρω φυσαλίδες αερίου κατά την έντονη ανάδευση του δείγματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι αν παραλειφθεί το στάδιο της απαέρωσης, η δημιουργία φυσαλίδων μέσα στη μικρορευστομηχανική κυψελίδα κατά τη διαβίβαση των δειγμάτων επηρεάζει αρνητικά την επαναληψιμότητα των μετρήσεων, με αποτέλεσμα οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης των αποκρίσεων που λαμβάνονται για τους διαφορετικούς αισθητήρες μιας ψηφίδας αλλά και μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών με την ίδια ψηφίδα να είναι υψηλότερες από 20%. Ως εκ τούτου, στο στάδιο της προετοιμασίας των δειγμάτων έχει συμπεριληφθεί ένα στάδιο απαέρωσης με υπερήχους διάρκειας 10 λεπτών.

Εκτός από την απαέρωση, αραίωση της μπίρας με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (ΡΔΑ) δοκιμάστηκε ως μέσο ελαχιστοποίησης της επίδρασης της μήτρας στον ανοσοπροσδιορισμό καθεμιάς από τις τέσσερις μυκοτοξίνες χωριστά, χρησιμοποιώντας μη αραιωμένη μπίρα και μπίρα αραιωμένη 2, 4,

8 ή 16 φορές με ΡΔΑ για την παρασκευή των βαθμονομητών. Οι αποκρίσεις που ελήφθησαν για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης για καθένα από τα παραπάνω διαλύματα συγκρίθηκαν με αυτές που παρείχε ο βαθμονομητής μηδενικής συγκέντρωσης σε ΡΔΑ. Όπως προκύπτει από το σχήμα 5.11, η παρουσία της μπίρας επηρεάζει διαφορετικά τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της κάθε μυκοτοξίνης.



**Σχήμα 5.11: Επίδραση της μήτρας του βαθμονομητή στο σήμα που λαμβάνεται κατά τους προσδιορισμούς των OTA (α), AFB1 (β), FB1 (γ) και DON (δ) για βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που έχει παρασκευαστεί σε μπίρα χωρίς αραιώση ή μπίρα αραιωμένη 2, 4, 8 και 16 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (assay buffer, ΡΔΑ), σε ΡΔΑ και σε ΡΔΑ που περιέχει 0,625% (ο/ο) αιθανόλη. Οι στήλες αντιστοιχούν στη μέση τιμή των αποκρίσεων 7 BB-MZIs ± SD**

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το σχήμα 5.11α, όσον αφορά τον προσδιορισμό της OTA, η μη αραιωμένη μπίρα παρείχε υψηλότερα σήματα

για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης κατά περίπου 35% σε σύγκριση με το ΡΔΑ, ενώ η διαφορά μειωνόταν καθώς αυξανόταν η αραίωση της μπίρας. Αν και η λιγότερο αραιωμένη ή ακόμη και η μη αραιωμένη μπίρα παρείχε τις υψηλότερες αποκρίσεις σήματος για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης διαπιστώθηκε ότι οι αποκρίσεις επηρεάζονταν σημαντικά από τον τύπο της μπίρας (lager, ale, dark, κλπ.) και έτσι θα ήταν αδύνατον βαθμονομητές που είχαν παρασκευαστεί σε ένα είδος μπίρας να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση δειγμάτων μπίρας άλλου τύπου. Από την άλλη, βρέθηκε ότι αραίωση της μπίρας με το ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης παραπάνω από 16 φορές (π.χ., 32 φορές), δεν επηρέαζε το απόλυτο σήμα που λαμβάνονταν για βαθμονομητές μηδενικής συγκέντρωσης που είχαν παρασκευαστεί σε διαφορετικούς τύπους μπίρας. Εντούτοις, δεν ήταν επιθυμητή η μεγάλη αραίωση του δείγματος, επειδή με τον τρόπο αυτό η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ΟΤΑ στα δείγματα μπίρας θα αυξηθεί και οι μπίρες με χαμηλή περιεκτικότητα σε ΟΤΑ θα θεωρηθούν ψευδώς ως απαλλαγμένες από ΟΤΑ. Εντούτοις, δεν ήταν επιθυμητή η μεγάλη αραίωση του δείγματος, επειδή με τον τρόπο αυτό η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ΟΤΑ στα δείγματα μπίρας θα αυξηθεί και οι μπίρες με χαμηλή περιεκτικότητα σε ΟΤΑ θα θεωρηθούν ως απαλλαγμένες από ΟΤΑ.

Αντίστοιχα πειράματα για τους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς των AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> και DON έδειξαν ότι στην περίπτωση της AFB<sub>1</sub>, τα σήματα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης για τα μη αραιωμένα καθώς και για τα 2 ή 4 φορές αραιωμένα δείγματα μπίρας ήταν τα ίδια με αυτά που παρείχε το ΡΔΑ, ενώ περαιτέρω αραίωση είχε ως αποτέλεσμα την πτώση του σήματος περίπου 10-15% σε σύγκριση με το ΡΔΑ (Σχήμα 5.11β). Στον ανοσοχημικό προσδιορισμό της FB<sub>1</sub>, η μη αραιωμένη μπίρα παρείχε σημαντικά υψηλότερα σήματα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (σχεδόν 30%) σε σύγκριση με το ΡΔΑ, μια διαφορά η οποία μειώθηκε καθώς αυξήθηκε η αραίωση της μπίρας οδηγώντας σε τιμές ίσες με εκείνες που λαμβάνονται με το ΡΔΑ για 8 ή 16 φορές αραιωμένη μπίρα. Το αντίθετο συνέβη στην περίπτωση της DON. Στην περίπτωση αυτή, η μη αραιωμένη μπίρα παρείχε περίπου 35% χαμηλότερο σήμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης σε σύγκριση με το

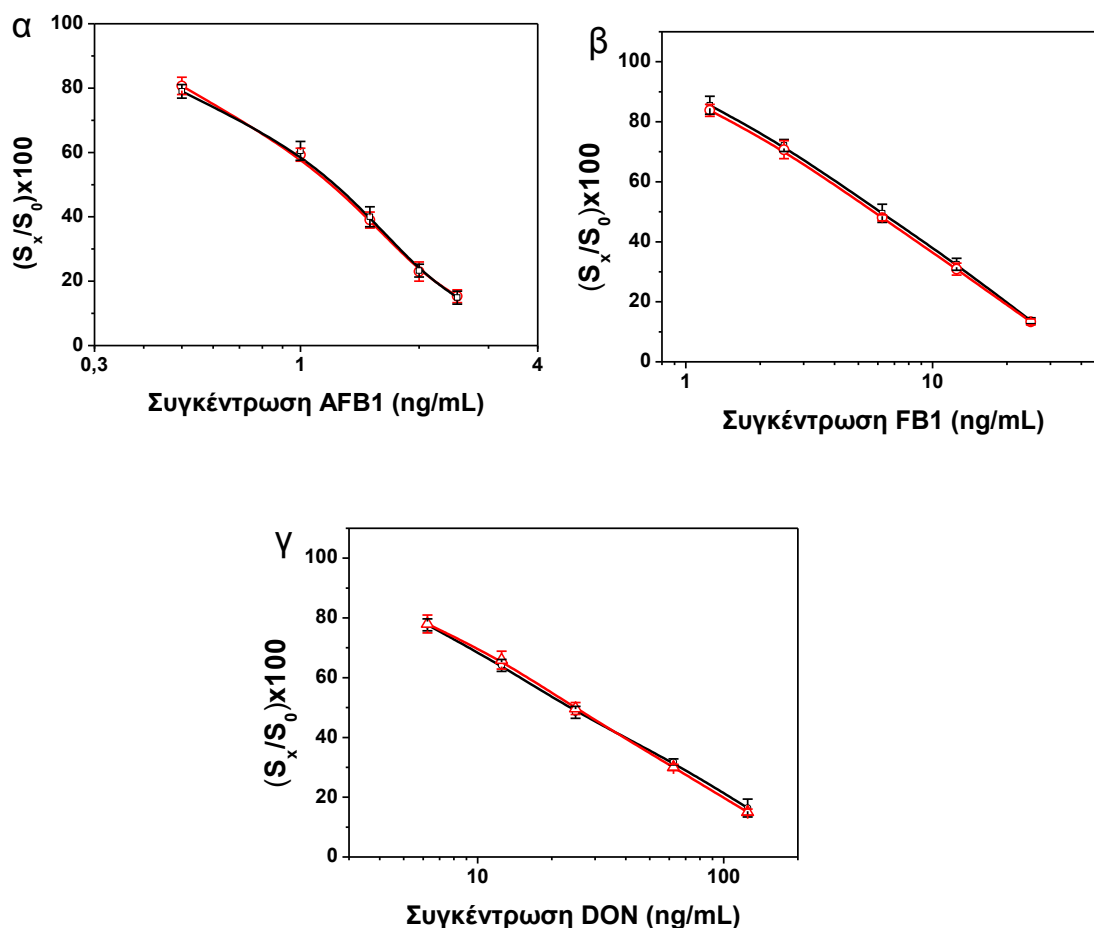
ΡΔΑ. Ωστόσο, η διαφορά αυτή μειώθηκε σταδιακά και ισοσταθμίστηκε με το ΡΔΑ για συντελεστή αραίωσης ίσο ή μεγαλύτερο από 8. Αν και σε όλες τις περιπτώσεις, μια αραίωση κατά 8 φορές φαίνεται να ελαχιστοποιεί την επίδραση από την μπύρα, οι τιμές του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης εξακολουθούν να διαφέρουν από εκείνες του ρυθμιστικού διαλύματος. Έτσι, δοκιμάστηκε ΡΔΑ που περιείχε 0,625% (ο/ο) αιθανόλη, το οποίο αντιστοιχούσε στη μέση περιεκτικότητα αιθανόλης μιας τυπικής μπύρας όταν αραιωθεί 8 φορές με ΡΔΑ. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα σχήματα 5.11α-δ, για τους προσδιορισμούς της ΟΤΑ (α), AFB1 (β), FB1 (γ) και DON (δ), αντίστοιχα, η προσθήκη 0,625% (ο/ο) αιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης οδήγησε σε τιμές βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ίσες με αυτές που ελήφθησαν για 8 φορές αραιωμένη μπύρα.

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η καταλληλότητα αυτού του διαλύματος για την παρασκευή των βαθμονομητών, συγκρίθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας διαλύματα που παρασκευάστηκαν σε μπύρα αραιωμένη 8 φορές με ΡΔΑ ή σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,625% αιθανόλη. Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.12 για τις τρεις μυκοτοξίνες AFB1, FB1 και DON οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με διαλύματα που παρασκευάστηκαν σε 8-φορές αραιωμένη με ΡΔΑ μπύρα ή σε ΡΔΑ που περιέχει 0,625% (ο/ο) αιθανόλη ήταν ταυτόσημες, οδηγώντας στην υιοθέτηση του ΡΔΑ που περιείχε 0,625% (ο/ο) αιθανόλη ως μήτρα για την παρασκευή βαθμονομητών των AFB1, FB1 και DON.

Συνεπώς, υιοθετώντας 8 φορές αραίωση των δειγμάτων μπύρας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν βαθμονομητές για AFB1, FB1 και DON παρασκευασμένοι είτε σε μπύρα απαλλαγμένη από μυκοτοξίνες είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,625% (ο/ο) αιθανόλη. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατόν να αναλυθούν διαφορετικοί τύποι μπύρας (lager, dark, ale, κ.λπ.) χωρίς αξιοσημείωτη επίδραση της μήτρας.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της ΟΤΑ, οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με διαλύματα που παρασκευάστηκαν σε 8-φορές αραιωμένη με ΡΔΑ μπύρα (Σχ. 5.13, μαύρη καμπύλη) και σε ΡΔΑ που περιείχε 0,625% (ο/ο)

αιθανόλη (Σχ. 5.13, μπλε καμπύλη), δεν εμφάνιζαν την ίδια ευαισθησία ανίχνευσης, παρόλο που το σήμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ήταν παρόμοιο. Όταν προστέθηκε στο ΡΔΑ, εκτός της αιθανόλης και 8,75% μεθανόλη ελαχιστοποιήθηκε η επίδραση της μήτρας της μπίρας στην ευαισθησία της ανάλυσης, αλλά και πάλι οι καμπύλες βαθμονόμησης δεν ήταν ταυτόσημες.

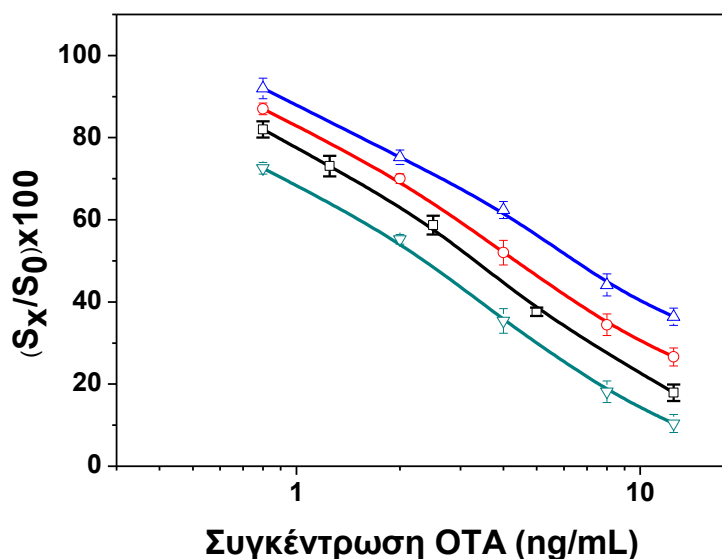


**Σχήμα 5.12:** Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης AFB1 (α), FB1 (β) και DON (γ) που έχουν ληφθεί από βαθμονομητές που παρασκευάστηκαν σε μπίρα αραιωμένη 8 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (μαύρη καμπύλη) ή ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,625% αιθανόλη (κόκκινη καμπύλη). Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή των αποκρίσεων 7 BB-MZIs (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD

Από το σχήμα 5.13 γίνεται αντιληπτό ότι κανένα ρυθμιστικό διάλυμα από αυτά που ελέγχθηκαν δεν παρείχε καμπύλες βαθμονόμησης ΟΤΑ παρόμοιες με αυτές που λαμβάνονται με βαθμονομητές που παρασκευάζονται σε μπίρα.



Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε οι βαθμονομητές για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της ΟΤΑ να παρασκευάζονται σε μπύρα απαλλαγμένη από ΟΤΑ και να αραιώνονται 8 φορές με ΡΔΑ το οποίο θα περιέχει 10% (ο/ο) μεθανόλη.



Σχήμα 5.13: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης ΟΤΑ που ελήφθησαν με βαθμονομητές που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (ΡΔΑ) που περιέχει 0,625% αιθανόλη (μπλε καμπύλη), σε ΡΔΑ που περιέχει 0,625% αιθανόλη και 8,75% μεθανόλη (κόκκινη καμπύλη), σε μπύρα αραιωμένη 8 φορές με ΡΔΑ (μαύρη καμπύλη) και σε μπύρα αραιωμένη 8 φορές με ΡΔΑ που περιέχει 8,75% μεθανόλη (πράσινη καμπύλη). Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή των αποκρίσεων 7 ΒΒ-ΜΖΙ (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD

#### 5.4 Βελτιστοποίηση του διαλύματος αναγέννησης

Μια άλλη παράμετρος που βελτιστοποιήθηκε ήταν η σύνθεση του διαλύματος αναγέννησης. Η αναγέννηση και η επαναχρησιμοποίηση των βιοενεργοποιημένων αισθητήρων αναμένεται να μειώσει σημαντικά το κόστος της ανάλυσης, ενώ παράλληλα αποτελεί ένα μέσο αξιολόγησης της σταθερότητας των ακινητοποιημένων βιομορίων αναγνώρισης. Αξιολογήθηκαν πέντε διαφορετικά διαλύματα αναγέννησης: ένα εμπορικά διαθέσιμο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης γ-σφαιρινών (IgG) από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας, ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5,

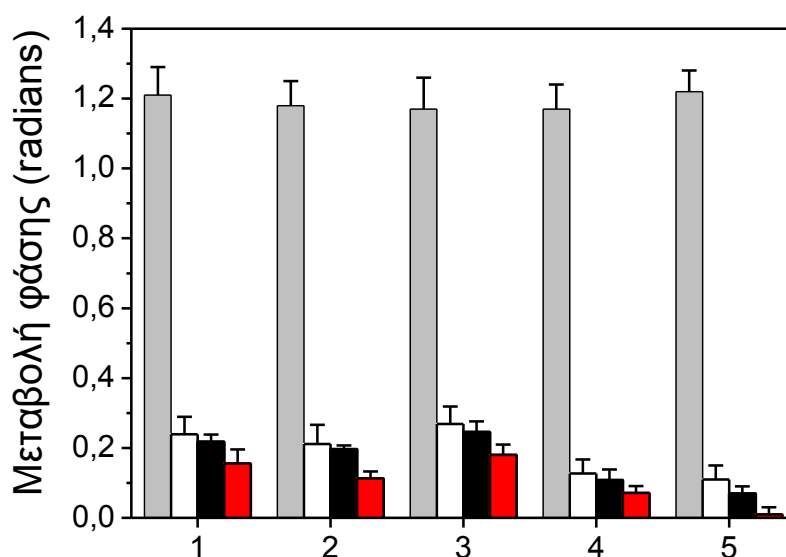
NaOH 50 mM, HCl 100 mM και SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9, ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν τα δεσμευμένα μόρια αντισώματος μετά την ολοκλήρωση της ανοσοαντίδρασης και να καθιστούν τον βιοαισθητήρα έτοιμο για ένα νέο κύκλο ανοσοχημικού προσδιορισμού.

Για την αξιολόγηση των διαφορετικών διαλυμάτων αναγέννησης, τα ακινητοποιημένα στον αισθητήρα βιομόρια αρχικά αντέδρασαν με διάλυμα μίγματος βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και αντισώματος, ακολουθούμενο από διάλυμα δευτέρου αντισώματος. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκαν στον αισθητήρα τα διαφορετικά διαλύματα αναγέννησης, ακολουθούμενα από διάλυμα δευτέρου αντισώματος. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκε το υπόλειμμα του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που παρέμεινε προσκολλημένο στην επιφάνεια του αισθητήρα μετά το στάδιο της αναγέννησης.

Για τον προσδιορισμό της OTA, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη χρονική διάρκεια του σταδίου της αναγέννησης για την οποία επιτυγχάνεται αποτελεσματική απομάκρυνση των ανοσοπροσροφημένων αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, τα ακινητοποιημένα μόρια OTA-OVA αντέδρασαν αρχικά με το μίγμα βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης και αντισώματος κατά της OTA, και ακολούθησε αντίδραση με το δεύτερο αντίσωμα (Σχ. 5.14, γκρι στήλες) ώστε να ληφθεί το σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια τα διαφορετικά διαλύματα αναγέννησης διαβιβάστηκαν πάνω από τον αισθητήρα για 1 λεπτό (Σχ. 5.14, λευκές στήλες), 2 λεπτά (Σχ. 5.14, μαύρες στήλες) ή 3 λεπτά (Σχ. 5.14, κόκκινες στήλες) και τέλος επαναδιαβιβάστηκε διάλυμα δευτέρου αντισώματος.

Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.14, το αποτελεσματικότερο διάλυμα αναγέννησης σε σχέση με την ικανότητα απομάκρυνσης των δεσμευμένων στο σύζευγμα OTA-OVA μορίων αντισώματος ήταν το διάλυμα HCl 0,1 M. Χρησιμοποιώντας όλα τα άλλα διαλύματα αναγέννησης, το ποσοστό του σήματος που ελήφθη από την αντίδραση του εναπομείναντος αντισώματος κατά της OTA με το δεύτερο αντίσωμα κυμάνθηκε μεταξύ 6 και 12% του σήματος που παρέχεται από τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, ενώ

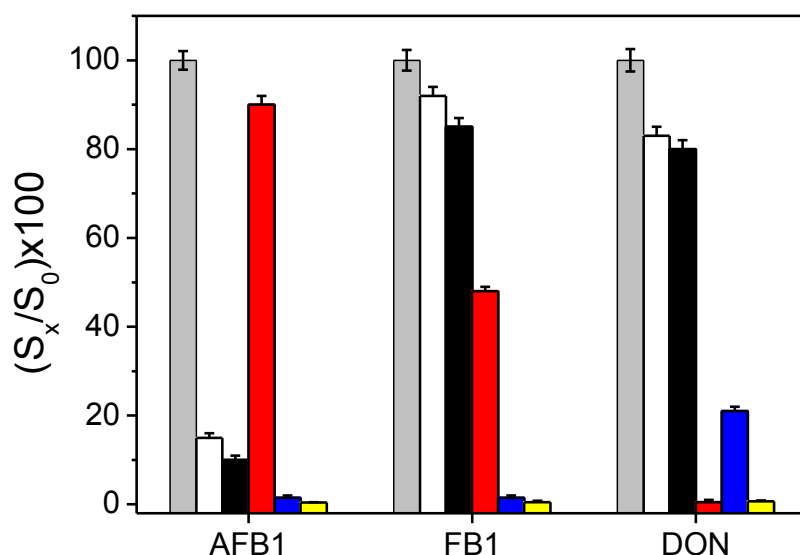
τα σήματα που ελήφθησαν μετά τη διέλευση του διαλύματος HCl 0,1 M για 3 λεπτά ήταν αμελητέα (<1%). Έτσι, η αναγέννηση των 3 λεπτών με διάλυμα HCl 0,1 M κρίθηκε επαρκής για την απομάκρυνση των δεσμευμένων μορίων αντισώματος από την επιφάνεια του αισθητήρα και την αναγέννηση της ψηφίδας κατά τον ανοσοπροσδιορισμό της ΟΤΑ.



**Σχήμα 5.14:** Τιμές σήματος που λαμβάνονται από αισθητήρα τροποποιημένο με ΟΤΑ-ΟΝΑ για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) και τα σήματα που λαμβάνονται μετά από αναγέννηση για 1 λεπτό (λευκές στήλες), 2 λεπτά (μαύρες στήλες) ή 3 λεπτά (κόκκινες στήλες) και επακόλουθη διαβίβαση δευτέρου αντισώματος. Τα διαλύματα που δοκιμάστηκαν ήταν: ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης IgG (ομάδα στηλών 1), ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5 (ομάδα στηλών 2), NaOH 0,05 M (ομάδα στηλών 3), SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9 (ομάδα στηλών 4) και HCl 0,1 M (ομάδα στηλών 5)

Από αντίστοιχα πειράματα για τους προσδιορισμούς των AFB1, FB1 και DON βρέθηκε ότι για όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα αναγέννησης η μέγιστη αποτελεσματικότητα επιτεύχθηκε όταν διαβιβάστηκαν από την επιφάνεια του αισθητήρα για τουλάχιστον 2 λεπτά και συνεπώς ο χρόνος αυτός υιοθετήθηκε για τις περαιτέρω μελέτες. Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.15, για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό των AFB1 και FB1, αποτελεσματική απομάκρυνση των δεσμευμένων στα ακινητοποιημένα συζεύγματα

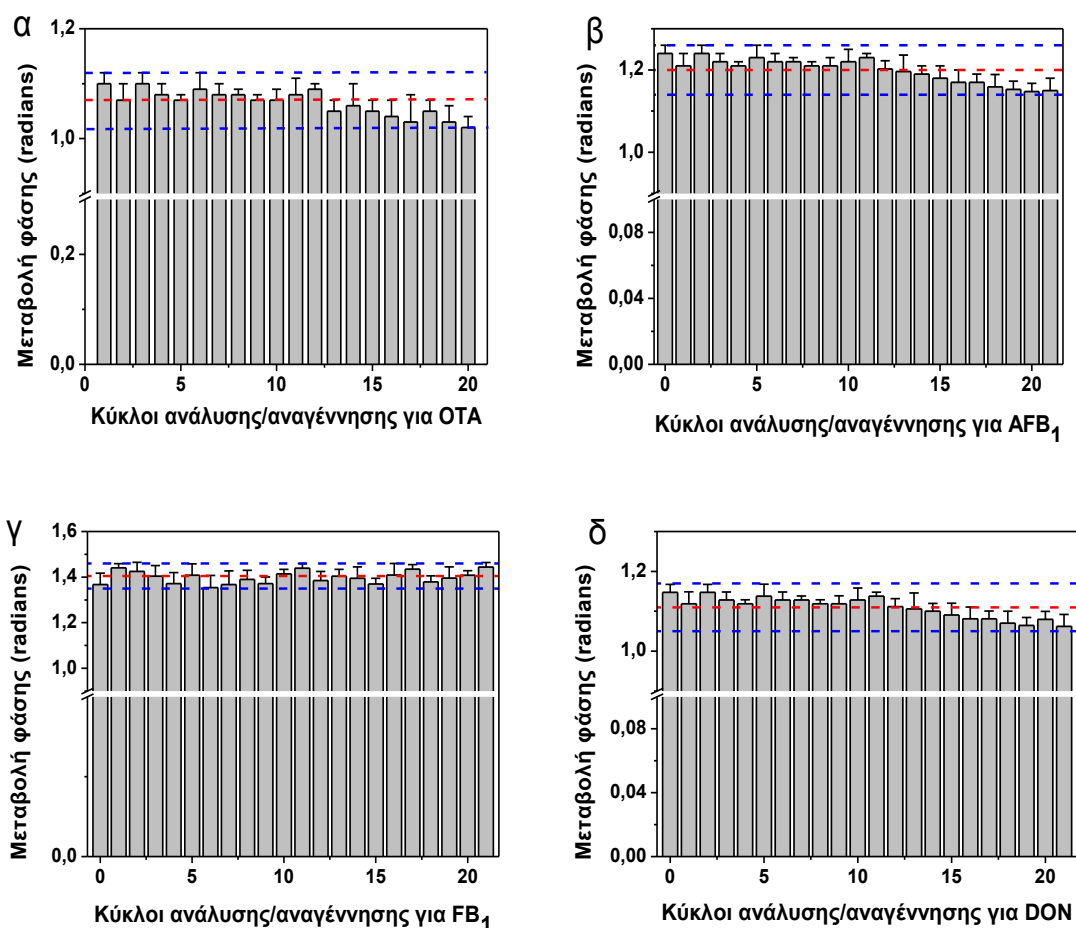
μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης αντισωμάτων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αναγέννησης είτε διάλυμα HCl 100 mM (μπλε στήλες), είτε διάλυμα SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9 (κίτρινες στήλες), ενώ για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της DON, τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν με διάλυμα NaOH 50 mM (κόκκινη στήλη) ή διάλυμα SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9 (κίτρινη στήλη). Σε όλες τις περιπτώσεις, το σήμα που προσδιορίστηκε κατά την διαβίβαση δευτέρου αντισώματος μετά την αναγέννηση εκφράστηκε ως επί τοις εκατό ποσοστό του σήματος του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες).



**Σχήμα 5.15:** Εκατοστιαίο ποσοστό του σήματος που λαμβάνεται κατά την διαβίβαση διαλύματος δευτέρου αντισώματος μετά από αναγέννηση με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης IgG (λευκές στήλες), ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5 (μαύρες στήλες), 50 mM NaOH (κόκκινες στήλες), 100 mM HCl (μπλε στήλες) ή 0,5% (β/ο) SDS, pH 1,9 (κίτρινες στήλες) σε σχέση με το αρχικό σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) για AFB1, FB1 και DON

Στο πλαίσιο της εναρμόνισης των προσδιορισμών των διαφορετικών μυκοτοξινών, τουλάχιστον για τους προσδιορισμούς των AFB1, FB1 και DON, επιλέχθηκε ως διάλυμα αναγέννησης το διάλυμα SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9.

Σε επόμενο βήμα, αξιολογήθηκε η σταθερότητα του βιοαισθητήρα ως προς το στάδιο της αναγέννησης μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων ανάλυσης/αναγέννησης, χρησιμοποιώντας για τον προσδιορισμό της OTA διάλυμα αναγέννησης HCl 0,1 M για 3 λεπτά και για τους προσδιορισμούς των AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> και DON διάλυμα SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9 για 2 λεπτά. Στο σχήμα 5.16 παρέχονται οι μέσες τιμές σήματος που ελήφθησαν με βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης από 7 BB-MZIs βιοαισθητήρων από ψηφίδες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί τα πρωτεϊνικά συζεύγματα των διαφόρων μυκοτοξινών μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ανάλυσης/αναγέννησης.



**Σχήμα 5.16:** Τιμές σήματος που λαμβάνονται για βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ανάλυσης/αναγέννησης για OTA (α), AFB<sub>1</sub> (β), FB<sub>1</sub> (γ) και DON (δ). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm$  SD. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στις μέσες τιμές των μετρήσεων και οι διακεκομμένες μπλε στο μέσο όρο  $\pm$  2SD

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 5.16, οι αποκρίσεις των βιοαισθητήρων ήταν σταθεροί επιτρέποντας τουλάχιστον 20 επαναλαμβανόμενους κύκλους ανάλυσης/αναγέννησης χωρίς σημαντική πτώση στο σήμα του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης. Μικρή πτώση του σήματος παρατηρείται για τους προσδιορισμούς των OTA, AFB1 και DON μετά από 15 κύκλους ανάλυσης/αναγέννησης, η οποία ωστόσο είναι μικρότερη από το 10% του σήματος βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης που ελήφθη κατά τον πρώτο κύκλο ανάλυσης. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν περαιτέρω την αποτελεσματικότητα του επιλεγμένου διαλύματος αναγέννησης και αποδεικνύουν τη σταθερότητα των ακινητοποιημένων επί των βιοαισθητήρων μορίων, δηλαδή των συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης.

#### **5.5 Τελικά πρωτόκολλα των ανοσοπροσδιορισμών που αναπτύχθηκαν στον αισθητήρα BB-MZI**

Αρχικά στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των τεσσάρων μυκοτοξινών OTA, AFB1, FB1 και DON με χρήση της ίδιας ψηφίδας πυριτίου, στην οποία διαφορετικοί αισθητήρες BB-MZIs θα είχαν τροποποιηθεί με τα αντίστοιχα βιομόρια αναγνώρισης. Από τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης των μεμονωμένων προσδιορισμών, ως προς τους χρόνους των ανοσοαντιδράσεων, τη μήτρα των προτύπων διαλυμάτων και τα διαλύματα αναγέννησης, γίνεται σαφές ότι οι βέλτιστες συνθήκες ανοσοχημικού προσδιορισμού της OTA διαφέρουν από τις συνθήκες προσδιορισμού των υπολοίπων μυκοτοξινών και δεν μπορούν να εναρμονιστούν σε ένα κοινό πρωτόκολλο. Αντιθέτως, οι προσδιορισμοί των AFB1, FB1 και DON μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτοχρόνως στην ίδια ψηφίδα πυριτίου.

Έτσι λοιπόν, ο προσδιορισμός της OTA πραγματοποιήθηκε σε ψηφίδα, όπου επτά από τους δέκα BB-MZIs επικαλύφθηκαν με διάλυμα OTA-OVA, ενώ οι εναπομείναντες τρεις MZIs με διάλυμα OVA για να χρησιμεύσει ως τυφλό και ο προσδιορισμός των AFB1, FB1 και DON πραγματοποιήθηκε σε μια κοινή ψηφίδα όπου τρεις από τους δέκα BB-MZIs επικαλύφθηκαν με AFB1-BSA,

τρεις με FB1-OVA και τρεις με DON-OVA, ενώ ο εναπομείναντας αισθητήρας επικαλύφτηκε με διάλυμα OVA για να χρησιμεύσει ως τυφλό (βλέπε ενότητα 4.6, εικόνα 4.4). Τα διάφορα στάδια προσδιορισμού, οι συνθήκες καθώς και η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου, τόσο της OTA όσο και των AFB1, FB1 και DON συνοψίζονται στους πίνακες 5.3 και 5.4, αντίστοιχα.

**Πίνακας 5.3: Πρωτόκολλο προσδιορισμού της OTA στον BB-MZI αισθητήρα**

Στάδια προσδιορισμού	Συνθήκες σταδίων προσδιορισμού	Διάρκεια σταδίων προσδιορισμού
Ακίνητοποίηση συζεύγματος μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης	OTA-OVA 100 µg/mL, OVA 100 µg/mL (τυφλό)	18-22 ώρες
Επικάλυψη κενών θέσεων	1% (β/ο) BSA σε 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,5	60 λεπτά
Έκπλυση/ Ξήρανση	Απεσταγμένο νερό/ Ρεύμα N <sub>2</sub>	
<i>Εφαρμογή μικρορευστομηχανικής κυψελίδας και τοποθέτηση στην κεφαλή της μετρητικής διάταξης</i>		
Προ-επώαση	μίγμα αντισώματος κατά της OTA σε ΡΔΑ και προτύπων διαλυμάτων ή αραιωμένων δειγμάτων μπίρας (τελική συγκέντρωση αντισώματος κατά της OTA 2 µg/mL)	60 λεπτά
Ανάλυση	προ-επωασμένο μίγμα	30 λεπτά
Ανίχνευση	αντίσωμα αίγας κατά των IgG ποντικού 10 µg/mL σε ΡΔΑ	20 λεπτά
Αναγέννηση	HCl 100 mM	3 λεπτά

**Πίνακας 5.4: Πρωτόκολλο προσδιορισμού των μυκοτοξινών AFB1, FB1 & DON στον BB-MZI αισθητήρα**

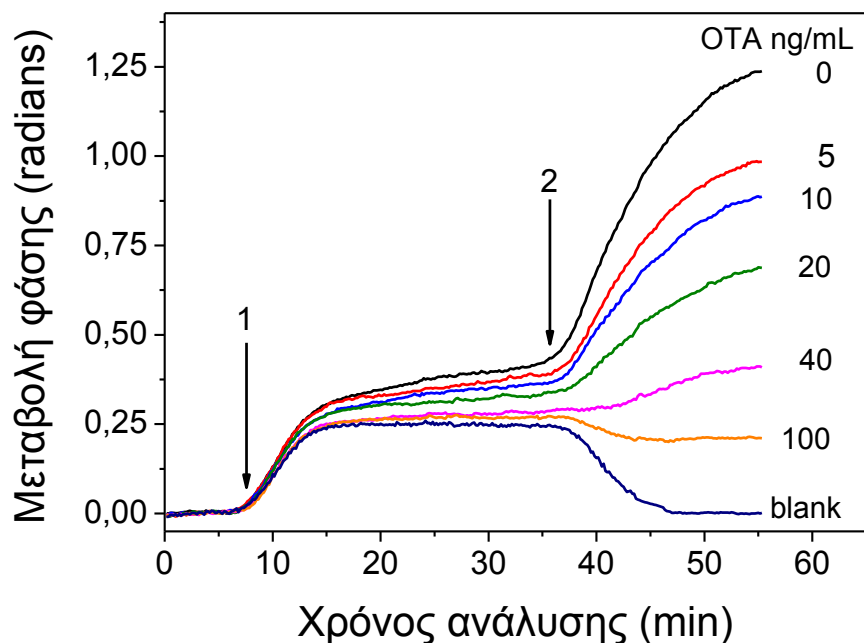
<b>Στάδια προσδιορισμού</b>	<b>Συνθήκες σταδίων προσδιορισμού</b>	<b>Διάρκεια σταδίων προσδιορισμού</b>
Ακίνητοποίηση συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης	AFB1-BSA 100 µg/mL, FB1-OVA 100 µg/mL, DON-OVA 100 µg/mL, OVA 100 µg/mL (τυφλό)	18-22 ώρες
Επικάλυψη κενών θέσεων	1% (β/ο) BSA σε 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,5	60 λεπτά
Έκπλυση/Ξήρανση	Απεσταγμένο νερό/ Ρεύμα N <sub>2</sub>	
<i>Εφαρμογή μικρορευστομηχανικής κυψελίδας και τοποθέτηση στην κεφαλή της μετρητικής διάταξης</i>		
Ανάλυση	μίγμα αντισωμάτων κατά των μυκοτοξινών σε ΡΔΑ και προτύπων διαλυμάτων ή αραιωμένων δειγμάτων μπίρας (τελικές συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά της: AFB1 2 µg/mL, FB1 0,5 µg/mL, DON 1 µg/mL)	8 λεπτά
Ανίχνευση	αντίσωμα αίγας κατά των IgG ποντικού 10 µg/mL σε ΡΔΑ	4 λεπτά
Αναγέννηση	SDS 0,5%, pH 1,9	2 λεπτά

### **5.5.1 Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοχημικού προσδιορισμού της ΟΤΑ στον αισθητήρα**

Το σήμα που παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο με κάποια μέθοδο οπτικής ανίχνευσης, όπως η συμβολομετρία Mach-Zehnder, που βασίζεται σε αλλαγές στον δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητήρα για την παρακολούθηση των βιομοριακών αντιδράσεων αναμένεται να επηρεάζεται από την παρουσία δείγματος όταν αυτό έχει πολύ διαφορετικό δείκτη διάθλασης από τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται πριν ή μετά



την ανάλυση. Αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται δείγματα μύρας στον αισθητήρα που αναπτύσσεται στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.



**Σχήμα 5.17:** Χαρακτηριστικές αποκρίσεις των αισθητήρων μιας ψηφίδας όπου 7 στα 10 BB-MZIs έχουν επικαλυφθεί με OTA-OVA και τα υπόλοιπα 3 με OVA (τυφλό) κατά τη διέλευση: από την αρχή μέχρι το βέλος 1: ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης (ΡΔΑ), από το βέλος 1-2: μειγμάτων βαθμονομητών παρασκευασμένων σε μύρα και αραιωμένων 8 φορές με ΡΔΑ με το αντίσωμα κατά της OTA (4 μg/mL σε ΡΔΑ), από το βέλος 2 έως το τέλος: διάλυμα δευτέρου αντισώματος (10 μg/mL σε ΡΔΑ). Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί στη μέση απόκριση 7 BB-MZIs για την ειδική αντίδραση και 3 BB-MZIs για το τυφλό

Όπως φαίνεται σχήμα 5.17, όπου παρέχονται οι αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο για μία σειρά βαθμονομητών OTA που παρασκευάζονται σε 8 φορές αραιωμένη μύρα, παράλληλα με την απόκριση ενός τυφλού BB-MZI (τροποποιημένου με OVA), η διαβίβαση του μίγματος βαθμονομητή/αντισώματος πάνω από τους αισθητήρες (βέλος 1), οι οποίοι έχουν εξισορροπηθεί πριν την ανάλυση με ρυθμιστικό διάλυμα, προκαλεί απότομη αύξηση της απόκρισης η οποία οφείλεται κυρίως στην μεταβολή του δείκτη διάθλασης, όπως υποδεικνύεται από την απόκριση του τυφλού. Ταυτόχρονα,

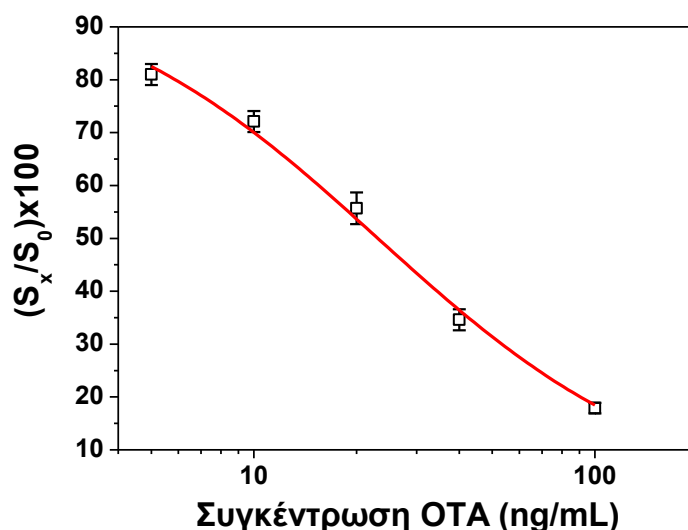
παρατηρείται μια συνεχής αύξηση στο σήμα των BB-MZIs που έχουν τροποποιηθεί με OTA-OVA η οποία αποδίδεται στην αντίδραση ειδικού αντισώματος με τον ακινητοποιημένο αναλύτη (βέλος 1 έως βέλος 2), ενώ η αντίστοιχη απόκριση του τυφλού δεν μεταβάλλεται.

Στη συνέχεια, όταν στην ψηφίδα διαβιβάζεται το διάλυμα του δευτέρου αντισώματος το οποίο έχει παρασκευαστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (βέλος 2 έως το τέλος) και απομακρύνεται η μπύρα το σήμα του τυφλού BB-MZI επιστρέφει σε τιμές πλησίον του μηδενός. Από την άλλη, οι αποκρίσεις που λαμβάνονται από τα τροποποιημένα με OTA-OVA BB-MZIs είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού της μείωσης του δείκτη διάθλασης του διαλύματος και της ταυτόχρονης αύξησης του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια των αισθητήρων λόγω της αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με τα ακινητοποιημένα μόρια του ειδικού κατά της OTA αντισώματος. Αυτή η επίδραση είναι πιο εμφανής στην περίπτωση βαθμονομητών υψηλής συγκέντρωσης (π.χ., 100 ng/mL OTA) και λιγότερο εμφανής στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Εντούτοις, μετά από αντίδραση 20 λεπτών με το δεύτερο αντίσωμα, η παρατηρούμενη απόκριση οφείλεται αποκλειστικά στην ανοσοαντίδραση, εφόσον η επίδραση του διαλύματος που διατρέχει την ψηφίδα στον δείκτη διάθλασης έχει μηδενιστεί πλήρως, όπως καταδεικνύεται από την απόκριση του τυφλού BB-MZI.

Με βάση τις τιμές που ελήφθησαν από τους διαφόρους βαθμονομητές OTA ακολουθώντας το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοπροσδιορισμού (Σχήμα 5.17), κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης και παρουσιάζεται στο σχήμα 5.18.

Το όριο ανίχνευσης προσδιορισμού (LOD) υπολογίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή 21 επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης αφαιρώντας την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη 3 φορές ( $-3\sigma$ ) και ήταν 2,0 ng/mL OTA σε μπύρα (0,25 ng/mL στην αραιωμένη μπύρα). Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, αφαιρώντας την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη 6 φορές

( $-6 \times SD$ ,  $n=21$ ) και ήταν  $4,0 \text{ ng/mL}$  σε μύρα ( $0,50 \text{ ng/mL}$  στο αραιωμένο δείγμα).



**Σχήμα 5.18:** Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης της OTA. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή της απόκρισης 7 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος)  $\pm SD$

Για να προσδιοριστεί η ακρίβεια της ανάλυσης, παρασκευάστηκαν σε μύρα που δεν περιείχε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις OTA (διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των βαθμονομητών) τρία δείγματα ελέγχου με χαμηλή, μέση και υψηλή συγκέντρωση OTA, τα οποία καλύπτουν το εύρος των βαθμονομητών. Ο ενδο-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (intra-assay CV) προσδιορίστηκε από 3 επαναληπτικές μετρήσεις εκάστου διαλύματος ελέγχου την ίδια ημέρα, ενώ ο δια-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (inter assay CV) προσδιορίστηκε από μετρήσεις εις διπλούν των δειγμάτων ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν σε 10 διαδοχικές ημέρες. Οι τιμές CV και για τα τρία διαλύματα ελέγχου ήταν μικρότερες από 9% και 14%, αντίστοιχα.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση που θα μπορούσαν να έχουν τα διαφορετικά ήδη μύρας, όπως lager, pilsner, ale, dark, κ.λπ., στον ανοσοπροσδιορισμό των μυκοτοξινών με τους αισθητήρες, δοκιμάστηκαν διαφορετικοί τύποι μύρας. Όλες οι μύρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν απαλλαγμένες από OTA όπως προσδιορίστηκε με ανάλυση LC-MS/MS [173]

αυτών των δειγμάτων και επιβεβαιώθηκε από τον αναπτυχθέντα αισθητήρα. Τα δείγματα εμπλουτίστηκαν με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ΟΤΑ (15, 30 και 75 ng/mL) και αναλύθηκαν εις τριπλούν τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη ΟΤΑ.

**Πίνακας 5.5: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της ΟΤΑ στους αισθητήρες BB-MZI**

Τύποι μπίρας	Ποσό που προστέθηκε (ng/mL)	Ποσό που προσδιορίστηκε (ng/mL)		% Ανάκτηση	
		BB-MZI	ELISA	BB-MZI	ELISA
Amstel lager	15,0	15,7	15,5	105	103
	30,0	29,6	30,5	98,7	102
	45,0	42,0	43,5	93,3	96,7
Zeos pilsner	15,0	13,6	14,1	90,7	94,0
	30,0	33,2	32,9	111	110
	45,0	49,7	48,6	110	109
Fix dark	15,0	17,4	16,8	116	112
	30,0	27,2	27,6	90,6	92,0
	45,0	42,2	41,9	93,8	93,1
Vergina pale ale	15,0	16,3	15,9	109	106
	30,0	27,6	28,4	92,0	94,7
	45,0	48,1	47,8	107	106
Brink's dark	15,0	16,3	17,0	109	113
	30,0	31,2	33,2	104	111
	45,0	43,6	46,2	96,9	103
KEO lager	15,0	13,6	14,2	90,7	94,7
	30,0	27,4	28,9	91,3	96,3
	45,0	41,6	43,1	92,4	95,8

Οι επί τοις εκατό ποσοστιαίες τιμές ανάκτησης υπολογίστηκαν από την ακόλουθη εξίσωση:

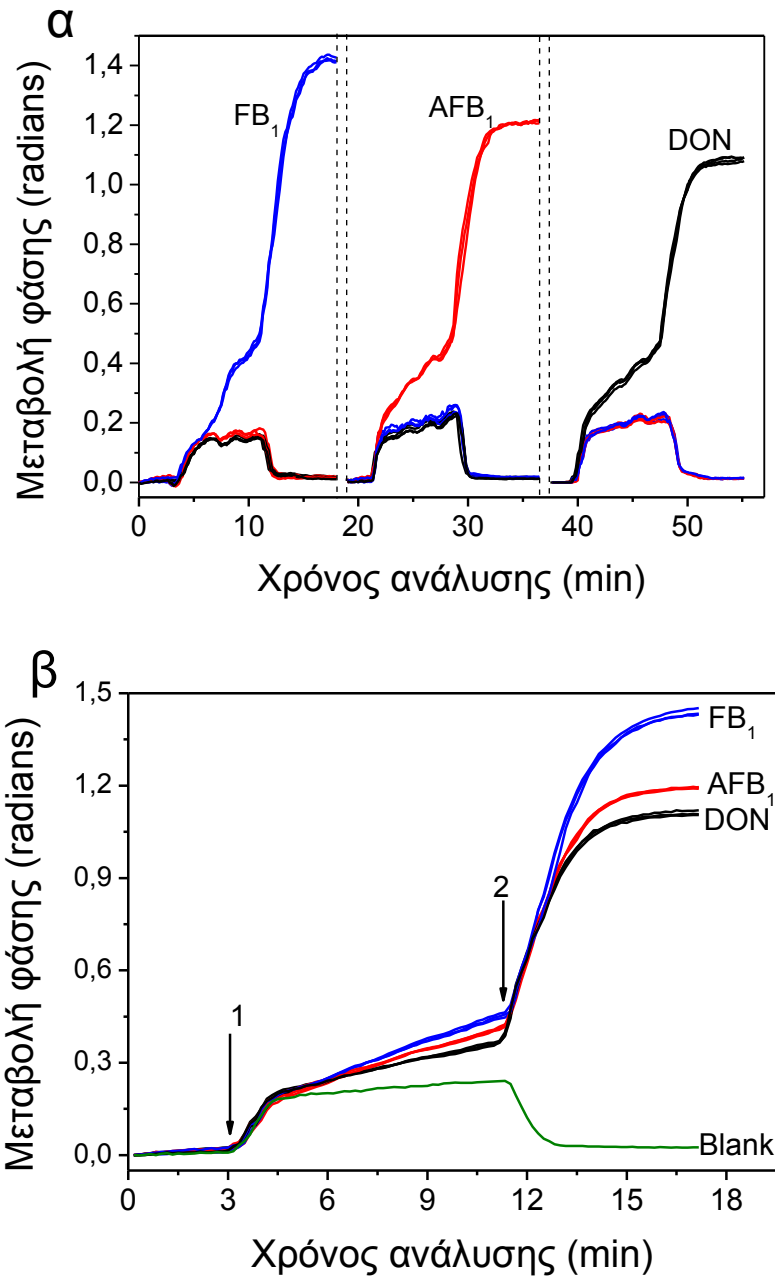
$$\text{Ανάκτηση\%} = [\text{ποσό που προσδιορίστηκε} / \text{ποσό που προστέθηκε}] \times 100$$

και παρέχονται στον πίνακα 5.5 μαζί με τις τιμές που προσδιορίστηκαν από την ανάλυση των ιδίων δειγμάτων με μέθοδο ELISA που αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια (σύζευγμα OTA-OVA και ειδικό κατά της OTA μονοκλωνικό αντίσωμα). Λόγω του γεγονότος ότι η καμπύλη βαθμονόμησης της ELISA είχε δυναμικό εύρος από 0,8 έως 40 ng/mL, τα δείγματα μπίρας αραιώθηκαν 16 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης ενώ για την ανάλυση στον αισθητήρα τα δείγματα αραιώθηκαν 8 φορές. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.5, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν με τις δύο μεθόδους είναι σε καλή συμφωνία. Επιπλέον, οι τιμές ανάκτησης που προσδιορίστηκαν για τον αισθητήρα κυμαίνονταν μεταξύ 90,6 και 116%, υποδεικνύοντας την καλή ακρίβεια των προσδιορισμών που πραγματοποιούνται με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα.

#### **5.5.2 Αξιολόγηση της ειδικότητας των ανοσοχημικών προσδιορισμών των AFB1, FB1 και DON στον αισθητήρα BB-MZI**

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός αισθητήρα με στόχο τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών μυκοτοξινών, AFB1, FB1 και DON, είναι να εξασφαλιστεί ότι η απόκριση που λαμβάνεται από τους αισθητήρες που έχουν τροποποιηθεί με τα αντίστοιχα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης είναι απολύτως ειδική. Έτσι, ελέγχθηκε η πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση των ειδικών αντισωμάτων κατά της κάθε μυκοτοξίνης με τα ακινητοποιημένα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης των υπολοίπων δυο χρησιμοποιώντας ψηφίδα τροποποιημένη όπως υποδεικνύεται στην εικόνα 4.4β της ενότητας 4.6 και διαβιβάζοντας από την ψηφίδα κάθε ένα από τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα χωριστά, ακολουθούμενα από αντίδραση με το δεύτερο αντίσωμα και αναγέννηση.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.19α, λαμβάνεται απόκριση διακριτή από εκείνη του τυφλού αισθητήρα (αισθητήρας τροποποιημένος με OVA) για κάθε μια από τις τρεις ομάδες αισθητήρων μόνο όταν διαβιβάζεται πάνω από την επιφάνεια το αντίστοιχο ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα.



Σχήμα 5.19: (α) Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από ψηφίδα στην οποία 3 από τα 10 MZIs είχαν τροποποιηθεί με FB<sub>1</sub>-OVA (μπλε γραμμές), 3 με AFB<sub>1</sub>-BSA (κόκκινες γραμμές) και 3 με DON-OVA (μαύρες γραμμές) κατά τη διαβίβαση διαδοχικά πάνω από τον αισθητήρα διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος της FB<sub>1</sub>, της AFB<sub>1</sub> και της DON, καθένα ακολουθούμενο από διάλυμα δεύτερου αντισώματος και αναγέννηση (υποδεικνύεται από τις δύο διακεκομμένες κάθετες γραμμές). (β) Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από ψηφίδα στην οποία τα 9 MZIs έχουν τροποποιηθεί όπως στο (α) και ο ένας MZI με OVA (πράσινη γραμμή) όταν διαβιβάζεται μίγμα αντισωμάτων κατά των FB<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub> και DON (βέλος 1 έως 2) ακολουθούμενο από διάλυμα δεύτερου αντισώματος (βέλος 2 έως τέλος)

Επιπλέον, οι αποκρίσεις που λαμβάνονται από μια ψηφίδα τροποποιημένη με τα τρία συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης κατά τη διέλευση μίγματος των τριών ειδικών αντισωμάτων ακολουθούμενη από δεύτερο αντίσωμα (Σχήμα 5.19β) είναι ταυτόσημες με αυτές που παρέχονται από τους αισθητήρες όταν διαβιβάζεται μόνο το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την ειδικότητα των ανοσοαντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε καθέναν από τους αισθητήρες της ψηφίδας. Από το σχήμα 5.19β, στο οποίο παρουσιάζεται και η απόκριση του τυφλού αισθητήρα, προκύπτει επίσης ότι η αύξηση του σήματος που παρατηρείται κατά την εισαγωγή του μίγματος διαλύματος βαθμονομητή/αντισωμάτων είναι λόγω της διαφοράς του δείκτη διάθλασης του ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης με το οποίο ο αισθητήρας έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί σε σχέση με εκείνο του μίγματος βαθμονομητή/αντισωμάτων, εφόσον μετά την εισαγωγή του διαλύματος δευτέρου αντισώματος, το οποίο παρασκευάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης, η απόκριση του τυφλού αισθητήρα επιστρέφει σχεδόν στην αρχική του τιμή. Το τελευταίο είναι ενδεικτικό του χαμηλού σήματος μη ειδικής δέσμησης των ανοσοπροσδιορισμών που αναπτύχθηκαν στους αισθητήρες BB-MZIs.

Η ειδικότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε επίσης και ως προς τις κυριότερες μυκοτοξίνες της ομάδας καθεμιάς από τις τρεις μυκοτοξίνες ή/και των κυριότερων μεταβολιτών της κάθε μυκοτοξίνης. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της AFB1 ελέγχθηκε η διασταυρούμενη δραστηριότητα έναντι της AFB2 και για τον προσδιορισμό της FB1 η διασταυρούμενη δραστηριότητα έναντι της FB2. Ως προς την DON, οι ενώσεις που ελέγχθηκαν ήταν η δεσοξυνιβαλενολ-3-βD-γλυκοζίτης (D3G), μια κεκαλυμμένη μυκοτοξίνη, που σχηματίζεται με ενζυματική σύζευξη της γλυκόζης στην DON [174], τα ακετυλιωμένα παράγωγα 3-ακετυλο-DON (3AcDON) και 15-ακετυλο-DON (15AcDON) και η νιβαλενόλη (NIV).

Σε όλες τις περιπτώσεις, παρασκευάστηκαν διαλύματα καθεμιάς από τις ουσίες που ελέγχονται για διασταυρούμενη αντίδραση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1000 έως 0,1 ng/mL (με 10-πλάσιες διαδοχικές αραιώσεις)

σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης και χρησιμοποιήθηκαν ως βαθμονομητές σε προσδιορισμούς των αντίστοιχων αναλυτών.

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (CR) υπολογίστηκε με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\% CR = (IC_{50} \text{ αναλύτης στόχος} / IC_{50} \text{ διασταυρούμενο αντιδραστήριο}) \times 100,$$

όπου  $IC_{50}$  είναι η συγκέντρωση των AFB1, FB1 ή DON που αντιστοιχεί σε ποσοστό 50% του σήματος μηδενικού προτύπου και  $IC_{50}$  διασταυρούμενο αντιδραστήριο είναι η συγκέντρωση της υπό έλεγχο ουσίας η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 50% του αντίστοιχου βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης.

Το ποσοστό της διασταυρούμενης δραστηριότητας που προσδιορίστηκε για την AFB2 για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της AFB1 ήταν περίπου 1% και συνεπώς δεν αναμένεται σημαντική επίδραση της AFB2, λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι η AFB1 είναι η κύρια αφλατοξίνη που ανιχνεύεται στα δημητριακά. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της FB1 παρουσίαζε διασταυρούμενη αντίδραση 55% ως προς την FB2, η οποία είναι επιθυμητή σε κάποιο βαθμό εφόσον οι ανώτερες επιτρεπόμενες τιμές που καθορίζονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία αναφέρονται στο άθροισμα των δύο αναλυτών [175]. Τέλος, το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της DON έδειξε υψηλή διασταυρούμενη αντίδραση με την 3AcDON ~ 480%, με την D3G 19,6% και αμελητέα με την 15AcDON και την νιβαλενόλη (<0,1%). Η υψηλή διασταυρούμενη δραστηριότητα του αντισώματος με την 3AcDON δεν αναμένεται να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ανάλυση της DON δεδομένου ότι το 3AcDON απαντάται στα δημητριακά σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (20-100 φορές χαμηλότερες) από την DON [176,177]. Από την άλλη, η παρουσία της D3G θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αυξημένες συγκεντρώσεις κατά τον προσδιορισμό της DON σε δημητριακά και μπύρες [45,176].



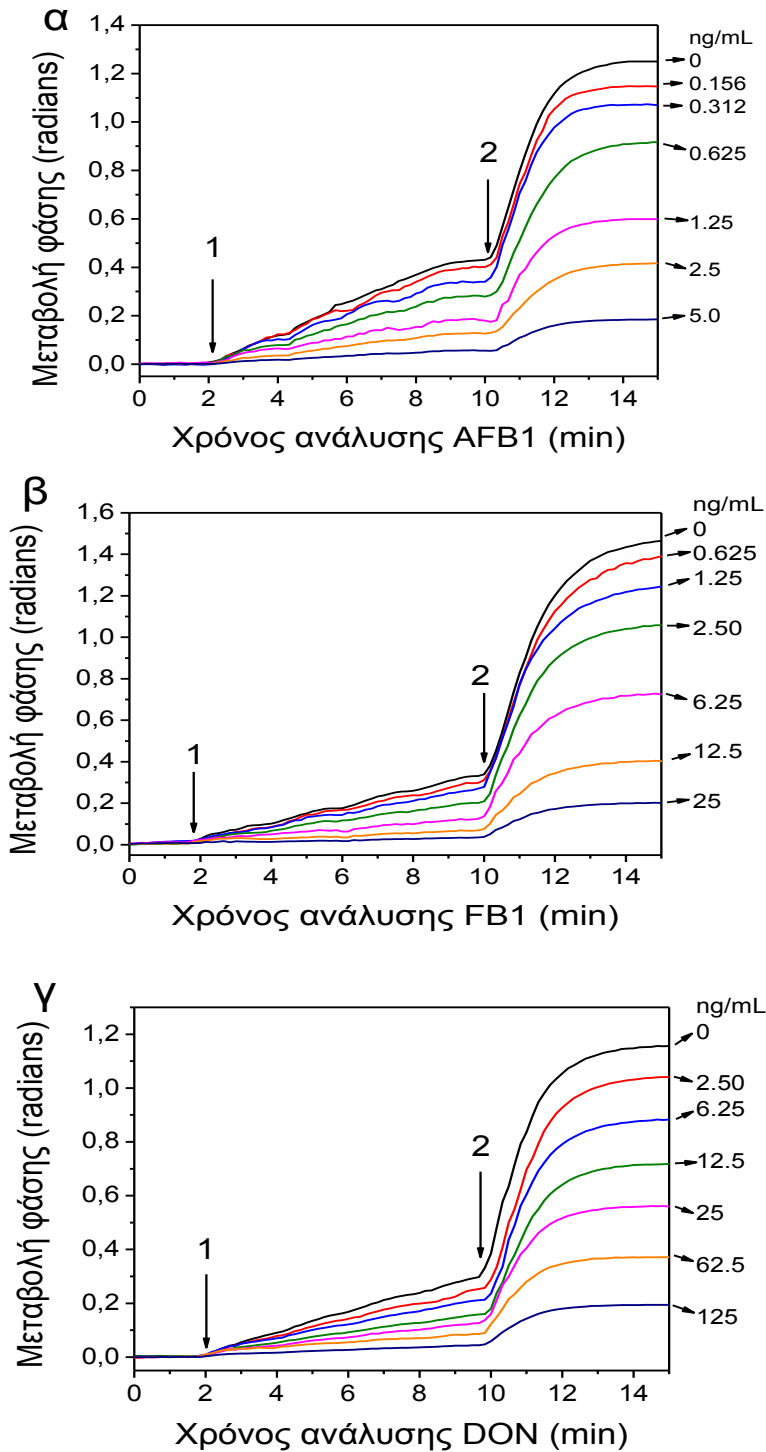
### 5.5.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοχημικών προσδιορισμών των AFB1, FB1 και DON σε αισθητήρες BB-MZI

Χαρακτηριστικές αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που αντιστοιχούν σε βαθμονομητές που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις των τριών αναλυτών παρέχονται στα σχήματα 5.20α-γ για τις AFB1, FB1 και DON, αντίστοιχα. Για να είναι δυνατή η διάκριση του σήματος που προέρχεται αποκλειστικά από την ανοσοαντίδραση και όχι από την μεταβολή του δείκτη διάθλασης, λόγω της διαφορετικής σύστασης των διαλυμάτων, κατά την επεξεργασία των γραφημάτων αφαιρέθηκε η απόκριση του τυφλού αισθητήρα από εκείνες των αισθητήρων που έχουν τροποποιηθεί με τα τρία συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης.

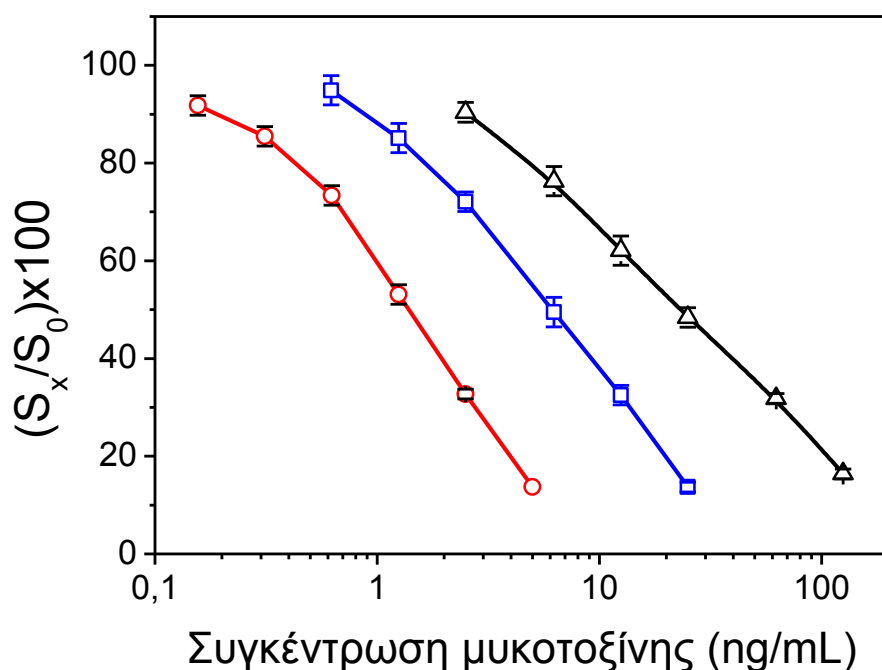
Οι αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης απεικονίζονται στο σχήμα 5.21.

Το όριο ανίχνευσης προσδιορισμού (LOD) υπολογίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή 21 επαναληπτικών προσδιορισμών του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης αφαιρώντας την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη 3 φορές ( $-3\sigma$ ). Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.6, τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν ήταν 0,1, 0,7 και 2,5 ng/mL για τις AFB1, FB1 και DON αντίστοιχως, σε ρυθμιστικό διάλυμα και 0,8, 5,6 και 20 ng/mL, αντίστοιχως, σε μη αραιωμένη μπίρα λαμβάνοντας υπόψη την 8-φορές αραιώση.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή 21 επαναληπτικών προσδιορισμών του βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης αφαιρώντας την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη 6 φορές ( $-6\sigma$ ,  $n=20$ ) και ήταν 1,6, 11,2 και 40 ng/mL για τις AFB1, FB1 και DON, αντίστοιχα σε μπίρα, ενώ η περιοχή γραμμικής απόκρισης εκτείνονταν έως τα 2,5, 25 και 125 ng/mL, αντίστοιχα, σε ρυθμιστικό διάλυμα ή 20, 200 και 1000 ng/mL σε μη αραιωμένη μπίρα.



**Σχήμα 5.20:** Αποκρίσεις που λαμβάνονται σε πραγματικό χρόνο από αισθητήρες που έχουν τροποποιηθεί με τα προϊόντα σύζευξης μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης όταν αντιδρούν με διαλύματα βαθμονομητών που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις AFB1 (α), FB1 (β) και DON (γ). Το βέλος 1 υποδεικνύει το χρονικό σημείο της εισαγωγής του μείγματος βαθμονομητών/αντισώματος και το βέλος 2 την εισαγωγή του 2<sup>ου</sup> αντισώματος



Σχήμα 5.21: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης AFB1 (κόκκινη καμπύλη), FB1 (μπλε καμπύλη) και DON (μαύρη καμπύλη) που λαμβάνονται με τον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος της απόκρισης 3 αισθητήρων (3 επαναλήψεις έκαστος) ± SD

Πίνακας 5.6: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των προσδιορισμών των μυκοτοξινών AFB1, FB1 & DON σε μύρα με τον αισθητήρα BB-MZI

Μυκοτοξίνες	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Δυναμική περιοχή (ng/mL)	Ενδο-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (intra-assay CV)	Δια-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (inter-assay CV)
AFB1	0,8	1,6	1,6-40	9%	14%
FB1	5,6	11,2	11,2-200	8%	12%
DON	20	40	40-1000	12%	16%

Η επαναληψιμότητα της ανάλυσης προσδιορίστηκε με ανάλυση τριών δειγμάτων ελέγχου που παρασκευάστηκαν σε μύρα lager και

εμπλουτίστηκαν έτσι ώστε οι τρεις μυκοτοξίνες να είναι παρούσες σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, που κάλυπταν ολόκληρο το εύρος των βαθμονομητών. Ο ενδο-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (intra-assay CV) προσδιορίστηκε με 3 επαναληπτικές μετρήσεις καθενός από τα δείγματα ελέγχου την ίδια ημέρα, ενώ ο δια-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (inter-assay CV) προσδιορίστηκε με μετρήσεις εις διπλούν των δειγμάτων ελέγχου που εκτελέστηκαν σε 10 διαδοχικές ημέρες. Οι τιμές του ενδο- και δια-αναλυτικού συντελεστή διακύμανσης ήταν και για τα τρία δείγματα ελέγχου μικρότερες από 12 % και 16%, αντίστοιχα.

**Πίνακας 5.7: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της AFB1 στον αισθητήρα BB-MZI**

Τύποι μπίρας	Ποσό που προστέθηκε (ng/mL)	Ποσό που προσδιορίστηκε (ng/mL)	% Ανάκτηση
Amstel lager	5,0	5,2	104
	7,5	8,2	109
	10,0	9,5	95,0
Zeos pilsner	5,0	4,8	96,0
	7,5	8,3	111
	10,0	10,9	109
Fix dark	5,0	5,6	112
	7,5	6,9	92,0
	10,0	9,3	93,0
Vergina pale ale	5,0	5,3	106
	7,5	7,0	93,3
	10,0	10,6	106
Brink's dark	5,0	5,7	114
	7,5	8,3	111
	10,0	10,3	103
KEO lager	5,0	4,7	94,0
	7,5	7,2	96,0
	10,0	9,6	96,0

Η ακρίβεια των προσδιορισμών αξιολογήθηκε με πειράματα ανάκτησης. Για το σκοπό αυτό, διαφορετικά ήδη μπίρας εμπλουτίστηκαν με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις της κάθε μιας από τις τρεις μυκοτοξίνες (5,0, 7,5 και 10 ng/mL για την AFB1, 20, 50 και 100 ng/mL για την FB1 και 150, 300 και 750 ng/mL για την DON). Όλες οι μπίρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ελεύθερες από μυκοτοξίνες όπως προσδιορίστηκε με ανάλυση LC-MS/MS και επιβεβαιώθηκε με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα. Όλα τα δείγματα μπίρας αναλύθηκαν εις τριπλούν τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη μυκοτοξινών και υπολογίστηκαν οι τιμές ανάκτησης.

**Πίνακας 5.8: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της FB1 στον αισθητήρα BB-MZI**

Τύποι μπίρας	Ποσό που προστέθηκε (ng/mL)	Ποσό που προσδιορίστηκε (ng/mL)	% Ανάκτηση
Amstel lager	20	18,9	94,5
	50	52,5	105
	100	114	114
Zeos pilsner	20	21,6	108
	50	46,4	89,8
	100	96,0	96,0
Fix dark	20	22,3	112
	50	43,4	86,8
	100	113	113
Vergina pale ale	20	17,0	85,0
	50	52,5	105
	100	109	109
Brink's dark	20	18,6	93,0
	50	54,5	109
	100	97,0	97,0
KEO lager	20	21,0	105
	50	51,5	103
	100	95,5	95,5

Όπως φαίνεται στους πίνακες 5.7-5.9, οι τιμές ανάκτησης που προσδιορίστηκαν για τις τρεις μυκοτοξίνες στα 3 διαφορετικά δείγματα ελέγχου κυμαίνονταν μεταξύ 85,0 και 115%, υποδεικνύοντας την καλή ακρίβεια του αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα.

**Πίνακας 5.9: Τιμές ανάκτησης για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της DON στον αισθητήρα BB-MZI**

Τύποι μπίρας	Ποσό που προστέθηκε (ng/mL)	Ποσό που προσδιορίστηκε (ng/mL)	% Ανάκτηση
Amstel lager	150	141	94,0
	300	278	92,7
	750	820	109
Zeos pilsner	150	133	88,7
	300	345	115
	750	710	94,7
Fix dark	150	167	111
	300	270	90,0
	750	790	105
Vergina pale ale	150	162	108
	300	320	107
	750	730	97,3
Brink's dark	150	134	89,3
	300	260	86,7
	750	810	112
KEO lager	150	155	103
	300	290	96,7
	750	770	103

## 5.6 Ανάλυση δειγμάτων μύρας

Συνολικά 29 μύρες, διαφορετικών ειδών και προέλευσης, αναλύθηκαν με τον αναπτυσθέντα βιοαισθητήρα. Από τα δείγματα που αναλύθηκαν σε κανένα δεν βρέθηκαν AFB1 και OTA σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις, σε 7 δείγματα προσδιορίστηκαν ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις FB1, ενώ στα περισσότερα δείγματα βρέθηκαν συγκεντρώσεις DON μεγαλύτερες του ορίου ανίχνευσης (Πίνακας 5.10).

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν παράλληλα με τις αντίστοιχες μεθόδους ELISA, ενώ συγκεκριμένα δείγματα αναλύθηκαν και με μέθοδο LC-MS/MS [176]. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 5.10, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τον βιοαισθητήρα βρίσκονται γενικά σε καλή συμφωνία με εκείνα που ελήφθησαν με τις μεθόδους ELISA που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αποκλίσεις στις τιμές DON που προσδιορίστηκαν για ορισμένα δείγματα μύρας (όπως τα Νο 614, 1026 και U7) με τις δύο μεθόδους οφείλεται στο γεγονός ότι οι τιμές αυτές είναι μικρότερες από το LOQ της μεθόδου και επομένως υπόκεινται σε μεγαλύτερη αβεβαιότητα.

Σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων με τις ανοσοχημικές μεθόδους (βιοαισθητήρας και ELISA) και με τη μέθοδο LC-MS/MS παρέχονται στον πίνακα 5.11.

Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκαν αποκλίσεις στις τιμές που προσδιορίστηκαν για ορισμένα δείγματα. Αυτές οι αποκλίσεις μεταξύ των ανοσοχημικών μεθόδων και της μεθόδου LC-MS/MS μπορούν να αποδοθούν σε κάποιες περιπτώσεις στην διασταυρούμενη δραστηριότητα των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται με κάποιους μεταβολίτες των FB1 και DON που μπορεί να συνυπάρχουν στα δείγματα μύρας. Η διασταυρούμενη δραστηριότητα θα μπορούσε να οδηγήσει σε υψηλότερες τιμές μυκοτοξίνης όταν ένα δείγμα αναλύεται με τις ανοσοχημικές μεθόδους σε σύγκριση με την LC-MS/MS μέθοδο.

**Πίνακας 5.10: Συγκεντρώσεις DON και FB1 που προσδιορίστηκαν σε 29 δείγματα μπύρας με τον αισθητήρα BB-MZI και την αντίστοιχη ELISA**

No. μπύρας	DON (ng/mL)		FB1 (ng/mL)	
	BB-MZI	ELISA	BB-MZI	ELISA
11	64 ± 4,7	68 ± 2,7	<LOD	<LOD
12	87 ± 5,6	67 ± 3,7	<LOD	<LOD
13	44 ± 2,8	37 ± 1,6	<LOD	<LOD
16	26 ± 2,3*	25 ± 0,9	<LOD	<LOD
18	26 ± 3,2*	25 ± 1,2*	<LOD	<LOD
20	26 ± 2,9*	21 ± 1,1*	<LOD	<LOD
488	28 ± 3,0*	22 ± 0,9*	54 ± 3,1	53 ± 1,7
614	28 ± 2,9*	16 ± 0,7*	20 ± 1,1	22 ± 0,9
121	24 ± 2,8*	20 ± 0,8*	<LOD	<LOD
124	92 ± 4,3	90 ± 3,5	<LOD	<LOD
132	56 ± 2,2	55 ± 1,8	<LOD	<LOD
138	80 ± 4,7	82 ± 3,1	<LOD	<LOD
880	40 ± 3,2*	40 ± 1,6	<LOD	<LOD
885	60 ± 3,5	67 ± 2,1	<LOD	<LOD
991	144 ± 12	100 ± 7,0	<LOD	<LOD
1026	25 ± 3,2*	14 ± 0,5*	<LOD	<LOD
1034	216 ± 15	178 ± 11	<LOD	<LOD
1042	<LOD	9 ± 2,3*	<LOD	<LOD
1047	82 ± 4,3	74 ± 2,7	<LOD	<LOD
U7	31 ± 3,5*	21 ± 1,7*	<LOD	<LOD
U8	45 ± 3,9	35 ± 1,5	<LOD	<LOD
U9	100 ± 6,0	93 ± 4,7	<LOD	<LOD
U10	72 ± 3,1	80 ± 2,5	<LOD	<LOD
U12	44 ± 3,5	52 ± 1,9	<LOD	<LOD
48	22 ± 1,9*	25 ± 0,8	20 ± 1,2	19 ± 0,9
280	34 ± 4,0*	30 ± 1,7	10 ± 0,8*	11 ± 0,6
398	23 ± 2,4*	21 ± 0,6*	25 ± 1,0	24 ± 0,8
423	18 ± 1,7*	20 ± 0,5*	68 ± 3,4	70 ± 2,7
941	32 ± 2,4*	35 ± 1,1	38 ± 2,3	38 ± 1,6

\*Τιμές DON χαμηλότερες από το LOQ της μεθόδου



**Πίνακας 5.11: Συγκεντρώσεις των DON και FB1 που προσδιορίστηκαν σε δείγματα μπύρας με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα και με τις δυο μεθόδους σύγκρισης, LC-MS/MS και ELISA. Οι τιμές σε παρενθέσεις αντιστοιχούν στη συγκέντρωση του D3G που προσδιορίστηκε στα δείγματα με τη μέθοδο LC-MS/MS**

Αναλύτης	No. δείγματος	LC-MS/MS (ng/mL)	BB-MZI (ng/mL)	ELISA (ng/mL)
FB1	48	20	20±1,2	19±0,9
	280	11	10±0,8	11±0,6
	398	28	25±1,0	24±0,8
	423	36	68±3,4	70±2,7
	488	51	54±3,1	53±1,7
	614	<LOD	20±1,1	22±0,9
	941	69	38±2,3	38±1,6
DON	11	104 (56)	64±4,7	68±2,7
	18	11 (21)	26±2,3	25±0,9
	124	41 (68)	92±4,3	90±3,5
	132	24 (36)	56±2,2	55±1,8
	138	<LOD (42)	80±4,7	82±3,1

Μία άλλη πιθανή πηγή απόκλισης των τιμών που προσδιορίζονται από τις δύο μεθόδους, ειδικά για τα δείγματα 941 και 11, για τις οποίες προσδιορίστηκαν υψηλότερες τιμές με LC-MS/MS από ότι με τις ανοσοχημικές μεθόδους, θα μπορούσε να είναι η επίδραση της μήτρας της μπύρας, δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα δείγματα ήταν ειδικές σκουρόχρωμες μπίρες με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ (~ 15%).

Παρά τις παρατηρηθείσες αποκλίσεις μεταξύ των τιμών που προσδιορίζονται με τον αισθητήρα και τη μέθοδο LC-MS/MS, που θεωρείται μέθοδος αναφοράς, λόγω της απλής διαδικασίας που ακολουθείται για την κατεργασία του δείγματος και του σύντομου χρόνου ανάλυσης, ο βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την επιτόπια ταυτοποίηση δειγμάτων με συγκεντρώσεις μυκοτοξινών άνω του επιτρεπόμενου ορίου μειώνοντας σημαντικά τον όγκο εργασίας που απαιτείται

για τις αναλύσεις με LC-MS/MS. Αν και δεν έχουν ακόμη επισήμως θεσπιστεί μέγιστα επιτρεπόμενα όρια για μυκοτοξίνες σε δείγματα μύρας, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) έχει ορίσει ως ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (Tolerable Daily Intake, TDI) τα 2 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα για το άθροισμα των FB1, FB2 και FB3 [178] και το 1 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα για την DON [179]. Έτσι, ένα άτομο που ζυγίζει περίπου 70 kg θα πρέπει να καταναλώσει τουλάχιστον 2 λίτρα μύρας με συγκέντρωση FB1 περίπου 70 ng/mL (όπως το δείγμα 423) ή 1 λίτρο μύρας με ίση συγκέντρωση DON (π.χ. δείγματα 124 ή 138) προκειμένου να υπερβεί το TDI. Αυτές οι συγκεντρώσεις βρίσκονται εντός της γραμμικής περιοχής εργασίας του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα και εξ όσων γνωρίζουμε, είναι ο μόνος ανοσοαισθητήρας που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών μυκοτοξινών AFB1, FB1 και DON σε δείγματα μύρας.

Συμπερασματικά, ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για ταχείες και μικρού κόστους επιτόπιες αναλύσεις δειγμάτων μύρας σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, με όλα τα σχετικά οφέλη τόσο για τους παραγωγούς μύρας όσο και για τους καταναλωτές. Προς αυτή την κατεύθυνση, βρίσκονται σήμερα σε εξέλιξη διαδικασίες για την περαιτέρω σμίκρυνση του συστήματος με τη χρήση μικροαντλιών και μικροβαλβίδων και ενός πιο εξελιγμένου μικρορευστομηχανικού δικτύου που θα επιτρέψει την αυτοματοποιημένη διαβίβαση των διαφόρων αντιδραστηρίων πάνω από την επιφάνεια του αισθητήρα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε οπτικός ανοσοαισθητήρας ολοκληρωμένος σε ψηφίδες πυριτίου για την ανίχνευση χωρίς τη χρήση ιχνηθετών τεσσάρων μυκοτοξινών, της αφλατοξίνης B1 (AFB1), της ωχρατοξίνης A (OTA), της φουμονισίνης B1 (FB1) και της δεοξυνιβαλενόλης (DON) σε δείγματα μύρας. Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας βασίζεται στην Ευρέως Φάσματος Συμβολομετρία Mach-Zehnder (BB-MZI) και κάθε ψηφίδα πυριτίου περιλαμβάνει συστοιχία 10 συμβολομέτρων.

Για τον προσδιορισμό σε κάθε ψηφίδα ακινητοποιήθηκαν πρωτεϊνικά συζεύγματα καθεμιάς από τις τέσσερις μυκοτοξίνες και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της ανοσοανάλυσης για κάθε αναλύτη χωριστά, πριν επιχειρηθεί ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους με την ίδια ψηφίδα. Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στον να επιλεγούν κοινές συνθήκες ανάλυσης και για τις τέσσερις μυκοτοξίνες, ιδιαίτερα όσον αφορούσε τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης και παρασκευής των βαθμονομητών αλλά και την χρονική διάρκεια των σταδίων της ανοσοανάλυσης. Διαπιστώθηκε ότι για τρεις από τις τέσσερις μυκοτοξίνες (AFB1, FB1 και DON) λαμβάνονταν ικανοποιητικό σήμα για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης για χρόνο ανάλυσης 12 λεπτών ο οποίος περιελάμβανε 8 λεπτά αντίδραση με το ειδικό κατά της μυκοτοξίνης αντίσωμα και 4 λεπτά με το δεύτερο αντίσωμα προς ενίσχυση του σήματος. Στην περίπτωση της ωχρατοξίνης A, προκειμένου να ληφθεί επαρκές σήμα για τον βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, ο χρόνος της ανάλυσης έπρεπε να αυξηθεί. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν 30 λεπτά για το στάδιο της ανοσοαντίδρασης με το ειδικό κατά της OTA αντίσωμα και 20 λεπτά για το στάδιο της αντίδρασης με το δεύτερο. Επίσης προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία της ανοσοανάλυσης απαιτείτο προεπάση 60 λεπτών του διαλύματος του ειδικού αντισώματος της ωχρατοξίνης A με τα πρότυπα διαλύματα ή τα δείγματα, πριν από το στάδιο

της ανάλυσης. Επιπλέον, ενώ για τους προσδιορισμούς των AFB1, FB1 και DON οι βαθμονομητές μπορούσαν να παρασκευαστούν σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,625% (ο/ο) αιθανόλη και να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση δειγμάτων διαφορετικών τύπων μπύρας μετά από 8-φορές αραιώσή τους με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης, για τον προσδιορισμό της OTA ήταν απαραίτητο οι βαθμονομητές να παρασκευαστούν σε μπύρα απαλλαγμένη από OTA και να αραιώνονται 8 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει 10% (ο/ο) μεθανόλη.

Ως εκ τούτου, ο ανοσοπροσδιορισμός της ωχρατοξίνης A αναπτύχθηκε σε επίπεδο αισθητήρα ως προσδιορισμός μονού αναλύτη, όπου επτά από τα δέκα MZIs της ψηφίδας επικαλύφθηκαν με OTA-OVA, ενώ τα εναπομείναντα τρία MZIs με διάλυμα OVA για να χρησιμεύσουν ως τυφλό. Για τις υπόλοιπες τρεις μυκοτοξίνες η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα στην ίδια ψηφίδα, με ακινητοποίηση των αντίστοιχων πρωτεϊνικών συζευγμάτων σε διαφορετικούς αισθητήρες της ίδιας ψηφίδας. Πιο συγκεκριμένα τρία από τα δέκα MZIs επικαλύφθηκαν με AFB1-BSA, τρία με FB1-OVA και τρία με DON-OVA, ενώ ο εναπομείναντας αισθητήρας επικαλύφθηκε με διάλυμα OVA για να χρησιμεύσει ως τυφλό.

Ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στην αξιολόγησης της ειδικότητας της απόκρισης των MZIs της ψηφίδας που προορίζονταν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών μυκοτοξινών. Η ειδικότητα προσδιορίστηκε διαβιβάζοντας διαδοχικά πάνω από την ψηφίδα διάλυμα καθενός από τα τρία μονοκλωνικά αντισώματα κατά των μυκοτοξινών, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης των ειδικών αντισωμάτων κατά της κάθε μίας μυκοτοξίνης με τα ακινητοποιημένα συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης των υπολοίπων δυο μυκοτοξινών. Απόκριση διακριτή από εκείνη του τυφλού αισθητήρα ελήφθη για κάθε μια από τις τρεις ομάδες αισθητήρων μόνο όταν το αντίστοιχο ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα διαβιβάστηκε πάνω από την επιφάνεια. Επιπλέον οι αποκρίσεις που ελήφθησαν από ψηφίδα τροποποιημένη με τα τρία συζεύγματα μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης κατά την διέλευση μίγματος των τριών ειδικών αντισωμάτων ήταν ταυτόσημες με αυτές

που παρέχονται όταν διαβιβάζονταν χωριστά κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την ειδικότητα της κάθε ανοσοαντίδρασης.

Βασικό πλεονέκτημα ενός αισθητήρα, ως προς το κόστος της ανάλυσης και την ανταγωνιστική του αξία σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους ανάλυσης, είναι η μεγάλη διάρκεια ζωής και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του. Η διάρκεια ζωής ενός αισθητήρα εξαρτάται κυρίως από τη σταθερότητα του ακινητοποιημένου βιομορίου αναγνώρισης και τη διατήρηση της δραστικότητας του σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Προκειμένου να αξιολογηθεί τόσο η σταθερότητα των ακινητοποιημένων στους αισθητήρες συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης όσο και η δυνατότητα αναγέννησης τους αξιολογήθηκαν αρχικά διαφορετικά διαλύματα αναγέννησης, ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν τα δεσμευμένα μόρια αντισώματος, μετά την ολοκλήρωση της ανοσοαντίδρασης και να καθιστούν τον βιοαισθητήρα έτοιμο για έναν νέο κύκλο προσδιορισμού. Βρέθηκε ότι αναγέννηση 3 λεπτών με διάλυμα HCl 0,1 M για τις ψηφίδες που προορίζονταν για τον προσδιορισμό της OTA ή 2 λεπτών με διάλυμα SDS 0,5% (β/ο), pH 1,9, για τις ψηφίδες που προορίζονταν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των AFB1, FB1 και DON ήταν επαρκής για να απομακρύνει εντελώς τα δεσμευμένα μόρια αντισώματος από την επιφάνεια του αισθητήρα. Με τα επιλεγμένα για κάθε περίπτωση διαλύματα αναγέννησης, αξιολογήθηκε στη συνέχεια η σταθερότητα των ακινητοποιημένων στον αισθητήρα συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης ως προς το στάδιο της αναγέννησης μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων ανάλυσης/αναγέννησης. Από τη μελέτη, προέκυψε ότι οι αισθητήρες ήταν εξαιρετικά σταθεροί επιτρέποντας τουλάχιστον 20 επαναλαμβανόμενους κύκλους ανάλυσης/αναγέννησης χωρίς σημαντική απώλεια της δραστικότητας των ακινητοποιημένων συζευγμάτων μυκοτοξίνης-πρωτεΐνης.

Μετά από βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων της ανάλυσης, ο ανοσοπροσδιορισμός της ωχρατοξίνης A σε δείγματα μπύρας με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα είχε όριο ανίχνευσης 2,0 ng/mL και γραμμική περιοχή απόκρισης 4,0-100 ng/mL σε δείγματα μπύρας. Σχετικά με τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των μυκοτοξινών αφλατοξίνη B1, φουμονισίνη B1

και δεοξυριβοσουλφονόλη σε δείγματα μύρας τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν ήταν 0,8, 5,6 και 20 ng/mL, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι προσδιορισμοί χαρακτηρίζονταν από υψηλή ακρίβεια, με τιμές ανάκτησης που κυμάνθηκαν από 85.0 έως 116% και επαναληψιμότητα με συντελεστές ενδο- και δια-αναλυτικής διακύμανσης 12% και 16%, αντίστοιχα.

Η τελική αξιολόγηση των αισθητήρων πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης δειγμάτων μύρας και της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με ενζυμοανοσοχημικούς προσδιορισμούς που αναπτύχθηκαν σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιώντας τα ίδια ανοσοαντιδραστήρια καθώς και με δημοσιευμένη μέθοδο LC-MS/MS από συνεργαζόμενο εργαστήριο στο RIKILT Wageningen. Συνολικά αναλύθηκαν 29 μύρες, διαφορετικού είδους και προέλευσης. Σε κανένα από τα δείγματα μύρας δεν προσδιορίστηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες AFB1 και OTA, ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις FB1 προσδιορίστηκαν σε 7 δείγματα και τα περισσότερα δείγματα βρέθηκαν θετικά σε DON. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τον αισθητήρα ήταν σε καλή συμφωνία με εκείνα που ελήφθησαν με τις μεθόδους ELISA που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής χρησιμοποιώντας τα ίδια ανοσοαντιδραστήρια. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ανάλυση των δειγμάτων μύρας με ανοσοχημικές μεθόδους (ανοσοαισθητήρας και ELISA) συγκρίθηκαν και με αυτά που ελήφθησαν για τα ίδια δείγματα με μέθοδο LC-MS/MS. Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκαν κάποιες αποκλίσεις στις τιμές που προσδιορίστηκαν για ορισμένα δείγματα. Αυτές οι αποκλίσεις μεταξύ των ανοσοχημικών μεθόδων και της μεθόδου LC-MS/MS μπορούν να αποδοθούν σε διασταυρούμενη δραστικότητα των αντισωμάτων με κάποιους μεταβολίτες των FB1 και DON που μπορεί να συνυπάρχουν στα δείγματα μύρας. Η διασταυρούμενη δραστικότητα θα μπορούσε να οδηγήσει σε υψηλότερες τιμές μυκοτοξίνης όταν ένα δείγμα αναλύεται με τις ανοσοχημικές μεθόδους σε σύγκριση με την μέθοδο LC-MS/MS. Μία άλλη πιθανή πηγή απόκλισης των τιμών, ειδικά στην περίπτωση που προσδιορίζονται υψηλότερες τιμές με τη μέθοδο LC-MS/MS σε σχέση με αυτές που προσδιορίζονται από τις ανοσοχημικές μεθόδους, θα μπορούσε να είναι η επίδραση της μήτρας της μύρας, δεδομένου ότι τα δείγματα για τα

όποια παρατηρήθηκαν αυτού του είδους οι αποκλίσεις ήταν σκουρόχρωμες μπόρες με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ (~ 15%). Έτσι, συνολικά, μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι η αναλυτική ευαισθησία που επιτυγχάνεται με τον βιοαισθητήρα που αναπτύχθηκε είναι αρκετά ικανοποιητική για την ανίχνευση των AFB1 και FB1 σε δείγματα μπόρας, ενώ για την DON θα χρειαζόταν ένα χαμηλότερο όριο ανίχνευσης για να είναι σε θέση να ανιχνεύσει τον αναλύτη στις περισσότερες μπόρες που βρέθηκαν επιμολυσμένες με DON στην ευρωπαϊκή αγορά [43,45].

Για τον προσδιορισμό της OTA σε δείγματα μπόρας έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι LC/MS-MS, με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται από 0,005-0,1 ng/mL [69,73,88-91]. Σχεδόν σε όλες τις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται περίπλοκες διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων (απαέρωση, εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, φυγοκέντρηση, συμπύκνωση με εξάτμιση διαλύτη και/ ή αραίωση) και ακριβή οργανολογία για αποκλειστική χρήση σε καλά ελεγχόμενο εργαστηριακό περιβάλλον. Επίσης για τον ίδιο σκοπό έχουν αναπτυχθεί ανοσοχημικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης όπως ELISA, ανοσοχρωματογραφικού προσδιορισμού ροής με χρήση σωματιδίων κολλοειδούς χρυσού ως ιχνηθετών ή στήλες ανοσοπροσδιορισμού [106-107]. Οι μέθοδοι αυτές είναι λιγότερο ευαίσθητες σε σχέση με τις μεθόδους LC/MS-MS, εντούτοις η προκατεργασία του δείγματος περιορίζεται σε απαέρωση και αραίωση με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, οι Wang et al. [106], ανέφεραν την ανάπτυξη μεθόδου ELISA και ανοσοχρωματογραφίας με όρια ανίχνευσης στην μπόρα 1,75 και 25 ng/mL, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ποιοτική ενζυμοανοσοχημική μέθοδος ανίχνευσης της OTA που βασίζεται σε στήλες ανοσοσυγγένειας για την προσυμπύκνωση του αναλύτη από 10 mL δείγματος, η οποία μπορούσε να ανιχνεύσει OTA σε μπόρες σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,2 ng/mL [107]. Επίσης, έχει αναπτυχθεί ηλεκτροχημικός αισθητήρας με όριο ανίχνευσης OTA σε μπόρα 5 ng/mL, μετά από 50 φορές αραίωση του δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα [111]. Σε σύγκριση με αυτές τις μεθόδους, ο αναπτυχθέντας αισθητήρας παρέχει συγκρίσιμη ή ακόμα και υψηλότερη

ευαισθησία ανίχνευσης (0,25 ng/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα, 2,0 ng/mL σε μπύρα), ειδικά σε σύγκριση με τον ηλεκτροχημικό αισθητήρα.

Ως προς τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών μυκοτοξινών στη μπύρα οι πιο σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρονται στον προσδιορισμό με GC- ή LC-MS/MS [43-46,70], ELISA [47,99] ή ανοσοπροσδιορισμούς βασισμένους σε μικροσφαιρίδια [176] μιας ή δύο από τις μυκοτοξίνες-στόχους της παρούσας διατριβής, σε συνδυασμό, σε ορισμένες περιπτώσεις και με άλλες μυκοτοξίνες που δεν περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη. Γενικά, όλες αυτές οι μέθοδοι χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης, απαιτούν όμως χρονοβόρες προκατεργασίες πολλαπλών σταδίων των δειγμάτων, όπως είναι η υγρή εκχύλιση [43-44] ή η προ-συμπύκνωση των αναλυόμενων ουσιών πριν την ανάλυση με στήλες χρωματογραφίας συγγενείας [70,46], με αποτέλεσμα την αύξηση του απαιτούμενου χρόνου ανάλυσης των δειγμάτων, με εξαίρεση τους ανοσοπροσδιορισμούς που βασίζονται σε μικροσφαιρίδια στους οποίους η ανάλυση λαμβάνει χώρα μετά από απαέρωση και αραιώση του δείγματος [176]. Όσον αφορά τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών σε δείγματα μπύρας με οπτικούς αισθητήρες χωρίς τη χρήση ιχνηθετών, πρόσφατα αναφέρθηκε ένας αισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) που ανιχνεύει DON και OTA [115]. Τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν με τον συγκεκριμένο αισθητήρα στην μπύρα ήταν 7 ng/mL για την OTA και 17 ng/mL για τη DON και η διάρκεια ανάλυσης ήταν 15 λεπτά, χαρακτηριστικά συγκρίσιμα με αυτά του αισθητήρα που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του αισθητήρα σε συνδυασμό με το μικρό του μέγεθος ενισχύουν τις δυνατότητές του για ενσωμάτωση σε ένα φορητό όργανο με το οποίο θα μπορούν να πραγματοποιηθούν επιτόπιες αναλύσεις, όπως για παράδειγμα σε ζυθοποιίες ή χώρους αποθήκευσης των πρώτων υλών για την παρασκευή μπύρας, προκειμένου να ελεγχθούν πιθανές μολύνσεις καθ' όλη τη διαδικασία παραγωγής, από τις πρώτες ύλες μέχρι το τελικό προϊόν.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

**Πίνακας 6: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων**

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2,2- άζινο- δις (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο- 6-σουλφονικό οξύ)
3- acetyl-deoxynivalenol	3-ακετυλοδεσοξυνιβαλενόλη
3-(aminopropyl) triethoxysilane	3- (αμινοπροπυλ) τριαιθοξυσιλάνιο
9-(fluorenylmethyl) chloroformate	9- (φθορενυλομεθυλο) χλωροφορμικό οξύ
15- acetyl-deoxynivalenol	15-ακετυλοδεσοξυνιβαλενόλη
Aflatoxin B1	Αφλατοξίνη Β1
Balkan Endemic Nephropathy	Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια
Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη Ορού Βοός
Broad-Band Mach-Zehnder Interferometer	Ευρέως Φάσματος Συμβολόμετρο Mach- Zehnder
Bulk Acoustic Wave	Μαζικό Ακουστικό Κύμα
Coefficient of Variation	Συντελεστής Διακύμανσης
C-Reactive Protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
Deoxynivalenol	Δεοξυνιβαλενόλη
dimethylsulfoxide	διμεθυλοσουλφοξείδιο
European Commission	Ευρωπαϊκή Επιτροπή
European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός

Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας
Fluidic Module	Ρευστομηχανική Μονάδα
Food and Agriculture Organization	Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
Fourier Transform Infrared	Φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
Fumonisin B1	Φουμονισίνη Β1
Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
glucose-3-β-D-glucopyranosyl-4-deoxynivalenol	γλυκόζη-3-β-D-γλυκοπυρανοζυλ-4-δεσοξυνιβαλενόλη
Hepatocellular carcinoma	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
High-Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
hollow microfibers	κυρτές μικροΐνες
Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση της ραπανάδος
Immunoaffinity column	Στήλες ανταλλαγής ιόντων
immunochemistry strips	ανοσοχρωματογραφία πλευρικής ροής
Immunoglobulin G	Ανοσοσφαιρίνη G
International Agency for Research on Cancer	Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο
Isoperibol	Ισοπεριβολικό
Light Emitting Diode	Δίοδος Εκπομπής Φωτός
Liquid Chromatography–Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας
Liquid-liquid extraction	Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης
Mach-Zehnder Interferometer	Συμβολόμετρο Mach-Zehnder
Mycotoxicosis	Μυκοτοξίκωση
N- (3-dimethylaminopropyl) -N-ethyl-	υδροχλωρικό N- (3-διμεθυλαμινοπροπυλ)- N-αιθυλ-

carbodiimide hydrochloride	καρβοδιιμίδιο
Nivalenol	Νιβαλενόλη
N-hydroxy sulfo succinimide	N-υδρόξυ σουλφο ηλεκτριμίδιο
Ochratoxin A	Ωχρατοξίνη Α
o-phthaldialdehyde	ο-φθαλδιαλδεΰδη
Ovalbumin	Ωολευκωματίνη
poly (methyl methacrylate)	πολύ (μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)
Quartz	Χαλαζίας
Refractive Index	Δείκτης Διάθλασης
Reflectometric Interference Spectroscopy	Φασματοσκοπία Ανακλαστικής Συμβολής
Room Temperature	Θερμοκρασία Δωματίου
silica gel	πηκτή πυριτίου
sodium dodecyl sulfate	δωδεκυλοθειικό νάτριο
Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
Surface Acoustic Wave	Επιφανειακό Ακουστικό Κύμα
Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
Thin-Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας
Vomitoxin	Βομιτοξίνη
World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

**Πίνακας 7: Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους**

3AcDON	3- acetyldeoxynivalenol
15AcDON	15- acetyldeoxynivalenol
AFB1	Aflatoxin B1
ABTS	2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
APTES	(3-aminopropyl) triethoxysilane
BAW	Bulk Acoustic Wave
BB-MZI	Broad-Band Mach-Zehnder Interferometer
BEN	Balkan Endemic Nephropathy
BSA	Bovine Serum Albumin
C-18	octadecyl carbon chain bonded silica
CRP	C-Reactive Protein
CV	Coefficient of Variation
D3G	glucose-3-β-D-glucopyranosyl-4-deoxynivalenol
DMSO	dimethylsulfoxide
DON	Deoxynivalenol
EC	European Commission
EDC	N- (3-dimethylaminopropyl) -N-ethyl-carbodiimide hydrochloride
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray ionization
FAO	Food and Agriculture Organization
FB1	Fumonisin B1
FD	Fluorescence Detector

FID	Flame Ionization Detector
FTIR	Fourier Transformer Infrared
GC	Gas Chromatography
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IAC	Immunoaffinity column
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgG	Immunoglobulin G
HCC	Hepatocellular carcinoma
LC-MS	Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry
LED	Light Emitting Diode
LLE	Liquid-liquid extraction
Mab	Monoclonal Antibody
MZI	Mach-Zehnder Interferometer
NHS	N-Hydroxy Succinimide
NIV	Nivalenol
OVA	Ovalbumin
OTA	Ochratoxin A
PMMA	poly (methyl methacrylate)
PoN	Point of Need
RI	Refractive Index
RIfS	Reflectometric Interference Spectroscopy
RT	Room Temperature
SAW	Surface Acoustic Wave
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

SPE	Solid phase extraction
SPR	Surface Plasmon Resonance
TDI	Tolerable Daily Intake
TE	Transverse Electric mode
TLC	Thin-Layer Chromatography
TM	Transverse Magnetic mode
UHPLC	Ultra High-Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra Violet
WGMs	Whispering- Gallery Modes
WHO	World Health Organization





## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. S. Brase, A. Encinas, J. Keck, C.F. Nising, Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites, Chem. Rev., 109, 2009, pp 3903-3990.
2. J.L. Richard, Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview, Int. J. Food Microbiol., 119, 2007, pp 3-10.
3. M. Capcarova, K. Zbynovska, A. Kalafova, J. Bulla, P. Bielik, Environment contamination by mycotoxins and their occurrence in food and feed: Physiological aspects and economical approach, J. Environ. Sci. Health B, 51, 2016, pp 236-244.
4. L.R. Beuchat, Field and storage fungi, Food and Beverage Mycology, 2<sup>nd</sup> ed., Van Nostrand Reinhold, New York., 1987, pp 211-232.
5. D.B. Sauer, R.A. Meronuck, C.M. Christensen, Microflora, in Storage of Cereal Grains and Their Products American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 1992, pp 313-340.
6. A.T. Roberts, J.L. Cordier, L. Gram, B.R. Tompkin, I.J. Pitt, M.L.G. Gorris, J.K.M. Swanson, Cereals and cereal products, Micro-Organisms in Foods, 6, 2005, pp 392-439.
7. J.I. Pitt, Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin, Water Relations of Foods, London: Academic Press, Glasgow, UK, 1975, pp 273-307.
8. J.I. Pitt, A.D. Hocking, Fungi and Food Spoilage, 2nd ed., Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, 1999.
9. K. Sargeant, J. O'Kelly, R.B.A. Carnaghan, R. Allcroft, The assay of a toxic principle in certain groundnut meals, Veterinary Record, 73, 1961, pp 1219-1222.

10. D.L. Eaton, J.D. Groopman, *The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, Academic Press, New York, 1994, pp 383-426.
11. P.A. Murphy, S. Hendrich, C. Landgren, C.M. Bryant, Food mycotoxins: an update, *J. Food Sci.*, 71, 2006, pp 51-65.
12. International Agency for Research on Cancer (IARC), *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*, IARC Press, vol. 56, 1993.
13. International Agency for Research on Cancer (IARC) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, Lyon, IARC Press, vol. 82, 2002.
14. L. Lewis, M. Onsongo, H. Njapau, H. Schurz-Rogers, G. Lubber, S. Kieszak, J. Nyamongo, L. Backer, A. Dahiye, A. Misore, K. DeCock, C. Rubin, Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspective*, 113, 2005, pp 1763-1767.
15. S. Marin, J.A. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment *Food and Chemical Toxicology*, 60, 2013, pp 218-237.
16. D.L. Palliyaguru, F. Wu, Global geographical overlap of aflatoxin and hepatitis C, controlling risk factors for liver cancer worldwide, *Food Additives and Contaminants Part A*, 30, 2013, pp 534-540.
17. Council for Agricultural Science and Technology (CAST), *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ames, IA, Task Force Report 139, 2003.
18. Y. Jiang, P.E. Jolly, P. Preko, J.S. Wang, W.O. Ellis, T.D. Phillips, J.H. Williams, Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human

- immunodeficiency virus disease, *Clinical and Developmental Immunology*, 2008, 2008, pp 1-12.
19. I. Dvoracková, V. Pevchová, Pulmonary interstitial fibrosis with evidence of aflatoxin B1 in lung tissue, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 18, 1986, pp 153-157.
  20. C. Magnoli, C. Hallak, A. Astoreca, L. Ponsone, S. Chiacchiera, A.M. Dalcero, Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina, *Mycopathologia*, 161, 2006, pp 53-58.
  21. K.J. Van der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh., *Journal of the Chemical Society*, 5, 1965, pp 7083-7088.
  22. M. Castegnaro, D. Canadas, T. Vrabcheva, T. Petkova-Bocharova, I.N.Chernozemsky, A. Pfohl-Leszkowicz, Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers, *Mol. Nutr. Food Res*, 50, 2006 pp 519-529.
  23. D. Ringot, A. Chango, Y.J. Schneider, Y. Larondelle, Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, *Chem. Biol. Interact.*, 159, 2006, pp18-46.
  24. W.C.A. Gelderblom, K. Jaskiewicz, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, R.M. Horak, R. Vleggaar, N.P.J. Kriek, Fumonisin - Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*, *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1988, pp 1806-1811.
  25. W.M. Wan Norhasima, A.S. Abdulmir, F. Abu Bakar, R. Son, A. Norhafniza, The health and toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. *American Journal of Infectious Diseases*, 5, 2009, pp 283-291.
  26. A. Waskiewicz, M. Beszterda, P. Golinski, Occurrence of fumonisins in food: An interdisciplinary approach to the problem, *Food Control*, 26, 2012, pp 491-499.

27. L. Van der Westhuizen, G.S. Shephard, V.M. Scussel, L.L.F. Costa, H.F. Vismer, J.P. Rheeder, Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, pp 5574-5578.
28. G. Sun, J. Su, T. Huang, J. Yu, L. Tang, W. Gao, J.S. Wang, Fumonisin B1 contamination of home grown corn in high-risk areas for esophageal cancer in China, *Food Additives and Contaminants*, 24, 2007, pp 181-185.
29. W.F.O. Marasas, R.T Riley, K.A Hendricks, V.L Stevens, T.W Sadler, J.G. Waes, Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize, *Journal of Nutrition*, 134, 2004, pp 711-716.
30. G.G. Freeman, R.I. Morrison, The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link, *Biochemical Journal*, 44, 1949, pp 1-5.
31. J.F. Grove, Macrocyclic trichothecenes, *Natural Product Reports*, 10, 1993, pp 429-448.
32. G.S. Eriksen, J. Alexander, *Fusarium Toxins in Cereals - A Risk Assessment*, Nordic Council of Ministers, TemaNord 502, Copenhagen, Denmark, 1998.
33. H.S Rupp, Determination of deoxynivalenol in whole wheat flour and wheat bran, *J. AOAC Int.*, 2002, 85, pp 1355-1359.
34. J.J. Pestka, Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance, *Arch. Toxicol.*, 84, 2010, pp 663-679.
35. P. Sobrova, V. Adam, A. Vasatkova, M. Beklova, L. Zeman, R. Kizek, Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdisciplinary Toxicology*, 3, 2010, pp 94-99.

36. D.E. Corrier, "Mycotoxicosis: mechanism of immunosuppression", *Vet Immunol Immunopathol.*, 30, 1991, pp 73-87.
37. K. De Ruyck, M. De Boevre, I. Huybrechts, S. De Saeger, Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review, *Mutation Res.*, 766, 2015, pp 32-41.
38. Y. Li, B. Zhang, X. He, W.H. Cheng, W. Xu, Y. Luo, R. Liang, H. Luo, K. Huang, Analysis of individual and combined effects of Ochratoxin A and Zearalenone on HepG2 and KK-1 cells with mathematical models, *Toxin*, 6, 2014, pp 1177-1192.
39. L.Y. Wan, P.C. Turner, H. El-Nezami, Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells, *Food Chem. Toxicol.*, 57, 2013, pp 276-283.
40. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Off. J. Eur. Commun.*, L 364, 2006, p 5.
41. C.E. Wolf-Hall, Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 2007, pp 89-94.
42. T. Inoue, Y. Nagatomi, A. Uyama, N. Mochizuki, Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 2013, pp 1410-1415.
43. Y. Rodríguez-Carrasco, M. Fattore, S. Albrizio, H. Berrada, J. Mañes, Occurrence of Fusarium mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population, *Food Chem.*, 178, 2015, pp 149-155.
44. M. Zachariasova, T. Cajka, M. Godula, A. Malachova, Z. Veprikova, J. Hajslova, Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24, 2010, pp 3357-3367.

45. E. Varga, A. Malachova, H. Schwartz, R. Krska, F. Berthiller, Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyldeoxynivalenol in 374 beer samples, *Food Add. Contam. A*, 30, 2013, pp 137-146.
46. K.C. Piacentini, G.D. Savi, G. Olivo, V.M. Scussel, Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer, *Food Cont.*, 50, 2015, pp 925-929.
47. J.I. Bauer, M. Gross, C. Gottschalk, E. Usleber, Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer, *Food Control*, 63, 2016, pp135-139.
48. World Health Organization, Alcohol consumption, in V. Poznyak and D. Rekve (Eds.), *Global status report on alcohol and health*, Geneva: World Health Organization, 2014 edition, pp 27-42.
49. V. Betina, Thin-layer chromatography of mycotoxins, *J. Chromatogr.*, 334, 1985, pp 211-276.
50. M. Dawlatana, R.D. Coker, M.J. Nagler, G. Blunden, A normal phase HPTLC method for the quantitative determination of ochratoxin A in rice, *Chromatographia*, 42, 1996, pp 25-28.
51. L. Lin, J. Zhang, P. Wang, Y. Wang, J. Chen, Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods, *J. Chromatogr. A*, 815, 1998, pp 3-20.
52. J.E. Welke, M. Hoeltz, H.A. Dottori, I.B. Noll, Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector, *Food Addit. Contam. Part A*, 26, 2009, pp 754-758.
53. M. Klaric, Z. Cvetnic, S. Pepeljnjak, I. Kosalec, Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, 60, 2009, pp 427-434.

54. D. Caputo, G. de Cesare, A. Nascetti, R. Scipinotti, F. Pavanello, R. Arrigoni, DEMOCHEM: integrated system for mycotoxins detection, *Procedia Eng.*, 87, 2014, pp 1354-1357.
55. A.L. Capriotti, G. Caruso, C. Cavaliere, P. Foglia, R. Samperi, A. Lagana, Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, 31, 2012, pp 466-503.
56. O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, 1228, 2012, pp 298-323.
57. M.W. Trucksess, L. Bao, C.M. Weaver, K.D. White, Determination of deoxynivalenol in processed foods, *J. AOAC Int.*, 93, 2010, pp 1236-1242.
58. S.M. Herzallah, Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors, *Food Chem.*, 114, 2009, pp 1141-1146.
59. M. Tozlovanu, A. Pfohl-Leskowicz, Ochratoxin A in roasted coffee from French supermarkets and transfer in coffee beverages: comparison of analysis methods, *Toxins*, 2, 2010, pp 1928-1942.
60. A. De Girolamo, M. Mc Keague, J.D. Miller, M.C. De Rosa, A. Visconti, Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer based solid phase extraction column, *Food Chem.*, 127, 2011, pp 1378-1384.
61. M. Zahn, M.L. Jeong, D. Wang, T. Trinh, B. Fay, W. Ma, Product-specific sample clean-up and HPLC analysis of aflatoxins for a dietary product, *Phytochem. Anal.*, 20, 2009, pp 335-337.
62. W.S. Khayoon, B. Saad, C.B. Yan, N.H. Hashim, A.S.M. Ali, M.I. Salleh, B. Salleh, Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up, *Food Chem.*, 118, 2010, pp 882-886.
63. M.H. Iha, C.B. Barbosa, A.R. Heck, M.W. Trucksess, Aflatoxin M1 and ochratoxin A in human milk in Ribeirao Preto-SP, Braz., *Food Control*, 40, 2014, pp 310-313.

64. M.H. Iha, C.B. Barbosa, I.A. Okada, M.W. Trucksess, Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil, *Food Control*, 22, 2011, pp 1971-1974.
65. W.T. Kok, Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 659, 1994, pp 127-137.
66. M. Holcomb, H.C. Thompson, L.J. Hankins, Analysis of fumonisin B1 in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOc and fluorescence detection, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1993, pp 764-767.
67. E. Chiavaro, C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Biancardi, E. Gambarelli, A. Dossena, New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent, *J. Chromatogr. A*, 937, 2001, pp 31-40.
68. M. Jimenez, J.J. Mateo, R. Mateo, Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 870, 2000, pp 473-481.
69. M. Becker, P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, H. Humpf, Column liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin, *J. Chromatogr. A*, 818, 1998, pp 260-264.
70. K. Benesova, S. Belakova, R. Mikulikova, Z. Svoboda, Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry, *Food Control*, 25, 2012, pp 626-630.
71. T. Cajka, M. Vaclavikova, Z. Dzuman, L. Vaclavik, J. Ovesna, J. Hajslova, Rapid LC-MS-based metabolomics method to study the fusarium infection of barley, *J. Sep. Sci.*, 37, 2014, pp 912-919.
72. B. Romagnoli, M. Ferrari, C. Bergamini, Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals



- and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 45, 2010, pp 1075-1080.
73. R. Romero-Gonzalez, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, M.M. Aguilera-Luiz, Determination of ochratoxin A and T-2 toxin in alcoholic beverages by hollow fiber liquid phase microextraction and ultra high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta*, 82, 2010, pp 171-176.
  74. R. Romero-Gonzalez, J.L. Martínez Vidal, M.M. Aguilera-Luiz, A. Garrido Frenich, Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2009, pp 9385-9392.
  75. M. Tamura, A. Uyama, N. Mochizuki, Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultrahigh- performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Sci.*, 27, 2011, p 629.
  76. P. Aqai, J. Peters, A. Gerssen, W. Haasnoot, M.W.F. Nielen, Immunomagnetic microbeads for screening with flow cytometry and identification with nanoliquid chromatography mass spectrometry of ochratoxins in wheat and cereal, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400, 2011, pp 3085-3096.
  77. W. Jiang, Z. Wang, G. Nolke, J. Zhang, L. Niu, J. Shen, Simultaneous determination of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in food matrices by enzyme-linked immunosorbent assay, *Food Anal. Methods*, 6, 2013, pp 767-774.
  78. S.C. Cunha, J.O. Fernandes, Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products, *J. Sep. Sci.*, 33, 2010, pp 600-609.
  79. Y. Rodríguez-Carrasco, H. Berrada, G. Font, J. Manes, Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction

- procedure and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1270, 2012, pp 28-40.
80. Y. Rodríguez-Carrasco, J.C. Molto, J. Manes, H. Berrada, Development of a GC-MS/MS strategy to determine 15 mycotoxins and metabolites in human urine, *Talanta*, 128, 2014, pp 125-131.
  81. Y. Rodríguez-Carrasco, J.C. Molto, H. Berrada, J. Manes, A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC-MS/MS, *Food Chem.*, 146, 2014, pp 212-219.
  82. Y. Onji, Y. Aoki, N. Tani, K. Umebayashi, Y. Kitada, Y. Dohi, Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 815, 1998, pp 59-65.
  83. M.C. Cerveró, M.A. Castillo, R. Montes, E. Hernandez, Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain, *Rev Iberoam Micol*, 24, 2007, pp 52-55
  84. J.C. Young, D.E. Games, Analysis of *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 663, 1994, pp 211-218.
  85. P.M. Scott, Mycotoxin methodology, *Food Addit. Contam.*, 12, 1995, pp 395-403.
  86. Y. Jiao, W. Blaas, C. Rühl, R. Weber, Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 595, 1992, pp 364-367.
  87. K.F. Nielsen, U. Thrane, Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 929, 2001, pp 75-87.
  88. A. Medina, M. Jimenez, J.V. Gimeno- Adelantado, F.M. Valle-Algarra, R. Mateo, Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent, *J. Chromatogr. A*, 1083, 2005, pp 7-13.
  89. S. Belakova, K. Benesova, R. Mikulikova, Z. Svoboda, Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra-performance liquid

- chromatography with fluorescence detection, *Food Chem.*, 126, 2011, pp 321-325.
90. M. Reinsch, A. Topfer, A. Lehmann, I. Nehls, U. Panne, Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection, *Food Chem.*, 100, 2007, pp 312-317.
  91. F. Al-Taher, K. Banaszewski, L. Jackson, J. Zweigenbaum, D. Ryu, J. Cappozzo, Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 2013, pp 2378-2384.
  92. V. Vishwanath, M. Sulyok, R. Labuda, W. Bicker, R. Krska, Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 395, 2009, pp 1355-1372.
  93. O. Vendl, F. Berthiller, C. Crews, R. Krska, Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS, *Anal Bioanal Chem*, 395, 2009, pp 1347-1354.
  94. A.Y. Kolosova, W.B. Shim, Z.Y. Yang, S.A. Eremin, D.H. Chung, Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 2006, pp 286-294.
  95. Y. Goryacheva, S. De Saeger, S.A. Eremin, C. Van Peteghem, Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review, *Food Addit. Contam. A*, 10, 2007, pp 1169-1183.
  96. D. Guan, P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, D. Zhang, J. Jiang, An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products, *Food Chem.*, 125, 2011, pp 1359-1364.
  97. M.R.A. Morgan, Mycotoxin immunoassays (with special reference to elisas), *Tetrahedron*, 45, 1989, pp 2237-2249.

98. L.H. Stanker, P. Merrill, M.C. Scotcher, L.W. Cheng, Development and partial characterization of high-affinity monoclonal antibodies for botulinum toxin type A and their use in analysis of milk by sandwich ELISA, *J. Immunol. Methods*, 336, 2008, pp 1-8.
99. C.N. Rossi, C.R. Takabayashi, M.A. Ono, G.H. Saito, E.N. Itano, O. Kawamura, E.Y. Hirooka, E.Y.S. Ono, Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed, *Food Chem.*, 132, 2012, pp 2211-2216.
100. J.J. Pestka, Z. Islam, C.J. Amuzie, Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse, *Toxicol Lett.*, 178, 2008, pp 83-87.
101. R.R.G. Soares, P. Novo, A.M. Azevedo, P. Fernandes, V. Chu, J.P. Conde, M.R. Aires-Barros, Aqueous two-phase systems for enhancing immunoassay sensitivity: simultaneous concentration of mycotoxins and neutralization of matrix interference, *J. Chromatogr. A*, 1361, 2014, pp 67-76.
102. F.Y. Yu, M.M. Vdovenko, J.J. Wang, I.Y. Sakharov, Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 2011, pp 809-813.
103. Z. Zhang, Y. Li, P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, X. Hu, X. Ding, Monoclonal antibody- quantum dots CdTe conjugate- based fluoro-immunoassay for the determination of aflatoxin B1 in peanuts, *Food Chem.*, 146, 2014, pp 314-319.
104. S. Piermarini, G. Volpe, L. Micheli, D. Moscone, G. Palleschi, An ELIME-array for detection of aflatoxin B1 in corn samples, *Food control.*, 20, 2009, pp 371-375.
105. L. Anfossi, G. D'Arco, M. Calderara, C. Baggiani, C. Giovannoli, G. Giraudi, Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize, *Journal Food Additives & Contaminants: A*, 28, 2011, pp 226-234.

106. X.-H. Wang, T. Liu, N. Xu, Y. Zhang, S. Wang, Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2007, pp 903–911.
107. I.Y. Goryacheva, E.Y. Basova, C. Van Peteghem, S.A. Eremin, L. Pussemier, J.C. Motte, S. De Saeger, Novel gel-based rapid test for non-instrumental detection of ochratoxin A in beer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 2008, pp 723–727.
108. S.S. Moises, M. Schäferling, Toxin immunosensors and sensor arrays for food quality control, *Bioanal. Rev.*, 1, 2009, pp 73-104.
109. J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, S. Hernández, J.R. Bertolín, C. Cubel, J.R. Castillo, Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review, *Biosens. Bioelectron.*, 49, 2013, pp 146-158.
110. M. Puiu, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, Progress in biosensor for mycotoxins assay, *Chem. Sensor*, 4, 2014, pp 1-10.
111. M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.*, 25, 2010, pp 1333-1337.
112. A. Rhouati, A. Hayat, D.B. Hernandez, Z. Meraihi, R. Munoz, J.-L. Marty, Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of ochratoxin A, *Sensors Actuators B Chem.*, 176, 2013, pp 1160-1166.
113. A. Jodra, M.A. Lopez, A. Escarpa, Disposable and reliable electrochemical magnetoimmunosensor for fumonisins simplified determination in maize based foodstuffs, *Biosens. Bioelectron.*, 64, 2015, pp 633-638.
114. J. Yuan, D. Deng, D.R. Lauren, M.-I. Aguilar, Y. Wu, Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages, *Anal. Chim. Acta*, 656, 2009, pp 63-71.
115. S. Joshi, R.M. Annida, H. Zuilhof, T.A. van Beek, M.W.F. Nielen, Analysis of mycotoxins in beer using a portable nanostructured imaging

- surface plasmon resonance biosensor, *J. Agric. Food Chem.*, 64, 2016, pp 8263-8271.
116. H. Nakamura, I. Karube, Current research activity in biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 2003, pp 446-468.
117. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition, 1997  
<http://www.iupac.org/goldbook/B00663.pdf>
118. L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102, 1962, p 29.
119. A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, 30, 2012, pp 489-511.
120. S. Balamurugan, A. Obubuafo, S.A. Soper, D.A. Spivak, Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 2008, pp 1009-1021.
121. L.F. Sgobbi, S.A.S. Machado, Functionalized polyacrylamide as an acetylcholinesterase-inspired biomimetic device for electrochemical sensing of organophosphorus pesticides, *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 2018, pp 290-297.
122. B.P. Corgier, A. Laurent, P. Perriat, L.J. Blum, C.A. Marquette, A Versatile Method for Direct and Covalent Immobilization of DNA and Proteins on Biochips, *Angewandte Chemie*, 119, 2007, pp 4186-4188.
123. J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor Recognition Elements, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10, 2008, pp 1-12.
124. B. Van Dorst, J. Mehta, K. Bekaert, E. Rouah-Martin, W. De Coen, P. Dubruel, R. Blust, J. Robbens, Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2010, pp 1178-1194.
125. D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, 16, 2001, pp 121-131.

126. Y. Tan, X. Chu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice, *Anal. Biochem.*, 387, 2009, pp 82-86.
127. M.K. Kadir, I.E. Tothill, Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods, *Toxins*, 2, 2010, pp 382-398.
128. M. Heurich, M.K.A. Kadir, I.E. Tothill, An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis, *Sens. Actuators B Chem.*, 156, 2011, pp 162-168.
129. Z. Olcer, E. Esen, T. Muhammad, A. Ersoy, S. Budak, Y. Uludag, Fast and sensitive detection of mycotoxins in wheat using microfluidics based realtime electrochemical profiling, *Biosens. Bioelectron.*, 62, 2014, pp 163-169.
130. L.X. Tiefenauer, S. Kossek, C. Padeste, P. Thiébaud, Towards amperometric immunosensor devices, *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 1997, pp 213-223.
131. S.C. Li, J.H. Chen, H. Cao, D.S. Yao, D.L. Liu, Amperometric biosensor for aflatoxin B1 based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes, *Food control*, 22, 2011, pp 43-49.
132. A.E. Radi, X. Munoz-Berbel, V. Lates, J.L. Marty, Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A, *Biosens Bioelectron.*, 24, 2009, pp 1888-1892.
133. Y. Liu, Z. Qin, X. Wu, H. Jiang, Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode, *Biochemical Engineering Journal*, 32, 2006, pp 211-217.
134. A. Janshoff, H.J. Galla, C. Steinem, Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors, An alternative to optical biosensors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2000, pp 4004-4032.
135. J.C. Vidal, P. Duato, L. Bonel, J.R. Castillo, Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz–crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 2009, pp 575-582.

136. R. Fogel, J. Limson, A.A. Seshia, Acoustic biosensors, *Essays Biochem.*, 60, 2016, pp 101-110.
137. K. Lange, F.J. Gruhl, M. Rapp, Surface Acoustic Wave (SAW) biosensors: coupling of sensing layers and measurement, *Methods Mol Biol.*, 949, 2013, pp 491-505.
138. J. Olsson, T. Borjesson, T. Lundstedt, J. Schnurer, Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC–MS and electronic nose, *International Journal of Food Microbiology*, 72, 2002, pp 203-214.
139. W. Lee, J. Lee, J. Koh, Development and applications of chip calorimeters as novel biosensors, *Nanobiosensors in Disease Diagnosis*, 1, 2012, pp 17-29.
140. G. Kos, H. Lohninger, R. Krska, Development of a method for the determination of Fusarium fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics, *Analytical Chemistry*, 75, 2003, pp 1211-1217.
141. H. Pettersson, L. Aberg, Near-infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals, *Food Control*, 14, 2003, pp 229-232.
142. Y. Wang, J. Dostalek, W. Knoll, Long range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M1 in milk, *Biosens. Bioelectron.*, 24, 2009, pp 2264-2267.
143. X. Xu, X. Liu, Y. Li, Y. Ying, A simple and rapid optical biosensor for detection of aflatoxin B1 based on competitive dispersion of gold nanorods, *Biosens. Bioelectron.*, 47, 2013, pp 361-367.
144. W.E. Moerner, New directions in single-molecule imaging and analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, 2007, pp 12596-12602.
145. X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Analytica Chimica Acta*, 620, 2008, pp 8-26.
146. J. Ko, C. Lee, J. Choo, Highly sensitive SERS-based immunoassay of aflatoxin B1 using silica-encapsulated hollow gold nanoparticles, *J. Hazard. Mater.*, 285, 2015, pp 11-17.



147. G. Gauglitz, Direct optical sensors: principles and selected applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 2005, pp 141-155.
148. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 1983, pp 299-304.
149. X.D. Hoa, A.G. Kirk, M. Tabrizian, Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress, *Biosens. Bioelectron.*, 23, 2007, pp 151-160.
150. D. Dorokhin, W. Haasnoot, M.C.R. Franssen, H. Zuilhof, M.W.F. Nielen, Imaging surface plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400, 2011, pp 3005-3011.
151. A.E. Urusov, S.N. Kostenko, P.G. Sveshnikov, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Ochratoxin A immunoassay with surface plasmon resonance registration: lowering limit of detection by the use of colloidal gold immunoconjugates, *Sens. Actuators B Chem.*, 156, 2011, pp 343-349.
152. J.-H. Park, J.-Y. Byun, H. Mun, W.-B. Shim, Y.-B. Shin, T. Li, M.-G. Kim, A regeneratable, label-free, localized surface plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.*, 59, 2014, pp 321-327.
153. B. Drapp, J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, B.J. Luff, J.S. Wilkinson, J. Ingenhoff, Integrated optical Mach-Zehnder interferometers as simazine immunoprobes, *Sens. Actuators B*, 39, 1997, pp 277-282.
154. B.J. Luff, J.S. Wilkinson, J. Piehler, U. Hollenback, J. Ingenhoff, N. Fabricius, Integrated optical Mach-Zehnder biosensor, *J. Lightwave tech.*, 16, 1998, pp 583-592.
155. K. Fischer, J. Muller, Sensor application of SiON integrated optical waveguides on silicon, *Sens. Actuators B*, 9, 1992, pp 209-213.
156. A. Brandenburg, Differential refractometry by an integrated-optical Young interferometer, *Sens. Actuators B*, 39, 1997, pp 266-271.
157. A. Ymeti, J. Greeve, P.V. Lambeck, R. Wijn, R.G. Heideman, J.S. Kanger, Drift correction in a multichannel integrated optical Young interferometer, *Appl. Opt.*, 44, 2005, pp 3409-3412.

158. A. Ymeti, J. Greve, P.V. Lambeck, T. Wink, S.W.F.M. van Hovell, T.A.M. Beurner, R.R. Wijn, R.G. Heideman, V. Subramaniam, J.S. Kanger, Fast, ultrasensitive virus detection using a Young interferometer sensor, *Nano Lett.*, 7, 2007, pp 394-397.
159. B.P. Mohrle, K. Kohler, J. Jaehrling, R. Brock, G. Gauglitz, Label-free characterization of cell adhesion using reflectometric interference spectroscopy (RIfS), *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 2006, pp 407-413.
160. E. Stavra, P.S. Petrou, G. Koukouvinos, C. Kiritsis, I. Pirmettis, M. Papadopoulos, D. Goustouridis, A. Economou, K. Misiakos, I. Raptis, S. E. Kakabakos, Simultaneous determination of paraquat and atrazine in water samples with a white light reflectance spectroscopy biosensor, *Journal of Hazardous Materials*, 359, 2018, pp 67-75.
161. P.S. Petrou, D. Ricklin, M. Zavali, I. Raptis, S.E. Kakabakos, K. Misiakos, J.D. Lambris, Real-time label-free detection of complement activation products in human serum by white light reflectance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.*, 24, 2009, pp 3359-3364.
162. A.L. Washburn, L.C. Gunn, R.C. Bailey, Label-free quantitation of a cancer biomarker in complex media using silicon photonic microring resonators, *Anal. Chem.*, 81, 2009, pp 9499-9506.
163. A.L. Washburn, M.S. Luchansky, A.L. Bowman, R.C. Bailey, Quantitative label-free detection of five protein biomarkers using arrays of silicon photonic microring resonators, *Anal. Chem.*, 82, 2010, pp 69-72.
164. M.S. Luchansky, A.L. Washburn, M.S. McClellan, R.C. Bailey, Sensitive on-chip detection of a protein biomarker in human serum and plasma over an extended dynamic range using silicon photonic microring resonators and sub-micron beads, *Lab Chip*, 11, 2011, pp 2042-2044.
165. K. Misiakos, S.E. Kakabakos, P.S. Petrou, H.H. Ruf, A monolithic silicon optoelectronic transducer as a real-time affinity biosensor, *Anal. Chem.*, 76, 2004, pp 1366-1373.
166. M. Kitsara, K. Misiakos, I. Raptis, E. Makarona, Integrated optical frequency-resolved Mach-Zehnder interferometers for label-free affinity sensing, *Opt.Ex.*, 18, 2010, pp 8193-8206.

167. K. Misiakos, I. Raptis, A. Salapatas, E. Makarona, A. Botsialas, M. Hoekman, R. Stoffer, G. Jobst, Broad-band Mach-Zehnder interferometers as high performance refractive index sensors: theory and monolithic implementation, *Opt. Ex.*, 22, 2014, pp 8856-8870.
168. K. Misiakos, I. Raptis, E. Makarona, A. Botsialas, A. Salapatas, P. Oikonomou, A. Psarouli, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, K. Tukkiniemi, M. Sopanen, G. Jobst, All silicon monolithic Mach-Zehnder interferometer as a refractive index and biochemical sensor, *Opt. Exp.*, 22, 2014, pp 26803-26813.
169. A. Psarouli, A. Salapatas, A. Botsialas, P.S. Petrou, I. Raptis, E. Makarona, G. Jobst, K. Tukkiniemi, M. Sopanen, R. Stoffer, S.E. Kakabakos, K. Misiakos, Monolithically integrated broad-band Mach-Zehnder interferometers for highly sensitive label-free detection of biomolecules through dual polarization optics, *Sci. Rep.*, 5, 2015, p 17600.
170. A. Psarouli, A. Bourkoula, P. Petrou, K. Misiakos, N. Chaniotakis, S. Kakabakos, Covalent Binding vs. Adsorption of Biomolecules on Silicon Nitride Planar Waveguides, *Procedia Engineering*, 25, 2011, pp 350-353.
171. M. Angelopoulou, A. Botsialas, A. Salapatas, P.S. Petrou, W. Haasnoot, E. Makarona, G. Jobst, D. Goustouridis, A. Siafaka-Kapadai, I. Raptis, K. Misiakos, S.E. Kakabakos, Assessment of goat milk adulteration with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 2015, pp 3995-4004.
172. A. Psarouli, A. Botsialas, A. Salapatas, G. Stefanitsis, D. Nikita, G. Jobst, N. Chaniotakis, D. Goustouridis, E. Makarona, P.S. Petrou, I. Raptis, K. Misiakos, S.E. Kakabakos, Fast label-free detection of C-reactive protein using broad-band Mach-Zehnder interferometers integrated on silicon chips, *Talanta*, 65, 2017, pp 458-465.
173. J. Peters, M. Bienenmann-Ploum, T. de Rijk, W. Haasnoot, Development of a multiplex flow cytometric microsphere immunoassay for mycotoxins

- and evaluation of its application in feed, *Mycotox. Res.*, 27, 2011, pp 63-72.
174. B. Poppenberger, F. Berthiller, D. Lucyshyn, T. Sieberer, R. Schuhmacher, R. Krska, K. Kuchler, J. Glössl, C. Luschnig, G. Adam, Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, 278, 2003, pp 47905-47914.
175. J. Peters, D. Thomas, E. Boers, T. de Rijk, F. Berthiller, W. Haasnoot, M. W. F. Nielen, Colour-encoded paramagnetic microbead-based direct inhibition triplex flow cytometric immunoassay for ochratoxin A, fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based feed, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 2013, pp 7783-7794.
176. J. Peters, R. van Dam, R. van Doorn, D. Katerere, F. Berthiller, W. Haasnoot, M.W.F. Nielen, Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer, *PLoS One* 12, 2017.
177. M. Schollenberger, H.-M. Müller, K. Ernst, S. Sondermann, M. Liebscher, C. Schlecker, G. Wischer, W. Drochner, K. Hartung, H.-P. Piepho, Occurrence and distribution of 13 trichothecene toxins in naturally contaminated maize plants in Germany, *Toxins*, 4, 2012, pp 778-787.
178. SCF/CS/CNTM/MYC/28, Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3 (expressed on 4 April 2003), [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_fusarium\\_out185\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_fusarium_out185_en.pdf). (Accessed December 2016).
179. SCF/CS/CNTM/MYC/27, Final opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol (adopted on 26 February 2002), [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_contaminants\\_catalogue\\_fusarium\\_out123\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_fusarium_out123_en.pdf).
180. J. Yang, P. Gao, Y. Liu, R. Li, H. Ma, B. Du, Q. Wei, Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.*, 64, 2015, pp 13-18.