

Diagnostik von Nahrungs- und Futtermitteln sowie Umweltproben mit einem biologischen Indikatorsystem auf Zellkulturbasis (MTT-Test)

Diagnosics of food, feedstuffs and samples from the environment by use of a cell culture based bioassay (MTT-Test)

M. GAREIS und R. ROTHENEDER

Zusammenfassung

Bei der Beantwortung der hygienischen Qualität von Lebens- und Futtermitteln sowie von Umweltproben spielt nicht nur die mögliche Belastung mit pathogenen und/oder saprobiotischen Mikroorganismen eine Rolle, sondern auch die Kontamination sowohl mit toxischen Stoffwechselprodukten mikrobieller Herkunft (bakterielle Toxine und die von Schimmelpilzen gebildeten Mykotoxine) als auch die Belastung mit Xenobiotika. Im Unterschied zu physikalisch-chemischen und immunchemischen Methoden, die den Nachweis und die Identifizierung einzelner Toxine in Nahrungsmitteln erlauben, können mit Hilfe von biologischen Testverfahren Hinweise zur Toxizität als Summenparameter erfasst werden. Der Einsatz von Bioassays ist insbesondere dann sinnvoll, wenn mehrere Toxine in einer Probe erwartet werden können. Für diesen Zweck wurde in den letzten Jahren ein Bioassay auf Zellkulturbasis entwickelt und für die Überprüfung der hygienischen Qualität von Nahrungsmitteln, Futtermitteln sowie Umweltproben eingesetzt. Grundlage des Testes ist die Spaltung von gelbgefärbten Tetrazoliumsalsen (MTT) zu violetten Formazanen durch in Mikrotiterplatten kultivierbare Zelllinien. Jede Schädigung dieser Zielzellen durch zytotoxische Substanzen oder Rückstände in Rohextrakten von Probenmaterialien reduziert diese Spaltungsaktivität und erlaubt eine objektive Aussage über die mögliche Belastung mit zytotoxischen Rückständen im Vergleich zu Kontrollproben. Die Anwendungsbereiche des Bioassays umfassen neben der Testung von Standardsubstanzen und Schimmelpilzisolaten Lebens- und Futtermittel sowie unterschiedlichste Umweltproben.

Summary

The formation of mycotoxins in moulded food, feed or materials from the environment is dependent on a row of factors, among which the toxigenicity of the particular fungus, the composition and the water activity of the substrate are of most importance. In order to assess a possible human or animal exposure to mycotoxins in such samples, information on the toxicity of field samples is needed. For that purpose a sensitive cell culture based bioassay for the evaluation of cytotoxic properties and the hygienic quality of food, feedstuffs and samples from the environment has been developed. The principle of this bioassay is based on the transformation of the yellow tetrazolium salt MTT by viable, living cells (via mitochondrial dehydrogenase) to purple formazans. Swine kidney monolayer cells (SK), known to be sensitive to mycotoxins, were used as target cells. Crude extracts of food, feed and indoor samples (controls and moulded samples) were prepared by extraction of sample aliquots with organic solvents and tested in the MTT-bioassay. The cell culture assay has been shown to be a useful diagnostic tool for cytotoxicity screening and could be applied to a variety of sample materials such as cereals, bread, mixed feed and building materials.

Schlüsselwörter Biologischer Test – Kontaminanten – Mykotoxine

Key Words bioassay – contaminants – mycotoxins

Einleitung

Als Testobjekte für die Reihe verschiedener Bioassays sind u. a. Pflanzen, Bakterien, Protozoen, Arthropoden, Vertebraten und Zellkulturen verwendet worden. Die Mehrzahl dieser Tests wurde und wird für die Beschreibung der Toxizität von Reinstoffen oder Kulturextrakten eingesetzt, hat jedoch keine praktische Bedeutung für die Überprüfung von komplex zusammengesetzten Probenmaterialien erlangt. Ursache dafür ist die mit den Tests verbundene Unspezifität, die, je komplexer zusammengesetzt das Probenmaterial ist, zunimmt, sowie die Empfindlichkeit einzelner Systeme auf Matrixbestandteile der Proben.

Viele der genannten Bioassays sind aus praxisorientierten Gründen daher nicht brauchbar, da sie sehr zeitaufwändig sind, häufig keine objektive Befunderhebung möglich ist und, bei Verwendung von Versuchstieren, ethische und tierschutzrechtliche Gründe dem Einsatz entgegenstehen. Bei der Konzeption und der Erarbeitung des MTT-Zellkulturtestes als Screening-Test waren daher die nachfolgenden Anforderungen maßgebend:

- Schnelle und einfache Durchführbarkeit (Screening-Methode)
- Hohe Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen bei geringer Spezifität
- Objektive Befunderhebung
- Testung von Rohextrakten verschiedener Ausgangsmaterialien muss möglich sein, um möglichst alle Rückstände erfassen zu können (geringe Sensitivität gegenüber Matrixbestandteilen).

Das Prinzip des MTT-Testes beruht auf einer colorimetrischen Reaktion, bei der eine quantitative Umsetzung des gelbgefärbten Tetrazoliumsalzes MTT zu violetten Formazanen erfolgt (1, 2). Diese Reaktion erfolgt durch mitochondriale Dehydrogenasen in biologischen Systemen und wurde bereits 1941 von KUHN

und JERCHEL bei Desinfektionsstudien erstmals beschrieben (1). MOSMANN beschrieb dieses Testprinzip 1983 für Zellkulturen (2). Seitdem wird es für die Testung der Viabilität von Zellen und Wirksamkeitsprüfungen von Medikamenten, Antibiotika etc. in vielen Bereichen eingesetzt. Im Hintergrund für diesen Bereich steht die *in vitro* Prüfung von Reinstoffen, nicht jedoch von komplex zusammengesetzten Probenmaterialien wie z. B. Lebensmittel.

Ziel der eigenen Arbeiten war es jedoch nicht Reinstoffe zu testen, sondern dieses Prinzip als Teil eines Bioassays zu verwenden, mit dessen Hilfe die qualitativen Eigenschaften von biologischen Proben vergleichend getestet werden können.

Um diesem Anspruch für praxisorientierte Belange gerecht zu werden, wurden zunächst grundlegende Arbeiten zur Auswahl geeigneter Zielzellen und zur Optimierung der Zelltestparameter durchgeführt (3). Voraussetzung für die biologische Charakterisierung von unterschiedlichen Proben ist die Erfassung möglichst aller toxischer Rückstände, weshalb Rohextrakte und keine aufgereinigten Probenfraktionen gegenüber Zielzellen zu testen sind. Dabei muss das Testsystem so abgestimmt werden, dass die Zellen nicht aufgrund der Matrixeffekte der Probenrohextrakte geschädigt werden.

Material und Methodik

Zur Herstellung der Rohextrakte werden bei Nahrungs- und Futtermitteln 20 g Probenmaterial eingewogen, mit Acetonitril/Wasser (3:1) auf dem Schüttler extrahiert und mit Hexan entfettet. Bei Umweltproben werden 2 g Probenmaterial mit 40 ml Methanol über Nacht eingeweicht, am nächsten Tag zusätzlich mit je 40 ml Chloroform und Methanol auf dem Schüttler extrahiert und die Filtrate vereinigt. Nach Einengung am Rotationsverdampfer müssen die Rückstände in entsprechende Probengefäße überführt, aliquotiert, mit Stickstoff eingengt und in Zellkulturmedium aufgenommen werden.

Die so gewonnenen Rohextrakte werden in Verdünnungsstufen auf in Mikrotiterplatten eingesäte Zelllinien gegeben und bis zu 48 Std. im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des MTT-Farbreagenzes erfolgt nach weiterer vierstündiger Inkubation die photometrische Messung der in DMSO gelösten violetten Farbkristalle bei 510 nm. Die Auswertung der jeweiligen Spaltungsaktivitäten erfolgt über ein entsprechendes Messprogramm (Mikrowin 2000). Dabei werden die Extinktionen jeder Probenkonzentration mit der unbehandelten Zellkontrolle (100 % Spaltungsaktivität) verglichen und ins

Verhältnis gesetzt. Als toxische Grenzkonzentration wird der IC₅₀ Wert ermittelt, d. h. die niedrigste Konzentration in mg/ml, die die Spaltungsaktivität um 50 % reduziert.

Ergebnisse

Der auf diese Weise konzipierte MTT-Test (Abb. 1) hat sich mittlerweile bei einer Vielzahl von Fragestellungen an Probenmaterialien ganz unterschiedlicher Zusammensetzung bewährt (4-10).

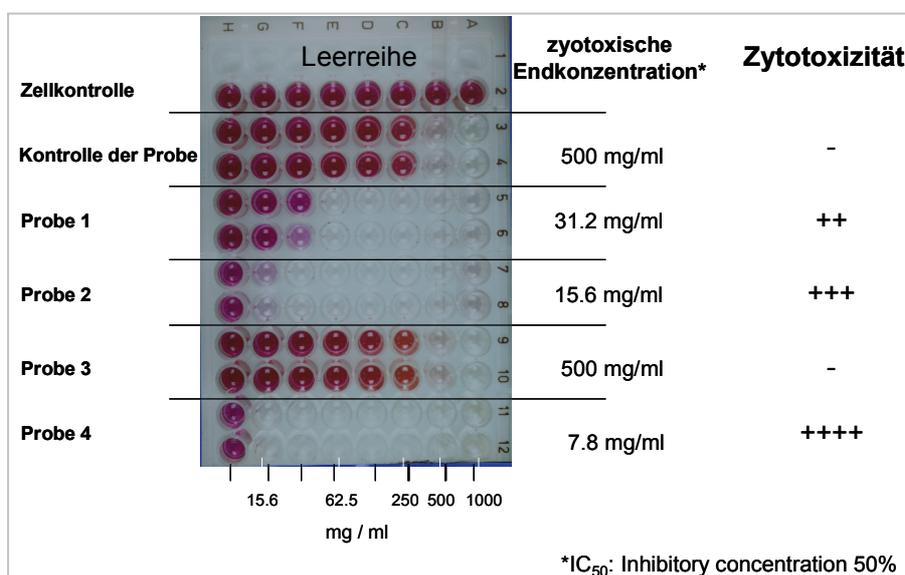


Abb. 1: MTT-Assay von 4 Lebensmittelproben (Rohextrakten). Im Vergleich zum Kontrolleextrakt weisen die Proben 1, 2 und 3 eine deutlich erhöhte zytotoxische Aktivität auf, was auf eine Belastung mit zytotoxischen Substanzen, möglicherweise Mykotoxine, hinweist

Als Zielzelle wird von uns die gegenüber Mykotoxinen besonders empfindliche SK-Zelllinie (Swine-Kidney) eingesetzt (Tab. 1). Extrem hohe zytotoxische Eigenschaften weisen makrozyklische Trichothecene (Roridin A, Satratoxin G und H) sowie das Typ A-Trichothecen T-2 Toxin auf. Diese Mykotoxine werden von *Stachbotrys chartarum*, *Myrothecium roridum* bzw. *Fusarium* spp. gebildet und können in Umweltproben (Stäuben) und Futtermitteln vorkommen. Auch Typ-B Trichothecene wie Nivalenol und Deoxynivalenol sowie verschiedene Mykotoxine von *Penicillium*- und *Aspergillus*arten (Gliotoxin, Patulin, Ochratoxin A) sind ver-

gleichsweise stark zytotoxisch im MTT-Assay gegenüber SK-Zielzellen. Verschiedene andere Toxine wie Penitrem A und Roquefortin sind dagegen nur gering oder nicht zytotoxisch.

Die SK-Zielzelle erweist sich gegenüber den Rohextrakten und Matrixeffekten der Probenmaterialien stabil, weshalb Messungen in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials in einem Bereich zwischen etwa 50-1000 mg Probenaliquot/ml Zellkulturmedium (erste Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihen) durchgeführt werden können.

Tab. 1: Zytotoxizität von Mykotoxinen im MTT-Zellkulturtest mit SK-Zielzellen

| Mykotoxin | IC ₅₀ | |
|----------------------|------------------|----------|
| | µg/ml | µM |
| Roridin A | 0,0018 | 0,0033 |
| Verrucaridin A | 0,0070 | 0,0139 |
| Satratoxin G | 0,0081 | 0,0149 |
| Satratoxin H | 0,0183 | 0,035 |
| T2-Toxin | 0,0373 | 0,080 |
| Gliotoxin | 0,34 | 1,05 |
| Nivalenol | 2,08 | 6,66 |
| Patulin | 4,23 | 27,45 |
| Chaetocin | 11,56 | 16,61 |
| Fumagillin | 12,50 | 27,26 |
| Deoxynivalenol (DON) | 17,73 | 59,84 |
| Ochratoxin A | 15,31 | 37,91 |
| Citrinin | 25,00 | 99,88 |
| Monorden | 25,00 | 68,53 |
| Penicillinsäure | 25,00 | 146,89 |
| Tenuazonsäure | 40,62 | 178,16 |
| Alternariol | 116,67 | 451,86 |
| Beauvericin | 200,00 | 255,1 |
| L-DON | > 200,00 | > 680,27 |
| Mycophenolsäure | 200,00 | 624,41 |
| Penitrem A | 200,00 | 315,36 |
| Sterigmatocystin | > 200,00 | > 616,71 |
| X-DON | 200,00 | 675,68 |
| Roquefortine C | 250,00 | 641,85 |
| Cyclopiazonsäure | 400,00 | 1190,12 |

IC₅₀ (inhibitory concentration 50): Toxinkonzentration, die die MTT-Spaltungsaktivität auf 50 % der Kontrollwerte reduziert

Durch den Vergleich zwischen Rohextrakten von Proben hoher Qualität mit entsprechenden Extrakten zu untersuchender Proben lässt sich ein direkter Hinweis auf die mögliche Präsenz oder das Fehlen zytotoxischer Rückstände in der betreffenden Probe ableiten. Die Konzeption des Testes in Mikrotiterplatten erlaubt die gleichzeitige Überprüfung meh-

rerer Proben, was dem Anspruch der Praxis-tauglichkeit gerecht wird.

Der Anwendungsbereich des Bioassays umfasst, neben dem Vergleich von Reinstoffen, Schimmelpilzkulturen, Lebensmittel (z. B. Getreide, Brot und Backwaren), Futtermittel sowie Umweltpollen (Baumaterialien, Filterproben, Stäube) (4-13).

Schlussfolgerungen

Da die Art und Menge denkbarer toxischer Beimengungen in biologischen Probenmaterialien wie Lebensmitteln oder Umweltproben nicht vorhersehbar ist, ist die Analytik mit physikalisch-chemischen und immunchemischen Verfahren allein nicht ausreichend, wenn es um eine gesamte hygienische Beurteilung geht. Die Anwesenheit irgendwelcher toxischer Komponenten ist nur mit Hilfe biologischer Indikatorsysteme festzustellen, an die gänzlich andere Anforderungen als für die Verfahren wie DC, GC, HPLC oder EIA gestellt werden müssen. Dabei darf sich die Eignung eines Testes nicht nur anhand der Testung von Reinsubstanzen messen lassen, sondern muss primär auf der Basis seiner Praxistauglichkeit erfolgen. Der MTT-Bioassay erfüllt dabei, wie die verschiedenen Untersuchungen und Anwendungsbereiche zeigen, diese Ansprüche.

Als 'short term test' auf der Basis eines Zellkulturtestes in Mikrotiterplatten konzipiert, können Befunde bei geringem Aufwand bereits nach 24 bis 48 Stunden, die zelltechnischen Manipulationen nicht einberechnet, erhalten werden. Durch die Verwendung von Zielzellen, die einerseits eine genügend hohe Empfindlichkeit ge-

genüber der Mehrzahl der überprüften mikrobiellen Toxine, vor allem Mykotoxine, aufweisen, sich andererseits aber relativ unempfindlich gegenüber Rohextrakten verschiedenster komplexer Probenmatrices zeigen, können nicht nur die Effekte von Reinsubstanzen vergleichend überprüft werden, sondern auch die biologischen Aktivitäten von ganz unterschiedlichen Nahrungsmitteln, Futtermitteln und Umweltproben erfasst und somit deren hygienische Qualität beurteilt werden.

Durch die problemlose Handhabung, die schnelle Durchführbarkeit, die Möglichkeit der Miterfassung verschiedener Positiv- und Negativkontrollen sowie der photometrischen Messung des Parameters MTT-Umsatz als Maß der zytotoxischen Effekte, ist das erarbeitete Testsystem hinsichtlich der Interpretierbarkeit und Objektivierbarkeit der Ergebnisse anderen biologischen Testverfahren überlegen und auch eine Alternative für die Verwendung von Labortieren zum Nachweis von toxischen Rückständen.

Danksagung

Für die hervorragende technische Assistenz danken wir Frau Renate Schneider, Frau Brigitte Groß und Frau Georgine Krappmann.

Literatur

1. Kuhn, R. and Jerchel, D. (1941): Über Invertseifen. VII Mitteil.: Tetrazoliumsälze. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 73, 941-948.
2. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65: 55-63.
3. Hanelt, M., Gareis, M. and Kollarczik, B. (1995): Cytotoxicity evaluation of Mycotoxins evaluated by the MTT cell culture assay. Mycopathologia, 128: 167-174.
4. Gareis, M. and Wernery, J. (1994): Determination of gliotoxin in samples associated with cases of intoxication in camels. Mycotoxin Research 10: 2-8.
5. Gareis, M. und Ceynowa, J. (1994): Einfluß des Fungizids Matador® (Tebuconazole/Triadimenol) auf die Mykotoxinbildung durch *Fusarium culmorum*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 198: 244-248.
6. Gareis, M. und Walz, A. (1994): Vergiftungsfälle bei Rottweilerwelpen durch Milchpulver, kontaminiert mit *Bacillus cereus*. Tierärztl. Umschau 49: 319-322.
7. Richter, W., Lepschy v. Gleissenthal, J., Linder Mayer, H., Holzer, A., Obst, A. und Gareis, M. (1997): Behandlung von mit *Fusarium culmorum* infiziertem Winterweizen mit Konservierungstoffen. Das Wirtschaftseigene Futter, Band 42, Heft 2, 148-160.

8. Langseth, W., Kosiak, B., Clasen, P.-E., Torp, M. and Gareis, M. (1997): Toxicity and occurrence of *Fusarium species* and mycotoxins in late harvested and overwintered grain from Norway, 1993. *Phytopathology* 145, 409-426.
9. Johanning, E., Gareis, M., Yang Chin, S., Hintikka E.L., Nikulin, M. Jarvis, B. and Dietrich, R. (1998): Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachbotrys chartarum*). *Mycotoxin Research*, 14, 60-73.
10. Gareis, M., Rotheneder, R. and Rödel, W. (1999): Mould-ripened meat products: new selections scheme for non-toxigenic *Penicillium* spp. *Mycotoxin Research*, 15, 61-66.
11. Gareis, M., Johanning, E. and Dietrich, R. (1999): Mycotoxin Cytotoxicity Screening of Field Samples. In: Johanning, E. (ed) *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment, Prevention and Control*. Eastern New York Occupational and Environmental Health Center, Albany, NY, USA, Proceedings, 202-213.
12. Langseth, W., Bernhoft A., Rundberget, T., Brekke, T., Kosiak, B. and Gareis, M. (1997): Cytotoxicity and mycotoxin production of *fusarium* strains isolated from Norwegian grain. *Mycopathologia* 144, 103-113.
13. Twarużek M., Gareis M., Dietrich R., Grajewski J. (2002): Cytotoxicity testing and roridin A-ELISA of samples originating from water damaged dwelling pavilions on post-flood areas. *Mycotoxinworkshop 2002*, Berlin, Germany.