

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
(Dr. rer. biol. vet.)  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Elektrochemische Mikroarrays basierend auf  
anti-idiotypischen Antikörpern zum Vor-Ort-Nachweis  
von Cyanotoxinen und Mykotoxinen

von Katharina Schulz  
aus Beckendorf-Neindorf

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Tag der Promotion:** 6. Februar 2021

Für meine Familie

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Cyanotoxine und Mykotoxine .....</b>	<b>4</b>
1.1.	Einteilung .....	4
1.2.	Bedeutung .....	6
1.2.1.	Relevanz für die Lebensmittelanalytik .....	6
1.2.2.	Bedeutung im Bereich der Erkennung biologischer Gefahrenlagen .....	7
1.3.	Struktur-Wirkbeziehung und toxikokinetische Aspekte .....	8
1.3.1.	<i>Paralytic shellfish poisoning</i> -Toxine .....	8
1.3.2.	Microcystine .....	10
1.3.3.	Typ-A-Trichothecen T-2-Toxin und Typ-D-Trichothecene .....	13
1.3.4.	Aflatoxine .....	15
1.4.	Nachweisbarkeit in Blut und Urin .....	17
<b>2.</b>	<b>Analytik von Cyanotoxinen und Mykotoxinen .....</b>	<b>19</b>
2.1.	Laborbasierte Verfahren .....	19
2.1.1.	Physikalisch-chemische Methoden .....	19
2.1.2.	Immunbasierte Methoden .....	20
2.2.	Vor-Ort-basierte Verfahren .....	23
2.2.1.	Immunchromatographische Streifentests .....	23
2.2.2.	Biosensoren .....	24
2.2.2.1.	Mikroarray-Technologie .....	26
2.3.	Anti-idiotypische Antikörper als Nachweisreagenz .....	31
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>36</b>
<b>1.</b>	<b>Publikation 1 .....</b>	<b>36</b>
<b>2.</b>	<b>Publikation 2 .....</b>	<b>63</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
<b>1.</b>	<b>Etablierung kompetitiver, anti-idiotypischer Antikörper-basierter Testsysteme auf elektrochemischen Mikroarrays .....</b>	<b>98</b>
1.1.	Eignung der eingesetzten Antikörper als Fänger- bzw. Detektionsmolekül .....	98
1.2.	Etablierung indirekter und direkter Testformate .....	100
1.3.	Beurteilung der Sensitivität und Spezifität .....	103

---

<b>2.</b>	<b>Anwendung der Mikroarray-Systeme für klinische Proben.....</b>	<b>107</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>112</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>
<b>VIII.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>139</b>
<b>IX.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>140</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>141</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Adda	3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeka-4,6-diensäure
AF	Aflatoxin
Ak1	Toxinspezifischer Antikörper
Ak2	Anti-idiotypischer Antikörper
Ak3	Anti-anti-idiotypischer Antikörper
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
AS	Aminosäure
bGAL	$\beta$ -D-Galaktosidase
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CCD	<i>Charged coupled device</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
dc-	Decarbamoyl-
d. h.	Das heißt
DON	Deoxynivalenol
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EIA	Enzymimmunoassay
EU	Europäische Union
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
GTX	Gonyautoxin
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HT-2	HT-2-Toxin
i. p.	Intraperitoneal
IAE	<i>Immunoaffinity extraction</i>
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

---

LD <sub>50</sub>	Mittlere letale Dosis
LFA	<i>Lateral flow assay</i>
LOD	<i>Limit of detection</i>
MC	Microcystin
MCR 3	<i>Munich Chip Reader 3rd generation</i>
Mdha	2-Methylamino-2-dehydroalanin
MeAsp	D-Erythro- $\beta$ -methylasparaginsäure
MS	Massenspektrometrie
NEO	Neosaxitoxin
o. D.	Ohne Datum
OPCW	<i>Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons</i>
OTA	Ochratoxin A
pAP	<i>p</i> -Aminophenol
pAPG	<i>p</i> -Aminophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
pBDi	<i>Portable BioDetector integrated</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pQI	<i>p</i> -Quinonimin
PSP	<i>Paralytic shellfish poisoning</i>
RoA	Roridin A
RoE	Roridin E
SAM	<i>Self assembled monolayer</i>
SatG	Satratoxin G
SatH	Satratoxin H
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SPGE	<i>Screen printed gold electrode</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
STX	Saxitoxin
T-2	T-2-Toxin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TDI	<i>Tolerable daily intake</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin



---

TTX	Tetrodotoxin
UV	Ultraviolett
VHH	<i>Variable domain of heavy-chain antibody</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z. B.	Zum Beispiel
ZEN	Zearalenon

Aminosäuren wurden mit dem Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

## I. EINLEITUNG

Cyanobakterielle Toxine und Mykotoxine sind niedermolekulare Biotoxine, die im Sekundärstoffwechsel von Bakterien, Pilzen oder Pflanzen gebildet werden und eine gesundheitliche Bedrohung für Mensch, Tier und Umwelt darstellen können. So kann z. B. eine Intoxikation mit cyanobakteriellen Toxinen, wie dem neurotoxischen *paralytic shellfish poisoning* (PSP)-Toxin Saxitoxin (STX) oder dem hepatotoxischen Microcystin-LR (MC-LR), tödlich verlaufen (Bartram und Chorus, 1999). Hierbei besteht bei den Microcystinen die größte Gefahr durch Kontakt mit kontaminiertem Wasser bzw. beim Einatmen kontaminierter Aerosole, wohingegen sich PSP-Toxine in Schalenweichtieren, wie z. B. Muscheln, anreichern und in die Nahrungskette gelangen können (Muschelvergiftung (Mytilismus)). Die Gefahr einer akuten Intoxikation mit Mykotoxinen aus der Gruppe der Aflatoxine bzw. Trichothecene ist hingegen als gering einzustufen; unter lebensmittelhygienischen Aspekten ist eher eine chronische Exposition bei Aufnahme kontaminierter Zerealien als kritisch zu bewerten. Hierbei ist Aflatoxin B1 (AFB1) eines der stärksten natürlich vorkommenden Leberkarzinogene (IARC, 2002), während T-2-Toxin (T-2) und Roridin A (RoA) potente Vertreter der stark zytotoxisch und dermatotoxisch wirksamen Trichothecene darstellen (Ueno, 1983).

Aufgrund ihrer ausgeprägten toxischen Eigenschaften zählen alle oben angegebenen Cyano- und Mykotoxine zu den potenziell als biologische Kampfstoffe einsetzbaren Verbindungen (Pitschmann und Hon, 2016). Da jede Toxingruppe eine mitunter hohe Zahl toxischer Kongenere beinhaltet, müssen die im Fall einer akzidentellen oder intentionalen Toxin-Freisetzung eingesetzten Analysenverfahren in der Lage sein, alle toxischen Kongenere schnell, sensitiv und automatisiert vor Ort zu erfassen. Da im Fall einer biologischen Gefahrenlage nicht bekannt ist, welches das verursachende Toxin ist, ist ein paralleler Nachweis der verschiedenen Toxine ebenfalls von Vorteil.

Gegenwärtig erfolgt der Nachweis cyanobakterieller Toxine und Mykotoxine vor allem mittels physikalisch-chemischer Verfahren und/oder immunbasierter Methoden (Krska *et al.*, 2008). Physikalisch-chemische Verfahren ermöglichen zwar eine umfassende Multi-Toxin-Analytik sowie eine eindeutige Identifizierung des Toxins, können jedoch aufgrund ihrer technischen Komplexität nicht als Vor-Ort-System konzipiert werden. Ebenso muss die Probe vor der eigentlichen Analyse meist aufwendig aufgearbeitet werden, was eine Automatisierung ebenfalls erschwert (Solfrizzo *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu bieten immunbasierte Methoden aufgrund

der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion den Vorteil, dass eine Analyse in komplexen Matrices ohne umfangreiche Probenaufarbeitungsprozeduren bei hoher Sensitivität durchgeführt werden kann. Die Verwendung gruppenspezifischer Antikörper ermöglicht es zudem, alle Kongenere in Summe zu erfassen (Samdal *et al.*, 2014). Hierzu wurden in der Vergangenheit bevorzugt Enzymimmunoassays (EIAs) im Mikrotiterplatten-Format entwickelt, die jedoch nur stationär einsetzbar und in geringem Maß multiplexfähig sind (Urusov *et al.*, 2010). Immunchromatografische Streifentests (LFA, *lateral flow assay*) sind zwar schnell vor Ort durchführbar, aber meist wenig sensitiv (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Immunosensoren weisen hingegen ähnliche Sensitivitäten wie die EIA-Testsysteme auf und werden der Forderung nach Automatisierung und Transportfähigkeit gerecht (McGrath *et al.*, 2012). Hierbei können insbesondere elektrochemische Mikroarrays nicht nur kostengünstig hergestellt werden, sondern zeichnen sich aufgrund des Arrayformats auch durch eine hohe Multiplexfähigkeit aus (Dill und Ghindilis, 2009). Jedoch ist die Mehrzahl der bisher entwickelten Sensoren für die Lebensmittel- oder Umweltanalyse konzipiert und wurde nicht für die Vor-Ort-Anwendung bei klinischem Probenmaterial (Blut, Urin), das im Fall einer Intoxikation analysiert werden muss, getestet (Schneider *et al.*, 2004).

Der immunbasierte Nachweis niedermolekularer Toxine erfolgt dabei mehrheitlich im kompetitiven Format, d. h. es werden Marker-gekoppelte Toxine als Fang- oder Detektionsmoleküle eingesetzt, die allerdings sowohl für Hersteller als auch für den Anwender dieser Testformate gesundheitsgefährdend sein können. Ein alternatives Nachweisreagenz stellen anti-idiotypische Antikörper des  $\beta$ -Typs (Ak2 $\beta$ ) dar, da diese spezifisch das Paratop des primären (=toxinspezifischen) Antikörpers (Ak1) binden und so mit dem eigentlichen Antigen (=Toxin) um die Bindung an Ak1 konkurrieren können (Jerne, 1984). Dies ermöglicht es, rein Antikörper-basierte kompetitive Tests für niedermolekulare Biotoxine, wie den Cyano- und Mykotoxinen, zu entwickeln.

In Anbetracht dessen war das Ziel dieser Arbeit<sup>1</sup> die Entwicklung, Optimierung und Validierung elektrochemischer Mikroarrays zum Vor-Ort-Nachweis von PSP-Toxinen, Microcystinen, Aflatoxinen und Trichothecenen, bei denen Ak2 $\beta$  als kompetitive Fang- bzw. Detektionsmoleküle eingesetzt werden. Zudem sollte durch Verwendung gruppenspezifischer Antikörper eine breitbandige Toxindetektion erreicht werden.

Das Antikörper-basierte Nachweiskonzept sollte auf der elektrochemischen Vor-Ort-

---

<sup>1</sup>Das dieser Arbeit zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projekts „Sensor-basierte und automatisierte Detektion von hoch- und niedermolekularen biologischen Toxinen (SensTox)“ (Förderkennzeichen 13N137-91/95) gefördert.

Detektionsplattform pBDi (*portable BioDetector integrated*) implementiert und charakterisiert werden. Die verwendeten monoklonalen Ak1 sowie die entsprechenden Ak2 $\beta$  wurden allesamt im Rahmen anderer Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt und hergestellt (Dietrich *et al.*, 1995; Szkola *et al.*, 2014; Gayk, 2019).

Des Weiteren sollten die zu entwickelnden Biochips anwendungsspezifisch konzipiert werden. Für den Fall lebensmittelbedingter Intoxikationen sollten Ak2 $\beta$ -basierte Singleplex-Mikroarrays für Urinproben entwickelt werden, die z. B. die Diagnostik einer Intoxikation nach Verzehr kontaminierter Lebensmittel unterstützen. Im Fokus stand die sensitive und zuverlässige Detektion der Toxine STX, T-2 bzw. Aflatoxine. Die Implementierung Ak2 $\beta$ -basierter Immunoassays auf elektrochemisch-auslesbaren Biochips ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Für den Fall einer biologischen Bedrohungslage bzw. intentionalen Toxin-Freisetzung sollte ein Ak2 $\beta$ -basierter Multiplex-Mikroarray zum Nachweis der bioterroristisch relevanten Toxine STX, MC-LR, AFB1, T-2 und RoA etabliert werden. Dieser Biochip soll es z. B. Erstrettern und Einsatzkräften vor Ort erlauben, Blutproben exponierter Personen gegen ein Panel niedermolekularer biologischer Agenzien zu testen, um im Fall einer biologischen Gefahrenlage zügig medizinische Gegenmaßnahmen einleiten zu können. Ein solcher Multiplex-Nachweis ist bisher weder publiziert noch ist ein solcher Test auf einem kommerziellen Detektionssystem etabliert.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Cyanotoxine und Mykotoxine

#### 1.1. Einteilung

Cyanotoxine sind niedermolekulare Verbindungen, die im Sekundärstoffwechsel von Cyanobakterien gebildet werden. Hierbei sind Cyanobakterien natürlicher Bestandteil des Phytoplanktons biologischer Gewässer, die sich jedoch bei Vorhandensein hoher Nährstoffkonzentrationen stark vermehren können (Carmichael, 2008). So kommt es durch die vom Menschen verursachte Eutrophierung von Gewässern in Kombination mit der fortschreitenden Klimaerwärmung immer häufiger zu einer explosionsartigen Vermehrung toxischer Cyanobakterien, sog. „Algenblüten“. Sterben die Zellen ab, werden nach der Zellyse die für Mensch und Tier toxisch wirkenden Cyanotoxine freigesetzt. Toxische Cyanobakterienarten treten überwiegend in Süßwassergebieten auf (Stewart *et al.*, 2006).

Cyanotoxine lassen sich hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in folgende Gruppen einteilen (Kuiper-Goodmann *et al.*, 1999):

- Neurotoxine (PSP-Toxine und Anatoxine),
- Hepatotoxine (Microcystine und Nodularine),
- Zytotoxine (Cylindrospermopsin) und
- Dermatotoxine (Aplysiatoxin und Lyngbyatoxin).

Die neurotoxischen PSP-Toxine und hepatotoxischen Microcystine sind dabei die am weitverbreitetsten und zugleich toxischsten Vertreter der Cyanotoxine. Sie zählen zu den stärksten niedermolekularen Biotoxinen (Lehane, 2001). PSP-Toxine stellen zudem eine Besonderheit dar, da sie nicht nur von Süßwasser-Cyanobakterien sondern auch von im Meerwasser lebenden eukaryotischen Dinoflagellaten (einzellige Algen), wie z. B. *Alexandrium*, produziert werden (Hackett *et al.*, 2012). Dinoflagellaten bilden als Hauptbestandteil des marinen Phytoplanktons die Nahrungsgrundlage für alle höheren trophischen Ebenen, so dass deren Verzehr insbesondere während einer Algenblüte für Fische, Vögel sowie Meeressäuger, aber auch für den Menschen, gesundheitliche Beeinträchtigungen zur Folge haben kann.

Mykotoxine sind ebenfalls niedermolekulare Sekundärstoffwechselprodukte, die im Gegensatz zu Cyanotoxinen von Schimmelpilzen gebildet werden (Haschek und Voss, 2013). Dabei kann ein Wachstum der toxinproduzierenden Schimmelpilze, wie z. B. Aspergillen, Penicillien, Fusarien, Alternaria, und somit eine Kontamination der

Lebensmittel mit den Toxinen bereits auf den Feldern, bei der Lagerung oder beim Transport auftreten (Tola und Kebede, 2016). Derzeit sind mehrere hundert verschiedene Mykotoxine bekannt.

Zu den wichtigsten lebensmittelrelevanten Mykotoxinen zählen folgende Gruppen (Tola und Kebede, 2016):

- Aflatoxine,
- Trichothecene,
- Ochratoxine,
- Fumonisine und
- Patuline.

Hierbei sind die Aflatoxine und Trichothecene die am weitverbreitesten und toxischsten Mykotoxine (Bennett und Klich, 2003). Bei den Aflatoxinen ist z. B. die chronische Toxizität besonders bedeutsam, da die Aufnahme geringer Toxinmengen über einen längeren Zeitraum die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms begünstigt (Kew, 2013). Chronische Aflatoxikosen treten auch heutzutage noch vor allem in Südostasien und Afrika auf (Williams *et al.*, 2004). AFB1 zählt zu den am stärksten natürlich vorkommenden Karzinogenen (IARC, 2002). Die Trichothecene sind hingegen zytotoxisch, wobei vor allem das Typ-A-Trichothecen T-2 und die makrozyklischen Typ-D-Trichothecene durch eine hohe Dermatotoxizität gekennzeichnet sind (Ueno, 1983).

Einige Charakteristika toxischer Cyanotoxine und Mykotoxine, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine größere Rolle spielen, sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

**Tabelle 1: Eigenschaften hochtoxischer Cyano-bzw. Mykotoxine.**

	Gruppe	Leittoxin	Wirkung	LD <sub>50</sub> Maus (µg/kg)
Cyanotoxine	PSP-Toxine	STX	Neurotoxisch	263 (oral); 2 (inhalativ)
	Microcystine	MC-LR	Hepatotoxisch	5000 (oral); 50 (inhalativ)
Mykotoxine	Typ-A-Trichothecene	T-2	Zytotoxisch, dermatotoxisch	10000 (oral); 160 (inhalativ)
	Typ-D-Trichothecene	RoA	Zytotoxisch, dermatotoxisch	500 (i. p.)
	Aflatoxine	AFB1	Hepatotoxisch, kanzerogen	9000 (oral)

Diese niedermolekularen Biotoxine können einerseits zu lebensmittelbedingten Erkrankungen führen (Kumar *et al.*, 2017), andererseits zählen sie aber auch aufgrund ihres hohen toxischen Potenzials zu den für bioterroristische Zwecke einsetzbaren biologischen Kampfstoffen (Pitschmann und Hon, 2016).

## 1.2. Bedeutung

### 1.2.1. Relevanz für die Lebensmittelanalytik

Unter den für die vorliegende Arbeit relevanten Toxinen ist insbesondere die Gruppe der PSP-Toxine für akute Intoxikationen verantwortlich. Hierbei kommt es nach Verzehr toxinhaltiger Meeresfrüchte zum paralytischen Mytilismus, die lähmende Form der Muschelvergiftung. Ursache dafür ist, dass die PSP-Toxin-bildenden Algen als Nahrungsgrundlage für Schalenweichtiere (Muscheln, Krabben, Krebse, Hummer) dienen, wobei sich mitunter große Toxinmengen (bis zu 60 mg/kg) im Gewebe der Schalenweichtiere ablagern können (El Gamal, 2010). Zudem können die Algen auch mehrere Toxine gleichzeitig produzieren. Die Lebensfähigkeit der Weichtiere wird durch die Aufnahme toxinhaltiger Algen jedoch nicht beeinträchtigt, für den Menschen kann der Verzehr kontaminierter Muscheln allerdings tödlich enden (Etheridge, 2010). In der Europäischen Union (EU) liegt die gesetzliche Höchstmenge für PSP-Toxine in Muschelfleisch bei 800 µg/kg (EC, 2004).

Die cyanobakteriellen Microcystine können hingegen während einer Algenblüte direkt ins Wasser übergehen und bei chronischer Exposition zu schweren Lebererkrankungen führen (Chorus und Bartram, 1999). Die dabei freigesetzten Microcystine werden in der Regel bei der Trinkwasseraufbereitung weitgehend reduziert. Wird jedoch zu wenig Ozon eingesetzt, z. B. bei hoher Zelldichte während einer Algenblüte, werden die Toxine nur partiell abgebaut (Hoeger *et al.*, 2002). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) empfiehlt daher einen Grenzwert von 1 µg MC-LR pro L Trinkwasser (WHO, 2017). Eine gesetzliche Regelung zur Microcystin-Belastung von Trinkwasser existiert aber bislang nicht. Eine weitere Gefahr besteht, wenn beim Baden in Seen stark Microcystin-kontaminiertes Wasser geschluckt wird oder als Aerosol z. B. beim Wassersport in die Atemwege gelangt (Umweltbundesamt, 2015).

Eine akute Intoxikation mit Typ-A-Trichotheceen führt zur Alimentären Toxischen Aleukie, eine Erkrankung des blutbildenden Systems, die aufgrund des Verzehrs von belastetem Getreide Anfang des 20. Jahrhunderts mehrere tausend Opfer forderte (Mirocha und Pathre, 1973). Solch hohe Toxinkonzentrationen sind unter den heute üblichen Ernte- und Lagerungsbedingungen jedoch nicht im Getreide zu finden. Für die Belastung von Zerealien mit dem Typ-A-Trichotheceen T-2 und dessen Metabolit HT-2-Toxin (HT-2) gibt es in der EU derzeit nur Richtwerte (2013/165/EU), obwohl erst kürzlich deren Wert für die tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI, *Tolerable Daily Intake*) um das Fünffache auf 0,02 µg/kg gesenkt wurde (EFSA CONTAM, 2017). Die

Richtwerte liegen je nach Getreide- oder Maiserzeugnis zwischen 15-200 µg/kg (EC, 2013). Die makrozyklischen Typ-D-Trichothecene kommen hingegen selten in Lebensmitteln vor. Als Metabolite des Schimmelpilzes *Stachybotrys* sind sie als Kontaminanten der Raumluft in Gebäuden von Bedeutung und wurden als möglicher Faktor für die Genese des sog. *sick-building*-Syndroms diskutiert (Straus, 2009).

Von einer Aflatoxin-Kontamination sind neben Getreideerzeugnissen auch Nüsse, Gewürze, Trockenfrüchte oder Ölsaaten betroffen (Wang und Liu, 2007). Wenn z. B. kontaminierte Futtermittel verfüttert wurden, können die Toxine auch über tierische Produkte, wie Milch, in Form des Aflatoxins M1 (AFM1) in die Nahrungskette gelangen (Galvano *et al.*, 1996). Zudem sind die Toxine chemisch und physikalisch äußerst stabil, so dass weder durch Kochen noch durch Einfrieren der Lebensmittel die toxische Wirkung signifikant gesenkt werden kann. Die in der EU zulässigen Höchstmengen für Aflatoxin-belastete Nahrungsmittel liegen bei 2-8 µg/kg für AFB1 und 4-10 µg/kg für die Summe der Aflatoxine (Aflatoxin B1, B2, G1, G2) (EC, 2006). Für AFM1 in Rohmilch gilt eine Höchstmenge von 0,05 µg/kg.

### 1.2.2. Bedeutung im Bereich der Erkennung biologischer Gefahrenlagen

Im Allgemeinen umfasst der Begriff „Biologischer Kampfstoff“ Biotoxine sowie pathogene und umweltresistente Bakterien- und Virenstämme, die in der Lage sind, eine Handlungsunfähigkeit, eine Dauerschädigung oder den Tod der Betroffenen herbeizuführen (Kuhn, 2003).

Im Irak wurde in den 1980er-Jahren neben den Proteotoxinen Botulinumtoxin und Rizin auch große Mengen an Aflatoxin hergestellt und bevorratet, um Bomben und Raketen zu bestücken, die in Form sog. „*cancer bombs*“ Verwendung finden sollten (Paterson, 2006). In Amerika sollten Gewehrmunitionen und Selbstmordkapseln mit STX präpariert werden, da es deutlich potenter als das synthetische Nervengift Sarin ist (Osterbauer und Dobbs, 2009). Als *agent TZ* war STX als chemischer Kampfstoff im Gespräch. Neben dem Proteotoxin Rizin ist STX als Kampfstoff biologischer Herkunft im weltweiten Chemiewaffenübereinkommen (Liste 1) aufgeführt (OPCW, 2005) und wird zusammen mit den Microcystinen im Kriegswaffenkontrollgesetz der Bundesrepublik Deutschland gelistet (Bundesamt für Justiz, 2017). STX und T-2 befinden sich zudem auf der amerikanischen Liste der *select agents* (CDC, 2002). Dabei hat T-2 im militärischen Umfeld eine gewisse Bedeutung erlangt, nachdem während des Vietnamkrieges aus Flüchtlingsseinrichtungen ungeklärte Vergiftungsfälle gemeldet wurden (Russmann, 2003). Nach Zeugenaussagen hätten dort zuvor Flugzeuge eine gelbe Flüssigkeit versprüht („*yellow rain*“). Untersuchungen



gesammelter Proben lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Ob der T-2-belastete Niederschlag natürlichen Ursprungs oder tatsächlich ein Kampfmittel war, konnte nicht geklärt werden (Robinson *et al.*, 1990). Insbesondere T-2 und das makrozyklische RoA sind die einzigen Biotoxine, die dermal wirksam sind und wie chemische Haut-Kampfstoffe zu verbrennungsartigen Verletzungen führen können (Agrawal *et al.*, 2012). Beide Toxine sind deutlich toxischer als Senfgas (Janik *et al.*, 2019).

Zur Kontrolle der Verbreitung biologischer Toxine hat sich Deutschland als Mitglied der *Australia Group* verschiedenen Im- und Exportregularien unterworfen. Bei der *Australia Group* handelt es sich um einen Zusammenschluss von mehr als 40 Staaten, der sich für die Einhaltung der weltweiten Chemie- und Biowaffenübereinkommen einsetzt. Auf deren Exportkontrollliste sind insgesamt 19 Toxine aufgeführt, darunter STX, Microcystine, T-2 und Aflatoxine (AG, 2018). Obwohl niedermolekulare Toxine äußerst stabil und sehr toxisch sind, gilt deren Einsatz als biologische Waffe im klassischen Sinn für militärische Zwecke als eher unwahrscheinlich (Zhang *et al.*, 2014a; Janik *et al.*, 2019). So ist eine enorm große Menge des Toxin-produzierenden Organismus für die Extraktion letaler Dosen notwendig. Zudem lassen sich die Toxine totalsynthetisch nur in geringen Mengen herstellen (McDougal und Schmuff, 1985; Thottumkara *et al.*, 2014; Zemskov *et al.*, 2017). Dennoch bestünde die Möglichkeit, dass die Toxine mittels *metabolic engineering* (Expression von Genen heterologen Ursprungs) im Großmaßstab hergestellt werden könnten (Tucker, 2013). Denkbare Szenarien wären in diesem Fall ein gezielter Anschlag auf die lokale Lebensmittel- und Trinkwasserverarbeitung oder die Freisetzung als Aerosol (Janik *et al.*, 2019).

### 1.3. Struktur-Wirkbeziehung und toxikokinetische Aspekte

#### 1.3.1. *Paralytic shellfish poisoning*-Toxine

##### *Vorkommen*

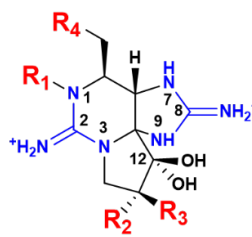
PSP-Toxine werden von den Cyanobakterien *Anabaena*, *Planktothrix*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis* und *Aphanizomenon* (Wiese *et al.*, 2010) und den Dinoflagellaten *Alexandrium*, *Gymnodinium* und *Pyrodinium* produziert (Oshima *et al.*, 1993; Usup *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1997).




##### *Chemische Struktur und Toxizität*

Das PSP-Toxin STX ist die Leitsubstanz der derzeit 58 bekannten PSP-Toxine (Wiese *et al.*, 2010), die zur Stoffgruppe der Alkaloide gehören und deren trizyklische

Struktur durch ein Tetrahydropurin-Grundgerüst mit einem geminalen Diol am C12 und zwei Guanidingruppen gekennzeichnet ist (**Abbildung 1**). Die beiden Struktur motive tragen maßgeblich zur hohen Polarität des Moleküls bei.

Die Unterscheidung der PSP-Toxine erfolgt anhand der vier Substituenten an den Positionen R1 bis R4. Dabei wird zwischen Vertretern ohne Sulfatgruppe (STX und Neo-STX (NEO)), mit einer Sulfatgruppe (Gonyautoxin (GTX)-1 bis 6) oder mit zwei Sulfatgruppen (C1 und C2) unterschieden (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Die Kongenere NEO, GTX-1, GTX-4 und GTX-6 werden auch als hydroxylierte PSP-Toxine bezeichnet. Zu jedem Carbamoyl-Toxin existiert die decarbamoylierte (dc) Variante.



		R1	R2	R3	R4
Carbamoyl-Gruppe	STX	H	H	H	
	NEO	OH	H	H	
	GTX-1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GTX-4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	GTX-2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	GTX-3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
N-Sulfo-carbamoyl-Gruppe	GTX-5	H	H	H	
	GTX-6	OH	H	H	
	C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
Decarbamoyl-Gruppe	dc-STX	H	H	H	
	dc-NEO	OH	H	H	
	dc-GTX-1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dc-GTX-4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	
	dc-GTX-2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dc-GTX-3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	

**Abbildung 1: Struktur der PSP-Toxine.**

Als Strukturmerkmale gelten die Guanidingruppen (blau), das geminale Diol am C12 und die Substituenten R1-R4 (rot).

Der Substituent an Position R4 verweist nicht nur auf die jeweilige Strukturklasse der PSP-Toxine, sondern bestimmt maßgeblich deren toxische Potenz. Die Hauptvertreter der PSP-Toxine gehören zur Carbamoyl-, N-Sulfocarbamoyl- oder Decarbamoyl-Gruppe, deren Toxizität in absteigender Reihenfolge folgendermaßen beschrieben wird:

Carbamoylrest > Decarbamoylrest > N-Sulfocarbamoylrest (Oshima *et al.*, 1993).

Mit einer LD<sub>50</sub> (Maus, i. p.) von 10 µg/kg Körpergewicht ist STX eines der stärksten natürlich vorkommenden niedermolekularen Toxine (Lehane, 2001). Die tödliche orale Dosis für einen erwachsenen Menschen liegt bei 1-3 mg STX (Evans, 1969). Als Aerosol aufgenommen, ist STX deutlich toxischer. Die inhalative LD<sub>50</sub> beträgt 2 µg/kg Körpergewicht (Wang *et al.*, 2016a). Neben STX besitzen NEO und GTX-1 die höchste biologische Aktivität, gefolgt von GTX-4, GTX-3 und GTX-2. Die dc-Toxine besitzen eine moderate Toxizität. Die N-Sulfocarbamoyl-Toxine weisen im Vergleich zu STX eine bis zu 100-fach geringere Toxizität auf (Hall *et al.*, 1990).

### *Symptome und Wirkmechanismus*

Bei einer Exposition gegenüber PSP-Toxinen können Intoxikationserscheinungen bereits in den ersten 15-30 Min auftreten (Evans, 1969; Gessner und Middaugh, 1995). Symptome sind Reizungen der Mundschleimhaut und ein Taubheitsgefühl in den Extremitäten, welches in eine Lähmung übergehen kann und von Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen begleitet wird. Bei höheren Dosen geht die Lähmung auf die Atemmuskulatur über und kann innerhalb von 24 h zum Tod der Betroffenen führen. Auf molekularer Ebene hemmen PSP-Toxine spannungsgesteuerte Ionenkanäle in der Membran erregbarer Zellen (Hille, 1975; Catterall, 1980) und zeigen eine Präferenz für neuronale und skelettmuskuläre Natriumionenkanäle (Catterall, 1992). Durch die Anwesenheit von STX, bei dem beide Guanidingruppen protoniert vorliegen müssen, wird der Eingang des Kanals für Natriumionen blockiert und eine Reizweiterleitung findet nicht mehr statt (Catterall *et al.*, 2007).

### *Eliminierung*

Als Haupteliminierungsrouten der PSP-Toxine beim Menschen gilt die renale Exkretion (Gessner *et al.*, 1997b; García *et al.*, 2004). Erste toxikokinetische Untersuchungen führten zu der Annahme, dass PSP-Toxine in unveränderter Form ausgeschieden werden. Gessner *et al.* (1997a) und Coleman *et al.* (2018) fanden hingegen deutliche Unterschiede zwischen dem Toxinprofil in der Muschel und in den Körperflüssigkeiten der Betroffenen. Dies legt die Vermutung nahe, dass einige PSP-Toxine oxidiert und als Konjugate ausgeschieden werden (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010). Allerdings existiert derzeit kein Konsens über eine mögliche Bio-transformation der PSP-Toxine beim Menschen.

## **1.3.2. Microcystine**

### *Vorkommen*

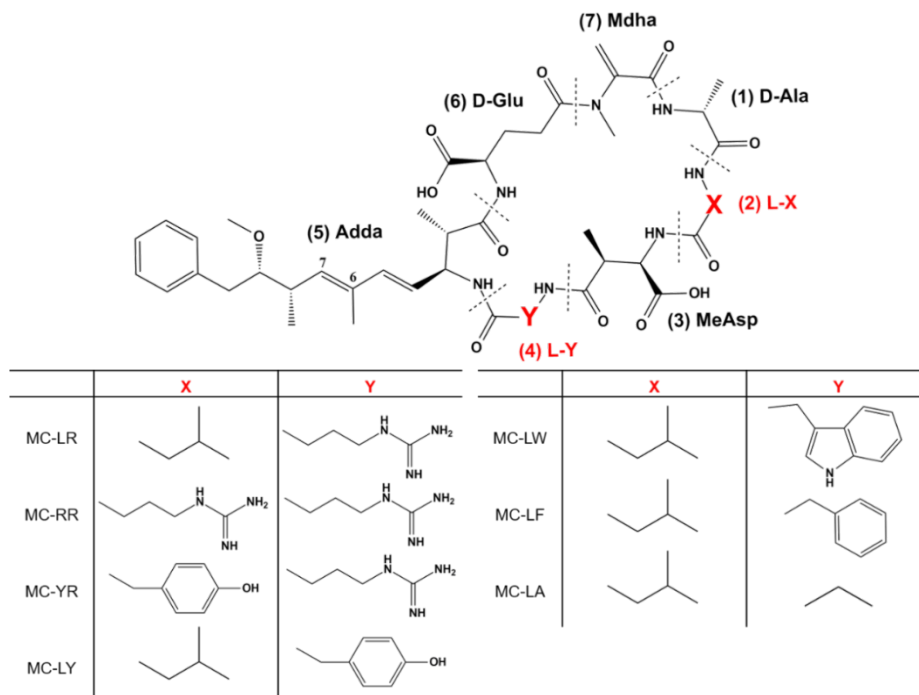
Microcystine werden von Cyanobakterien der Gattung *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix* und *Oscillatoria* produziert (Carmichael *et al.*, 1988; Carmichael, 1992; Rinehart *et al.*, 1994; Rapala *et al.*, 1997).

### *Chemische Struktur und Toxizität*

Microcystine sind monozyklische Heptapeptide (800-1100 Da), deren Grundstruktur sich aus folgenden Aminosäuren (AS) zusammensetzt (Harada *et al.*, 1990):

- (1) D-Alanin (D-Ala),
- (2) variable L-AS (L-X),
- (3) D-Erythro- $\beta$ -methylasparaginsäure (MeAsp),
- (4) variable L-AS (L-Y),
- (5) 3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeka-4,6-diensäure (Adda),
- (6) D-Glutaminsäure (D-Glu),
- (7) 2-Methyl-amino-2-dehydroalanin (Mdha) (**Abbildung 2**).

Neben der Variabilität der L-AS X und Y tragen vor allem Demethylierungen in den Aminosäuren MeAsp und Mdha, Veresterungen der Carboxylgruppe in D-Glu und MeAsp sowie eine Acetylierung des Sauerstoffs der Adda-Seitenkette zur hohen Strukturvielfalt der Microcystine bei (Carmichael, 1992; Rinehart *et al.*, 1994). Bisher wurden 246 Varianten beschrieben (Spoon und Catherine, 2017). Die Nomenklatur der Microcystine ergibt sich dabei aus der AS-Variation an Position 2 und 4 und wird als Ein-Buchstabencode an den Namen ‚Microcystin‘ als Suffix angefügt. So besitzt das Microcystin MC-LR die AS Leucin (L) und Arginin (R) an Position 2 und 4. Eine weitere Variation an der Seitenkette der jeweiligen AS wird als Präfix in eckigen Klammern angefügt. In [D-Asp<sup>3</sup>]MC-LR ist die Asparaginsäure (Asp) an Position 3 demethyliert.



**Abbildung 2: Grundstruktur der Microcystine.**

Dargestellt sind die AS X und Y der am häufigsten vorkommenden Microcystine (Turner *et al.*, 2018; Díez-Quijada *et al.*, 2019).

Mit einer LD<sub>50</sub> (Maus, i. p.) von 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht gilt MC-LR als Leittoxin der Microcystine (Rinehart *et al.*, 1994). Die orale LD<sub>50</sub> beträgt 5  $\text{mg}/\text{kg}$  Körpergewicht,

wohingegen eine Aufnahme als Aerosol 100-fach toxischer ist (Fawell *et al.*, 1999). Im Wesentlichen ist für die Toxizität der Microcystine die *trans*-Konfiguration der C6-C7-Doppelbindung der  $\beta$ -AS Adda (Harada *et al.*, 1990) sowie die Kombination der AS an Position 2 und 4 verantwortlich (Zurawell *et al.*, 2005; Puerto *et al.*, 2009). So führt eine Substitution von Leucin (L) mit Arginin (R) an Position 2 zu einer deutlichen Verringerung der Toxizität. Folglich liegt die LD<sub>50</sub> (Maus, i. p.) für MC-RR fünffach über der von MC-LR (Stotts *et al.*, 1993). MC-LA ist hingegen ähnlich toxisch wie MC-LR (WHO, 2017). Zur *in vivo* Toxizität der Microcystine mit aromatischen AS, wie MC-LW, MC-LF und MC-LY, ist bisher wenig bekannt. *In vitro* geht eine Substitution von Arginin (R) mit Phenylalanin (F) oder Tryptophan (W) mit einer gesteigerten Toxizität einher (Vesterkvist *et al.*, 2012).

### *Symptome und Wirkmechanismus*

Eine Intoxikation mit Microcystinen äußert sich zunächst in einer Reizung der Schleimhaut, gefolgt von Übelkeit, Erbrechen und Durchfall bis hin zu schweren Leberschäden bei chronischer Exposition (Kuiper-Goodmann *et al.*, 1999).

In der Leber inhibieren die Microcystine Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen (Eriksson *et al.*, 1990; MacKintosh *et al.*, 1990), die durch Abspaltung von Phosphatgruppen bei Proteinen zelluläre Prozesse regulieren (Cohen, 1989). Dabei interagieren die Microcystine über das zyklische Peptidrückgrat, die lipophile Adda-Seitenkette sowie die Carboxylgruppe von D-Glu und MeAsp mit dem aktiven Zentrum der Phosphatasen. Die irreversible Inhibierung der Phosphatase-Aktivität erfolgt letztlich durch kovalente Bindung des Mdha der Microcystine an einen konservierten Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms (Rudolph-Böhner *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2013; Fontanillo und Köhn, 2018). Infolgedessen kommt es zu einer Hyperphosphorylierung von Proteinen, die den Abbau der Mikrofilamente des Zytoskeletts initiieren, was zur Zerstörung der Hepatozyten führt (Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

MC-LR besitzt zudem tumorpromovierende Eigenschaften (Ohta *et al.*, 1992). Von der IARC (*International Agency of Research on Cancer*) wurde es daher als „potenziell humankarzinogen“ (Gruppe 2B) eingestuft (IARC, 2010).

### *Eliminierung*

Im Maus-Modell erfolgt die Ausscheidung von MC-LR in unveränderter Form oder als Glutathion-Konjugat (Kondo *et al.*, 1996; Pflugmacher *et al.*, 1998). Zudem deuten aktuelle Untersuchungen darauf hin, dass der Mensch im Vergleich zu anderen Säugern deutlich sensitiver auf Microcystine reagiert, da MC-LR und MC-RR eine höhere

Affinität zu humanem Serumalbumin als zu Schweine- oder Rinderalbumin besitzen (Zhang *et al.*, 2013). Dies führt dazu, dass sich deren Halbwertszeit im Blut deutlich erhöht (Pollaro und Heinis, 2010; Chen *et al.*, 2018).

### 1.3.3. Typ-A-Trichothecen T-2-Toxin und Typ-D-Trichothecene

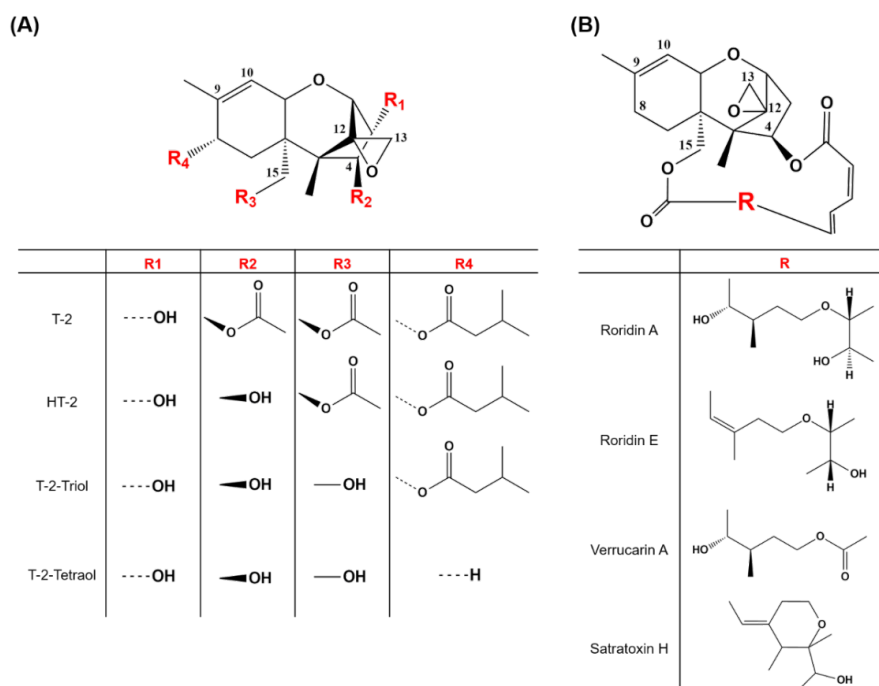
#### Vorkommen

Das Typ-A-Trichothecen T-2 wird von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* und *Trichothecium* produziert (Freeman und Morrison, 1949; Brian *et al.*, 1961). Typ-D-Trichothecene kommen bei *Myrothecium* und *Stachybotrys* sowie bei Pflanzen der Gattung *Baccharis* vor (Härrä *et al.*, 1962; Eppley und Bailey, 1973; Busam und Habermehl, 1982).

#### Chemische Struktur und Toxizität

Bei den Trichothecenen (250-550 Da) handelt es sich um Sesquiterpene mit einem zyklischen 12,13-Epoxytrichothec-9-en-Grundgerüst (Schütte, 2000), die in vier Gruppen (Typ-A bis -D) eingeteilt werden (Ueno, 1980).

Das Typ-A-Trichothecen T-2 sowie dessen Metabolite HT-2, T-2-Triol und T-2-Tetraol unterscheiden sich durch Art und Anzahl der Veresterungen (Essigsäure- und Isovaleriansäureester) sowie durch die Anzahl der Hydroxylgruppen an den Positionen R1 bis R4 voneinander (**Abbildung 3A**).



**Abbildung 3: Struktur der (A) Typ-A- und (B) Typ-D-Trichothecene.**

Dargestellt sind das Grundgerüst der (A) Typ-A-Trichothecene und (B) Typ-D-Trichothecene sowie die Struktur der Substituenten (R1-R4; R) für die jeweils wichtigsten Vertreter (Haschek und Voss, 2013).

Typ-D-Trichothecene sind durch einen zusätzlichen makrozyklischen Ring (Makrolid) zwischen C4 und C15 gekennzeichnet (Grove, 1993) (**Abbildung 3B**). Innerhalb der Typ-D-Trichothecene werden die Kongenere in die Gruppe der Roridine, Verrucarine und Satratoxine eingeteilt, die ihrerseits unterschiedlich komplexe Makrolide aufweisen. Eine zusätzliche Etherbindung kennzeichnet Roridin A und E (RoA, RoE), wohingegen Verrucarin A (VerA) eine Esterbindung im Makrolid besitzt. Satratoxin H (SatH) enthält hingegen ein weiteres Tetrahydropyran.

Maßgebend für die Toxizität des T-2 und der Typ-D-Trichothecene ist das 12,13-Epoxid (Swanson *et al.*, 1987). Neben der C9-C10-Doppelbindung wird die Toxizität der Trichothecene vor allem durch die verschiedenen Substituenten am Trichothecan-Grundgerüst bestimmt (Bennett und Klich, 2003; Wu *et al.*, 2013). Die toxische Potenz des T-2 und seiner Metabolite korreliert mit der Anzahl an Estergruppen im Molekül: T-2 (3 Ester)  $\geq$  HT-2 (2 Ester)  $>$  T-2-Triol (1 Ester)  $>$  T-2-Tetraol (0 Ester) (Madhyastha *et al.*, 1994).

Die orale LD<sub>50</sub> (Maus, i. p.) ist für T-2 und HT-2 ähnlich und liegt bei ca. 5-10 mg/kg Körpergewicht (Ueno, 1983). Eine inhalative Aufnahme ist deutlich toxischer (LD<sub>50</sub> (Maus, Aerosol) = 0,16 mg/kg) (Creasia und Lambert, 1989). Im Vergleich zu T-2 sind Typ-D-Trichothecene weitaus potenter (Ueno, 1983; Yoshizawa *et al.*, 1986). So ist die LD<sub>50</sub> (Maus, i. p.) von RoA zehnfach niedriger als die von T-2 und liegt bei 0,5 mg/kg Körpergewicht (Ueno, 1983).

### *Wirkmechanismus und Symptomatik*

Auf molekularer Ebene sind die toxischen Effekte der Trichothecene vor allem auf die Inhibierung der Proteinbiosynthese aufgrund der hohen Affinität zur ribosomalen 60S-Untereinheit zurückzuführen (Cundliffe und Davies, 1977). Durch Öffnung des 12,13-Epoxids bindet das Toxin kovalent an das Ribosom, so dass die mRNA-Bindestelle nicht mehr frei zugänglich ist (Cundliffe *et al.*, 1974). Je nachdem welches Trichothecen bindet, wird die Proteinbiosynthese in der Initiations-, Elongations- oder Terminationsphase inhibiert (Feinberg und McLaughlin, 1989).

Eine Trichothecen-Intoxikation ist durch unspezifische Krankheitssymptome, wie z. B. Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel und Übelkeit gekennzeichnet (Creppy, 2002). Je nach Exposition können aber auch Haut- und Schleimhautnekrosen sowie Lungenblutungen auftreten.

### *Metabolismus*

Wie in verschiedenen Tier- und Zellkulturmodellen gezeigt werden konnte, wird T-2 schnell durch Hydrolyse, Hydroxylierung und Deepoxidierung metabolisiert (Dohnal *et al.*, 2008). Als zentraler Schritt der T-2-Biotransformation gilt die Carboxylesterase-vermittelte Hydrolyse des Essigsäureesters an Position R2, was zur Bildung von HT-2 führt (Dohnal *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). Erst die weitere HT-2-Hydrolyse zu T-2-Triol und T-2-Tetraol vermindert die toxische Wirkung. Neben den Hauptmetaboliten HT-2, T-2-Triol und T-2-Tetraol treten auch deren deepoxidierte und hydroxylierte Formen auf. Die T-2-Metabolite werden meist an Glucuronsäure gebunden und ausgeschieden, wobei die Eliminierungsrouten spezialisiert über Urin und/oder Fäzes verläuft (Robison *et al.*, 1979; Corley *et al.*, 1985). *In vivo* Daten zum Metabolismus und zur Exkretion makrozyklischer Trichothecene sind bisher kaum erhoben. Für Satratoxin G (SatG) wurde im Mausmodell gezeigt, dass sich bei intranasaler Verabreichung ein Großteil des Toxins in den Nasenmuscheln anreichert und dort eine Apoptose der olfaktorischen Sinneszellen induziert (Amuzie *et al.*, 2010). Nur ein geringer Teil des verabreichten SatG konnte in anderen Bereichen des respiratorischen oder neuronalen Gewebes (Lunge, Niere, Milz, Herz, Leber, Thymus, Gehirn) nachgewiesen werden. Ebenso wurde auch nur ein sehr kleiner Anteil der gesamten SatG-Dosis im Urin und Fäzes wiedergefunden. Die Autoren vermuteten aber, dass SatG metabolisiert wurde, die Metabolite allerdings nicht im eingesetzten EIA kreuzreagierten.

#### **1.3.4. Aflatoxine**

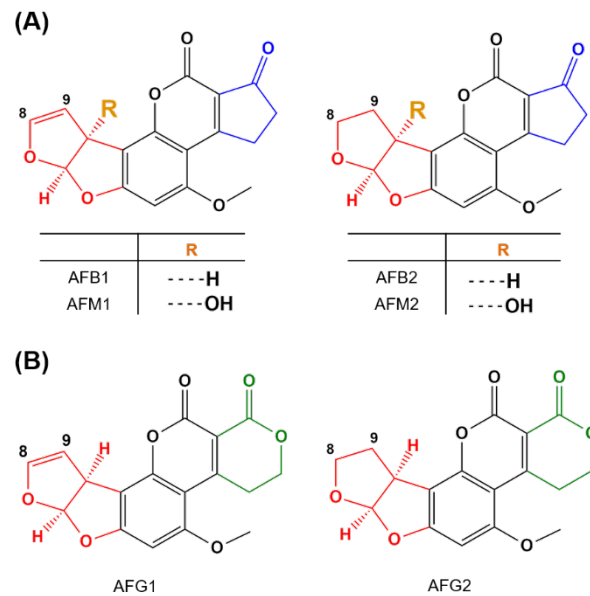
##### *Vorkommen*

Die Haupt-Aflatoxinproduzenten sind Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* (Hesseltine *et al.*, 1966; Köhler *et al.*, 1975; Kurtzman *et al.*, 1987).

##### *Chemische Struktur und Toxizität*

Aflatoxine (312-330 Da) sind heterozyklische Verbindungen, die anhand ihrer fluoreszierenden Eigenschaften unter UV-Licht in die Gruppe der B (Blau)- und G (Grün)-Aflatoxine eingeteilt werden (Asao *et al.*, 1963; Cheung und Sim, 1964). Chemisch betrachtet sind es Methoxycoumarin-Derivate, die mit einem Furofuranring und mit einem Cyclopentanon (B-Gruppe) oder 5-Valerolacton (G-Gruppe) anelliert sind (**Abbildung 4**).





**Abbildung 4: Struktur der (A) B-Aflatoxine und (B) G-Aflatoxine.**

Dargestellt ist die Einteilung der wichtigsten Aflatoxine anhand struktureller Gemeinsamkeiten (Schwarz: Methoxycoumarin; Rot: Furofuranringsystem) und Unterschiede (Blau: Cyclopentanon; Grün: Valerolacton).

Unter den 20 bekannten Aflatoxinen (Kumar *et al.*, 2017) sind AFB1, AFB2, AFG1 und AFG2 die Hauptvertreter (Sweeney und Dobson, 1998). Die Toxine AFM1 und AFM2 stellen Metabolite der B-Aflatoxine dar (Holzapfel *et al.*, 1966), die durch Hydroxylierung des Furofuranrings entstehen (Pong und Wogan, 1971).

Aflatoxine lassen sich anhand ihrer C8-C9-Bindung am terminalen Furan in Dihydrofurofurane (AFB1, AFM1, AFG1) und Tetrahydrofurofurane (AFB2, AFM2, AFG2) einteilen. AFB1 ist das toxischste Aflatoxin. Die orale LD<sub>50</sub> für AFB1 liegt speziesabhängig zwischen 0,03-18 mg/kg Körpergewicht (Dharumadurai *et al.*, 2011). Ausgehend von AFB1 wird die Toxizität der übrigen Aflatoxine in absteigender Reihenfolge wie folgt beschrieben:

AFB1 > AFM1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 = AFM2 (Asao *et al.*, 1965; Legator, 1966; Sullman *et al.*, 1970; Frank, 1974). Grund für die höhere toxische Potenz der Dihydrofurofurane AFB1, AFM1 und AFG1 ist die C8-C9-Doppelbindung im terminalen Furan, die im Zuge der Aflatoxin-Metabolisierung einer Epoxidierung unterliegt und zur Bildung der eigentlichen reaktiven Spezies, dem AFB1-8,9-Epoxid, führt (Essigmann *et al.*, 1977; Baertschi *et al.*, 1989). Innerhalb der Dihydrofurofurane bestimmt die Art des kondensierten Rings die Toxizität, wobei die Substitution des Cyclopentanons mit 5-Valerolacton deren toxische Potenz verringert (Wogan *et al.*, 1971).

*Wirkung, Symptome und Metabolismus*

Die Aflatoxine AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> und AFG<sub>2</sub> sind Humankarzinogene der Gruppe 1 (IARC, 2002). AFM<sub>1</sub> wird hingegen in die Gruppe 2B als „potenziell humankarzinogen“ eingestuft. Eine akute Aflatoxikose geht mit einer direkten Schädigung der Leber einher (Etzel, 2002), eine chronische Aflatoxikose kann zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms führen (Williams *et al.*, 2004; Wu und Santella, 2012).

Nach oraler Aufnahme wird das Toxin in der Leber nahezu vollständig metabolisiert (Dohnal *et al.*, 2014; Rushing und Selim, 2019). Mikrosomale Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysieren die Umwandlung des AFB<sub>1</sub> zum toxischen AFB<sub>1</sub>-8,9-Epoxid (Guengerich *et al.*, 1996). Das elektrophile Epoxid bindet in der DNA kovalent an Position N<sup>7</sup> der Nucleobase Guanin, was zur Bildung eines AFB<sub>1</sub>-DNA-Addukts (AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanin) führt (Essigmann *et al.*, 1977) und Mutationen auslösen kann (Bailey *et al.*, 1996). Aflatoxine können außerdem Addukte mit RNA oder Proteinen bilden und die Proteinbiosynthese hemmen (Sabbioni, 1990; Guengerich *et al.*, 2002). Des Weiteren findet in der Leber die Umwandlung des AFB<sub>1</sub> zu weniger toxischen Metaboliten statt. So entstehen nach AFB<sub>1</sub>-Hydroxylierung AFM<sub>1</sub> und Aflatoxin Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>) als Hauptmetabolite (Dharumadurai *et al.*, 2011). AFB<sub>1</sub> kann auch zu Aflatoxin P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>) demethyliert (Dalezios *et al.*, 1971) oder zu Aflatoxicol reduziert werden (Schoenhard *et al.*, 1976). Obwohl all diese Metabolite die reaktive C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-Doppelbindung aufweisen, ist das Ausmaß der Epoxidierung im Vergleich zu AFB<sub>1</sub> deutlich geringer (Eaton *et al.*, 1988).

Ein Großteil der Detoxifikation des AFB<sub>1</sub>-8,9-Epoxids und der hydroxylierten Metabolite erfolgt unter Bildung von Glutathion-Konjugaten (McLean und Dutton, 1995), die beim Menschen in Form von AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> und AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanin über Urin und Fäzes ausgeschieden werden (Groopman *et al.*, 1992; Mykkänen *et al.*, 2005).

#### **1.4. Nachweisbarkeit in Blut und Urin**

Im Allgemeinen kann eine Exposition bzw. Intoxikation des Menschen mit Toxinen durch deren Nachweis in Körperflüssigkeiten, wie Blut und Urin, festgestellt werden (Vidal *et al.*, 2018; Arce-López *et al.*, 2020). Die aufgenommenen Toxine werden vorrangig über den Urin in unveränderter Form oder als Metabolit ausgeschieden und reflektieren eine akute oder kürzlich stattgefundenene Exposition (Turner *et al.*, 2012; Knaack *et al.*, 2016). Eine Blut-Analyse gibt zudem Hinweise über eine chronische Exposition, da einige Toxine im Blut als Albumin-Addukt zirkulieren, was deren Halbwertszeit auf bis zu 20 Tage erhöhen kann (Ali *et al.*, 2018).

Zur Bestätigung einer Exposition gegenüber PSP-Toxinen werden Blut- und Urinproben betroffener Personen vorrangig auf Anwesenheit von STX und NEO getestet (Gessner *et al.*, 1997b; Llewellyn *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004). Dabei sind oft große Mengen der Toxine im Urin nachweisbar. So konnten bei Patienten während einer akuten PSP-Erkrankung 15-120 ng/mL STX im Urin detektiert werden (Gessner *et al.*, 1997b; Coleman *et al.*, 2018). Die STX-Konzentration im Serum lagen hingegen bei 0,8-14 ng/mL. In einer Fall-Studie von Coleman *et al.* (2018) wurden auch große Mengen an Gonyautoxinen im Urin eines erkrankten Patienten gefunden. Hierbei lagen die nachweisbaren Konzentrationen von GTX-1 bis GTX-4 (122-366 ng/mL) deutlich über der von STX und NEO (15-16 ng/mL).

Im Gegensatz dazu werden bei einem Expositionsverdacht gegenüber Microcystinen vorrangig Blutproben auf freies oder Protein-gebundenes Microcystin getestet (Greer *et al.*, 2018). Beispielsweise kam es in einer brasilianischen Klinik bei 116 von 131 Patienten nach einer Dialysebehandlung zu einer akuten Microcystin-Intoxikation, die für 76 Patienten tödlich verlief (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2006). Die Ursache war eine Kontamination des Dialysewassers aufgrund einer Algenblüte im Trinkwasserreservoir. Im Blut der Betroffenen fanden sich zwischen 2,2-133 ng/mL Microcystin. Neben MC-LR waren MC-YR und MC-AR nachweisbar (Pouria *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002). In zwei anderen Fallstudien wurde nach einer chronischen Microcystin-Exposition verursacht durch belastetes Trinkwasser MC-LR-Konzentrationen von 0,4-1,3 ng/mL im Blut gefunden (Chen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011).

Bei einer Exposition gegenüber AFB1 gilt das AFB1-Albumin- bzw. AFB1-Lysin-Addukt als valider Biomarker im Blut (Wild *et al.*, 1996; Wild und Turner, 2001). Dabei bindet ca. 1,4-2,3% des aufgenommenen AFB1 an Albumin (Gan *et al.*, 1988). In epidemiologischen Studien lag der AFB1-Albumin-Gehalt im Blut im zweistelligen pg/mg-Bereich (Gan *et al.*, 1988; Wild *et al.*, 1992; Scussel *et al.*, 2006), während dieser Wert bei einer akuten Toxikose 1000-fach höher liegen kann (Kamala *et al.*, 2018). Zum Nachweis einer kürzlich stattgefundenen Exposition ist der Nachweis von AFM1, AFB1-N<sup>7</sup>-Guanin und AFQ1 im Urin sinnvoll (Mykkänen *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2012), wobei sich die Untersuchungen meist auf den Nachweis von AFM1 beschränken (Jager *et al.*, 2011). In der Regel werden ca. 1,2-2,3% des aufgenommenen AFB1 als AFM1 ausgeschieden (Zhu *et al.*, 1987). In verschiedenen Biomonitoring-Studien lagen die nachweisbaren AFM1-Konzentrationen bei zufällig ausgewählten Personengruppen im pg/mL- bis unteren ng/ml-Bereich (Zhu *et al.*, 1987; Qian *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2010; Abia *et al.*, 2013; Ezekiel *et al.*,

2014). Die niedrigste AFM1-Konzentration lag bei 5,96 pg/mL (Romero *et al.*, 2010), die höchste bei 5,2 ng/mL (Qian *et al.*, 1994).

Zur Feststellung einer Exposition gegenüber makrozyklischen Trichothecenen werden Blut- als auch Urinproben der Betroffenen getestet (Brasel *et al.*, 2004; Hooper *et al.*, 2009). Die gemessenen Konzentrationen lagen dabei im unteren ng/mL-Bereich. Valide Expositions-Biomarker für Typ-D-Trichothecene sind bisher nicht beschrieben. Ein putativer Biomarker wurde von Yike *et al.* (2006) postuliert, indem die Autoren Satratoxin-Albumin-Addukte im Blut *Stachybotrys*-exponierter Personen nachwiesen. Ebenso ist bisher kein valider Biomarker zur Feststellung einer Exposition gegenüber T-2 bekannt. HT-2 gilt als T-2-Hauptmetabolit (Wu *et al.*, 2014) und ist oftmals Bestandteil von Biomonitoring-Studien, die sich mit einer Mykotoxin-Exposition verschiedener Bevölkerungsgruppen beschäftigen (Rubert *et al.*, 2011; Ediage *et al.*, 2012; Ediage *et al.*, 2013; Heyndrickx *et al.*, 2015). Nur selten waren hierbei T-2 bzw. HT-2 nachweisbar, die gemessenen Konzentrationen lagen im einstelligen ng/mL-Bereich (Gerding *et al.*, 2014; Rodriguez-Carrasco *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2019).

In den vorgestellten Studien wurden Blut- und Urinproben fast ausschließlich mittels Massenspektrometrie (MS)-basierten Multi-Toxin-Methoden analysiert. Dies bietet vor allem in Biomonitoring-Studien den Vorteil, dass die jeweiligen Toxingruppen subtypisiert und die entsprechenden Kongenere eindeutig identifiziert werden können.

## **2. Analytik von Cyanotoxinen und Mykotoxinen**

Da Toxine auch in Abwesenheit ihres produzierenden Organismus toxisch sind, werden für deren Nachweis physikalisch-chemische Verfahren und/oder immunochemische Methoden eingesetzt (Krska *et al.*, 2008; Gerssen *et al.*, 2010).

### **2.1. Laborbasierte Verfahren**

#### **2.1.1. Physikalisch-chemische Methoden**

Physikalisch-chemische Verfahren, bei denen leistungsstarke chromatographische Trennmethode (HPLC, *high performance liquid chromatography*) entweder an einen MS-, UV- oder Fluoreszenz-Detektor gekoppelt werden, dienen im Bereich der Lebensmittel- oder klinischen Analytik der Identifizierung, Bestätigung und/oder Quantifizierung (Dell'Aversano *et al.*, 2005; Meister, 2008; Turner und Hatfield, 2012; Nakagawa *et al.*, 2018), wobei meist ein positives Ergebnis eines immunochemischen Screenings vorausgeht.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Nachweisverfahren ist neben der hohen Sensitivität und dem hohen Probendurchsatz die hohe Multiplex-Kapazität, die es ermöglicht, simultan verschiedene Toxine in einer Mischung zu analysieren und eindeutig zu identifizieren (Turner und Hatfield, 2012; Yang *et al.*, 2017). Dieser Vorteil ist dennoch zugleich ein Nachteil, da sich die Multi-Toxin-Bestimmung auf Toxine mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften beschränkt. Eine Methode für die gleichzeitige Analyse der hier beschriebenen Toxingruppen, die sich ihrerseits physikalisch-chemisch deutlich voneinander unterscheiden, ist bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Zudem ist eine physikalisch-chemische Detektion anfällig gegenüber Störsubstanzen aus der Probenmatrix (Choi *et al.*, 2001). Somit wird eine zuverlässige und sensitive Analytik der Toxine meist nur durch eine zeit-, kosten- sowie laborintensive Probenvorbereitung erreicht. Hierzu werden die Toxine in der Regel an einer Festphase (SPE, *solid phase extraction*) von den Matrixbestandteilen getrennt (Harju *et al.*, 2015). Dieses Verfahren ermöglichte z. B. den Nachweis von 5 nM STX in Muschelfleisch (Dell'Aversano *et al.*, 2005). Baliu-Rodriguez *et al.* (2020) entwickelten eine SPE-Methode für die HPLC-MS-basierte Detektion von Microcystinen in Lebergewebe (Nachweisgrenze: 0,25 ng/g). Allerdings ist die Selektivität der Festphase limitiert, wenn Toxin und Matrixkomponenten ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften haben. Im Vergleich dazu ermöglicht eine Immunoaffinitätsextraktion (IAE, *immunoaffinity extraction*) eine äußerst selektive Extraktion und Anreicherung des Toxins aus der Probe (Aranda-Rodriguez *et al.*, 2003; Meister, 2008; Iha *et al.*, 2017), ist jedoch auf einzelne Toxine beschränkt (Malachová *et al.*, 2018). Mit einem verwandten Verfahren, der immunomagnetischen Separation, bei dem Antikörper an magnetische Partikel gekoppelt sind, konnten so bis zu 1 ng/mL STX (Bragg *et al.*, 2018) bzw. 0,01 ng/mL MC-LR (Wharton, 2018) im Urin nachgewiesen werden.

### 2.1.2. Immunbasierte Methoden

Im Vergleich zu physikalisch-chemischen Methoden zeichnen sich immunbasierte Verfahren durch niedrigere Kosten und eine einfachere Handhabung aus. Durch die hohe Spezifität der Methode kann ein Nachweis in komplexen Matrices meist ohne umfangreiche Probenaufarbeitungsprozeduren durchgeführt werden.

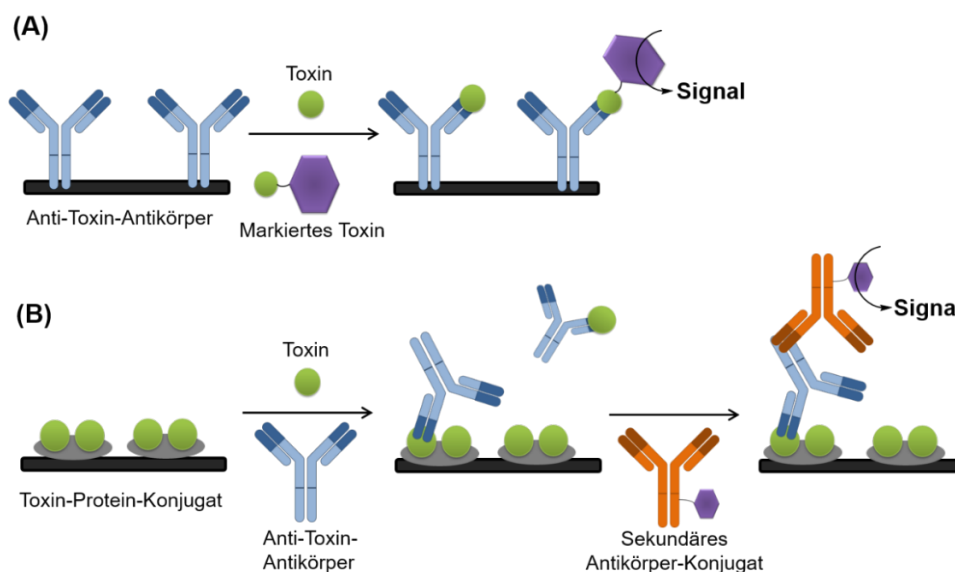
Alle immunochemischen Methoden folgen dem Grundprinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der mono-, polyklonale oder rekombinante Antikörper das Toxin binden (Engvall und Perlmann, 1971; Van Weemen und Schuur, 1971; Voller *et al.*, 1975). Die Detektion erfolgt durch Markierung des Toxins oder Antikörpers mit Fluorophoren (Farbstoffe, Lanthanoide, Proteine), Nanopartikeln (Quantenpunkten (*quantum dots*),

Edelmetall-, Kohlenstoff-, magnetische Partikel) oder Enzymen (Alkalische Phosphatase, Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*),  $\beta$ -D-Galaktosidase (bGAL)) (Butler, 2000; Matabaro *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2020).

Da niedermolekulare Toxine aus immunologischer Sicht in der Regel Haptene sind (Landsteiner und Jacobs, 1936), die nur eine antigene Determinante (Epitop) besitzen, erfolgt deren immunbasierter Nachweis mehrheitlich im kompetitiven Format. Hierbei wird zwischen einem direkten und indirekten Testformat unterschieden (**Abbildung 5**).

Beim direkt kompetitiven Immunoassay wird das Marker-gekoppelte Toxin direkt als Detektionsmolekül (Tracer) eingesetzt (**Abbildung 5A**). Dabei konkurriert freies Toxin in der Probe mit einer definierten Menge an Tracer um eine limitierte Anzahl freier Bindungsstellen des an eine Festphase immobilisierten toxinspezifischen Fangantikörpers (Ak1).

Das indirekt kompetitive Format beinhaltet einen zweiten Reaktionsschritt, bei dem tierartsspezifische Sekundärantikörper-Konjugate eingesetzt werden (**Abbildung 5B**). Zunächst konkurrieren freies Toxin und immobilisiertes Toxin-Protein-Konjugat (Fangmolekül) um die Bindungsstellen des zur Probe zugegebenen toxinspezifischen Detektionsantikörpers (Ak1). Nach diesem kompetitiven Inkubationsschritt wird der an der Festphase gebundene Ak1 mit einem Sekundärantikörper nachgewiesen. Eine Variation dieses Formates, mit der oft eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden kann, beruht auf dem Einsatz biotinylierter Ak1, die dann im nächsten Schritt mit Streptavidin-Konjugaten nachgewiesen werden (Guesdon *et al.*, 1979).



**Abbildung 5: Prinzip kompetitiver Immunoassays für niedermolekulare Toxine.**

Dargestellt ist das Prinzip eines (A) direkt kompetitiven Assays und (B) indirekt kompetitiven Assays.

In beiden Formaten sinkt mit steigender Toxinkonzentration die Intensität des Signals, da weniger Tracer an das an der Festphase immobilisierte Fangmolekül binden kann. Das Messsignal ist somit indirekt proportional zur Toxinkonzentration.

### *Enzymimmunoassays*

Das bis heute am weitesten verbreitete und am häufigsten eingesetzte Immunoassay-Verfahren ist der EIA. Hierzu wurden in der Vergangenheit zahlreiche EIAs für den Nachweis von Cyano- und Mykotoxinen beschrieben (Pomeranz, 1994; Usleber *et al.*, 2001; Weller, 2013; Nolan *et al.*, 2019), wobei sich vorrangig kompetitive EIAs im Mikrotiterplatten-Format für das laborbasierte Screening bewährt haben (Chu, 1996; Nolan *et al.*, 2019). Typische Nachweisgrenzen solcher EIAs für STX, MC-LR, Aflatoxine bzw. T-2 liegen bei 1-20 pg/mL (Hack *et al.*, 1988; Usleber *et al.*, 1991; Dietrich *et al.*, 1995; Usleber *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1997). Aufgrund der einfachen Handhabung und der relativ geringen Kosten dieser EIA-Systeme werden diese auch vielfach als kommerzielle Testkits angeboten (Rivasseau *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2015). So bietet die Firma Abraxis EIA-Testkits zum Nachweis von STX in Muscheln und Microcystinen in Wasser an (Abraxis, o. D.). Dabei können laut Hersteller bis zu 15 pg/mL STX und 0,1 ng/mL Microcystin detektiert werden. Auch im Bereich der Mykotoxin-Analytik von Lebensmitteln werden entsprechende Verfahren angeboten. Beispielsweise sind die von der Firma R-Biopharm vertriebenen EIA-Systeme in der Lage, Aflatoxine in einem Bereich von 1-4 µg/kg bzw. T-2/HT-2 in Konzentrationen von 12-33 µg/kg nachzuweisen (R-Biopharm, o. D.). Im Gegensatz dazu wurden bisher lediglich ein paar wenige kommerzielle EIAs für die Anwendung bei klinischem Probenmaterial getestet. Wharton *et al.* (2017) demonstrierten, dass mit dem STX-EIA-Kit der Firma Abraxis eine Quantifizierung von STX in menschlichem Vollblut in einem Bereich zwischen 0,02-0,8 ng/mL möglich ist. Der PSP-Toxin-EIA von Beacon Analytical Systems wurde für ein qualitatives Screening von Urinproben validiert (Eangoor *et al.*, 2017). Heussner *et al.* (2014) zeigten, dass das Microcystin-Abraxis-Testkit für menschliches Blutserum anwendbar ist.

Insgesamt finden beim klassischen EIA die Reaktionen annähernd im Gleichgewicht statt, so dass diese in der Regel sehr sensitiv sind, aber eine Analysezeit von einer bis mehrere Stunden benötigen. Hierbei konnte in den letzten Jahren insbesondere durch Verwendung von Nanopartikeln eine Verbesserung der Immunoassays erzielt werden (Gao *et al.*, 2020). So entwickelten Petrakova *et al.* (2015b) einen Immunoassay unter Verwendung eines magnetischen Nanopartikel-Antikörper-Konjugats als Fangmolekül sowie AFB1-HRP als Detektor. Im Vergleich zum klassisch kompetitiven EIA wurde

eine zehnfach niedrigere Nachweisgrenze (2 pg/mL) sowie eine deutliche Verkürzung der Assayzeit von 120 Min auf 50 Min erreicht. Li *et al.* (2018) demonstrierten, dass durch Verwendung Gold-Nanopartikel gekoppelter Antikörper-HRP-Konjugate ein sensitiver Nachweis der Mykotoxine Fumonisin B1, B2 und B3 möglich ist.

## 2.2. Vor-Ort-basierte Verfahren

Im Hinblick auf die hohe gesundheitliche Relevanz einer intentionalen Toxin-Freisetzung und des damit einhergehenden Vergiftungsgeschehens ist es grundsätzlich wünschenswert, schnelle und sensitive Nachweissysteme für den Vor-Ort-Einsatz zur Verfügung zu haben.

Bei Nachweissystemen, die für den Vor-Ort-Einsatz gedacht sind, muss zunächst zwischen solchen Systemen unterschieden werden, die entweder als Standard-Gerät in mobilen Laboren eingesetzt werden oder explizit als tragbares Gerät konzipiert wurden (Stern *et al.*, 2016). Auch wenn bei tragbaren Testsystemen meist eine technische Einfachheit und Robustheit sowie eine schnelle Durchführung im Vordergrund stehen, müssen solche Tests auch eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzen (Gubala *et al.*, 2012; Luppá *et al.*, 2016). Für den Einsatz im Fall einer biologischen Gefahrenlage muss das Testsystem außerdem in der Lage sein, in kürzester Zeit mehrere Analyten gleichzeitig nachzuweisen (Spindel und Sapsford, 2014; Dincer *et al.*, 2017).

### 2.2.1. Immunchromatographische Streifentests

Das einfachste und vielfach kommerziell erhältliche Vor-Ort-Testsystem ist der LFA (Anfossi *et al.*, 2013). Beim klassisch kompetitiven LFA dienen Ak1, die an kolloidales Gold gekoppelt sind, als Nachweisreagenz. Dabei befindet sich auf dem Teststreifen im Bereich der Testzone das immobilisierte Protein-Toxin-Konjugat, wohingegen in der Kontrollzone ein Anti-Spezies-Antikörper immobilisiert wurde. In der Testzone konkurrieren das Toxin in der Probe und das auf der Membran immobilisierte Toxin-Konjugat um die Bindung an den Gold-markierten Ak1. Infolgedessen erscheint bei negativen Proben eine rote Test- und Kontrolllinie, bei positiven Proben bleibt die Färbung der Testlinie aus. Nach ca. 5-20 Min kann das Signal visuell oder Instrumentengestützt bestimmt werden.

Typische Nachweisgrenzen von Singleplex-LFAs für Cyano- und Mykotoxine liegen bei 2-20 µg/kg (Xiulan *et al.*, 2006; Tippkötter *et al.*, 2009; Jawaid *et al.*, 2015; Petrakova *et al.*, 2015a). Diese LFAs sind meist als Einzeltoxin-Nachweis konzipiert und ausschließlich für Lebensmittelproben validiert. Lediglich für STX wurde ein



kommerzieller LFA für den Bereich der Erkennung einer biologischen Gefahrenlage getestet (Komano *et al.*, 2011).

Der größte Nachteil dieses Testformats liegt in der oftmals geringen Sensitivität, da keine Signalamplifizierung stattfindet (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Technische Modifizierungen, die nicht nur eine verbesserte Empfindlichkeit sondern auch einen Multitoxin-Nachweis erlauben, wurden z. B. durch Markierung der Antikörper mit Quantenpunkten, fluoreszierenden oder farbigen Nanopartikeln erreicht (Anfossi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019). Auch wenn die Mehrheit dieser Entwicklungen die Sensitivität der Tests verbesserte, erhöhte sich gleichzeitig die Komplexität des Schnelltests, d. h. die Analysezeit verlängerte sich (Xu *et al.*, 2018), der Assayablauf wurde umfangreicher (Liu *et al.*, 2019) oder ein Auslesegerät war notwendig (Li *et al.*, 2019). Dies sind sicherlich auch die Gründe dafür, weshalb keine dieser Techniken bisher bei einem kommerziellen LFA umgesetzt wurde.

### 2.2.2. Biosensoren

Die Biosensorik gewinnt in der Lebensmittel- und Umweltüberwachung sowie im klinischen Bereich und der Biosicherheitsforschung zunehmend an Bedeutung, da Biosensoren häufig eine erhöhte Empfindlichkeit und Spezifität der Messung bei gleichzeitiger Reduktion der Messzeiten sowie der benötigten Proben- und Reagenzienmenge bewirken, wodurch die Gesamtkosten für eine Analyse maßgeblich gesenkt werden können (Campàs *et al.*, 2012; Kirsch *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014b; Justino *et al.*, 2017).

Nach Definition der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ist ein Biosensor eine analytische Apparatur, die die Identifizierung eines Analyten mit einem biologischen Erkennungselement (biochemischer Rezeptor) in Form eines elektronischen Signals ermöglicht (Cammann, 1977). Dabei ist das Erkennungselement an einen Signalwandler (*transducer*) gekoppelt, der die molekulare Wechselwirkung erfasst. So verwenden piezoelektrische Sensoren die Frequenz eines Schwingquarzes, der eine Masseänderung detektiert (Steinem und Janshoff, 2007). Optische Sensoren basieren auf Lumineszenz-, Wellenleiter- oder Oberflächenplasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*)-Spektroskopie (Ligler und Taitt, 2008), die wiederum in markierte und markierungsfreie Sensoren eingeteilt werden können. Ein wesentlicher Nachteil, insbesondere SPR-basierter Geräte, ist, dass sie aufgrund ihrer optischen Baugruppen nur schwer miniaturisierbar sind (Dill und Ghindilis, 2009; Joshi *et al.*, 2016). Elektrochemische Biosensoren zeichnen sich hingegen durch hohe Sensitivität, Spezifität sowie leichte Miniaturisierbarkeit aus (Vidal *et al.*, 2013; Campuzano *et al.*,

2017). So misst ein amperometrischer Biosensor den Stromfluss zwischen zwei Elektroden bei konstantem Potenzial, so dass die Bildung elektrochemisch-aktiver Produkte während einer Reaktion verfolgt werden kann (Thévenot *et al.*, 2001).

### *Immunosensoren*

Die für cyanobakterielle Toxine und Mykotoxine entwickelten Immunosensoren basieren mehrheitlich auf den Prinzipien eines kompetitiven Assays (McPartlin *et al.*, 2016; Matabaro *et al.*, 2017).

In **Tabelle 2** werden ausgewählte Immunosensoren für STX, MC-LR, Aflatoxine bzw. T-2 verglichen.

**Tabelle 2: Charakteristika von verschiedenen Biosensoren zum Nachweis von Cyano- bzw. Mykotoxinen.**

Toxin	Detektion	Matrix	LOD (ng/mL)	Referenz
STX	O/SPR	k.A.	0,5	Yakes <i>et al.</i> (2011)
MC-LR	EC/A	Wasser	0,03	Zhang <i>et al.</i> (2010)
AFM1	EC/A	Milch	0,025	Micheli <i>et al.</i> (2005)
AFB1	O/SPR	k.A.	0,19	Dunne <i>et al.</i> (2005)
T-2	EC/A	Fleisch	0,13	Wang <i>et al.</i> (2018)

Abkürzungen: EC = Elektrochemisch; A = Amperometrisch, O = Optisch; SPR = *surface plasmon resonance*; LOD = *limit of detection*; k.A. = Keine Angabe

Für den Nachweis von STX wurde z. B. ein optimierter, markierungsfreier SPR-Sensor unter Verwendung eines polyklonalen Ak1 entwickelt, der das Toxin in 5-20 Min in Konzentrationen von bis zu 0,5 ng/mL detektieren kann (Yakes *et al.*, 2011). Einen weiteren SPR-Biosensor etablierten Dunne *et al.* (2005) für AFB1. Die Autoren nutzten dafür rekombinant hergestellte Ak1-Fragmente und wiesen bis zu 0,19 ng/mL AFB1 nach. Eine sensitive Detektion von MC-LR erreichten Zhang *et al.* (2010) mit einem elektrochemischen Biosensor und Kohlenstoff-Nanoröhren. Dazu wurde auf dem Chip die Microcystin-funktionalisierten Nanoröhren immobilisiert und HRP-konjugierter Ak1 als Detektionsantikörper eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,003 ng/mL MC-LR (Assayzeit: 30 Min).

Insgesamt wird deutlich, dass die bisher entwickelten Biosensoren zwar sehr sensitiv sind, jedoch in der Mehrzahl für den Einzelnachweis der Toxine in verschiedenen Lebensmittel- oder Umweltproben konzipiert wurden.

### 2.2.2.1. Mikroarray-Technologie

Insbesondere im Bereich der Erkennung biologischer Gefahrenlagen sind Testsysteme notwendig, die nicht „nur“ das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit eines Toxins anzeigen, sondern gleichzeitig die Möglichkeit bieten auf das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit anderer bioterroristisch relevanter Toxine prüfen zu können. Hierbei bieten Biosensoren im Mikroarray-Format den Vorteil, dass Einzelnachweise leicht parallelisiert werden können.

Im Allgemeinen werden Mikroarrays auch als Biochips bezeichnet. Dabei muss nach Schena (2005) ein Biochip-basierter Assay vier Kriterien erfüllen, um als Mikroarray bezeichnet zu werden: geordnet, mikroskopisch klein, planar und spezifisch. Hierfür werden die Fangmoleküle in hoher Dichte in einem definierten geometrischen Raster (Zeilen und Spalten), auf einer definierten Position sowie einer geeigneten Oberfläche aufgebracht. Als typisch planare Oberflächen gelten Glas, Plastik und Silizium.

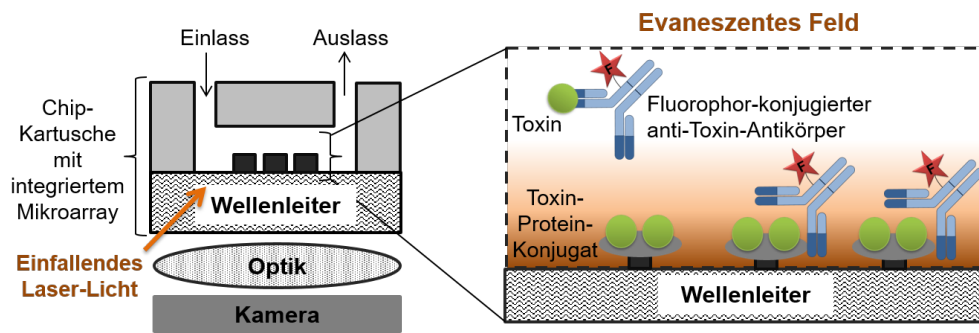
Für die Detektion des Messsignals haben sich ebenfalls optische oder elektrochemische Transduktionsprinzipien bewährt (Tomizaki *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.1.1. Optische Mikroarray-Systeme

Optische Mikroarray-Systeme nutzen mehrheitlich die Effekte der Fluoreszenz oder Chemilumineszenz, indem sie das emittierte Licht mit CCD-Kameras (*charged coupled device*) aufnehmen (Christensen und Herron, 2009).

Ein automatisiertes Chemilumineszenz-basiertes Detektionssystem für Mykotoxine (Oswald *et al.*, 2013) bzw. Cyanotoxine (Szkola *et al.*, 2013) stellt hierbei der *Munich Chip Reader 3rd generation* (MCR 3) dar. Der Toxin-Nachweis beruht auf einem indirekt kompetitiven EIA mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern. Dazu wurden auf Epoxy-PEG-aktivierten Glasträgern Toxin-Protein-Konjugate oder native Toxine kovalent immobilisiert. Mit diesem Testprinzip konnten Nachweisgrenzen von 0,4 ng/mL STX in Muschelfleisch, 0,9 µg/kg AFB1 und 39 µg/kg T-2 in Hafer innerhalb von 18 Min Analysezeit erreicht werden.

Ein Sensorsystem basierend auf der Verwendung von Toxin-Protein-Konjugaten als Fangmoleküle und Fluorophor-markierten Ak1 als Tracer, der die Verstärkung des Fluoreszenz-Signals in einem evaneszenten Feld mittels planarem Wellenleiter nutzt, wurde von Herron *et al.* (1993) entwickelt und von Lochhead *et al.* (2011) auf das Mikroarray-Format übertragen (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6: Konzept eines optischen Mikroarray-Sensorsystems basierend auf einem planaren Wellenleiter (Lochhead *et al.*, 2011).**

Dabei wird mit einem Laser Licht in den auf einer Glasoberfläche aufgebrachtene Wellenleiter eingekoppelt, wo es sich durch Totalreflektion an der Grenzfläche des optisch dichteren Wellenleiters zum optisch dünneren Umgebungsmedium (z. B. wässrige Probe) weiter ausbreitet. Das dabei entstehende evaneszente Feld regt die Fluoreszenz des gebundenen Tracers an, wobei die Wechselwirkung nur in direkter Umgebung der Wellenleiter-Oberfläche detektiert wird. Mit diesem Messprinzip gelang es, in realen Wasser- und Algenproben 12-50 pg/mL STX (Meneely *et al.*, 2013; McNamee *et al.*, 2014) bzw. 400 pg/mL MC-LR (Bickman *et al.*, 2018) in 10-15 Min nachzuweisen. Kommerziell erhältlich ist dieses Verfahren in Form der mobilen Detektionsplattform *MBio* (MBio Diagnostics Inc., Boulder, USA).

Die planare Wellenleiter-Technologie findet ebenso beim *NRL Array Biosensor* Anwendung (Golden *et al.*, 2005). Diese Detektionsplattform erlaubt den Nachweis von neun Analyten (Taitt *et al.*, 2002). Neben Sandwich-EIAs für Proteotoxine und Mikroorganismen wurden auch kompetitive Assays für die Mykotoxin-Detektion etabliert (Ligler und Taitt, 2008). So erfolgte z. B. der Nachweis von AFB1 mittels biotinyliertem AFB1 als Fangmolekül auf einem Neutravidin-funktionalisierten Wellenleiter, bei dem ein Fluorophor-markierter Ak1 als Tracer diente (Sapsford *et al.*, 2006). Nach einer Assayzeit von 30 Min lag die Nachweisgrenze bei 0,3 ng/mL AFB1 in Puffer.

### 2.2.2.1.2. Elektrochemische Mikroarray-Systeme

Elektrochemische Mikroarrays oder Mikroelektrodenarrays haben gegenüber anderen Nachweismethoden den Vorteil, dass sie nicht nur einfach zu miniaturisieren sind, sondern auch kostengünstig in großen Stückzahlen hergestellt werden können (Dill und Ghindilis, 2009). Zudem besitzen Mikroelektrodenarrays eine schnelle Ansprechzeit sowie ein erhöhtes Signal/Rausch-Verhältnis aufgrund ihrer kleinen Maße (Heinze, 1993). Darüber hinaus benötigen elektrochemische Detektionssysteme keine teuren optischen Bauteile oder komplexe Software zur Signalverarbeitung, da sie direkt ein

elektrisches Messsignal erzeugen, so dass sie leicht als tragbare Geräte konzipiert werden können.

Bisher wurde das elektrochemische Detektionsprinzip vorrangig für DNA-Mikroarrays im diagnostischen Bereich genutzt (Drummond *et al.*, 2003; Cagnin *et al.*, 2009). Insbesondere für die Detektion niedermolekularer Toxine sind derzeit nur wenige elektrochemische Antikörper-Mikroarrays beschrieben. Beispielsweise entwickelten Parker *et al.* (2009) einen Mikroarray bestehend aus 35 quadratischen Mikrogoldelektroden für den Nachweis von AFM1 in Milch. Das Testprinzip beruht auf einem direkt kompetitiven EIA, bei dem AFM1 in der Probe und AFM1-HRP als Tracer um die Bindung an den auf der Elektrode immobilisierten Ak1 konkurrieren. Das letztlich generierte amperometrische Messsignal beruht auf der HRP-vermittelten Oxidation von TMB in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Die Methode konnte direkt für die Analyse von entfetteten Milchproben eingesetzt werden, ohne dass eine umfangreiche Vorbereitung notwendig war. Die Nachweisgrenze wurde mit 8 pg/mL AFM1 angegeben. Die Assayzeit betrug ca. 120 Min.

Einen indirekt kompetitiven EIA implementierten Reverté *et al.* (2017) auf einem Mikroarray mit 8 Golddickschichtelektroden (SPGE, *screen printed gold electrode*) für das niedermolekulare Tetrodotoxin (TTX), ein Neurotoxin des Kugelfischs. Dabei wurde zunächst auf der SPGE-Oberfläche eine selbstorganisierte Monoschicht (SAM, *self assembled monolayer*) unter Verwendung eines Carboxylat-Dithiols erzeugt, auf der anschließend die Immobilisierung des nativen TTX als Fangmolekül erfolgte. Nach dem kompetitiven Reaktionsschritt wurde der gebundene Ak1 mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper und TMB als elektrochemisches Substrat nachgewiesen. Die Anwendbarkeit des Sensors, insbesondere in Hinblick auf eine zuverlässige Quantifizierung, wurde für verschiedene Kugelfisch-Spezies gezeigt. Bei einer Assayzeit von 100 Min lag die Nachweisgrenze bei 2,6 ng/mL TTX.

Einige wichtige Arbeiten im Bereich elektrochemischer Mikroelektrodenarrays erfolgten bereits in den 1990er-Jahren am Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie in Kooperation mit der Siemens AG sowie der Infineon Technologies AG (Hintsche *et al.*, 1994). Dort entwickelten Albers *et al.* (2003) einen Silizium-Biochip mit einer Interdigital-Array-Elektrodenstruktur. Diese Chip-Technologie diente in Kombination mit der kommerziell erhältlichen Mikroarray-Ausleseplattform pBDi (Bruker Optik GmbH) als Basis für die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Assays.

### Portable BioDetector integrated (pBDi)

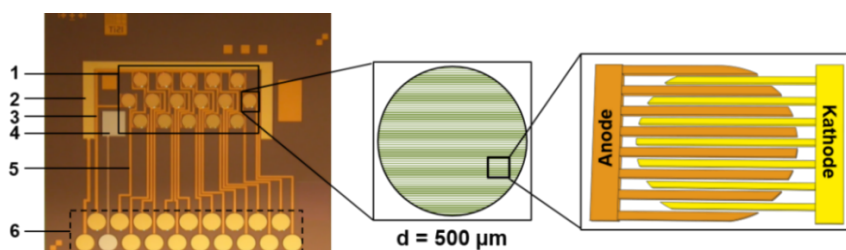
Das pBDi ist ein tragbares Sensor-basiertes Nachweissystem, bei dem ein Mikrocontroller-gesteuerter Mehrkanal-Potentiostat für die amperometrische Auslesung der Chips eingesetzt wird (**Abbildung 7**). Die Durchführung des Assays sowie deren Auswertung erfolgt automatisiert mit einer computergesteuerten Software (Pöhlmann und Elßner, 2017). Über eine integrierte Pumpen- und Ventileinheit werden die Pufferlösung, die Probe sowie die für die Detektion erforderlichen Reagenzien nacheinander in einem automatisierten Verfahren in der pBDi-Plattform auf dem Chip inkubiert.



**Abbildung 7: Mikroarray-basierte Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi.**

Dargestellt sind (1) Grundgerät pBDi (Produktnummer: 1847000, Bruker Optik GmbH), (2) Chip-Einlass, (3) Reagenzien- und (4) Proben-Halter, (5) Tablet-PC mit Steuerungssoftware „pBDi Control“ (Quelle: Bruker Optik GmbH).

Der Chip befindet sich dabei in einer Kartusche, das Flusszellenvolumen liegt bei ca. 10  $\mu\text{L}$ . Die verwendeten Biochips wurden von Albers *et al.* (2003) entwickelt und sind in **Abbildung 8** dargestellt.



**Abbildung 8: Aufbau des elektrischen Biochips und schematische Vergrößerung der Interdigital-Array-Goldelektrodenstruktur.**

(1) 16 Interdigital-Goldelektroden, (2) Gegenelektrode, (3) Kathode, (4) Referenzelektrode, (5) Leiterbahnen, (6) 19 Kontaktpads (Abbildung modifiziert nach Hintsche *et al.* (2005)).

Ein Chip ist 9 x 10 mm groß und besteht aus einem Siliziumträger, auf dem 16 Interdigital-Goldelektroden im Array-Format für die Immobilisierung der Fänger-moleküle, eine Gegen- und Referenzelektrode zum Ausgleich temperaturbedingter

Spannungsunterschiede sowie 19 Kontaktpads für den Anschluss an den Potentiostat aufgebracht sind (Elsholz *et al.*, 2006). An den 16 interdigitalen Elektrodenpositionen findet positionsspezifisch die enzymvermittelte, elektrochemische Reaktion statt.

Bislang wurden mit dem pBDi-System Nukleinsäuren, Mikroorganismen sowie hochmolekulare Toxine nachgewiesen (**Tabelle 3**). Ein pBDi-Biochip für die sensitive Detektion niedermolekularer Toxine wurde bislang nicht beschrieben.

**Tabelle 3: Übersicht über bisher etablierte pBDi-Biochips.**

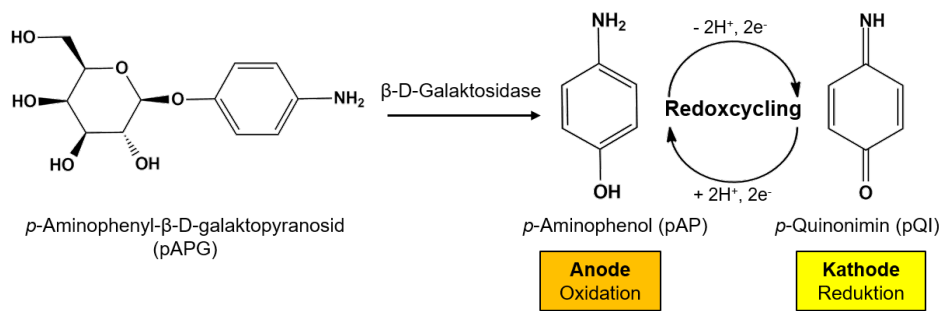
Gerätenamen entsprechender pBDi-Vorgängerversionen sind pTD, ePaTOX oder eMicroLISA.

Analyt	Fangmolekül	Detektionsmolekül	Referenz
Nukleinsäuren	Thiol-modifiziertes Oligodesoxy-nukleotid	Biotin-modifiziertes Oligodesoxy-nukleotid	Elsholz <i>et al.</i> (2006); Liu <i>et al.</i> (2007); Elsholz <i>et al.</i> (2009)
Antikörper	Antigen; mAk	pAk-Enzym; pAk-Biotin	Kraus <i>et al.</i> (2011); Quiel <i>et al.</i> (2012)
Proteine	pAk	mAk-Biotin	Quiel <i>et al.</i> (2010)
Proteotoxine	mAk	mAk-Biotin	Hintsche <i>et al.</i> (2005); Hansbauer (2016)
Pathogene Erreger	mAk	mAk-Biotin	Pöhlmann und Elßner (2017)

Abkürzungen: mAk = Monoklonaler Antikörper; pAk = Polyklonaler Antikörper

Zum Nachweis von Proteotoxinen oder pathogenen Erregern wurden Mikroarrays entwickelt, die den Prinzipien eines Sandwich-Immunoassays folgen. Dabei wird zunächst der Fangantikörper mit einem kontaktlosen Piezospotter auf die Interdigital-Goldelektroden aufgebracht. Bindet im nächsten Schritt der Zielanalyt an die auf dem Biochip immobilisierten Fangantikörper, wird dieser mit einem spezifischen biotinylierten Detektionsantikörper markiert und mit dem Streptavidin-markierten Reporterenzym bGAL nachgewiesen. Zudem demonstrierten Kraus *et al.* (2011), dass auch die direkte Markierung des Zielanalyten mit einem Antikörper-bGAL-Konjugat möglich ist.

Die Signalgenerierung beruht darauf, dass an jeder Interdigital-Elektrode durch enzymatische Umwandlung des elektrochemisch-inaktiven *p*-Aminophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosids (pAPG) das elektrochemisch-aktive *p*-Aminophenol (pAP) gebildet wird, das einen Redoxcycling-Prozess durchläuft (Niwa *et al.*, 1990; Paeschke *et al.*, 1996). Bei Anlegen eines Potentials wird pAP an der Anode zu *p*-Quinonimin (pQI) oxidiert, welches wiederum an der Kathode zu pAP reduziert wird (**Abbildung 9**).



**Abbildung 9: Prinzip der elektrochemischen Detektion mittels Redoxcycling.**

Solange das Potenzial anliegt, wiederholt sich die Redoxreaktion zwischen Anode und Kathode, so dass stetig Elektronen produziert werden, die amperometrisch detektierbar sind. Das enzymvermittelte Redoxcycling sorgt so für eine deutliche Amplifizierung des Messsignals (Yang, 2012). Des Weiteren ist der erzeugte Stromfluss bei gestoppter Fluidik (*stopped flow mode*) direkt proportional zur Menge des gebundenen Moleküls (Nebling *et al.*, 2004).

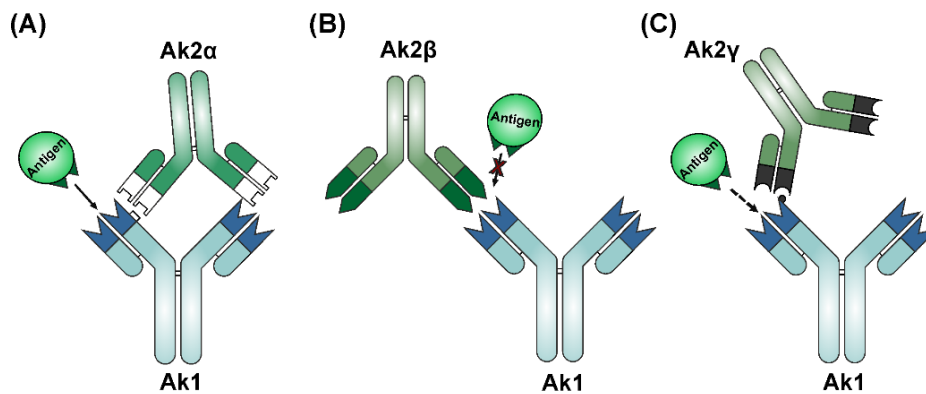
Die gesamte Messung dauert für einen Sandwich-Immunoassay ca. 20 Min (Pöhlmann und Elßner, 2017). Zudem weist jeder Chip interne Positiv- und Negativkontrollen zur Assay-Validierung auf.

### 2.3. Anti-idiotypische Antikörper als Nachweisreagenz

Grundsätzlich ist die Antigenbindungsstelle (Paratop) eines (toxinspezifischen) Ak1 strukturell komplementär zum Epitop des Antigens und kann daher vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Dies kann in der Bildung eines gegen diese antigenbindende Region (Idiotop) gerichteten anti-Idiotypen bzw. anti-idiotypischen Antikörper (Ak2) resultieren (Lindenmann, 1973; Jerne, 1974). Das Paratop des Ak2 kann wiederum als Antigen wirken und die Produktion anti-anti-idiotypischer Antikörper (Ak3) stimulieren, die die gleiche Antigenspezifität wie Ak1 besitzen. Diese Kaskade wird als „Idiotypische Netzwerktheorie“ bezeichnet und dient der Regulation des Immunsystems (Bona und Köhler, 1984).

Von besonderer Bedeutung sind hierbei vor allem Ak2, da sie verschiedene Strukturen der variablen Domäne (Idiotope) des Ak1 binden und so dessen Wechselwirkung mit dem eigentlichen Antigen beeinflussen können (**Abbildung 10**).





**Abbildung 10: Idiotope-Bindungseigenschaften der Ak2-Subtypen (A) Ak2 $\alpha$ , (B) Ak2 $\beta$  sowie (C) Ak2 $\gamma$ .**

Hierbei wird zwischen drei Gruppen unterschieden: Ak2 $\alpha$ , Ak2 $\beta$  und Ak2 $\gamma$  (Jerne, 1974; Bona und Köhler, 1984; Jerne, 1984; Köhler *et al.*, 1989). Anti-idiotypische Antikörper des  $\alpha$ -Typs (Ak2 $\alpha$ ) binden Idiotope, die zwar in der variablen Domäne aber nicht im Paratop des Ak1 liegen (**Abbildung 10A**), wohingegen Ak2 $\gamma$  mit Idiotypen nahe dem Ak1-Paratop wechselwirken und aufgrund sterischer Effekte die Bindung des Antigen an Ak1 hemmen können (**Abbildung 10C**). Die anti-idiotypischen Antikörper des  $\beta$ -Typs (Ak2 $\beta$ ) binden hingegen spezifisch Idiotope im Paratop des Ak1 und imitieren die Struktur des eigentlichen Antigen (**Abbildung 10B**). Ak2 $\beta$  stellen somit ein „inneres Abbild“ (*internal image*) des Epitops des Antigen dar und sind in der Lage mit diesem, um die Bindung an Ak1 zu konkurrieren.

Durch die Eigenschaft der Ak2 $\beta$  das Epitop des eigentlichen Antigen nachzuahmen, ergibt sich für die Entwicklung immunchemischer Testverfahren zum Nachweis von niedermolekularen Toxinen die Möglichkeit Ak2 $\beta$  als Nachweisreagenz einzusetzen. Allerdings wurde dieser Antikörper-Typ bisher vorrangig zur aktiven Immunisierung gegen toxische oder schwer zu isolierende Antigene sowie zur Tumor-Behandlung eingesetzt (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 2003; Naveed *et al.*, 2018). So wurden unter anderem auch für STX (Chanh und Hewetson, 1993) und T-2 (Chanh *et al.*, 1990) Ak2 $\beta$  generiert, um als Antikörper-basierte Vakzine eingesetzt zu werden (Chanh *et al.*, 1991).

Im Bereich der immunchemischen Analytik niedermolekularer Toxine kann somit auf die bei klassischen kompetitiven Assays eingesetzten markierten Toxine verzichtet werden (He *et al.*, 2010). Infolgedessen kann z. B. der mit arbeitsschutzrechtlich hohen Anforderungen verbundene Umgang mit großen Toxinmengen bei der Herstellung der entsprechenden Konjugate vermieden werden. Zudem hängt die Effizienz der Konjugation stark von den molekularen Eigenschaften der nativen Toxine, wie z.B. Wasserlöslichkeit oder das Vorhandensein funktioneller Gruppen, ab (Xiao *et al.*, 1995; Akkoyun *et al.*, 2000). Grundsätzlich ist die Handhabung rein Antikörper-

basierter Assays auch deutlich sicherer, da eine gesundheitsgefährdende Exposition des Anwenders gegenüber kanzerogenen Aflatoxinen und Microcystinen sowie den hoch toxischen PSP-Toxinen und Trichothecenen deutlich reduziert wird. STX unterliegt als Kampfstoff, der in der Liste 1 des Chemiewaffenübereinkommens genannt ist, strikten Ausfuhrbeschränkungen, was den Vertrieb klassisch kompetitiver Tests erschwert.

**Tabelle 4** gibt eine Übersicht zu bislang publizierten Ak2 $\beta$ -basierten Assay-Formaten zum Nachweis von Aflatoxinen, T-2, MC-LR und STX. Dabei wurden vor allem verschiedene EIAs im Mikrotiterplatten-Format etabliert, bei denen der Ak2 $\beta$  entweder als Fang- oder Detektionsantikörper eingesetzt wurde und mit dem Toxin in der Probe um die Bindung an Ak1 konkurriert. Zudem wurde die Verwendung von Ak2 $\beta$  als Surrogat-Standard zur Erstellung von Kalibrierkurven beschrieben (Guan *et al.*, 2011). Dass monoklonale Ak2 $\beta$  sowohl als Fang- und Detektionsantikörper im indirekten EIA einsetzbar sind, demonstrierten Tsutsumi *et al.* (1998) für den Nachweis von MC-LR, auch wenn die erzielte Testsensitivität deutlich unter der des klassischen EIA-Formats lag. Im Gegensatz hierzu zeigte Gayk (2019) anhand des Nachweises von AFM1 bzw. T-2/HT-2, dass bei Verwendung monoklonaler Ak2 $\beta$  – unabhängig ob als Fang- oder als Detektionsantikörper – eine deutliche Steigerung der Testsensitivität im Vergleich zum klassischen EIA-Format erreicht werden kann. Die Ak2 $\beta$  wurden dabei in einem syngenem Immunisierungsansatz induziert. Der Nachweis der Ak2 erfolgte mittels ausgefeilter, spezieller Immunoassay-Varianten. Dazu wurden die zu überprüfenden Ak2-haltigen Antiseren in Mikrotiterplatten, die mit Fc (*fragment crystallizable*)-spezifischen anti-Maus-Antikörpern vorbeschichtet waren, appliziert, und danach die Ak2 $\beta$  durch Zugabe HRP-markierter Ak1-Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) nachgewiesen. Die von Gayk (2019) entwickelten Ak2 $\beta$  für AFM1 und T-2/HT-2 wurden in dieser Arbeit genutzt, um erstmals ein Ak2 $\beta$ -basiertes Vor-Ort-Testsystem zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Toxingruppen zu entwickeln.

Tabelle 4: Ak2 $\beta$ -basierte Assays zum Nachweis von Aflatoxinen, T-2, MC-LR und STX.

Toxin	Ak2 $\beta$ -basierter Assay					Referenz
	Ak2 $\beta$ -Typ	Assay-Reagenz	Assay-Format	LOD (ng/mL)	Assayzeit (h)	
<b>Singleplex-Assay</b>						
AFM1	pAk	Surrogat-Toxin	Indirekt komp. EIA	k.A.	2,25	Guan <i>et al.</i> (2011)
AFB1	mAk	Surrogat-Toxin	Indirekt komp. EIA	k.A.	2,25	Hu <i>et al.</i> (2017)
AFM1	mAk	Detektionsmolekül	Direkt komp. EIA	0,027	2,00	Gayk (2019)
AFB1	VHH <sub>2,5</sub>	Fangmolekül	Indirekt komp. EIA	0,1	2,25	Wang <i>et al.</i> (2013)
AFB1	VHH	Detektionsmolekül	Indirekt komp. EIA	1,0	2,25	Wang <i>et al.</i> (2014)
AFB1	VHH <sub>2,5</sub>	Surrogat-Toxin	Indirekt komp. EIA	0,015	2,25	Wang <i>et al.</i> (2016b)
AFB1	VHH <sub>2,5</sub>	Kompetitor	Immuno- <i>real time</i> PCR	0,02	2,25	Lei <i>et al.</i> (2014)
T-2/HT-2	mAk	Detektionsmolekül	Direkt komp. EIA	0,15	2,00	Gayk (2019)
MC-LR	pAk	Surrogat-Toxin	Direkt komp. EIA	0,1	1,75	Liu <i>et al.</i> (1996)
MC-LR	mAk	Detektionsmolekül	Indirekt komp. EIA	0,1	3,00	Tsutsumi <i>et al.</i> (1998)
<b>Multiplex-Assay</b>						
AFB1, (ZEN)	VHH <sub>2,5</sub>	Kompetitor	Immuno- <i>real time</i> PCR	0,03	2,60	Ren <i>et al.</i> (2019)
AFB1, (ZEN)	VHH <sub>2,5</sub>	Fangmolekül	LFA	0,05	0,13	Tang <i>et al.</i> (2017)
STX, (Rizin, SEB)	mAk	Fangmolekül	Indirekt komp. EIA-Mikroarray	2,3	0,30	Szkola <i>et al.</i> (2014)

Abkürzungen: Ak2 $\beta$  = Anti-idiotypischer Antikörper des  $\beta$ -Typs; mAk = Monoklonaler Antikörper; pAk = Polyklonaler Antikörper; VHH = *variable domain of heavy-chain antibodies*; EIA = Enzymimmunoassay; komp. = kompetitiv; k.A. = Keine Angabe; LOD = *limit of detection*; IC<sub>50</sub> = Mittlere inhibitorische Konzentration, ZEN = Zearalenon; SEB = Staphylokokken Enterotoxin B; PCR = *polymerase chain reaction*; LFA = *lateral flow assay*

Zusätzlich zu den konventionellen Ak2 $\beta$  wurde in der Literatur vor allem der Einsatz von VHH-Antikörpern (*variable domain of heavy-chain antibody*) aus Kameliden beschrieben (**Tabelle 4**). Hierbei wurden die anti-idiotypischen VHH-Antikörper (Ak2 $\beta$ -VHH) mittels Phagen-Display selektiert. Nach Immunisierung der Tiere mit Ak1 wurde die genetische Information des Ak2 $\beta$ -VHH-Repertoires aus dem Blut isoliert, amplifiziert und in eine Phagen-Bibliothek kloniert. Spezifische Phagen wurden mittels *biopanning* gegen Ak1 ausgewählt. So fand der von Wang *et al.* (2013) generierte Ak2 $\beta$ -VHH<sub>2-5</sub> für AFB1 neben klassischen EIA-Formaten auch in zwei Immuno-*real time* PCRs Anwendung. Im ersten Schritt konkurrieren AFB1 und die VHH<sub>2-5</sub>-abbildenden Phagen um die Bindung an den in einer Mikrotiterplatte immobilisierten Ak1. Anschließend werden die an Ak1 gebundenen Phagen eluiert und als DNA-Template in einer *real time* PCR eingesetzt. Das *proof-of-concept* lieferten Lei *et al.* (2014) anhand des Einzeltoxin-Nachweises von AFB1. Ren *et al.* (2019) übertrugen dieses Konzept in ein multiplexfähiges Format, um parallel AFB1 und Zearalenon (ZEN) nachzuweisen. Ein anderes Nachweiskonzept zur simultanen Analyse von AFB1 und ZEN beschrieben Tang *et al.* (2017) anhand eines Fluoreszenz-LFAs, bei dem Ak2 $\beta$ -VHH<sub>2-5</sub>-abbildende Phagen als Fangmoleküle eingesetzt wurden. Für die Anwendung im Bereich der Erkennung bioterroristisch relevanter Agenzien zeigten Szkola *et al.* (2014) anhand von STX, dass durch den Einsatz von Ak2 $\beta$  der parallele Nachweis hoch- und niedermolekularer Toxine auf einem Mikroarray möglich ist. Das monoklonale Ak1/Ak2 $\beta$ -Paar für STX wurde ebenfalls am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch entwickelt; der Ak2 $\beta$  wurde auch in dieser Arbeit genutzt.

### III. PUBLIKATIONEN

#### 1. Publikation 1

##### **Electrochemical Biochip Assays Based on Anti-idiotypic Antibodies for Rapid and Automated On-Site Detection of Low Molecular Weight Toxins**

Katharina Schulz<sup>1,2</sup>, Christopher Pöhlmann<sup>1</sup>, Richard Dietrich<sup>2</sup>, Erwin Märtlbauer<sup>2,\*</sup>,  
Thomas Elßner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany

<sup>2</sup> Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

\* Corresponding author

**Journal:**

**Frontiers in Chemistry, Section Analytical Chemistry, 2019 7: 31**

**DOI:**

**10.3389/fchem.2019.00031**

**Keywords:** electrochemical biochip, on-site detection, pBDi, competitive immunoassay, anti-idiotypic antibodies, aflatoxins, T-2 toxin, saxitoxin

## Abstract

Phycotoxins and mycotoxins, such as paralytic shellfish poisoning toxins, type A trichothecenes, and aflatoxins are among the most toxic low molecular weight toxins associated with human poisoning incidents through the consumption of naturally contaminated food. Therefore, there is an utmost need for rapid and sensitive on-site detection systems. Herein, an electrochemical biochip for fast detection of saxitoxin, T-2 toxin as well as aflatoxin M1 and their corresponding congeners, respectively, using a portable and fully automated detection platform (pBDi, portable BioDetector integrated) was developed. Toxin analysis is facilitated upon the biochip via an indirect competitive immunoassay using toxin-specific antibodies combined with anti-idiotypic antibodies. The developed biochips enable detection in the low ng/mL-range within 17 min. Moreover, the assays cover a wide linear working range of 2–3 orders of magnitude above the limit of detection with an inter-chip coefficient of variation lower than 15%. The broad specificity of the employed antibodies which react with a large number of congeners within the respective toxin group allows efficient screening of contaminated samples for the presence of these low molecular weight toxins. With respect to the analysis of human urine samples, we focused here on the detection of saxitoxin, HT-2 toxin, and aflatoxin M1, all known as biomarkers of acute toxin exposure. Overall, it was proved that the developed biochip assays can be used to rapidly and reliably identify severe intoxications caused by these low molecular weight toxins.

## Introduction

Low molecular weight toxins, like phycotoxins and mycotoxins, are highly toxic contaminants posing a risk to human and animal health. Intoxication occurs through ingestion of contaminated food, feed or from environmental exposure. Consumption of contaminated seafood leads to paralytic shellfish poisoning (PSP) caused by PSP toxins (Anderson *et al.*, 2012). PSP toxins are a class of chemically related neurotoxins comprising up to 50 congeners which differ significantly in toxicity, with saxitoxin (STX) being the most toxic one. Symptoms of PSP include numbness of lips, headache, dizziness, nausea, vomiting and diarrhea followed by muscle paralysis and respiratory failure in acute cases (Van Egmond *et al.*, 1993). Another health threat is associated with the consumption of plant food contaminated by fungi which produce mycotoxins as secondary metabolites. Trichothecenes and aflatoxins are two classes of mycotoxins mostly associated with human health issues. T-2 toxin (T-2) and HT-2 toxin (HT-2) belong to the type A trichothecenes. Moreover, T-2/HT-2 are the most potent

trichothecene toxins and poisoning in humans is known as alimentary toxic aleukia resulting in alimentary hemorrhage, damages to hematopoietic tissues, and vomiting (Adhikari *et al.*, 2017). For the group of aflatoxins, five different aflatoxins have been considered to be important for food safety including aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin G2 (AFG2), and the AFB1 metabolite aflatoxin M1 (AFM1). Due to carcinogenic properties of AFB1, a dietary exposure to AFB1 can be linked to the development of hepatocellular carcinoma, while an acute aflatoxicosis induce abdominal pain, vomiting, edema and death (Williams *et al.*, 2004).

For diagnosis of an acute poisoning incident, two approaches can be used: (i) analysis of suspected food or (ii) analysis of biomarkers in body fluids. If food is no longer available as sample matrix, the only chance to obtain a hint for an intoxication is to analyze body fluid samples of affected persons for the presence of the parent toxin or metabolites. One of the most common body fluids for biomarker analysis is urine due to the non-invasive sampling. Multiple studies demonstrated that ingested PSP toxins are excreted by urinary routes (Gessner *et al.*, 1997; García *et al.*, 2004). The same applies for T-2 and aflatoxins. T-2 is rapidly metabolized and, in animals, the most typical metabolites of T-2 are HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol as well as their hydroxylated variants. All compounds are found in urine and feces of exposed animals (Wu *et al.*, 2010). AFM1 is a main metabolite of AFB1 and can be used as a valid indicator of exposure to aflatoxins due to a dose-dependent relationship between the excretion of AFM1 in urine and the uptake of AFB1 (Groopman and Kensler, 1993).

Detection of these low molecular weight toxins is often achieved by methods utilizing chromatographic and/or mass spectrometry-based approaches (Turner *et al.*, 2009). These methods require skilled personnel, expensive laboratory equipment and complex preparation steps, and, thus, they are time-consuming and laborious. To provide a rapid and sensitive detection based on cost-effective and easy-to-use methods, a variety of screening methods has been developed. These methods mainly rely on antigen-antibody reactions. The most widely used immunoassays include microplate-based immunoassays, immunochromatographic assays (or lateral flow assays, LFA) as well as different immuno-biosensors. LFAs have several advantages over microplate-based assays including low cost as well as rapidity and simple use; on the other hand application of LFAs may be restricted by insufficient analytical sensitivity (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). The increasing emergence of immuno-biosensors in the field of food analysis is based on their advantageous properties such as being highly sensitive, portable, robust and capable for automation (McGrath *et al.*, 2012). Optical

immunosensors use, for example, surface plasmon resonance (SPR) for detection. However, unlabeled assay formats such as SPR suffer often from limited sensitivity and matrix interference (Granqvist *et al.*, 2013). In contrast, labeled assay formats are characterized by improved sensitivity, whereas a disadvantage is the additional labeling step required. McNamee *et al.* (2004) developed a planar waveguide microarray for multiplex detection of five groups of harmful phycotoxins applying 15 min assay time. Besides optical methods, electrochemical transduction technologies for immunobiosensors were intensively investigated for analysis of low molecular weight toxins (Vidal *et al.*, 2013). Advantages of electrochemical biosensors include their sensitivity, selectivity, low cost, simplicity, and in particular the potential for miniaturization and portability as well as integration in automated devices (Farré *et al.*, 2009). Portability is an important feature for immuno-biosensors because it allows point-of-care or on-site testing for medical diagnostics, food and environmental monitoring. Electrochemical immuno-biosensors were established for several low molecular weight toxins in the past, for example for AFB1 (Lin *et al.*, 2015) or STX (Bratakou *et al.*, 2017).

In general, detection of low molecular weight toxins by immunoassay-based techniques relies on a competitive format, in which the toxin is either coupled to carrier proteins used for coating or labeled with enzyme competing with the toxin in the sample for a limited amount of capture antibodies. Unfortunately, the chemical coupling of the toxin to proteins inevitably exposes operators and the environment to the toxic reagents, whereas anti-idiotypic antibodies have a promising potential to replace these hapten-protein conjugates (He *et al.*, 2010). Anti-idiotypic antibodies of the  $\beta$ -type are raised against the paratope (antigen-binding site) of the primary anti-hapten antibody such displaying an “internal image” of the hapten (Jerne *et al.*, 1974). In the final assay, these anti-idiotypic antibodies compete with the original hapten for binding sites of anti-hapten antibody. In the past, both polyclonal and monoclonal antibody techniques have been used to successfully generate anti-idiotypic antibodies against haptens like mycotoxins (Chanh *et al.*, 1991). Moreover, recombinant antibody approaches have also been applied to generate and genetically engineer anti-idiotypic antibodies (Wang *et al.*, 2013). In competitive immunoassay formats anti-idiotypic antibodies can serve either as capture antigen (Shu *et al.*, 2015) or as competing reagent (Shu *et al.*, 2016). Furthermore, anti-idiotypic antibodies have been utilized as surrogate toxin for the establishment of a standard curve (Guan *et al.*, 2011). With regard to the development of immuno-biosensors, Szkola *et al.* (2014) demonstrated the successful implementation of anti-idiotypic antibodies as capture molecules on a



chemiluminescence-based microarray for detection of STX.

In the present study, electrochemical readable anti-idiotypic antibody based competitive immunoassays allowing the detection of the phycotoxin STX and the mycotoxins T-2 as well as AFM1 and corresponding congeners, respectively, using a portable and fully automated detection platform (pBDi, portable BioDetector integrated) (Pöhlmann und Elßner, 2018) were developed. This electrochemical detection platform with corresponding biochips based on a non-competitive immunoassay format has already been tested for detection of high molecular weight toxins such as ricin (Worbs et al., 2015) and staphylococcal enterotoxin B (Nia et al., 2016) in the field of biosecurity. Here, we established competitive biochip-based assays as a screening tool to identify STX, HT-2 and AFM1 as urinary biomarker for diagnosing an acute poisoning incident, for example, after consumption of contaminated food.

## Material and Methods

### Materials

Reagents: Phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM disodium hydrogen phosphate, 1.8 mM potassium dihydrogen chloride, 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride) pH 7.4, Tween-20, trehalose, sorbitol, magnesiumchloride hexahydrate (MgCl<sub>2</sub>), skimmed milk powder, sodium hydroxide (NaOH), sodium dodecyl sulfate (SDS), *p*-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (*p*-APG), streptavidin- $\beta$ -D-galactosidase, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Toxin Standards: The PSP toxin standards, including STX, decarbamoylsaxitoxin (dc-STX), decarbamoylneosaxitoxin (dc-NEO), gonyautoxin 1 and 4 (GTX-1/-4), decarbamoylgonyautoxin 2 and 3 (dc-GTX-2/-3) and *N*-sulfocarbamoyl-gonyautoxin 2 and 3 (C1/C2) were purchased from LabMix24 GmbH (Hamminkeln, Germany), whereas neosaxitoxin (NEO), gonyautoxin 2 and 3 (GTX-2/-3) as well as gonyautoxin 5 (GTX-5) were from CIFGA S.A. (Lugo, Spain). The T-2 standards, including T-2 and its metabolites HT-2, T-2 triol and T-2 tetraol were obtained from Romer Labs (Getzersdorf, Austria). The aflatoxin standards AFM1, AFB1, AFG1, AFB2 and AFG2 were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany).

## Methods

### Antibody Production

Monoclonal antibodies (mAb), specific for low molecular weight toxins, 5F7 (anti-STX), 2A12 (anti-T-2/HT-2) and 2D1 (anti-AFM1) were prepared as described (Dietrich *et al.*, 1995). The  $\beta$ -type anti-idiotypic mAbs 1D8 (anti-5F7), 1D6 (anti-2A12) and 1G10 (anti-2D1) were generated according to Szkola *et al.* (2014).

### Biotinylation of Detection Antibodies

Detection mAbs were biotinylated using EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) dissolved in ultrapure water. The antibodies were mixed with a 20-fold molar excess of the biotin reagent and incubated for 1 h at room temperature. Excess of non-reacted biotin reagent was removed using Zeba™ Spin 7K MWCO Desalting Columns (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equilibrated with PBS. The concentration of biotinylated antibody was determined based on absorbance measurements at  $\lambda = 280$  nm using the NanoPhotometer NP-80 (Implen GmbH, Munich, Germany).

### Immobilization of Antibodies on Gold Electrodes of Biochips

The biochips were manufactured on 8-inch silicon wafers at the Fraunhofer Institute for Silicon Technology (Itzehoe, Germany) as described (Elsholz *et al.*, 2006). The final biochip sizes was 9 mm x 10 mm carrying 16 interdigitated array (IDA) gold electrodes each with a diameter of 500  $\mu\text{m}$ . Capture mAbs were immobilized directly via physisorption onto the gold electrodes using a non-contact piezo-electronic spotter (sciFLEXARRAYER S3, Scienion Inc., Berlin, Germany) at a final concentration of 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  1D8, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2A12 and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2D1 in 0.4% (w/v) BSA/PBS based on the results of preceding optimization experiments. BSA was added as co-immobilization agent for stabilization of capture mAbs immobilized on gold electrode surface. Biotinylated rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany) was used as positive control (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.02% (w/v) BSA/PBS) and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA/PBS as negative control. 130 droplets were spotted on each position resulting in a total volume of ca. 50 nL per electrode. After spotting, the biochips were incubated in a humidity chamber with PBS for 2 h at room temperature, followed by a 16 h-incubation at 4°C. Afterwards, the biochips were washed with 0.025% (v/v) Tween-20/PBS and PBS and then, blocked for 30 min with 1% (w/v) skimmed milk powder/PBS to prevent unspecific binding events. Following a final wash step with ultrapure water, spotted biochips were evaporated to dryness and stored at 4°C

protected from light. Finally, the biochip was mounted in a polycarbonate cartridge consisting of an internal flow cell with a volume of 10  $\mu\text{L}$ .

#### Instrumentation and Biochip Measurement

Spotted biochips were measured using the fully automated, electrochemical detection platform pBDi (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany). The electrochemical current measurement is calculated by applying a potential of +150 mV to the anodic fingers and -400 mV to the cathodic fingers of the IDA gold electrodes. The multipotentiostat achieves a resolution of the current of 5 pA within a range of  $\pm 200$  nA.

As sample, a total volume of 800  $\mu\text{L}$  toxin standard sample or urine sample mixed with the respective detection antibody was applied. The automatic assay program is summarized in **Table 1** indicating a total assay time of 16.7 min.

**Table 1. Automated assay program for the detection of STX, T-2/HT-2, and AFM1.**

Step	Process	Duration (s)	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	Equilibration with assay buffer	56	32
2	Sample and detection antibody flow	20	42
3	Competition reaction	594	42
4	Wash flow with assay buffer	26	42
5	Reporter enzyme flow	20	42
6	Reporter enzyme incubation	180	42
7	Wash flow with assay buffer	40	42
8	Substrate flow	10	50
9	Stopped flow	15	50
10	Wash flow with assay buffer	41	32

It includes, amongst other steps, washing with assay buffer (1x PBS pH 7.4, 1% (w/v) BSA, 0.025% (v/v) Tween-20), a competition step of the toxin sample with biotinylated detection antibody for limited binding sites of the capture antibody, an incubation step with reporter enzyme (streptavidin- $\beta$ -D-galactosidase stabilized with 100 mM  $\text{MgCl}_2$  and 100 mM sorbitol, then diluted to 1 U/mL with assay buffer) to label bound detection antibody, and a final signal generating step applying the reporter enzyme substrate *p*-APG (diluted to 1 mg/mL with assay buffer). Monitoring of the generated current by enzymatic substrate conversion as well as redox cycling was performed according to Elsholz *et al.* (2006) in stopped-flow mode. The absolute current slope for each electrode position is determined by linear regression during the first 4 s with 1 s delay after stopped-flow. For better inter-chip reproducibility, the absolute current

slopes of target electrode positions were mathematically normalized to the signal of the spotted positive control (Pos.Co.) and negative control (Neg.Co.):

$$\text{Normalized signal (\%)} = 100 \times \left[ \frac{\text{Slope}(\text{Target}) - \text{Slope}(\text{Neg. Co.})}{\text{Slope}(\text{Pos. Co.}) - \text{Slope}(\text{Neg. Co.})} \right]$$

Normalized signals were used for further data analysis.

To prevent carry-over, a 4 min-wash step with 0.1% (w/v) SDS in 0.1 M NaOH was performed before next measurements.

#### Preparation of Dose-Response Curves

Stock solutions of STX, T-2 and HT-2 as well as AFM1 were used to prepare different working solutions in assay buffer ranging from 0-300 ng/mL for STX and AFM1, 0-400 ng/mL for T-2 and 0-1000 ng/mL for HT-2. Working solutions were then mixed with the respective detection antibody (STX: 50 ng/mL 5F7-bio, T-2/HT-2: 150 ng/mL 1D6-bio, AFM1: 300 ng/mL 1G10-bio). According to the automated assay program, a 1 min pre-incubation of the toxin and the detection antibody takes place at room temperature before pumping to the biochip.

#### Assay Specificity

Specificity was evaluated by incubating the biochip with the respective toxin group congeners in presence of the corresponding detection antibody (STX: 50 ng/mL 5F7-bio, T-2/HT-2: 150 ng/mL 1D6-bio, AFM1: 300 ng/mL 1G10-bio). For PSP toxin detection, 150 ng/mL STX, dc-STX, NEO, dc-NEO, GTX-1/-4, GTX-2/-3, dc-GTX-2/-3, C1/C2 and GTX-5, respectively, were applied. For the T-2/HT-2 biochip, 150 ng/mL T-2 and equal concentrations of its metabolites HT-2, T-2 triol and T-2 tetraol were used. For aflatoxin detection, 10 ng/mL AFM1, AFB1, AFG1, AFB2 and AFG2, respectively, were incubated on the biochip. All toxin samples were diluted in assay buffer for measurements.

#### Data Analysis

Dose-response curves were described by the 4-parameter logistic regression model using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Displayed error bars indicate the standard deviation and were obtained from different biochips as indicated. The limit of detection (LOD), linear working range, and midpoint value ( $IC_{50}$ ) were interpolated from the 4-parameter logistic function. The LOD corresponds to the toxin concentration which gave a normalized signal equal to the normalized signal when no toxin is present ( $B_0$ ) minus three times its standard deviation obtained

from six biochips with two target electrode positions. The linear working range was determined as the concentrations of the toxin reducing the B0 signal to 20-80%. The IC<sub>50</sub> were calculated as the toxin concentration that lowered the normalized signal to 50% of B0. For verification of assay specificity, percent inhibition was calculated by the formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left[ \frac{\text{Signal} \times 100}{\text{B0 Signal}} \right]$$

#### Preparation of Urine Samples

First morning urine was used and collected freshly each day from healthy volunteers. One mL urine was mixed with 40 ng/mL STX or 20 ng/mL HT-2 or 8 ng/mL AFM1 and incubated for 30 min at room temperature using an end-over-end mixer. Then, urine samples as well as blank urine samples were centrifuged at 4500 x g for 5 min, diluted 4-fold with assay buffer, mixed with the respective biotinylated detection antibody and applied to the biochip.

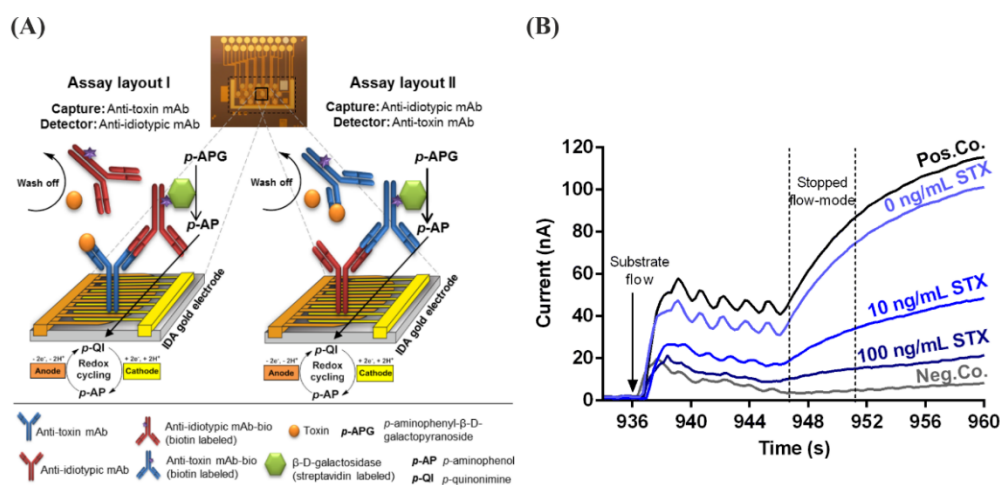
#### Threshold Value T and Cut-Off Factor Fm for Urine Samples

To demonstrate the applicability of the assays as screening methods for the analysis of urine samples, threshold value T and cut-off value Fm were determined for each toxin with an error probability of 5% according to the Decision No 2002/657/EC (EC, 2002; CRLs, 2010). Therefore, 20 urine samples spiked with toxin and 20 blank urine samples were analyzed. The obtained signals of the blank and spiked urine samples were set in relation to the B0 signal observed in buffer. The threshold value T was calculated as the mean signal of blank samples minus 1.729 times its standard deviation. The cut-off factor Fm was estimated as being the mean signal of spiked urine samples plus 1.729 times the standard deviation. A competitive method is validated as a screening method, when  $F_m < T$ .

## **Results**

### **Assay Principle**

A competitive electrochemical immunoassay format relying on the use of anti-idiotypic mAbs for detection of several low molecular weight toxins such as STX, T-2/HT-2, and AFM1 is presented. In contrast to traditional competitive immunoassays, the use of anti-idiotypic mAbs circumvents the need for toxin-protein conjugates either for coating or as tracer molecules. Either anti-toxin mAbs (layout I) or anti-idiotypic mAbs (layout II) are immobilized onto the IDA gold electrodes by physisorption (**Figure 1A**).



**Figure 1. Illustrated principle of the competitive, anti-idiotypic antibody based biochip assays with amperometric measurement.**

(A) The electrical biochip exhibits 16 IDA gold electrodes for immobilization of capture molecules. Utilization of anti-toxin mAbs and anti-idiotypic mAbs as capture or detector enabling two different assay layouts (I and II) based on a competitive format. During an automatic measurement the sample (toxin) plus the biotinylated detector antibody, the streptavidin labeled  $\beta$ -D-galactosidase and the substrate  $p$ -APG are sequentially applied to the biochip. Signal amplification of electrochemical detection is realized via redox cycling of  $p$ -AP between anodic and cathodic fingers of the electrode. (B) Amperometric response curves (current versus time) were generated after substrate flow to the biochip followed by enzymatic conversion to the electrochemically active product and redox cycling in stopped-flow mode. Curves for 10 and 100 ng/ml STX were obtained and compiled from two independent biochips. Pos.Co. = Biotin labeled rabbit anti-mouse IgG; Neg.Co. = BSA.

In layout I, samples containing the toxin and biotinylated anti-idiotypic mAbs are applied simultaneously to the coated biochip. Free toxin in the sample and biotinylated anti-idiotypic mAbs compete for limited binding sites of the immobilized anti-toxin mAbs. The biotinylated anti-idiotypic mAb serves as detector replacing the toxin-enzyme conjugate needed for competition in traditional competitive immunoassay format. In layout II, the anti-idiotypic mAb is immobilized onto the gold electrodes, thus, no toxin-protein conjugate is required for immobilization allowing safe manufacturing of biochips. Following the application of the toxin sample and the biotinylated anti-toxin mAb, a competition between the free toxin and the immobilized anti-idiotypic mAb for binding to the biotinylated anti-toxin mAbs functioning as detector takes place. The higher the toxin concentration, the fewer detection antibodies can bind to immobilized capture antibodies. Detection is realized via biotin-streptavidin interaction of biotinylated detection antibodies with the streptavidin labeled reporter enzyme  $\beta$ -D-galactosidase. Then, enzymatic conversion of the electrochemically inactive substrate  $p$ -APG to the electrochemically active product  $p$ -aminophenol ( $p$ -AP) occurs. Moreover, the arrangement of the electrodes as interdigitating anodic and cathodic fingers enables a redox cycling after substrate conversion. The electrochemically active product  $p$ -AP is oxidized at the anodic fingers and the

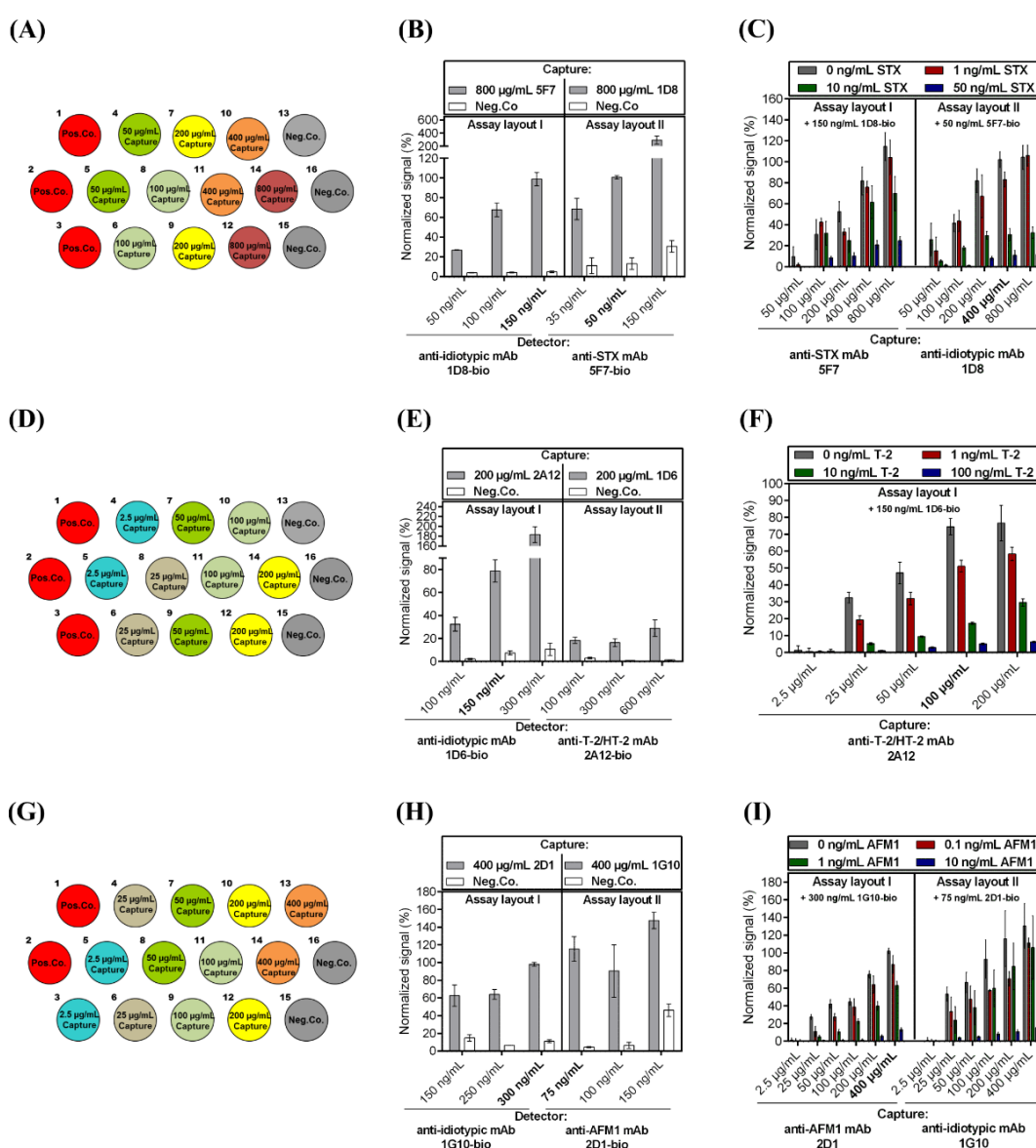
oxidation product, *p*-quinonimine (*p*-QI), is then reduced back to *p*-AP at the cathodic fingers resulting in a signal amplification factor of approximately 10 (Nebling *et al.*, 2004). Generally, for both assay layouts, the generated current signal is inversely proportional to the toxin concentration of the sample due to the underlying applied competitive assay principle (**Figure 1B**). Pos.Co. position shows a sharp increase of the current versus time during stopped-flow mode, whereas the Neg.Co. position exhibits a constant low current signal.

### Selection of Capture and Detection Antibodies

The following parameters were optimized independently for the detection of the three low molecular weight toxins: (i) assay layout (layout I vs. layout II, see **Figure 1A**), (ii) concentration of immobilized capture mAb and (iii) concentration of biotinylated detection mAb to achieve most sensitive assays.

First, anti-toxin mAbs and anti-idiotypic mAbs were tested for their suitability to be used as capture or detector on the biochip. Therefore, the anti-toxin mAbs and anti-idiotypic mAbs were spotted in duplicate on three different biochips, in different concentrations ranging from 2.5  $\mu\text{g/mL}$  up to 800  $\mu\text{g/mL}$  (**Figure 2A, 2D, 2G**).

For optimization of detector concentration, each biochip was exposed to different concentrations of the respective detection antibody (in the range from 35 ng/mL to 600 ng/mL) in the absence of toxin. To demonstrate the influence of different detector concentrations on the signal response, results are exemplarily shown for electrode positions spotted with the highest capture concentration and with Neg.Co. (**Figure 2B, 2E, 2H**). In most cases, signal intensity increased with the concentration of detection antibody applied (**Figure 2B, 2E left, 2H**). For STX assay layout II, signal intensity increased with rising concentrations of biotinylated detector antibody (35, 50, 150 ng/mL), however, use of biotinylated anti-STX mAb 5F7-bio resulted in elevated signals on Neg.Co. electrode positions covered with BSA (**Figure 2B, right**). Similar results were obtained for the AFM1 assay layout II in which application of 150 ng/mL anti-AFM1 mAb 2D1-bio also led to a signal rise of the Neg.Co. electrode positions, whereas use of 75 ng/mL or 100 ng/mL 2D1-bio, respectively, did not result in an elevation of negative control signals (**Figure 2H, right**). Contrarily, in the T-2 assay this effect was not observed (**Figure 2E, right**). However, further experiments revealed that activity of 2A12-bio in assay layout II was clearly impaired (data not shown) indicating that mAb 2A12 is not suitable for biotinylation in the described manner and thus, is not applicable as detector. Therefore, T-2 assay layout II was not further evaluated.



**Figure 2. Optimization of the anti-idiotypic antibody based biochip assay focusing on capture and detection antibody concentration.**

Anti-toxin mAbs as well as anti-idiotypic mAbs were spotted as capture antibodies with varying concentrations as indicated for (A) STX, (D) T-2/HT-2, and (G) AFM1. (B, E, H) Influence of the detection antibody concentration in absence of toxin on the signal response for each assay setup is exemplarily shown for electrode positions spotted with the highest capture concentration and Neg.Co. for the (B) STX, (E) T-2/HT-2, (H) AFM1 assay. Chosen concentrations of detection mAb are indicated bold. (C, F, I) Influence of the capture antibody concentration on the signal response for each assay layout applying a fixed concentration of detection antibody in the presence and absence of different concentrations of (C) STX, (F) T-2 and (I) AFM1. Toxin concentrations and applied detector antibody concentration are stated in the figures. Chosen capture mAb concentrations of the most sensitive assay layout are highlighted. Error bars represent standard deviation from two biochips with two target electrode positions ( $n=4$ ).

Optimal detection antibody concentration was chosen based on the selection criteria (i) a maximum signal response in combination with (ii) a low background signal. Therefore, detection antibody concentrations were selected as follows: 150 ng/mL 1D8-bio (STX assay layout I), 50 ng/mL 5F7-bio (STX assay layout II), 150 ng/mL



1D6-bio (T-2 assay layout I), 300 ng/mL 1G10-bio (AFM1 assay layout I) and 75 ng/mL 2D1-bio (AFM1 assay layout II).

Second, different dilutions of the corresponding toxin in combination with optimal detector concentration were applied to the biochips to select the optimal capture concentration (**Figure 2C, 2F, 2I**). In all cases, signal intensity correlated with the amount of capture antibody indicates that the higher the concentration of capture molecules, the higher the overall signal intensity. Furthermore, due to the competitive nature of the electrochemical immunoassay, decreasing signal intensities were obtained at increasing toxin concentrations. Overall, the results, summarized in **Figure 2**, showed that the sensitivity of the particular assays depends on the applied concentration of the capture antibody. For instance, after immobilizing 800  $\mu\text{g/mL}$  anti-idiotypic mAb 1D8 (STX assay layout II), a clear differentiation of 0 and 1 ng/mL STX was not possible (**Figure 2C, right**) while it was possible at lower coating concentrations. A possible explanation is that at higher coating concentrations the gold electrode is highly covered with anti-idiotypic antibodies, resulting in too many free binding sites for the selected optimal detection mAb concentration causing a loss in sensitivity. Analogously, immobilization of 100  $\mu\text{g/mL}$  anti-T2/HT-2 mAb 2A12 resulted in a more significant differentiation of 0 and 1 ng/mL T-2 compared to immobilization of 200  $\mu\text{g/mL}$  2A12 (**Figure 2F**).

Third, for selection of optimal assay layout, the chosen selection criterions were (i) the largest difference between the signals obtained in the absence and presence of the toxin and (ii) a relative standard deviation of the signal response between the two biochips  $\leq 20\%$  for the indicated concentration. Particularly, the AFM1 assay layout II exhibited signals with significantly higher standard deviations than signals in assay layout I (**Figure 2I, right**). This could be due to that immobilization of anti-idiotypic mAb 1G10 by physisorption on the gold electrode potentially led to its partial denaturation resulting in a decreased stability of the capture antibody, which in turn causes signals with poor reproducibility. Overall, the most sensitive layouts were STX assay layout II immobilizing 400  $\mu\text{g/mL}$  anti-idiotypic mAb 1D8 (**Figure 2C, right**), T-2 assay layout I with 100  $\mu\text{g/mL}$  anti-T-2/HT-2 mAb 2A12 as capture antibody (**Figure 2F**), and AFM1 assay layout I immobilizing 400  $\mu\text{g/mL}$  anti-AFM1 mAb 2D1 (**Figure 2I, left**).

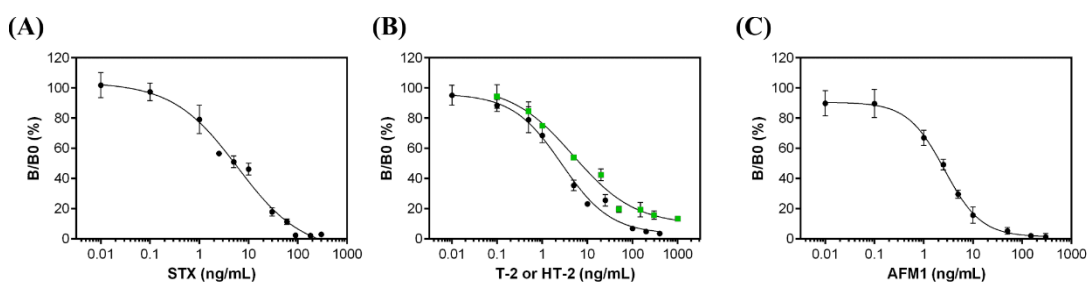
**Table 2** summarizes the optimal parameters for the establishment of the competitive electrochemical immunoassay relying on the use of anti-idiotypic mAbs for detection of STX, T-2/HT-2 and AFM1.

**Table 2. Optimal antibody pair combinations consisting of an anti-idiotypic mAb and an anti-toxin mAb for detection of STX, T-2/HT-2 and AFM1.**

Toxin	Assay layout	Capture mAb	Conc. capture mAb ( $\mu\text{g/mL}$ )	Detection mAb	Conc. detection mAb ( $\text{ng/mL}$ )
STX	II	Anti-idiotypic mAb 1D8	400	Anti-STX mAb 5F7-bio	50
T-2/HT-2	I	Anti-T-2/HT-2 mAb 2A12	100	Anti-idiotypic mAb 1D6-bio	150
AFM1	I	Anti-AFM1 mAb 2D1	400	Anti-idiotypic mAb 1G10-bio	300

### Analytical Characteristics

Applying optimal assay parameters determined in the previous chapter, dose-response curves for STX, T-2/HT-2 and AFM1 were generated by analyzing different concentrations of toxins diluted in assay buffer (Figure 3).

**Figure 3. Dose-response curves for the anti-idiotypic antibody based biochip assays.**

Measurements with different dilutions of (A) STX, (B) T-2 (black circles) and HT-2 (green squares) and, (C) AFM1 were performed in assay buffer. Data presented here were obtained using the optimal antibody pairs described in Table 2. Error bars correspond to the standard deviation obtained from three biochips with two target electrode positions ( $n=6$ ).

Correlation of toxin concentration and normalized signal reveals typical sigmoidal shaped curves with negative slope demonstrating that the pairs of anti-toxin mAb and anti-idiotypic mAb function in a competitive way for toxin detection. Analytical parameters obtained from dose-response curves are listed in Table 3.

**Table 3. Analytical parameters of the anti-idiotypic antibody-based biochip assays for the detection of STX, T-2 and HT-2 as well as AFM1.**

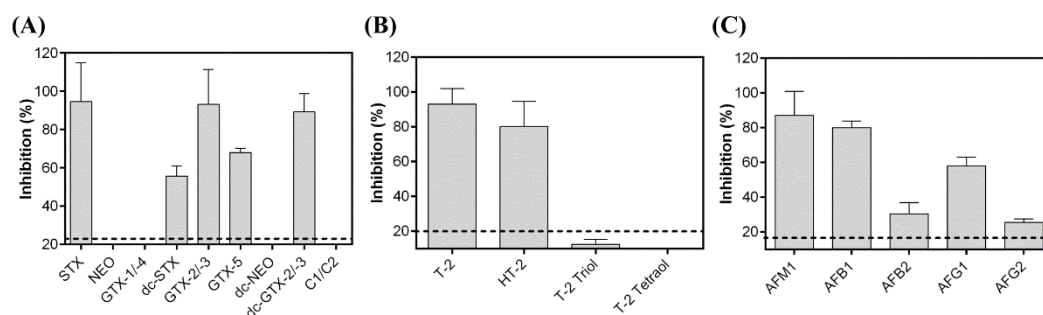
Toxin	LOD ( $\text{ng/mL}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\text{ng/mL}$ )	Linear working range ( $\text{ng/mL}$ )	CV <sub>Inter-chip</sub> (%)	Assay time (min)
STX	1.0	6.2	0.8-29.7	14.5	16.7
T-2	0.4	2.5	0.4-18.8	7.8	16.7
HT-2	1.0	5.1	1.0-118.6	12.7	16.7
AFM1	0.3	2.4	0.3-8.1	13.1	16.7

### Dose-Response Curves

The anti-idiotypic antibody-based biochip assay for STX exhibits a LOD in buffer of 1 ng/mL STX with an  $IC_{50}$  of 6.2 ng/mL. The linear working range is between 0.8 and 29.7 ng/mL covering two orders of magnitude of concentration above the LOD. Reproducibility of the signal for the individual concentration points between different biochips is expressed as mean coefficient of variation ( $CV_{\text{Inter-chip}}$ ) and is 14.5% for the STX assay. For T-2/HT-2 detection, the dose-response curves reveal a LOD in buffer of 0.4 ng/mL for T-2 and 1 ng/mL for HT-2. The  $IC_{50}$  for T-2 and HT-2 are 2.5 ng/mL and 5.1 ng/mL, respectively, indicating that the anti-toxin mAb 2A12 has a higher specificity towards T-2 compared to HT-2. The linear working range covers between two (T-2) and three (HT-2) orders of magnitude of concentration. For both toxins, the  $CV_{\text{Inter-chip}}$  is below 13% (T-2: 7.8%, HT-2: 12.7%). To detect AFM1, the anti-idiotypic antibody-based biochip assay has a LOD in buffer of 0.3 ng/mL AFM1 and an  $IC_{50}$  of 2.4 ng/mL. The linear working range is between 0.3 and 8.1 ng/mL covering one order of magnitude of concentration. The  $CV_{\text{Inter-Chip}}$  is 13.1%.

### Specificity Toward Toxin Group Congeners

A broad specificity towards several congeners of a toxin group is required for a biochip assay intended to be used on-site. To assess the potential of each biochip assay to detect a large variety of congeners, respective biochips were exposed to different PSP toxins, T-2 metabolites and aflatoxins. These toxins were used in a concentration close to the lower plateau of the sigmoidal dose-response curves (PSP toxins: 150 ng/mL, T-2 metabolites: 150 ng/mL, aflatoxins: 10 ng/mL). Results are presented in **Figure 4** indicating that each biochip assay exhibits a broad specificity towards the respective toxin group.



**Figure 4. Specificity of the anti-idiotypic antibody based biochip assays towards toxin group congeners.**

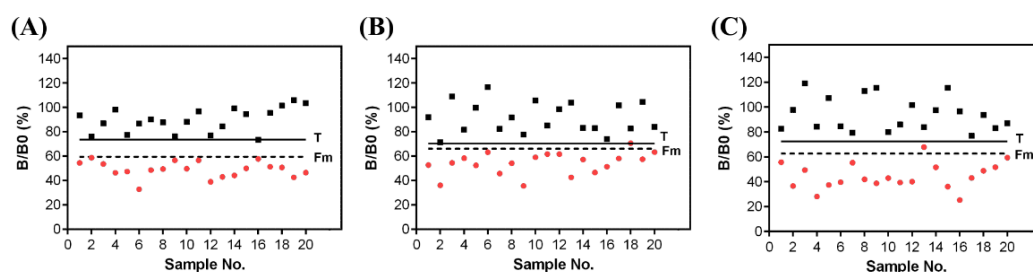
(A) 150 ng/mL PSP toxins, (B) 150 ng/mL T-2 and its metabolites and, (C) 10 ng/mL aflatoxins were used for analysis. Data presented here were obtained using the optimal antibody pairs described in **Table 2**. Dashed lines represent the LOD obtained from dose-response curves. Each bar is the mean of the signal from two biochips with two target electrode positions ( $n=4$ ) depicted as percent inhibition plus its standard deviation.

The STX biochip assay is capable to detect GTX-2/-3, dc-GTX-2/-3, dc-STX and GTX-5 in addition to STX (**Figure 4A**). STX, GTX-2/-3 and dc-GTX-2/-3 showed similar levels of signal inhibition, whereas specificity towards dc-STX and GTX-5 is significantly decreased. PSP toxins bearing a hydroxyl group at R1 could not be detected (NEO, dc-NEO, GTX-1/-4 and C1/C2) using the described assay layout. The T-2/HT-2 biochip assay detects T-2 and HT-2 with a higher sensitivity towards T-2 than towards HT-2 toxin (**Figure 4B**). Specificity is negligible towards T-2 triol and not-existing towards T-2 tetraol indicating that the acetyl group at C8 and the isovaleric acid group at C15 might be crucial for antibody binding. The antibody pair for AFM1 detection recognizes all five aflatoxins which are commonly found in food (**Figure 4C**). The antibodies show the highest sensitivity towards AFM1, followed by AFB1 and AFG1. Specificity towards AFB2 and AFG2, respectively, is clearly weaker than towards AFM1 or AFB1 indicating that the C8-C9 double bond has great influence on antibody affinity.

### Detection of STX, HT-2 and AFM1 in Urine Samples

To demonstrate the applicability of the assays as rapid screening methods for the detection of STX, HT-2, and AFM1 in urine, the threshold value  $T$  and the cut-off factor  $F_m$  were assessed for each toxin with an error probability of 5%. Blank urine samples ( $n=20$ ) and urine samples ( $n=20$ ) applied at target concentration (STX: 40 ng/mL, HT-2 toxin: 20 ng/mL, AFM1: 8 ng/mL) were analyzed on 40 biochips. Results of the validation are shown in **Figure 5**.

Validation experiments for the STX biochip assay resulted in a complete separation of 20 blank urine samples and 20 urine samples with a toxin concentration of 40 ng/mL STX (**Figure 5A**). No false positive as well as no false negative results were observed.



**Figure 5. Validation of the biochip assay for detection of (A) STX, (B) HT-2, and (C) AFM1 in urine.**

Signals were obtained from blank urine (filled squares) and urine spiked with target concentration (open circles) of (A) 40 ng/mL STX, (B) 20 ng/mL HT-2, and (C) 8 ng/mL AFM1. Signal in urine was set in relation to the B0 signal in assay buffer. Solid line corresponds to the threshold value  $T$ . Dashed line represents the cut-off factor  $F_m$ .

The T-2/HT-2 biochip assay is also applicable for the use in qualitative screenings of urine samples (**Figure 5B**). Negative urine samples can be distinguished from positive urine samples applied at target concentration of 20 ng/mL HT-2. No false positive results were generated, and one sample (sample 18) is considered as false negative, however, being in line with the error probability of 5%. The applicability of the biochip assay to detect AFM1 in urine is shown in **Figure 5C**. A complete separation of blank urine samples and urine samples spiked with 8 ng/mL AFM1 could be achieved. One positive sample (sample 13) is above the cut-off value  $F_m$ , but did not exceed the threshold factor  $T$ . This sample is considered as non-compliant which is in agreement with the error probability of 5%.

Overall, the cut-off value  $F_m$  is markedly below the threshold value  $T$ , thus, the three assays are applicable to screen urine samples at or above a target concentration of 40 ng/mL STX, 20 ng/mL HT-2 and 8 ng/mL AFM1.

## Discussion

The developed biochip assays demonstrate that anti-idiotypic antibodies can be applied on an electrochemical biochip for competitive immunoassay-based detection of low molecular weight toxins. The developed assays reveal high sensitivity, rapid assay time, improved assay reproducibility as well as ability for on-site detection provided by the portable detection platform. To our knowledge, an implementation of anti-idiotypic antibody-based assays on electrochemical biochips has not been described so far. The presented data demonstrate that in a competitive immunoassay format the use of potentially harmful toxin-protein conjugates can be avoided and replaced by implementing monoclonal anti-idiotypic antibodies, thus, an environmental-friendly and user-safe assay with a high degree of standardization is generated. Compared to previously reported microarrays for phycotoxin as well as mycotoxin detection using traditional toxin-protein conjugates, the developed assays showed similar or superior assay performance (**Supplementary Table 1**). Wang *et al.* (2012) described a microarray using agarose-modified glass slides with fluorescence detection via a bench-top laser scanner for semi-quantitative detection of six mycotoxins in drinking water. LODs for AFM1, AFB1 and T-2 were 0.24, 0.01 and 0.05 ng/mL, respectively. Nevertheless, each step of the assay was performed manually with a total assay time of approximately 240 min. In contrast, our assays implemented on microfluidic biochips overcome these shortages by being automated and more than 14 times faster. More recently, Chen *et al.* (2018) successfully developed an automated microfluidic microarray to detect four mycotoxins. Detection of T-2 and AFB1 was achieved in

30 min with a prototyping non-portable fluorescence detection platform providing slightly better LODs than the ones reported here. In contrast to our work, toxin-BSA conjugates were immobilized on the microarray, therefore, toxin standards are required for assay production and have to be handled in a safe manner complicating the manufacturing process. Moreover, chemical conjugation to carrier proteins, such as BSA, requires high amounts of toxin standard due to a poor efficiency of the conjugation process (Xiao *et al.*, 1995). Szkola *et al.* (2013) circumvent this drawback of chemical derivatization by direct immobilization of the native toxin on chemiluminescence microarray chips for detection of three phycotoxins in shellfish within 20 min with LODs in the ng/mL-range. Unlike such microarrays with chemiluminescence read out, electrochemical microarrays do not require luminescence reagents, thus disadvantages, such as the lack of photostability and a low quantum yield, are eliminated. Furthermore, electrochemical microarrays have the advantage that relatively simple, robust and portable read out devices can be used, whereas microarrays using fluorescence or chemiluminescence read out mostly require more sophisticated instrumentation. Uludag *et al.* (2016) developed an electrochemical readable microchip for detection of AFB1 utilizing an oriented immobilization of anti-toxin antibodies facilitated by protein A bound on the electrode via a self-assembled monolayer. Despite the fact that an oriented immobilization of capture antibodies can lead to an enhanced sensitivity, the here developed assay for AFM1 utilizing a random orientation is up to 10 times more sensitive. Recently, Bratakou *et al.* (2017) developed a potentiometric STX sensor based on graphene nanosheets electrodes leading to a highly sensitive system with a LOD of 0.3 ng/mL STX. Production of pure graphene sheets is elaborate and quite expensive, whereas the electrical biosensor can be easily and inexpensively manufactured on a large scale (gold electrodes on a low-cost silicon oxide substrate). A noticeable trend is the simultaneous measurement of multiple toxins in one sample. The configuration of the presented biochip would allow the detection of up to six toxins in duplicates on the same biochip including two Pos.Co. and Neg.Co. positions. Because implementation of anti-idiotypic antibodies in electrochemical immunoassay-based read out platforms has not been described so far, the electrochemical competitive immunoassays for detection of STX, T-2/HT-2 and AFM1 were designed in singleplex formats as a proof-of-concept for the implementation of anti-idiotypic antibodies on electrical biochips.

Moreover, the presented biochip assays in combination with the detection platform exploit key features of electrochemical biochip technology, particularly automatization of assay workflow as well as portability (Farré *et al.*, 2009). Considering the rapid assay

time (16.7 min) on a portable platform as well as the high sensitivity of the assays, a promising tool for rapid on-site detection of toxic food contaminants by overcoming the sensitivity limitations of LFAs (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009) was established. A multicolor LFA applying different nanoparticles reported by Xu *et al.* (2018) enables the parallel detection of AFB1, zearalenone, and T-2 within 20 min with LODs of 0.5, 2 and 30 ng/mL, respectively. There is no specialized read out equipment required; therefore, this LFA is optimally suited for on-site analysis. Nevertheless, sensitivity of the electrochemical biochip method developed in this study showed a slightly improved LOD for AFM1 and a dramatically lower LOD for T-2 applying a similar assay time. In the past decades, anti-idiotypic antibodies have been most common applied in microplate-based immunoassays. Wang *et al.* (2013) produced camelid anti-idiotypic heavy chain single domain antibodies and applied these antibodies in a competitive immunoassay format as coating antigen for detection of aflatoxins achieving a sensitive immunoassay setup with an  $IC_{50}$  of 0.16 ng/mL for AFB1. However, assay time was approximately 135 min and assay protocol was laborious mainly due to the use of conventional 96-well microplates. The here developed assay utilized automated biochip technology with a minimal hands-on time for the user. Szkola *et al.* (2014) implemented monoclonal anti-idiotypic antibodies on microarray glass slides to achieve a simultaneous detection of proteotoxins and low molecular weight toxins in the field of biosecurity. The anti-idiotypic antibody was utilized as coating antigen in an indirect assay for detection of STX with an automated chemiluminescence platform. A LOD of 2.3 ng/mL was achieved with an  $IC_{50}$  of 10.1 ng/mL and a CV of 28%. The here reported electrochemical detection leads to a 2-fold improvement of the sensitivity (LOD: 1 ng/mL,  $IC_{50}$ : 6.1 ng/mL). Moreover, the generated current signals were more stable ( $CV_{\text{inter-chip}}$ : 14.5%) enabling an improved assay reproducibility. In addition to STX, aflatoxins as well as T-2/HT-2 are listed in the Australia group export control list and are regarded as probable candidates for biosecurity screenings (AG, 2018). Thus, applying the developed assays, the robust and fast on-site detection system, pBDi, may also be used as a tool for monitoring these toxins in different samples after deliberate release in the future. Recently, anti-idiotypic antibodies were also utilized in LFAs. Tang *et al.* (2017) immobilized anti-idiotypic nanobodies on the nitrocellulose membrane of the LFA for detection of AFB1 as well as zearalenone using Eu/Tb (III) nanospheres for time-resolved fluorescence read out. In this study, a LOD of 0.05 and 0.07 ng/mL for AFB1 and zearalenone, respectively, was achieved. In contrast to traditional LFAs, a fluorescence read out requires a portable fluorescence reader for on-site use.

To emphasize the practical application of the developed assays, the biochip assays have been used for qualitative screening of an acute exposure to STX, T-2 and AFB1. It was shown that STX, HT-2 and AFM1 are detected as relevant biomarkers in urine with a low false positive rate ( $\leq 5\%$ ) in fortified urine samples. The developed STX biochip assay is applicable to detect relevant clinical concentrations of STX in urine. Post-mortem examinations of urine from victims who died after consumption of contaminated shellfish revealed an urinary toxin profile dominated by STX (up to 50%) including up to 1800 ng/mL STX equivalents (Llewellyn *et al.*, 2002). Moreover, the diagnosis of STX intoxications in patients with suspected PSP was confirmed by detecting STX in urine (Knaack *et al.*, 2016). Recently, Coleman *et al.* (2018) reported a non-fatal case with a urinary toxin profile dominated by GTX-1/-4 and GTX-2/-3. The urine specimen contained 433 ng/mL GTX-2/-3 (44.8%) and only 15 ng/mL STX (1.7%) demonstrating the necessity for assays exhibiting broad specificity to all PSP toxins. No case reports were published describing an acute exposition to T-2 in combination with the analysis of urinary T-2 metabolites. A first hint assessing HT-2 as biomarker in human biological fluids is provided by a study analyzing human milk samples to estimate mycotoxin exposure to mothers and infants (Rubert *et al.*, 2014). HT-2 was detected in 29% of the samples showing the highest concentration level among the addressed type A trichothecenes (62.5 ng/mL HT-2). The main drawback of HT-2 analysis in urine is the species-dependent elimination route. In animals, elimination occurs within 24 h in faeces and urine, whereas *in vivo* studies addressing the elimination route in humans are not available. For the detection of AFM1 in urine, about 1-2% of ingested AFB1 appears as AFM1 in urine (Groopman and Kensler, 1993). Everley *et al.* (2007) analyzed the urine of a rat administered a dose of AFB1 corresponding to the dose of aflatoxin ingested by human adults during outbreaks in Asia. AFM1 was detected as the major metabolite in urine with a concentration of 48.8 ng/mL indicating that the AFM1 biochip assay presented here can be utilized for detection of relevant concentrations of AFM1 in urine after an aflatoxicosis incident. These studies clearly illustrate that the presented biochip assays detect the biomarkers STX, HT-2 and AFM1 in relevant concentrations with a low false positive rate in urine samples. Therefore, the presented assays in combination with the on-site detection platform pBDi demonstrate the potential for diagnosing of chronic or acute exposure to low molecular weight toxins by rapid and sensitive detection of relevant biomarkers in urine.



## Conclusions

This paper describes the development of electrochemical biochip assays based on anti-idiotypic antibodies for fast detection of the low molecular weight toxins STX, T-2/HT-2 and AFM1. The biochips were processed in the on-site detection platform pBDi providing a fully automated system with an assay time of 16.7 min. With the optimization of capture and detector antibody concentration, a highly sensitive detection of these toxins with a broad specificity within the toxin group was achieved. The method was proved for the detection of these toxins in urine as biomarkers for toxin exposure. Further work is in progress to implement the singleplex assays for STX, T-2/HT-2 and AFM1 on one biochip allowing multiplex low molecular weight toxin detection as well as development of new reagents enabling improved broad specific detection within the toxin group.

## Conflict of Interest

KS, CP and TE are current employees of Bruker Daltonik GmbH. Bruker Daltonik GmbH has licensed the electrochemical biochip technology according to EP 1200817 B1 from Fraunhofer Institute for Silicon Technology (Itzehoe, Germany). This does not alter our adherence to all *Frontiers in Chemistry* policies on sharing data and materials.

## Author Contributions

KS and CP conceived and designed the experiments for the biochip-based assays. KS performed the experiments for assay implementation on the biochips, analyzed the data and wrote the first draft of the manuscript. CP and EM supervised KS, reviewed and edited the draft of the manuscript. RD conceived and designed the experiments for preparing the monoclonal antibodies. CP, TE, RD and EM contributed to the writing of the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This work was funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) of Germany [SensTox project, support code 13N13791 and 13N13795].

## References

- Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairi, A.A., Kaushik, N.K., et al. (2017). T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget* 8(20), 33933-33952. doi: 10.18632/oncotarget.15422.
- AG (2018). Australia Group Common Control List Handbook Volume II: Biological Weapons-Related Common Control Lists [Online]. Australia Group. Available: <https://australiagroup.net/en/documents/Australia-Group-Common-Control-List-Handbook-Volume-II.pdf> [Accessed 24 October 2018].
- Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., and Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14, 10-35. doi: 10.1016/j.hal.2011.10.012.
- Bratakou, S., Nikoleli, G.-P., Siontorou, C.G., Nikolelis, D.P., Karapetis, S., and Tzamtzis, N. (2017). Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Saxitoxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Anti-STX Using Graphene Electrodes. *Electroanalysis* 29(4), 990-997. doi: 10.1002/elan.201600652.
- Chanh, T.C., Siwak, E.B., and Hewetson, J.F. (1991). Anti-idiotype-based vaccines against biological toxins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 108(2), 183-193. doi: 10.1016/0041-008X(91)90109-R.
- Chen, Y., Meng, X., Zhu, Y., Shen, M., Lu, Y., Cheng, J., et al. (2018). Rapid detection of four mycotoxins in corn using a microfluidics and microarray-based immunoassay system. *Talanta* 186, 299-305. doi: 10.1016/j.talanta.2018.04.064.
- Coleman, R.M., Ojeda-Torres, G., Bragg, W., Fearey, D., McKinney, P., Castrodale, L., et al. (2018). Saxitoxin Exposure Confirmed by Human Urine and Food Analysis. *J Anal Toxicol* 42(7), e61-e64. doi: 10.1093/jat/bky031.
- CRLs (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) [Online]. Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Available: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_vet-med-residues\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf) [Accessed 08 October 2018].
- Dietrich, R., Schneider, E., Usleber, E., and Märthlbauer, E. (1995). Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. *Natural Toxins* 3(4), 288-293. doi: 10.1002/nt.2620030423.
- EC (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Official Journal of the European Community* L221, 8-36.
- Elsholz, B., Worl, R., Blohm, L., Albers, J., Feucht, H., Grunwald, T., et al. (2006). Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal Chem* 78(14), 4794-4802. doi: 10.1021/ac0600914.
- Everley, R.A., Ciner, F.L., Zhan, D., Scholl, P.F., Groopman, J.D., and Croley, T.R. (2007). Measurement of aflatoxin and aflatoxin metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 31(3), 150-156.
- Farré, M., Kantiani, L., Pérez, S., Barceló, D., and Barceló, D. (2009). Sensors and biosensors in support of EU Directives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(2), 170-185. doi: 10.1016/j.trac.2008.09.018.
- García, C., del Carmen Bravo, M., Lagos, M., and Lagos, N. (2004). Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 43(2), 149-158. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.018.

Gessner, B.D., Middaugh, J.P., and Doucette, G.J. (1997). Paralytic shellfish poisoning in Kodiak, Alaska. *Western Journal of Medicine* 167(5), 351-353.

Granqvist, N., Hanning, A., Eng, L., Tuppurainen, J., and Viitala, T. (2013). Label-enhanced surface plasmon resonance: a new concept for improved performance in optical biosensor analysis. *Sensors (Basel, Switzerland)* 13(11), 15348-15363. doi: 10.3390/s131115348.

Groopman, J.D., and Kensler, T.W. (1993). Molecular biomarkers for human chemical carcinogen exposures. *Chem Res Toxicol* 6(6), 764-770.

Guan, D., Li, P., Cui, Y., Zhang, Q., and Zhang, W. (2011). A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M1 in milk. *Anal Chim Acta* 703(1), 64-69. doi: 10.1016/j.aca.2011.07.011.

He, J., Fan, M.-T., Liang, Y., and Liu, X.-J. (2010). Application of Anti-idiotypic Antibody in Small Molecules Immunoassay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 38(9), 1366-1370. doi: 10.1016/S1872-2040(09)60068-2.

Jerne, N.K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 125c(1-2), 373-389.

Knaack, J.S., Porter, K.A., Jacob, J.T., Sullivan, K., Forester, M., Wang, R.Y., et al. (2016). Case diagnosis and characterization of suspected paralytic shellfish poisoning in Alaska. *Harmful Algae* 57(Pt B), 45-50. doi: 10.1016/j.hal.2016.03.006.

Lin, Y., Zhou, Q., Lin, Y., Tang, D., Chen, G., and Tang, D. (2015). Simple and sensitive detection of aflatoxin B1 within five minute using a non-conventional competitive immunosensing mode. *Biosensors and Bioelectronics* 74, 680-686. doi: 10.1016/j.bios.2015.07.029.

Llewellyn, L.E., Dodd, M.J., Robertson, A., Ericson, G., de Koning, C., and Negri, A.P. (2002). Post-mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon* 40(10), 1463-1469. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00164-2.

McGrath, T.F., Elliott, C.T., and Fodey, T.L. (2012). Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(1), 75-92. doi: 10.1007/s00216-011-5685-9.

McNamee, S.E., Elliott, C.T., Greer, B., Lochhead, M., and Campbell, K. (2014). Development of a Planar Waveguide Microarray for the Monitoring and Early Detection of Five Harmful Algal Toxins in Water and Cultures. *Environmental Science & Technology* 48(22), 13340-13349. doi: 10.1021/es504172j.

Nebling, E., Grunwald, T., Albers, J., Schäfer, P., and Hintsche, R. (2004). Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays. *Analytical Chemistry* 76(3), 689-696. doi: 10.1021/ac0348773.

Nia, Y., Rodriguez, M., Zeleny, R., Herbin, S., Auvray, F., Fiebig, U., et al. (2016). Organization and ELISA-Based Results of the First Proficiency Testing to Evaluate the Ability of European Union Laboratories to Detect Staphylococcal Enterotoxin Type B (SEB) in Buffer and Milk. *Toxins* 8(9), 268.

Pöhlmann, C., and Elßner, T. (2018). "Field-Based Multiplex Detection of Biothreat Agents," in *Enhancing CBRNE Safety & Security: Proceedings of the SICCC 2017 Conference*, eds. A. Malizia & M. D'Arienzo. (Cham: Springer), 31-39.

Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., and van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393(2), 569-582. doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.

Rubert, J., Leon, N., Saez, C., Martins, C.P., Godula, M., Yusa, V., et al. (2014). Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 820, 39-46. doi: 10.1016/j.aca.2014.02.009.

Shu, M., Xu, Y., Liu, X., Li, Y., He, Q., Tu, Z., et al. (2016). Anti-idiotypic nanobody-alkaline phosphatase fusion proteins: Development of a one-step competitive enzyme immunoassay for fumonisin B1 detection in cereal. *Anal Chim Acta* 924, 53-59. doi: 10.1016/j.aca.2016.03.053.

Shu, M., Xu, Y., Wang, D., Liu, X., Li, Y., He, Q., et al. (2015). Anti-idiotypic nanobody: A strategy for development of sensitive and green immunoassay for Fumonisin B(1). *Talanta* 143, 388-393. doi: 10.1016/j.talanta.2015.05.010.

Szkola, A., Campbell, K., Elliott, C.T., Niessner, R., and Seidel, M. (2013). Automated, high performance, flow-through chemiluminescence microarray for the multiplexed detection of phycotoxins. *Anal. Chim. Acta* 787(1), 211-218. doi: 10.1016/j.aca.2013.05.028.

Szkola, A., Linares, E.M., Worbs, S., Dorner, B.G., Dietrich, R., Märtlbauer, E., et al. (2014). Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *Analyst* 139(22), 5885-5892. doi: 10.1039/c4an00345d.

Tang, X., Li, P., Zhang, Q., Zhang, Z., Zhang, W., and Jiang, J. (2017). Time-Resolved Fluorescence Immunochemical Assay Developed Using Two Idiotype Nanobodies for Rapid, Quantitative, and Simultaneous Detection of Aflatoxin and Zearalenone in Maize and Its Products. *Anal Chem* 89(21), 11520-11528. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02794.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta* 632(2), 168-180. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.010.

Uludag, Y., Esen, E., Kokturk, G., Ozer, H., Muhammad, T., Olcer, Z., et al. (2016). Lab-on-a-chip based biosensor for the real-time detection of aflatoxin. *Talanta* 160, 381-388. doi: 10.1016/j.talanta.2016.07.060.

Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G.J.A., and Waldock, M. (1993). Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J.Natural Toxins* 2, 41-83.

Vidal, J.C., Bonel, L., Ezquerro, A., Hernandez, S., Bertolin, J.R., Cubel, C., et al. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosens Bioelectron* 49, 146-158. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.008.

Wang, Y., Li, P., Majkova, Z., Bever, C.R.S., Kim, H.J., Zhang, Q., et al. (2013). Isolation of alpaca anti-idiotypic heavy chain single domain antibody for the aflatoxin immunoassay. *Analytical chemistry* 85(17), 8298-8303. doi: 10.1021/ac4015885.

Wang, Y., Liu, N., Ning, B., Liu, M., Lv, Z., Sun, Z., et al. (2012). Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip. *Biosensors and Bioelectronics* 34(1), 44-50. doi: 10.1016/j.bios.2011.12.057.

Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., and Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(5), 1106-1122. doi: 10.1093/ajcn/80.5.1106.

Worbs, S., Skiba, M., Bender, J., Zeleny, R., Schimmel, H., Luginbuhl, W., et al. (2015). An International Proficiency Test to Detect, Identify and Quantify Ricin in Complex Matrices. *Toxins (Basel)* 7(12), 4987-5010. doi: 10.3390/toxins7124859.

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., and Yuan, Z. (2010). Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metab Rev* 42(2), 250-267. doi: 10.1080/03602530903125807.

Xiao, H., Clarke, J.R., Marquardt, R.R., and Frohlich, A.A. (1995). Improved Methods for Conjugating Selected Mycotoxins to Carrier Proteins and Dextran for Immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(8), 2092-2097. doi: 10.1021/jf00056a025.

Xu, L., Zhang, Z., Zhang, Q., Zhang, W., Yu, L., Wang, D., et al. (2018). An On-Site Simultaneous Semi-Quantification of Aflatoxin B1, Zearalenone, and T-2 Toxin in Maize- and Cereal-Based Feed via Multicolor Immunochromatographic Assay. *Toxins* 10(2), 87. doi: 10.3390/toxins10020087.

## Supplementary Material

**Supplementary Table 1: Comparison of the developed anti-idiotypic antibody biochip with biosensors using traditional toxin-protein conjugates to detect phycotoxins as well as mycotoxins.**

Automatization and portability are solely based on what is reported by the authors, although it may be possible that all the methods can be engineered in order to have these characteristics.

Toxin	Biosensor surface	Detection principle	LOD in buffer (ng/mL)	Assay time (min)	Integration in a detection platform		Application	Reference
					Fully automated	Portable		
STX	Singleplex microarray on gold electrode with anti-idiotypic mAb as capture	Electro-chemical	1	16.7	Yes	Yes	Urine	Our study
STX DA OA	Multiplex microarray on glass slide with toxin as capture	Chemiluminescence	1 0.5 0.3	20	Yes	Yes	Food	Szkola et al. (2013)
STX	Singleplex graphene nanosheet electrode with anti-STX pAb as capture incorporated into lipids	Electro-chemical	0.3	5-20	Yes	No	Water, food	Bratakou et al. (2017)
T-2 HT-2	Singleplex microarray on gold electrode with anti-T-2/HT-2 mAb as capture	Electro-chemical	0.4 1.5	16.7	Yes	Yes	Urine	Our study
AFM1	Singleplex microarray on gold electrode with anti-AFM1 mAb as capture	Electro-chemical	0.3	16.7	Yes	Yes	Urine	Our study
T-2 AFB1 OTA ZEN	Multiplex microarray on glass slide with BSA-toxin conjugate as capture	Fluorescence	0.12 0.03 1.24 0.58	30	Yes	No	Water, feed	Chen et al. (2018)

AFB1	Singleplex microarray on gold electrode with Protein A coupled to SAM	Electro-chemical	2	25	Yes	Yes	Food	Uludag et al. (2016)
AFM1 AFB1 T-2 DON OTA ZEN	Multiplex microarray on agarose-modified glass slide with BSA-toxin conjugate as capture	Fluorescence	0.24 0.01 0.05 15.45 15.39 0.01	240	No	No	Water	Wang et al. (2012)

Abbreviations: DA = Domoic acid; OA = Okadaic acid; OTA = Ochratoxin; ZEN = Zearalenone; DON = Deoxynivalenol; SAM = Self-assembled monolayer; BSA = Bovine serum albumin; mAb = Monoclonal antibody; pAb = Polyclonal antibody

## References

- Bratakou, S., Nikoleli, G.-P., Siontorou, C.G., Nikolelis, D.P., Karapetis, S., and Tzamtzis, N. (2017). Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Saxitoxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Anti-STX Using Graphene Electrodes. *Electroanalysis* 29(4), 990-997. doi: 10.1002/elan.201600652.
- Chen, Y., Meng, X., Zhu, Y., Shen, M., Lu, Y., Cheng, J., et al. (2018). Rapid detection of four mycotoxins in corn using a microfluidics and microarray-based immunoassay system. *Talanta* 186, 299-305. doi: 10.1016/j.talanta.2018.04.064.
- Szkola, A., Campbell, K., Elliott, C.T., Niessner, R., and Seidel, M. (2013). Automated, high performance, flow-through chemiluminescence microarray for the multiplexed detection of phycotoxins. *Anal. Chim. Acta* 787(1), 211-218. doi: 10.1016/j.aca.2013.05.028.
- Uludag, Y., Esen, E., Kokturk, G., Ozer, H., Muhammad, T., Olcer, Z., et al. (2016). Lab-on-a-chip based biosensor for the real-time detection of aflatoxin. *Talanta* 160, 381-388. doi: 10.1016/j.talanta.2016.07.060.
- Wang, Y., Liu, N., Ning, B., Liu, M., Lv, Z., Sun, Z., et al. (2012). Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immuno chip. *Biosensors and Bioelectronics* 34(1), 44-50. doi: 10.1016/j.bios.2011.12.057.

## 2. Publikation 2

### **An Electrochemical Fiveplex Biochip Assay Based on Anti-Idiotypic Antibodies for Fast On-Site Detection of Bioterrorism Relevant Low Molecular Weight Toxins**

Katharina Schulz<sup>1,2,†</sup>, Christopher Pöhlmann<sup>1,†</sup>, Richard Dietrich<sup>2</sup>, Erwin Märtlbauer<sup>2,\*</sup>, Thomas Elßner<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup> Bruker Daltonik GmbH, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany

<sup>2</sup> Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim, Germany

\* Corresponding author

† Present address: Bruker Optik GmbH, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany

#### **Journal:**

**Toxins, 2019 11(12): 696**

#### **DOI:**

**10.3390/toxins11120696**

**Keywords:** electrochemical biochip; multiplex on-site detection; anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking reagents; bioterrorism; low molecular weight toxins; saxitoxin; microcystins; trichothecenes; aflatoxins



## Abstract

Modern threats of bioterrorism force the need for multiple detection of biothreat agents to determine the presence or absence of such agents in suspicious samples. Here, we present a rapid electrochemical fiveplex biochip screening assay for detection of the bioterrorism relevant low molecular weight toxins saxitoxin, microcystin-LR, T-2 toxin, roridin A and aflatoxin B1 relying on anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking reagents. The proposed method avoids the use of potentially harmful toxin-protein conjugates usually mandatory for competitive immunoassays. The biochip is processed and analyzed on the automated and portable detection platform pBDi within 13.4 min. The fiveplex biochip assay revealed toxin group specificity to multiple congeners. Limits of detection were 1.2 ng/mL, 1.5 ng/mL, 0.4 ng/mL, 0.5 ng/mL and 0.6 ng/mL for saxitoxin, microcystin-LR, T-2 toxin, roridin A or aflatoxin B1, respectively. The robustness of the fiveplex biochip for real samples was demonstrated by detecting saxitoxin, microcystin-LR, HT-2 toxin, roridin A and aflatoxin B1 in contaminated human blood serum without elaborate sample preparation. Recovery rates were between 52–115% covering a wide concentration range. Thus, the developed robust fiveplex biochip assay can be used on-site to quickly detect one or multiple low molecular weight toxins in a single run.

## Key Contribution

This is the first demonstration of a fiveplex electrochemical biochip assay solely based on monoclonal anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking molecules enabling the user-safe, sensitive and parallel detection of highly toxic low molecular weight toxins with potential bioterrorism relevance within 13.4 min. In combination with the automated and portable biochip processing platform pBDi, the robust fiveplex biochip assay is ideal suited for on-site testing. To illustrate this capability, the detection of multiple low molecular weight toxins in human serum samples was demonstrated.

## Introduction

Human intoxications caused by low molecular weight toxins, such as cyanotoxins and mycotoxins, are global phenomena occurring mostly through contact with contaminated food or from environmental exposure. Among the cyanotoxins, paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins and microcystins (MCs) are two toxin groups encompassing the highest number of toxic structural variants. PSP toxins are chemically related neurotoxins comprising up to 58 congeners with saxitoxin (STX) being the most toxic one [1]. Most of the PSP poisoning events have been reported

from the consumption of marine-derived seafood which can even contain lethal concentrations of PSP toxins [2], whereas intoxications caused by MCs are a result of contaminated drinking water [3]. MCs are cyclic heptapeptides characterized by their potent hepatotoxic properties [4]. Especially, the high variation of the L-amino acid residue at position two and four of MCs leads to up to 246 congeners, with the highly toxic microcystin-LR (MC-LR) being the most common congener [5]. Another health threat is associated with intoxication events caused by two groups of mycotoxins, the cytotoxic trichothecenes and carcinogenic aflatoxins. While T-2 toxin (T-2) and HT-2 toxin (HT-2) belong to the type A trichothecenes constituting the majority of contaminants in food, the macrocyclic type D trichothecenes including roridin A (RoA) have attracted more attention as an indoor pollutant [6]. Among the 20 identified aflatoxins, aflatoxin B1 (AFB1) is the most toxic and most commonly occurring toxin of this group associated with food contamination [7]. Due to a high toxicity, stability and accessibility, STX, MCs, T-2 and aflatoxins are regarded as potential biological warfare agents [8], and therefore, noted in the list of human and animal pathogens and toxins for export control of the Australia Group [9]. Additionally, STX is listed in Schedule 1 of the Chemical Weapons Convention. Exposure to these low molecular weight toxins leads to rapid onset (min to h) of non-specific symptoms ranging from headache, nausea, vomiting and diarrhea to muscle paralysis and coma in severe cases [10]. In case of a deliberate release of such agents, rapid screening tools must assess the exposure level of individuals to prominent biological agents. Thus, testing biological fluids like blood serum for the presence of multiple toxins is preferable to assess a poisoning event. Multiple case reports documented the presence of the cyanotoxins STX and MCs in serum samples covering concentrations of 4.9–14 ng/mL during acute illness for STX [11] or up to 130 ng/mL MC-LR in fatal cases [12]. Serum samples from healthy individuals exposed to environmental molds were tested positive for various mycotoxins, including type D trichothecenes (up to 82 ng/mL) [13] and AFB1 (up to 0.492 ng/mL) [14]. HT-2, the primary metabolite of T-2, was detected in blood of animals exposed to T-2 [15].

Detection of multiple low molecular weight toxins is often achieved by multi-class methods utilizing chromatographic and/or mass spectrometry-based approaches [16]. While these methods achieve exceptional detection sensitivities, they all suffer from the common requirement of expensive laboratory equipment, skilled operators and complicated multi-step sample pretreatments to perform analysis. To provide a sensitive and easy-to-use detection system with fast response times, a variety of screening approaches based on immunoassay methods combined with different signal

transduction principles have been developed, including magnetic microsphere-based assays [17] or fluorescence polarization assays [18]. While offering a high degree of multiplexing, they mostly rely on complex optics or moving parts and are, therefore, also not ideally suited for use in the field [19]. For point-of-care or on-site testing for medical diagnostics or food and environmental monitoring, lateral flow immunoassays (LFAs) are the best-known low cost, rapid and easy-to-use testing systems, but mostly suffering from insufficient analytical sensitivity [20]. As a consequence, intensive research was focused on alternative electrochemical transduction of biological binding events, which offer high sensitivity along with cost- and time-effectiveness [21]. Another advantage of electrochemical biochips is the potential for miniaturization and portability as well as their simple integration in low-cost devices [22]. One major analytical challenge of on-site immuno-based detection of low molecular weight toxins is the generation of broad-specific antibodies recognizing a variety of congeners within a toxin group. However, the used antibodies must also be highly specific and should not detect any unrelated toxins [23]. Therefore, most desirable for on-site testing would be a broad-reactive immuno-based assay capable to detect all congeners of the respective toxin group.

All these immunoassay-based approaches rely on a competitive test format, because haptens do not have multiple epitopes for the simultaneous binding of two antibodies. Therefore, conjugation of the toxin to carrier proteins used for coating or to a label competing with the free toxin in the sample for binding to toxin specific capture antibodies is required, which can be considered as a major drawback of competitive assays applied to detection of low molecular weight toxins. Synthesis of toxin-protein conjugates can be time-consuming due to complicated coupling procedures leading to randomly cross-linked and unstable molecules which can reduce assay sensitivity [24]. Especially for MCs and aflatoxins, manipulation of these carcinogenic compounds could be hazardous for operators and the environment. Due to coverage of STX by the Chemical Weapons Classification, handling and distribution of STX is also strongly regulated. Therefore, replacement of these toxic reagents by alternative recognition elements, such as aptamers [25], molecularly imprinted polymers (MIPs) [26] and intact cells [27], or by using epitope-mimicking molecules, such as synthetic peptides [28], phage-displayed peptides [29] and anti-idiotypic antibodies [30], promise a more straightforward assay development. Particularly, anti-idiotypic antibodies of  $\beta$ -type (Ab2) raised against the paratope of the toxin specific antibody (Ab1) mimic the epitope of the target toxin and compete with the analyte for specific binding to the corresponding Ab1 [31], and can be used either as capture antigen [32], as competing

detection reagent [33] or as surrogate toxin [34] in immunoassays. Previously, we reported the utilization of monoclonal Ab2 (mAb2) to develop microarrays for singleplex detection of STX, T-2/HT-2 or aflatoxin M1 (AFM1) and proved their applicability for analyzing human urine samples [35].

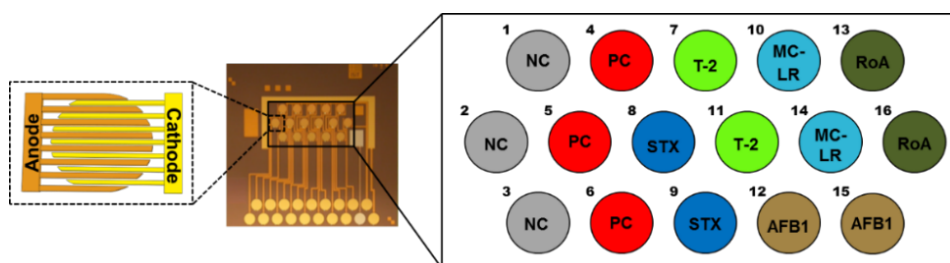
In this work, we present for the first time a fiveplex electrochemical biochip assay for on-site detection of low molecular weight toxins relying solely on anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking molecules. Moreover, due to the generation of reporter enzyme-labeled monoclonal detection antibodies used as tracer molecules, we demonstrate a straightforward assay allowing simultaneous detection of bioterrorism relevant STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 as well as corresponding congeners with minimal hands-on time using the automated on-site biochip processing platform pBDi (portable BioDetector integrated) [36]. Furthermore, we demonstrated the applicability of the robust multiplex detection system to screen human serum – beside urine another relevant body fluid – for the presence of STX, MC-LR, HT-2, RoA and AFB1 after intentional or natural occurring poisoning incidents.

## Results

### Fiveplex Biochip Assay Design

In-house generated mAbs1 and mAbs2 were tested as capture and detection reagents on the electrical biochip. The ideal capture mAb (mAb1 or mAb2) as well as the concentration used for immobilization were selected during competitive tests prior to the multiplex set-up (data not shown). The utilized mAb pairs for STX, T-2 and AFB1 were the same as those characterized previously in singleplex electrochemical biochip assays [35]. Selection of the respective Ab type as capture is the crucial step regarding assay sensitivity, because the competitive reaction is dependent on the amount and functionality of the mAb on the electrode surface [35] (see also **Figure S1**). Suitable capture mAbs (STX/mAb2, MC-LR/mAb2, T-2/mAb1, RoA/mAb2, AFB1/mAb1) were immobilized onto the biochip in duplicates on interdigitated array (IDA) gold electrodes consisting of two interlocking sets of anodic and cathodic fingers (**Figure 1**). Spotting concentrations of target specific capture mAbs are shown in **Table S1**.

Since all specific capture Abs used are mouse monoclonal immunoglobulins (IgGs), IgGs from non-immunized mice (mouse IgG) were chosen as independent negative control (NC) in a comparable concentration. Biotinylated anti-mouse IgG (anti-mouse IgG-bio) from rabbit was spotted as positive control (PC). Control Abs were immobilized in triplicates.



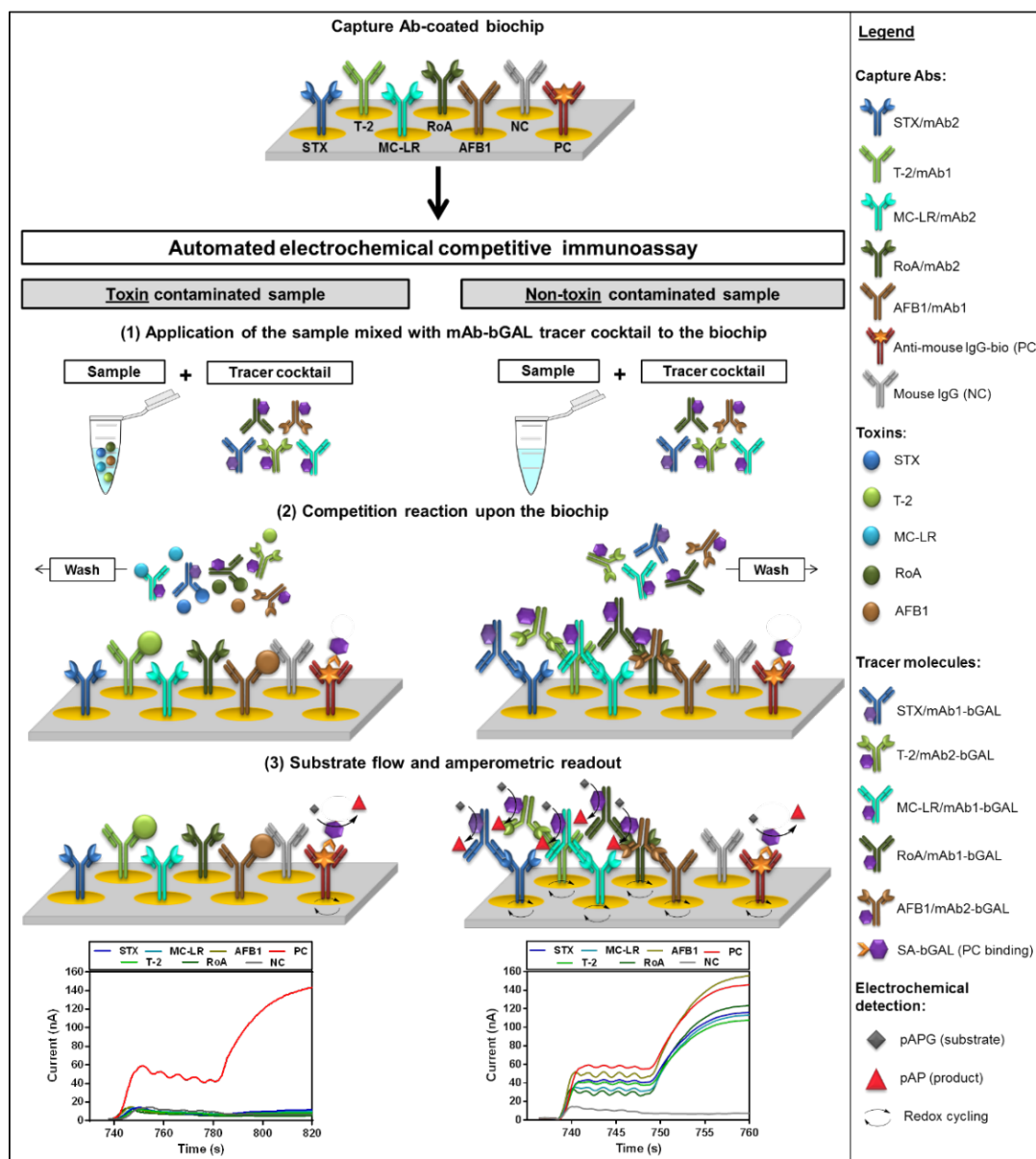
**Figure 1. Electrical biochip based on interdigitated array (IDA) gold electrodes with fiveplex biochip spotting layout.**

For simultaneous detection of saxitoxin (STX; dark blue), microcystin-LR (MC-LR; light blue), T-2 toxin (T-2; light green), roridin A (RoA; dark green) and aflatoxin B1 (AFB1; olive), target specific capture mAbs were immobilized in duplicates. Abs for PC (positive control; red) and NC (negative control; grey) were spotted in triplicates. The numbers indicate the corresponding electrode position on the biochip.

To avoid the use of any toxin-protein conjugates as tracer molecules, we employed monoclonal detection antibody- $\beta$ -D-galactosidase (mAb-bGAL) conjugates for the fiveplex competitive biochip assay. Applied dilutions of mAb-bGAL tracers were optimized by titration (data not shown) and optimal dilutions of mAb-bGAL tracers used in the detection mAb cocktail are presented in **Table S1**. Selection of the optimal tracer dilution was based on a stable maximum signal response (normalized signal close to 100%) with a coefficient of variation (%CV) less than 15%.

A scheme of the assay principle for the established fiveplex electrochemical biochip applying anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking molecules in a competitive format is shown in **Figure 2**. All pumping and incubation steps as well as electrochemical detection are performed by the fully automated on-site biochip processing platform [36]. Prior to the assay, mAb1 (T-2, AFB1) or mAb2 (STX, MC-LR, RoA) were immobilized on specific positions by physisorption on IDA gold electrodes of the biochip. Following the automated application of the sample mixed with a mAb-bGAL tracer cocktail, a competition reaction takes place upon the biochip. In case of a toxin contaminated sample, mode of competition depends on Ab type immobilized on the electrode. For detection of STX, MC-LR and RoA, free toxins in the sample compete with the immobilized mAb2 for binding to the mAb1-bGAL conjugates. In case of T-2 and AFB1, a competition between toxins in the sample and mAb2-bGAL for limiting binding sites of the immobilized mAb1 occurs. For both competition modes, the higher the toxin concentration in the sample, the fewer detection mAb-bGAL conjugates can bind to immobilized capture mAb. For a non-toxin contaminated sample, mAb-bGAL tracers are captured by the respective capture mAb. Following a washing step removing unbound molecules, detection is realized through  $\beta$ -D-galactosidase (bGAL) catalyzed conversion of the electrochemically inactive substrate *p*-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (pAPG) to the electro-

chemically active product *p*-aminophenol (pAP), which in turn, undergoes redox cycling amplifying the signal [37]. At the same time, amperometric response curves are recorded for each electrode position. The generated current is inversely proportional to the toxin concentration in the sample due to the competitive assay principle. Regardless of whether toxins were present in the sample, PC electrode positions always show a high current signal.



**Figure 2.** Schematic procedure of the automated fiveplex anti-idiotypic antibody-based competitive immunoassay for detection of STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 upon an electrochemical biochip.

(1) Application of the sample mixed with monoclonal detection antibody- $\beta$ -D-galactosidase (mAb-bGAL) tracer cocktail to the biochip pre-coated with capture mAbs; (2) Competition reaction upon the biochip; (3) bGAL substrate flow as well as amperometric readout of each electrode position. (Note: Illustrated biochip scheme represents only a small section of the entire electrode positions).

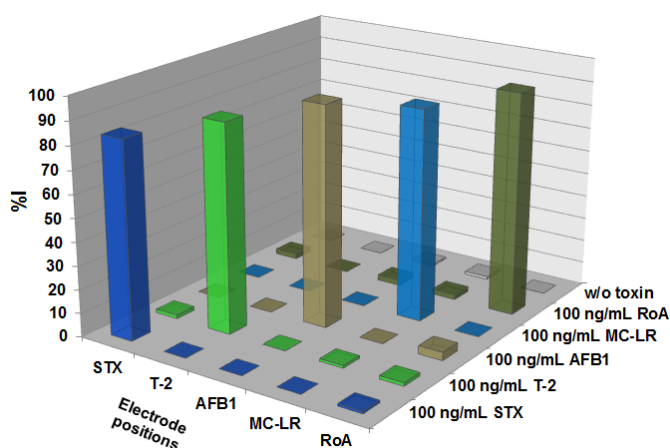
In contrast to the former reported assay set-ups [35] in which biotinylated detection mAbs and a subsequent labeling with streptavidin-bGAL (SA-bGAL) were applied,

here, we used covalently linked mAb-bGAL conjugates as tracer molecules. This modification resulted in a significant reduction of the assay time from 16.7 min to 13.4 min, because the additional incubation step with SA-bGAL (3.3 min) could be omitted. The automated assay program executed by the instrument is summarized in **Table S2**.

### Analytical Characteristics of the Fiveplex Biochip Assay

#### Assay Specificity

A technique that can detect different types of small molecules at the same time represents a more straightforward and rapid analytical approach compared to methods detecting only one type of an analyte. However, specificity is an important parameter for the establishment of multiplex detection methods. To demonstrate the specificity of the established multiplex biochip assay for corresponding toxins, samples containing one particular toxin at a high concentration (100 ng/mL) were tested with the mAb-bGAL tracer cocktail upon the fiveplex biochip exhibiting immobilized capture mAbs on specific electrode positions. As depicted in **Figure 3**, only electrode positions spotted with mAb specific for the corresponding toxin revealed a high signal reduction ( $\%I > 80\%$ ), whereas percent inhibition observed for toxins on electrode positions immobilized with non-corresponding mAbs was less than 4%. Corresponding raw data and extracted slope values are stated in **Figure S2**. Consequently, all tested low molecular weight toxins (STX, T-2, AFB1, MC-LR and RoA) were specifically detected as well as reliably distinguished by the established multiplex assay.



**Figure 3.** Specificity of the multiplex biochip assay for detection of STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1.

One hundred ng/mL of each toxin was applied separately on the multiplex biochip in presence of mAb-bGAL tracer cocktail. Mean normalized signals of target electrode positions are shown as percent inhibition ( $\%I$ ) obtained from four independent measurements ( $n = 8$ , i.e., four biochips with each two target electrode positions).

Furthermore, a method for on-site detection should ideally cover a wide range of multiple variants of one toxin group, i.e., using a broad-specific mAb to detect as much congeners as possible of PSP toxins is preferred. To assess the broad specificity of the fiveplex biochip assay, different PSP toxins, MCs or the structurally related and most abundant congener of the nodularins nodularin-R, type A trichothecenes, type D trichothecenes and aflatoxins were assayed separately at a high concentration (50 ng/mL or 100 ng/mL) in presence of mAb-bGAL tracer cocktail. Results are presented in **Table 1**.

**Table 1. Specificity of the employed antibodies to toxin group congeners.**

Antibody specificity is classified according to the signal reduction efficiency (%I) of the fiveplex biochip assay after applying (i) 100 ng/mL of a PSP toxin, (ii) 50 ng/mL of a MC or nodularin-R, (iii) 100 ng/mL of a type A trichothecene, (iv) 50 ng/mL of a type D trichothecene and (v) 50 ng/mL of an aflatoxin, respectively (n = 4, i.e., two biochips with each two target electrode positions):

+++ high (%I: 100–70%);  
 ++ moderate (%I: <70–40%);  
 + low (%I: <40–10%);  
 - negligible (%I: <10%).

Toxins		Target Electrode Positions for:				
Group	Congener	STX	MC-LR	T-2	RoA	AFB1
PSP toxin	STX	+++	-	-	-	-
	NEO	-	-	-	-	-
	GTX-1/-/4	-	-	-	-	-
	dc-STX	+	-	-	-	-
	GTX-2/-/3	+++	-	-	-	-
	GTX-5	++	-	-	-	-
	dc-NEO	-	-	-	-	-
	dc-GTX-2/-/3	+++	-	-	-	-
	C1/C2	+	-	-	-	-
MC	MC-LR	-	+++	-	-	-
	[DAsp <sup>3</sup> ]MC-LR	-	+++	-	-	-
	MC-RR	-	+++	-	-	-
	MC-YR	-	+++	-	-	-
	MC-LA	-	+	-	-	-
	MC-LY	-	+	-	-	-
	MC-LW	-	+	-	-	-
Nodularin	Nodularin-R	-	+++	-	-	-
Typ A trichothecene	T-2	-	-	+++	-	-
	HT-2	-	-	+++	-	-
	T-2 triol	-	-	-	-	-
	T-2 tetraol	-	-	-	-	-
	Verrucarol	-	-	-	-	-



Typ D trichothecene	RoA	-	-	-	+++	-
	RoE	-	-	-	+++	-
	SatH	-	-	-	++	-
	VerA	-	-	-	+++	-
Aflatoxin	AFB1	-	-	-	-	+++
	AFM1	-	-	-	-	+++
	AFG1	-	-	-	-	+++
	AFB2	-	-	-	-	++
	AFG2	-	-	-	-	++

Abbreviation: NEO = neosaxitoxin, GTX-1/-4 = gonyautoxin 1 and 4, dc-STX = decarbamoyl-saxitoxin, GTX-2/-3 = gonyautoxin 2 and 3, GTX-5 = gonyautoxin 5, dc-NEO = decarbamoylneo-saxitoxin, dc-GTX-2/-3 = decarbamoylgonyautoxin 2 and 3, C1/C2 = *N*-sulfocarbamoylgonyautoxin 2 and 3, RoE = roridin E, SatH = satratoxin H, VerA = verrucarins A, AFG1 = aflatoxin G1, AFB2 = aflatoxin B2, AFG2 = aflatoxin G2.

MAB pairs for STX, MC-LR, RoA and AFB1 exhibit a broad specificity toward the respective toxin group, whereas the mAb pair for T-2 is highly specific for T-2 and HT-2. Data obtained for PSP toxins, type A trichothecenes and aflatoxins confirm previously published results for singleplex assays only [35]. In brief, non-hydroxylated PSP toxins (STX, dc-STX, GTX-2/-3, dc-GTX-2/-3 and GTX-5) were detected, whereas hydroxylated variants like NEO, dc-NEO, and GTX-1/-4 showed no signal reduction at the applied concentration. The mAb pair for T-2 is specific for the most prominent congeners of type A trichothecenes (T-2 and HT-2). Employed antibodies for aflatoxins recognize all five aflatoxins congeners (AFB1, AFM1, AFG1, AFB2 and AFG2) commonly found in food. For the detection of MCs, the most common and/or toxic congeners were chosen [4]. The employed mAb1/mAb2-pair specific for MC-LR recognizes at least all of the seven tested MCs (MC-LR, [DAsp<sup>3</sup>]MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LY and MC-LW) as well as the structurally related nodularin-R with differing sensitivities. The variants MC-LR, [DAsp<sup>3</sup>]MC-LR, MC-RR, MC-YR and nodularin-R showed similar levels of signal reduction, whereas the magnitude of signal reduction was clearly lower for MC-LA, MC-LY, MC-LW indicating that arginine at position four has a great influence on antibody affinity. The mAb pair employed for the detection of type D trichothecenes (e.g., roridins, satratoxins and verrucarins) also shows a wide coverage across macrocyclic trichothecenes with distinctive specificity for roridins (RoA and RoE), followed by verrucarins A (VerA). Signal reduction in the presence of satratoxin H (SatH) was lower than for other tested type D trichothecenes suggesting that the presence of the six-membered ring within the macrocyclic ring system resulted in decreased antibody affinity [38,39]. Of particular importance is the assay's ability to distinguish clearly type A trichothecenes and type

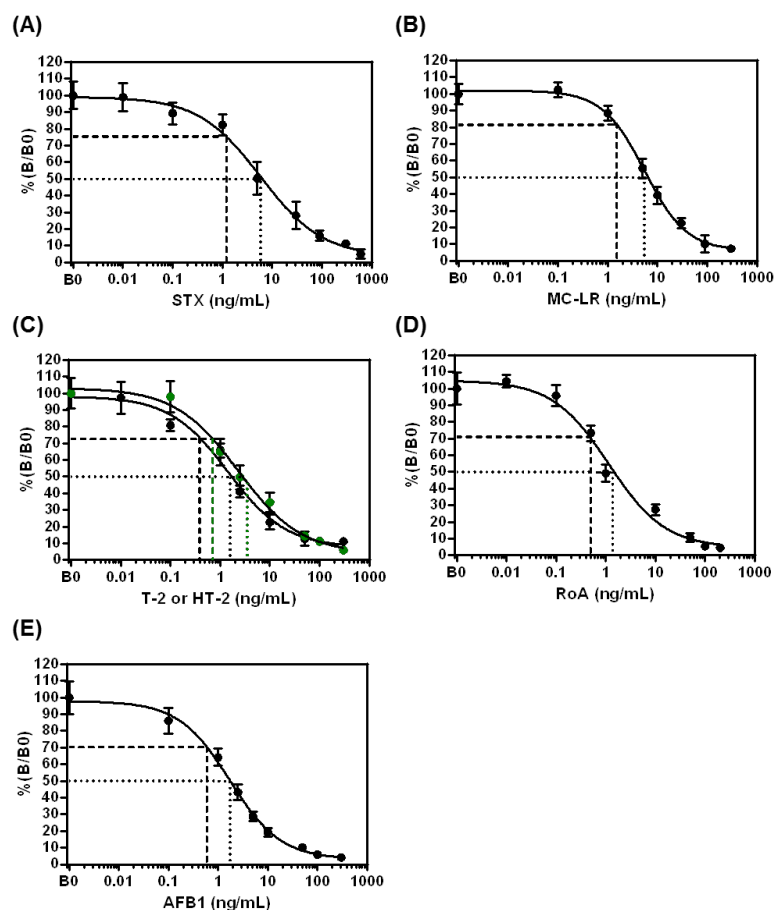
D trichothecenes. None of the assayed type A trichothecenes were bound by the mAb pair specific for RoA, and vice versa. Thus, both mAb1/mAb2-pairs can be regarded as highly specific to their corresponding toxin group.

Overall, no cross-reactivities between different toxin groups are existent, i.e., the magnitude of signal reduction for mAb pairs and non-corresponding toxins was negligible ( $\%I < 10\%$ ).

### Assay Performance

Dose-response curves for STX, MC-LR, T-2, HT-2 and RoA, as well as AFB1 were generated by analyzing different concentrations of toxin solutions in assay buffer (Figure 4).

For all applied toxins, typical sigmoidal shaped curves with negative slopes were obtained proving that the signal is inversely proportional to the toxin concentration.



**Figure 4. Individual dose-response curves for STX, MC-LR, T-2, HT-2 and RoA as well as AFB1 obtained with the electrochemical fiveplex biochip assay.**

Measurements of toxin solutions with different concentrations of (A) STX, (B) MC-LR, (C) T-2 (black circles) and HT-2 (green circles), (D) RoA and (E) AFB1, respectively, were performed in assay buffer ( $n = 6$ , i.e., three biochips with each two target electrode positions; error bars: SD). For determination of B0 values, ten biochips with each two target electrode positions were used ( $n = 20$ ). LOD is stated as dashed line.  $IC_{50}$  is depicted as dotted line. SD = standard deviation; LOD = limit of detection.

Parameters describing assay sensitivity (LOD, IC<sub>50</sub>, IC<sub>30</sub>–IC<sub>80</sub>) obtained from dose-response curves are summarized in **Table 2** indicating that the detection system is capable to detect all toxins in the low ng/mL- to pg/mL-range within a total assay time of 13.4 min. For all toxins, the working range (IC<sub>30</sub>–IC<sub>80</sub>) of the assay covered one to two orders of magnitude above the LOD.

**Table 2. Sensitivity and reproducibility of the fiveplex biochip assay for detection of STX, MC-LR, T-2, HT-2 and RoA as well as AFB1.**

Inter-chip %CV was determined from ten independent experiments (n = 20, i.e., ten biochips with each two target electrode positions). B0 = zero standard; B<sub>IC50</sub> = IC<sub>50</sub> standard.

Toxin	Sensitivity (ng/mL)			Reproducibility (inter-chip %CV)	
	LOD	IC <sub>50</sub>	IC <sub>30</sub> –IC <sub>80</sub>	B0	B <sub>IC50</sub>
STX	1.2	5.9	1.8-56.4	9.9	10.4
MC-LR	1.5	5.5	2.8-31.1	9.2	10.2
T-2	0.4	1.4	0.5-27.4	10.1	9.2
HT-2	0.7	2.4	0.8-25.6		11.6
RoA	0.5	1.2	0.5-10.8	9.6	10.0
AFM1	0.6	1.7	0.6-10.5	11.2	8.2

Ten B0 and ten B<sub>IC50</sub> were measured on different chips to determine the assay precision. Variability of normalized signals for individual toxin concentrations is expressed as inter-chip %CV (**Table 2**). In the absence of toxin (B0), inter-chip variability ranges from 9.2–11.2%. For samples with a toxin concentration at individual IC<sub>50</sub> (B<sub>IC50</sub>), the inter-chip %CV is between 8.2 and 11.6%; thus, reproducibility of the established fiveplex biochip is demonstrated.

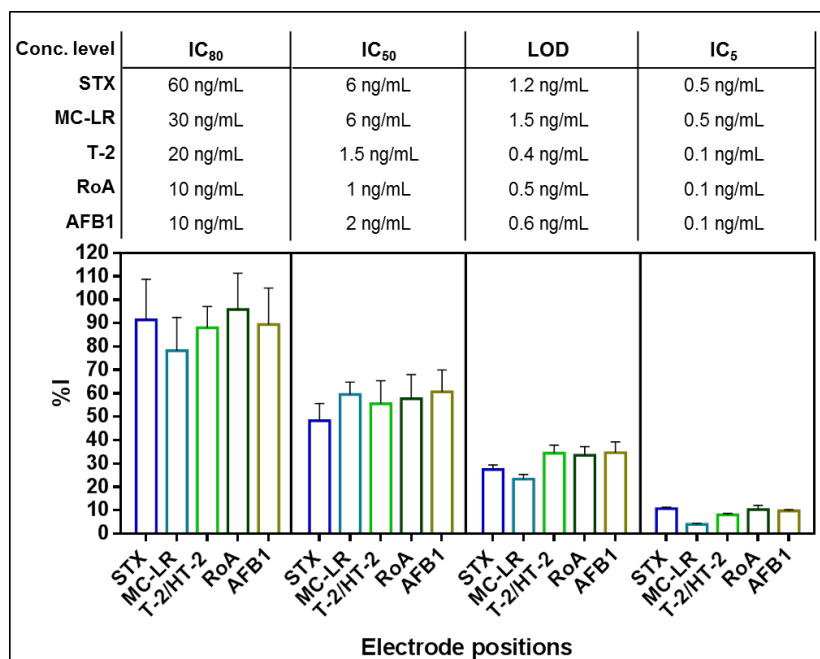
### **Fiveplex Detection of STX, MC-LR, T-2/HT-2, RoA and AFB1 in Buffer and Human Blood Serum**

#### Simultaneous Detection of STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 in Buffer

In order to characterize the ability of the developed multiplex biochip assay to detect STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 simultaneously, all five toxins were applied in mixtures at various concentration levels corresponding to their individual IC<sub>80</sub>, IC<sub>50</sub>, LOD and IC<sub>5</sub> (**Figure 5**).

As depicted in **Figure 5**, all of the five different low molecular weight toxins were detected simultaneously using the fiveplex electrochemical biochip assay. The higher the toxin concentration used, the higher the signal reduction on each target electrode position. Signal responses in the parallel assay coincide with signals observed in biochip experiments performed with single toxin standard solutions demonstrating no

significant cross-talk between different electrode positions at the tested toxin concentrations. Furthermore, it confirms the high specificity of the capture mAbs implemented on the fiveplex biochip for their respective toxin groups as shown in Section 2.4.2.



**Figure 5. Simultaneous detection of STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 in buffer.**

Measurements were performed with toxin mixtures containing STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 close to their individual IC<sub>80</sub>, IC<sub>50</sub>, LOD and IC<sub>5</sub> ( $n = 4$ , i.e., two biochips with each two target electrode positions; error bars: SD). Mean normalized signal of target electrode positions is depicted as %I.

Moreover, unspecific binding of different mAb-bGAL conjugates to NC immobilized with polyclonal mouse IgG was not observed (data not shown).

#### Simultaneous Detection of STX, MC-LR, HT-2, RoA and AFB1 in Serum Samples

To demonstrate the applicability of the proposed fiveplex biochip assay as a rapid on-site screening tool for assessing an intentional or naturally occurring intoxication event caused by highly toxic STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1, parent toxins or metabolites were determined in human serum samples. Human blood serum was spiked in quintuplicate with mixtures of cyanotoxins (STX and MC-LR) and mycotoxins (HT-2, RoA and AFB1) at three different concentration levels (low: 6 ng/mL cyanotoxins, 4 ng/mL mycotoxins; mid: 20 ng/mL cyanotoxins, 10 ng/mL mycotoxins; high: 200 ng/mL cyanotoxins, 100 ng/mL mycotoxins). Additionally, five non-spiked serum samples were tested to estimate the rate of false positive results. In case of the detection of a low molecular toxin in a fortified serum, this sample was classified as correctly identified according to the assumption:

$\%(B/B0)_{\text{Serum}} < \%(B/B0)_{\text{Buffer}}$  at LOD.

In case of blank samples, the criterion for a correct identification is

$\%(B/B0)_{\text{Serum}} \geq \%(B/B0)_{\text{Buffer}}$  at LOD (i.e., as negative).

The recovery rate of spiked serum samples were determined from dose-response curves obtained in assay buffer. Results of the recovery experiments are shown in **Table 3**.

**Table 3. Number of correctly identified serum samples as well as recovery rates for the detection of various concentrations of STX, MC-LR, HT-2, RoA and AFB1 spiked in human serum samples with inter-chip SD, mean  $\%(B/B0)_{\text{Serum}}$ -values and frequency of correctly identified samples obtained from five independent experiments.**

In total, 20 biochips were used for the analysis of serum samples. Spiked serum samples were diluted to obtain an assay concentration within the working range.

Toxin	Spiking conc. (ng/mL)	Assay conc. (ng/mL)	$(B/B0)_{\text{Serum}}^*$ (% $\pm$ SD)	Recovery rate (% $\pm$ SD)	Correctly identified (%)
STX	0	0	96.7 $\pm$ 13.9	-	100
	6	3	60.6 $\pm$ 6.5	113.7 $\pm$ 24.5	100
	20	10	41.7 $\pm$ 8.8	103.2 $\pm$ 16.11	100
	200	20	32.2 $\pm$ 3.6	112.6 $\pm$ 26.1	100
MC-LR	0	0	110.9 $\pm$ 19.8	-	100
	6	3	78.7 $\pm$ 6.5	78.8 $\pm$ 22.7	80
	20	10	46.9 $\pm$ 10.6	93.9 $\pm$ 24.9	100
	200	20	26.3 $\pm$ 4.8	98.2 $\pm$ 22.5	100
HT-2	0	0	117.3 $\pm$ 20.4	-	100
	4	2	67.5 $\pm$ 4.9	51.8 $\pm$ 17.6	100
	10	5	54.3 $\pm$ 10.6	60.6 $\pm$ 8.9	100
	100	10	26.3 $\pm$ 3.5	79.2 $\pm$ 24.3	100
RoA	0	0	101.4 $\pm$ 18.9	-	100
	4	2	38.9 $\pm$ 3.8	87.9 $\pm$ 6.9	100
	10	5	24.7 $\pm$ 2.2	100.7 $\pm$ 13.4	100
	100	10	16.7 $\pm$ 1.7	95.6 $\pm$ 18.2	100
AFB1	0	0	109.6 $\pm$ 17.1	-	100
	4	2	48.7 $\pm$ 6.3	101.1 $\pm$ 31.1	100
	10	5	25.6 $\pm$ 5.1	112.9 $\pm$ 24.6	100
	100	10	17.4 $\pm$ 2.9	114.8 $\pm$ 18.43	100

\* For non-spiked samples (0 ng/mL),  $\%(B0)_{\text{Serum}}/B0_{\text{Buffer}}$ -values are shown.

Despite of the complexity of the blood serum matrix, a dilution of sample matrix with assay buffer was sufficient as sample preparation for electrochemical biochip measurement. All non-spiked serum samples could be confirmed as negative (correctly identified = 100%, i.e., biochip signals for each target analyte were below LOD). Thus,

no false positive results were generated. Furthermore, the established multiplex biosensor was able to detect correctly five out of five samples contaminated with low, medium and high concentration of STX, HT-2, RoA and AFB1 (correctly identified = 100%, i.e., biochip signals for stated target analytes were above LOD). For MC-LR, four out of five samples containing the low concentration (6 ng/mL) were correctly identified (80%), whereas for the medium and high concentration five out of five samples were correctly assessed as positive (100%). The final assayed concentration of MC-LR in the low concentrated serum sample is 3 ng/mL, and thus, only two-fold above LOD obtained in assay buffer (1.5 ng/mL). In combination with a recovery rate lower than 80%, this resulted probably in the false negative detection of MC-LR in one out of five samples. Recovery rates for serum samples contaminated with STX, MC-LR, RoA and AFB1 were close to 100% (STX: 103.2-113.7%, MC-LR: 78.8-98.2%, RoA: 87.9-95.6%, AFB1: 101.1-114.8%), demonstrating the high robustness of the electrochemical biochip assay. For HT-2, recovery rates are clearly lower than for other tested low molecular weight toxins ranging from 51.8-79.2% which indicate a significant matrix effect. One possible explanation might be the presence of serum compounds binding HT-2 in an unspecific manner masking the epitope for binding to the immobilized capture mAb1. This leads to an apparently increased B-value for the applied HT-2 concentration and, thus, to a decreased  $\%(B/B_0)$ -value in serum causing a reduced recovery rate. Nevertheless, non-spiked serum samples and serum samples spiked at the lowest HT-2 concentration of 4 ng/mL (2 ng/mL assay concentration, i.e., three-fold above LOD) could be clearly distinguished and correctly identified.

Overall, these results indicate that the developed fiveplex biochip assay could be successfully applied for multi-toxin screening of human serum samples at relevant clinical concentrations even in the low ng/mL-range applying an automated assay procedure in a portable device.

## Discussion

Low molecular weight toxins such as STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1 possess serious health threat to both humans and animals. Additionally, being ubiquitous in nature, they are relevant in the health and food sector as well as in the security sector. On the one hand, low molecular weight toxins are linked with natural intoxications worldwide causing severe toxicoses. On the other hand, the mentioned toxins are regarded as potential biological warfare agent and, therefore, noted in the list of human and animal pathogens and toxins for export control of the Australia Group [9]. Hence,

both cases demand sensitive detection systems that are capable to detect on-site the presence or absence of these toxins in suspicious samples. Here, we present a multiplex assay suitable for fast screening of human serum samples after an acute intoxication with STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1. All five toxins were reliably detected in spiked serum samples over a wide concentration range from 4-200 ng/mL. However, sparse reports of human poisoning and clinical cases have been described in the literature thus far. At least a few reports of severe or fatal intoxications with STX and MC-LR, respectively, identified concentration levels of 15 ng/mL STX [11, 40] and up to 130 ng/mL MC-LR [12] in serum. A case study about an acute aflatoxicosis outbreak in Africa reported high serum AFB1 level (32.8 ng/mg aflatoxin-albumin adduct) [41]. No clinical case reports were published describing an exposition to trichothecenes with fatal outcome.

Most of the immunochemical methods for low molecular weight toxin detection employ a competitive assay format associated with a major drawback – the use of potentially harmful toxin-protein conjugates as assay reagents. Replacements of these conjugates by epitope-mimicking molecules pave a way for novel assay strategies that embodies a user-safe option to toxin-protein conjugates. However, assays based on epitope-mimicking reagents were exclusively established for single toxin detection so far. Here, we demonstrate for the first time an electrochemical multiplex biochip assay solely based on anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking molecules for simultaneous detection of five low molecular weight toxins (STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1). The newly developed fiveplex biochip assay based on a competitive immunoassay incorporates five key merits:

1. A high level multiplexing biochip to detect multiple potential bioterrorism relevant toxins in a single run.
2. An on-site applicability combined with a short assay time (13.4 min).
3. A multi-congener detection system by employing toxin group specific mAbs.
4. A completely user-safe assay due to waiving of harmful toxin-protein conjugates.
5. A straightforward assay workflow through reporter enzyme-conjugated detection mAbs.

Compared to previously reported assays for the detection of low molecular weight toxins using epitope-mimicking molecules, analytical characteristics of the here developed assay are superior (**Table S3**). In a previously reported assay for fumonisin B1 (FB1) [32], an anti-idiotypic nanobody (Ab2-Nb) was applied as coating antigen leading to the development of a competitive Ab2-Nb-based assay for FB1 with a 20 times higher sensitivity than that of the traditional assay with FB1-BSA conjugate.

Considering the predominant traits of Nbs (small size, high stability), they fulfill on-site testing requirements of reagents for competitive immuno-based screening assays and are also promising alternative reagents to anti-idiotypic antibodies. The use of epitope-mimicking peptides, or mimotopes, is another alternative approach to substitute toxin-protein conjugates and can be obtained by phage-display and chemical synthesis. Peltomaa *et al.* identified a mimotope for FB1 [28] and applied it to various magnetic bead-based assays either as phage-mimotope, as synthetic mimotope or as recombinant mimotope fused to yellow fluorescent protein (mimotope-YFP) [42]. Analysis of binding kinetics revealed that the phage-mimotope is not ideal suited for robust assay development due to the large size of biologically active phages. In comparison to the mimotope-YFP, the synthetic mimotope shows a slightly better assay sensitivity but a lower affinity to the target antibody. As a consequence, this might be important for the improved sensitivity of competitive assays since a smaller amount of the analyte is required to compete with the synthetic mimotope for antibody binding. In contrast, Zhao *et al.* [43] coupled a synthetic mimotope directly to horseradish peroxidase (mimotope-HRP) and used it as tracer reagent in a direct, competitive assay format for AFB1 detection. The direct immunoassay applying mimotope-HRP is not only more sensitive than the traditional immunoassay set-up but also has the superiority of being faster and simpler with better performance than an indirect mimotope-based immunoassay. Nevertheless, all of the described assays applying epitope-mimicking molecules are established exclusively for single toxin detection. Moreover, the assays are time-consuming (assay times between 30 min and 3.5 h) and need a lot of hands-on-time by the operator in contrast to the automated multiplex biochip assay based on anti-idiotypic antibodies developed in this work.

Beside application of epitope-mimicking molecules as assay reagents, alternative recognition elements were also used for assay development to determine low molecular weight toxins by directly capturing the analyte of interest (**Table S3**). The use of viable cells was described by Li *et al.* [27]. The duplex assay is very straightforward, needs no further reagents but exhibits a four-times higher LOD (5.19 ng/mL STX) than the LOD reported here (1.2 ng/mL STX). However, the use of viable cells or natural receptor molecules offers a detection of all relevant congeners of a toxin group and often better reflects the *in vivo* toxicity of low molecular weight toxins compared to antibody-based methods. Molecularly imprinted polymers (MIPs) [26] and aptamers [25] have already been identified as stable compounds suitable for use in direct assays. Contrary to the enzyme-amplified immuno-based sensor developed here, which involves labeling of detection antibodies and multiple assay steps of reagent



addition as well as intermediate washing steps, aptamer- and polymer-based sensors can be easily employed in label-free detection formats. Moreover, their inherent stability and low cost offer several advantages for biosensor application. Apart from that, MIPs often deal with significant lower affinities to the analyte as compared to antibodies. Therefore, LODs of MIP-based assays are often not sufficient to detect trace amounts of the analyte of interest [26]. Zejli *et al.* [25] overcome this limitation by developing a highly sensitive electrochemical aptasensor for AFB1 with a LOD of 1.6 pg/mL. However, the often high specificity of selected aptamers can be detrimental for on-site detection systems, which need to assess as many congeners as possible in a single run. This requirement is fulfilled by the here developed multiplex assay employing toxin group specific antibodies. Looking ahead, as more and more assays are being generated with alternative recognition elements or epitope-mimicking molecules, the possibility of replacing toxins in diagnostic procedures with presumably non-toxic reagents result in enhanced laboratory safety. This advantage could be even more significant when diagnostic test kits are used in the field by unskilled operators. The here presented microfluidic fiveplex biochip assay in combination with the electrochemical detection platform is ideal suited for the on-site use since it is fully portable and can be deployed to any location required. The developed multiplex assay is quick (assay time: 13.4 min) and at the same time highly sensitive (LODs in the low ng/mL- to pg/mL-range). Moreover, processing of the biochip on the automated detection platform with minimal hands-on time for the end-user meets the demand for easy-to-use on-site systems to rapidly analyze suspicious samples. In contrast to our assay, recently published microfluidic biosensors for on-site toxin detection utilize traditional toxin-protein conjugates as capture or detection reagent (**Table S3**). For example, an ultrafast multiplex mycotoxin detection was achieved through oriented immobilization of toxin specific antibodies with protein G beads packed in microchannels (assay time: 1 min) [44]. However, application to sample matrices revealed that the fluorescence signal was highly susceptible to matrix interferences. In contrast, the multiplex assay developed here is capable to detect qualitatively multiple low molecular weight toxins from spiked human serum samples with only minimal sample preparation demonstrating the robustness of electrochemical detection systems [45]. Furthermore, previously published results demonstrated the applicability of singleplex electrochemical biosensors for analysis of low molecular weight toxins in urine samples representing another relevant body fluid. As an example of a robust optical system, Brickman *et al.* [46] reported a waveguide biosensor allowing a higher sensitivity compared to the here reported LOD for parallel detection of MC-LR

(0.4 ng/mL) and cylindrospermopsin (0.7 ng/mL) on a portable and automated reader. Moreover, the short range of the evanescent wave enables it to discriminate between bound and unbound fluorescent labeled detection molecules, hence, eliminating the need for washing steps. Another novel system for point-of-need testing relies on a disc-based biosensor with recombinantly produced antibodies for simultaneous determination of MC-LR, STX and domoic acid within 30 min with LODs of 7.2 ng/mL, 20 ng/mL and 30 ng/mL, respectively [47]. Here, our assay achieves dramatically lower LODs for MC-LR (1.5 ng/mL) and STX (1.2 ng/mL) within a significant shorter assay time, thus demonstrating the exceptional ability of the here developed multiplex assay based on anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking molecules for developing a new generation of user-safe assays for low molecular weight toxins.

## Conclusions

The proposed fiveplex biochip assay offers the possibility of an automated and rapid on-site detection of highly toxic low molecular weight toxins with LODs in the low ng/mL- to pg/mL-range as well as broad specificity for congeners of the corresponding toxin group. For example, it can be applied for determining qualitatively the presence or absence of the bioterrorism relevant toxins STX, MC-LR, RoA, HT-2 and AFB1 in human serum samples after a suspected deliberate release of a biological warfare agent. By relying solely on anti-idiotypic antibodies as epitope-mimicking molecules, no derivatization of low molecular weight toxins for immobilization or conjugation to a reporter enzyme is necessary. Notably, this work demonstrates the applicability of anti-idiotypic antibodies to develop user-safe competitive immunoassays with superior analytical performance, including lower LODs and  $IC_{50}$  as well as a much higher degree of multiplexing capability than previously reported assays based on other epitope-mimicking molecules or alternative recognition elements. Furthermore, the application of antibody-reporter enzyme conjugates as tracers shortens the overall assay time to 13.4 min which allow a more straightforward assay workflow. The biochip will be automatically processed on a portable detection platform facilitating minimal end-user interaction ideal for on-site testing. The toxin group specificity of the antibodies enables that as many congeners as possible can be detected in a single analysis. In combination with the existing electrochemical biochip assays for high molecular weight toxins (e.g., botulinum neurotoxins, ricin) as well as for bioterrorism relevant microorganisms (e.g., *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*) [36], the pBDi platform is a valuable tool for rapid and straightforward on-site detection of various kinds of

biothreat agents. Moreover, the detection system has the flexibility to combine these assays for different kinds of biological agents on one biochip without modifying the general workflow, thus, offering a new level of biothreat detection.

Further work is in progress to extend the use of this fiveplex biochip assay in different fields of application, e.g., for food and environmental analysis.

## Materials and Methods

### Materials

Reagents: methanol, Tween-20 (T-20), trehalose, magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2$ ), sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sodium chloride (NaCl), phosphate-buffered saline pH 7.4 ( $1\times$  PBS; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM NaCl, 1.8 mM potassium dihydrogen chloride, 2.7 mM potassium chloride), thimerosal, 2-mercaptoethanol (2-ME), skimmed milk powder, sodium hydroxide (NaOH), sodium dodecyl sulfate (SDS), bovine serum albumin (BSA), *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), pAPG, bGAL, SA-bGAL, Amicon Ultra-50K MWCO centrifugal filter devices, anti-mouse IgG-bio and polyclonal rabbit anti-mouse IgG (anti-mouse IgG) were all purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). Mouse IgG were obtained from Dianova GmbH (Hamburg, Germany). Zeba Spin-7K MWCO desalting columns and sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Water used in all experiments was purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Toxin standards: cyanotoxins standards, including STX, dc-STX, dc-NEO, GTX-1/-4, dc-GTX-2/-3, C1/C2, MC-LR, MC-RR, MC-YR and nodularin-R were all purchased from LabMix24 GmbH (Hamminkeln, Germany). NEO, GTX-2/-3 and GTX-5 were all from CIFGA S.A. (Lugo, Spain). MC-LA, MC-LY, MC-LW and [DAsp<sup>3</sup>]MC-LR were all purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). T-2 and its metabolites HT-2, T-2 triol and T-2 tetraol were all obtained from Romer Labs GmbH (Getzersdorf, Austria). Verrucarol, RoA, VerA as well as AFB1, AFG1, AFM1, AFB2 and AFG2 were all from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany). RoE was purchased from Biozol Diagnostica GmbH (Eching, Germany).

### Methods

#### Antibody Production

The utilized mAbs1 were as follows: anti-STX mAb 5F7 (STX/mAb1), anti-MC-LR mAb 4H6 (MC-LR/mAb1), anti-T-2 mAb 2A12 (T-2/mAb1), anti-RoA mAb 7F8

(RoA/mAb1) and anti-AFB1 mAb 2D1 (AFB1/mAb1) and prepared as previously described [39,48]. The corresponding mAb2s were used as follows: anti-5F7 mAb 1D8 (STX/mAb2), anti-4H6 mAb 6A11 (MC-LR/mAb2), anti-2A12 mAb 1D6 (T-2/mAb2), anti-7F8 mAb 5G11 (RoA/mAb2) and anti-2D1 mAb 1G10 (AFB1/mAb2) and generated as previously reported [48,49].

#### Immobilization of Capture Antibodies on Gold Electrodes of Biochips

The biochips (9 mm × 10 mm) were manufactured on 8-inch silicon wafers at the Fraunhofer Institute for Silicon Technology (Itzehoe, Germany) exhibiting 16 IDA gold electrodes (diameter: 500 μm) as described [50]. Capture Abs were applied to the biochip via non-contact piezo-electronic spotter sciFLEXARRAYER S3 (Sciencion AG, Berlin, Germany) as reported by Schulz *et al.* [35]. Spotting concentrations were 400 μg/mL STX/mAb2, 200 μg/mL MC-LR/mAb2, 100 μg/mL T-2/mAb1, 200 μg/mL RoA/mAb2, 400 μg/mL AFB1/mAb1 in 0.4 mg/mL BSA/1× PBS, 2.5 μg/mL anti-mouse IgG-bio in 0.2 mg/mL BSA/1× PBS, and 500 μg/mL mouse IgG in 0.4 mg/mL BSA/1× PBS. BSA served as a co-immobilization agent to stabilize the capture Abs on the gold electrode surface. After spotting, biochips were treated as described [35].

#### Conjugation of Detection Antibodies to β-D-Galactosidase

Detection mAbs STX/mAb1, MC-LR/mAb1, T-2/mAb2, RoA/mAb1 and AFB1/mAb2 were covalently coupled to bGAL via an amine-to-sulfhydryl cross linkage. Antibody activation was carried out by adding a 20-fold molar excess of crosslinking reagent sulfo-SMCC (4.8 mg/mL in water) to 1 mg detection mAb (concentrated to 2 mg/mL in conjugation buffer (0.1 M sodium phosphate pH 7.2, 0.1 M NaCl)). After incubation for 1 h at room temperature, excess of non-reacted sulfo-SMCC was removed using Zeba Spin-7K MWCO desalting columns equilibrated with conjugation buffer. For formation of stable thioether bonds between the maleimide-activated mAb (mAb-SMCC) and free sulfhydryl groups in bGAL, a two-fold molar excess of mAb-SMCC (2 mg/mL in conjugation buffer) was mixed with bGAL (3.7 mg/mL in 1× PBS) and incubated overnight at 4 °C. The resulting mAb-bGAL tracers STX/mAb1-bGAL, MC-LR/mAb1-bGAL, T-2/mAb2-bGAL, RoA/mAb1-bGAL and AFB1/mAb2-bGAL were finally mixed with 1% (w/v) BSA (stabilizer) as well as 0.01% (v/v) thimerosal (preservative) and stored at 4 °C. Conjugation was confirmed by microplate-based immunoassay. In brief, serial dilutions of mAb-bGAL conjugates were applied to microtiter plates pre-coated with anti-mouse IgG (5 μg/mL in 1× PBS). Detection was realized by adding colorimetric bGAL substrate ONPG (2 mg/mL in 1× PBS, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-ME).

### Instrumentation and Electrochemical Biochip Measurements

Spotted biochips inserted in a polycarbonate cartridge were processed and measured using the electrochemical detection platform pBDi (Bruker Optik GmbH, Leipzig, Germany). For the electrochemical measurement, a potential of +150 mV to the anodic fingers and -400 mV to the cathodic fingers of the biochip IDA gold electrodes was applied and current readout was achieved within a range of  $\pm 200$  nA. For multiplex detection of STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1, a direct competitive immunoassay was performed. Toxin sample was mixed with mAb-bGAL tracer cocktail (1:2500 STX/mAb1-bGAL, 1:3500 MC-LR/mAb1-bGAL, 1:750 T-2/mAb2-bGAL, 1:6000 RoA/mAb1-bGAL and 1:7000 AFB1/mAb2-bGAL) and SA-bGAL (0.22 U/mL), yielding a total volume of 800  $\mu$ L. The mixture was immediately applied to the detection platform and automatically analyzed. The automatic program summarized in **Table S2** has an overall assay time of 13.4 min and includes, amongst other steps, washing steps with assay buffer (1 $\times$  PBS, 0.5% (w/v) BSA, 0.5% trehalose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.025% (v/v) T-20), a competition step of free toxins in the sample with mAbs2 for limited binding sites of the corresponding mAbs1 as well as PC binding reaction and, finally, a signal generating step applying the bGAL substrate pAPG (1 mg/mL in assay buffer). Monitoring of the generated current by enzymatic substrate conversion and subsequent redox cycling was performed according to Elsholz *et al.* [50] in stopped flow mode (**Figure S3**). The absolute current slope of target electrode positions was normalized to the signal of the spotted PC and NC according to Equation (1):

$$\text{Normalized signal (\%)} = 100 \times \left[ \frac{\text{Slope}(\text{Target}) - \text{Slope}(\text{Neg. Co.})}{\text{Slope}(\text{Pos. Co.}) - \text{Slope}(\text{Neg. Co.})} \right]$$

Normalized signals were used for further data analysis.

### Assay Specificity

Cross-reactivity of the developed assay was determined by incubating upon the fiveplex biochip toxin solutions with 100 ng/mL STX, T-2, MC-LR, RoA or AFB1, respectively, in the presence of mAb-bGAL tracer cocktail under competitive conditions. Specificity of the applied mAb pairs to toxin group congeners was assessed by analyzing toxin solutions containing either 100 ng/mL of a PSP-toxin (STX, dc-STX, NEO, dc-NEO, GTX-5, C1/C2, GTX-2/-3, dc-GTX-2/-3, GTX-1/-4), 50 ng/mL of a MC (MC-LR, [DAsp<sup>3</sup>]MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, nodularin-R), 100 ng/mL of a type A trichothecene (T-2, HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol, verrucarol), 50 ng/mL of a type D trichothecene (RoA, RoE, VerA, SatH) or 50 ng/mL

of an aflatoxin (AFB1, AFG1, AFM1, AFB2, AFG2) upon the fiveplex biochip. Measurements were performed in assay buffer.

#### Assay Sensitivity

Sensitivity of the fiveplex biochip assay was evaluated by testing toxin standard solutions prepared in assay buffer using various concentrations ranging from 0-600 ng/mL STX, 0-300 ng/mL MC-LR, AFB1, T-2 or HT-2, respectively, and 0-200 ng/mL RoA.

#### Simultaneous Toxin Detection

For simultaneous toxin detection, toxin standard solutions (STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1) were prepared at four different concentration levels ( $IC_5$ , LOD,  $IC_{50}$ ,  $IC_{80}$ ) in assay buffer and applied to the biochip.

#### Analysis of Toxins Spiked in Human Blood Serum

Human serum from male AB clotted whole blood (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany) was mixed with STX (0, 6, 20, 200 ng/mL), MC-LR (0, 6, 20, 200 ng/mL), HT-2 (0, 4, 10, 100 ng/mL), RoA (0, 4, 10, 100 ng/mL) and AFB1 (0, 4, 10, 100 ng/mL) to prepare spiked serum samples at four different concentration levels (zero, low, medium, high). Serum samples were shaken at 400 rpm for 1 h at room temperature to address potential matrix effects. Afterwards, samples were diluted two-fold (concentration level low and mid) or ten-fold (concentration level high) in assay buffer and directly subjected to biochip analysis. Even if the original sample matrix can generally vary in factors such as salt concentrations, viscosity, protein content or pH appropriate dilution of sample matrix in assay buffer can adjust these parameters to optimal assay conditions for the established multiplex assay.

#### Data Analysis

Dose-response curves were described by the four-parameter logistic regression model using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Displayed error bars represent the SD of mean target specific signals ( $n$ ) obtained from different biochips as indicated. One biochip was employed for the analysis of one sample. LOD, working range ( $IC_{30}$ – $IC_{80}$ ), and midpoint ( $IC_{50}$ ) were interpolated from the four-parameter logistic function. The LOD corresponds to the toxin concentration which gave a normalized signal equal to the normalized signal when no toxin is present ( $B_0$ ) minus three times of its SD obtained from  $n = 20$ . The working range was determined as the concentrations of the toxin reducing the  $B_0$  signal to 30–80%. The  $IC_{50}$  was

calculated as the toxin concentration that lowered the normalized signal to 50% of B<sub>0</sub>. Percent inhibition was calculated using Equation (2):

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left[ \frac{\text{Signal} \times 100}{\text{B}_0 \text{ Signal}} \right]$$

For recovery calculation,  $\%(\text{B}/\text{B}_0)_{\text{Serum}}$ -values were used for interpolation from dose-response curves obtained in assay buffer.

### Author Contributions

K.S. conceived and designed the experiments for assay establishment; R.D. conceived and designed the experiments for antibody production and characterization; K.S. performed the biochip experiments and analyzed the data; K.S. wrote the first draft of the manuscript; C.P. and E.M. supervised K.S.; C.P. reviewed and edited the first draft of the manuscript; C.P., T.E., R.D. and E.M. contributed to the writing of the final version of the manuscript; K.S., C.P., R.D., E.M. and T.E. read and approved the final version of the manuscript.

### Funding

This research was funded by Federal Ministry of Education and Research (BMBF) of Germany, SensTox project, 13N13791 and 13N13795.

### Acknowledgments

SatH was a kind gift from Bruce Jarvis (University of Maryland, Department of Chemistry and Biochemistry, Maryland, USA).

### Conflicts of Interest

K.S., C.P. and T.E. are current employees of Bruker Optik GmbH. Bruker Optik GmbH has licensed the electrochemical biochip technology according to EP 1200817 B1 from Fraunhofer Institute for Silicon Technology (Itzehoe, Germany). This does not influence our adherence to all policies on sharing data and materials. R.D. and E.M. declare that the research was conducted in the absence of any commercial and financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### References

1. Vilariño, N.; Louzao, M.C.; Abal, P.; Cagide, E.; Carrera, C.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M. Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection. *Toxins* 2018, 10, 324.
2. Lehane, L. Paralytic shellfish poisoning: A potential public health problem. *Med. J. Aust.* 2001, 175, 29–31.

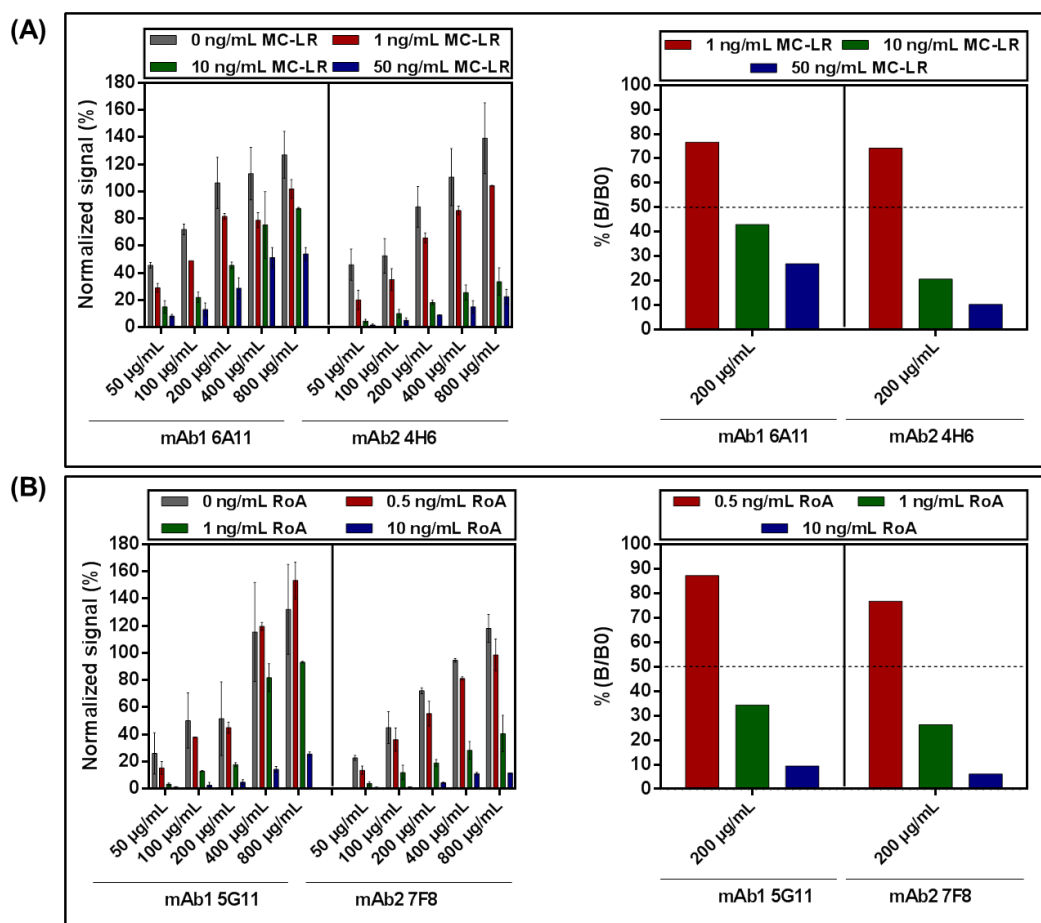
3. Svircev, Z.; Drobac, D.; Tokodi, N.; Mijovic', B.; Codd, G.A.; Meriluoto, J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 2017, 91, 621–650.
4. Díez-Quijada, L.; Prieto, A.I.; Guzmán-Guillén, R.; Jos, A.; Cameán, A.M. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food Chem. Toxicol.* 2019, 125, 106–132.
5. Spooft, L.; Catherine, A. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins. In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*; Meriluoto, J., Spooft, L., Codd, G.A., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2017; pp. 526–537.
6. Jarvis, B.B. *Stachybotrys chartarum*: A fungus for our time. *Phytochemistry* 2003, 64, 53–60.
7. Kumar, P.; Mahato, D.K.; Kamle, M.; Mohanta, T.K.; Kang, S.G. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Front. Microbiol.* 2017, 7, 2170.
8. Pitschmann, V.; Hon, Z. Military Importance of Natural Toxins and Their Analogs. *Molecules* 2016, 21, 556
9. Australia Group Common Control List Handbook Volume II: Biological Weapons-Related Common Control Lists. Available online: <https://australiagroup.net/en/documents/Australia-Group-Common-Control-List-Handbook-Volume-II.pdf> (accessed on 30 August 2019).
10. Ukwuru, M.U.; Ohaegbu, C.G.M.A. An Overview of Mycotoxin Contamination of Foods and Feeds. *J. Biochem. Microb. Toxicol.* 2018, 1, 1–11.
11. Gessner, B.D.; Middaugh, J.P.; Doucette, G.J. Paralytic shellfish poisoning in Kodiak, Alaska. *West. J. Med.* 1997, 167, 351–353.
12. Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R.L.; Barreto, V.T.; Ward, C.J.; Preiser, W.; Poon, G.K.; Neild, G.H.; Codd, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 1998, 352, 21–26.
13. Brasel, T.L.; Campbell, A.W.; Demers, R.E.; Ferguson, B.S.; Fink, J.; Vojdani, A.; Wilson, S.C.; Straus, D.C. Detection of Trichothecene Mycotoxins in Sera from Individuals Exposed to *Stachybotrys chartarum* in Indoor Environments. *Arch. Environ. Health* 2003, 58, 317–323.
14. De Santis, B.; Debegnach, F.; Sonogo, E.; Mazzilli, G.; Buiarelli, F.; Ferri, F.; Giorgi Rossi, P.; Collini, G.; Brera, C. Biomonitoring Data for Assessing Aflatoxins and Ochratoxin A Exposure by Italian Feedstuffs Workers. *Toxins* 2019, 11, 351.
15. Cano-Sancho, G.; Marin, S.; Ramos, A.J.; Sanchis, V. Biomonitoring of *Fusarium* spp. Mycotoxins: Perspectives for an Individual Exposure Assessment Tool. *Food Sci. Technol. Int.* 2010, 16, 266–276.
16. Maizels, M.; Budde, W.L. A LC/MS Method for the Determination of Cyanobacteria Toxins in Water. *Anal. Chem.* 2004, 76, 1342–1351.
17. Shriver-Lake, L.; Liu, J.; Brozozog Lee, P.; Goldman, E.; Dietrich, R.; Märklbauer, E.; Anderson, G. Integrating scFv into xMAP Assays for the Detection of Marine Toxins. *Toxins* 2016, 8, 346.
18. Li, C.; Wen, K.; Mi, T.; Zhang, X.; Zhang, H.; Zhang, S.; Shen, J.; Wang, Z. A universal multi-wavelength fluorescence polarization immunoassay for multiplexed detection of mycotoxins in maize. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 79, 258–265.
19. Dill, K.; Ghindilis, A. Electrochemical Detection on Microarrays. In *Microarrays: Preparation, Microfluidics, Detection Methods, and Biological Applications*; Dill, K., Liu, R.H., Grodzinski, P., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 25–34.



20. Posthuma-Trumpie, G.A.; Korf, J.; van Amerongen, A. Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 569–582.
21. Hintsche, R.; Albers, J.; Bernt, H.; Eder, A. Multiplexing of Microelectrode Arrays in Voltammetric Measurements. *Electroanalysis* 2000, 12, 660–665.
22. Farré, M.; Kantiani, L.; Pérez, S.; Barceló, D.; Barceló, D. Sensors and biosensors in support of EU Directives. *Trends Anal. Chem.* 2009, 28, 170–185.
23. Cui, X.; Jin, M.; Du, P.; Chen, G.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Shao, Y.; Wang, J. Development of immunoassays for multi-residue detection of small molecule compounds. *Food Agric. Immunol.* 2018, 29, 638–652.
24. Xiao, H.; Clarke, J.R.; Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A. Improved Methods for Conjugating Selected Mycotoxins to Carrier Proteins and Dextran for Immunoassays. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2092–2097.
25. Zejli, H.; Goud, K.Y.; Marty, J.L. An electrochemical aptasensor based on polythiophene-3-carboxylic acid assisted methylene blue for AFB1 detection. *Sens. Bios. Res.* 2019, 25, 100290.
26. Sergeeva, T.; Yarynka, D.; Piletska, E.; Lyytik, R.; Zaporozhets, O.; Brovko, O.; Piletsky, S.; El'skaya, A. Fluorescent sensor systems based on nanostructured polymeric membranes for selective recognition of Aflatoxin B1. *Talanta* 2017, 175, 101–107.
27. Li, H.; Wei, X.; Gu, C.; Su, K.; Wan, H.; Hu, N.; Wang, P. A Dual Functional Cardiomyocyte-based Hybrid-biosensor for the Detection of Diarrhetic Shellfish Poisoning and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *Anal. Sci.* 2018, 34, 893–900.
28. Peltomaa, R.; Benito-Pena, E.; Barderas, R.; Sauer, U.; González Andrade, M.; Moreno-Bondi, M.C. Microarray-Based Immunoassay with Synthetic Mimotopes for the Detection of Fumonisin B1. *Anal. Chem.* 2017, 89, 6216–6223.
29. Hou, S.; Ma, Z.; Meng, H.; Xu, Y.; He, Q. Ultrasensitive and green electrochemical immunosensor for mycotoxin ochratoxin A based on phage displayed mimotope peptide. *Talanta* 2019, 194, 919–924.
30. He, J.; Fan, M.; Liang, Y.; Liu, X. Application of Anti-idiotypic Antibody in Small Molecules Immunoassay. *Chin. J. Anal. Chem.* 2010, 38, 1366–1370.
31. Jerne, N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Paris)* 1974, 125c, 373–389.
32. Shu, M.; Xu, Y.; Wang, D.; Liu, X.; Li, Y.; He, Q.; Tu, Z.; Qiu, Y.; Ji, Y.; Wang, X. Anti-idiotypic nanobody: A strategy for development of sensitive and green immunoassay for Fumonisin B1. *Talanta* 2015, 143, 388–393.
33. Shu, M.; Xu, Y.; Liu, X.; Li, Y.; He, Q.; Tu, Z.; Fu, J.; Gee, S.J.; Hammock, B.D. Anti-idiotypic nanobody-alkaline phosphatase fusion proteins: Development of a one-step competitive enzyme immunoassay for fumonisin B1 detection in cereal. *Anal. Chim. Acta* 2016, 924, 53–59.
34. Guan, D.; Li, P.; Cui, Y.; Zhang, Q.; Zhang, W. A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M1 in milk. *Anal. Chim. Acta* 2011, 703, 64–69.
35. Schulz, K.; Pöhlmann, C.; Dietrich, R.; Märthlbauer, E.; Elßner, T. Electrochemical Biochip Assays Based on Anti-idiotypic Antibodies for Rapid and Automated On-Site Detection of Low Molecular Weight Toxins. *Front. Chem.* 2019, 7.
36. Pöhlmann, C.; Elßner, T. Field-Based Multiplex Detection of Biothreat Agents. In *Proceedings of the Scientific International Conference on CBRNe (SICC), Rome, Italy, 22–24 May 2017*; pp. 31–39.

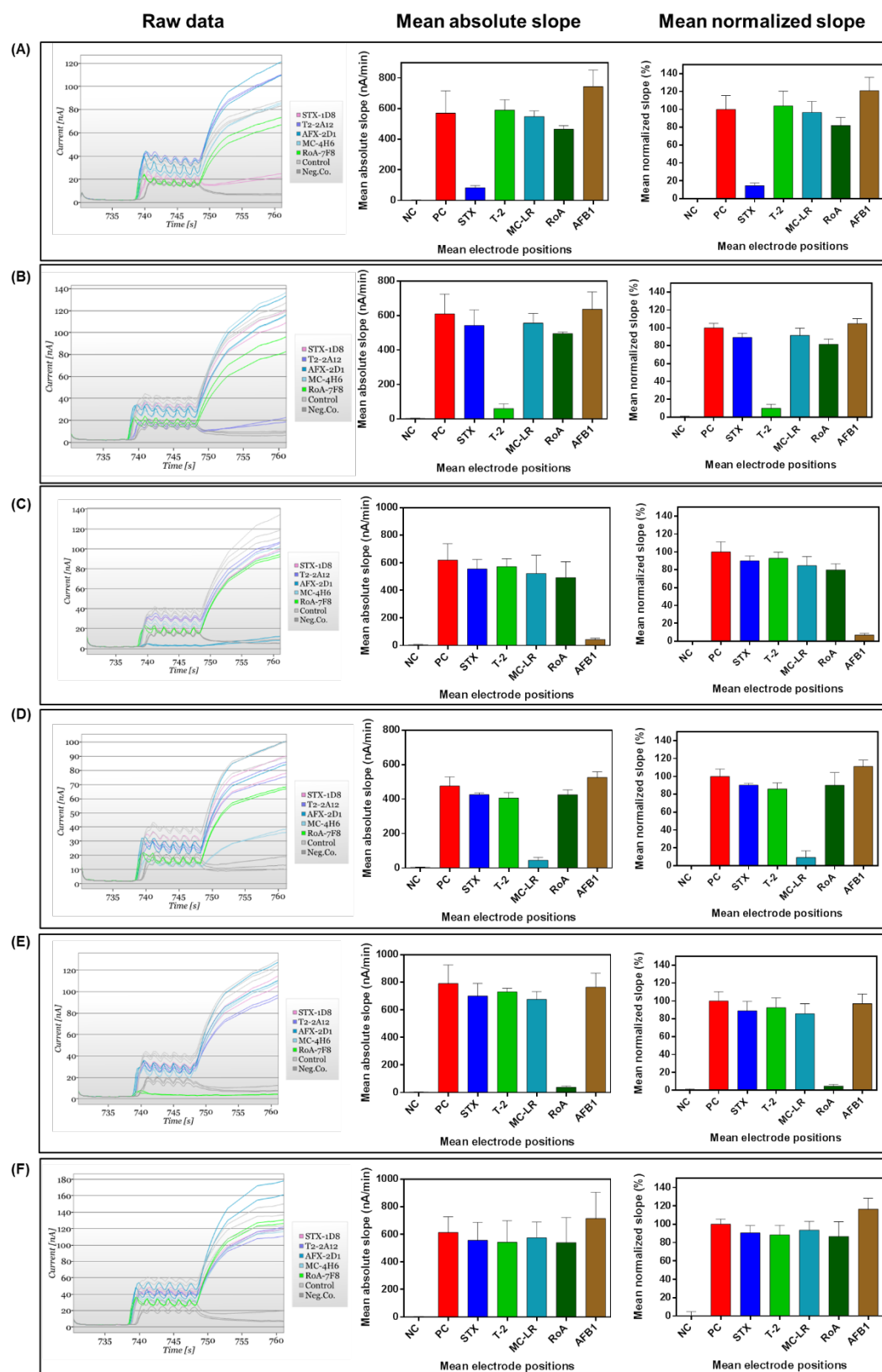
37. Nebling, E.; Grunwald, T.; Albers, J.; Schäfer, P.; Hintsche, R. Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays. *Anal. Chem.* 2004, 76, 689–696.
38. Märtlbauer, E.; Gareis, M.; Terplan, G. Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: Production, properties, and use of rabbit antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54, 225–230.
39. Hack, R.; Märtlbauer, E.; Terplan, G. Production and characterization of monoclonal antibodies to the macrocyclic trichothecene roridin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54, 2328–2330.
40. DeGrasse, S.; Rivera, V.; Roach, J.; White, K.; Callahan, J.; Couture, D.; Simone, K.; Peredy, T.; Poli, M. Paralytic shellfish toxins in clinical matrices: Extension of AOAC official method 2005.06 to human urine and serum and application to a 2007 case study in Maine. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 2014, 103, 368–375.
41. Kamala, A.; Shirima, C.; Jani, B.; Bakari, M.; Sillo, H.; Rusibamayila, N.; Saeger, S.D.; Kimanya, M.; Gong, Y.Y.; Simba, A.; et al. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin J.* 2018, 11, 311–320.
42. Peltomaa, R.; Agudo-Maestro, I.; Más, V.; Barderas, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M.C. Development and comparison of mimotope-based immunoassays for the analysis of fumonisin B1. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, 1–11.
43. Zhao, F.; Tian, Y.; Shen, Q.; Liu, R.; Shi, R.; Wang, H.; Yang, Z. A novel nanobody and mimotope based immunoassay for rapid analysis of aflatoxin B1. *Talanta* 2019, 195, 55–61.
44. Soares, R.R.G.; Santos, D.R.; Pinto, I.F.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R.; Chu, V.; Conde, J.P. Multiplexed microfluidic fluorescence immunoassay with photodiode array signal acquisition for sub-minute and point-of-need detection of mycotoxins. *Lab Chip* 2018, 18, 1569–1580.
45. Jodra, A.; López, M.Á.; Escarpa, A. Disposable and reliable electrochemical magnetoimmunosensor for Fumonisin B1 simplified determination in maize-based foodstuffs. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 64, 633–638.
46. Bickman, S.R.; Campbell, K.; Elliott, C.; Murphy, C.; O’Kennedy, R.; Papst, P.; Lochhead, M.J. An Innovative Portable Biosensor System for the Rapid Detection of Freshwater Cyanobacterial Algal Bloom Toxins. *Environ. Sci. Technol.* 2018, 52, 11691–11698.
47. Maguire, I.; Fitzgerald, J.; Heery, B.; Nwankire, C.; O’Kennedy, R.; Ducree, J.; Regan, F. Novel Microfluidic Analytical Sensing Platform for the Simultaneous Detection of Three Algal Toxins in Water. *Acs Omega* 2018, 3, 6624–6634.
48. Gayk, L. Entwicklung und Anwendung auf Antidiotypischen Antikörpern basierender Verfahren zum Nachweis von Aflatoxinen und T-2 Toxin. Ph.D. Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, 2019.
49. Szkola, A.; Moura Linares, E.; Worbs, S.; Dorner, B.G.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Niessner, R.; Seidel, M. Rapid and simultaneous detection of ricin, Staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *Analyst* 2014, 139, 5885–5892.
50. Elsholz, B.; Wörl, R.; Blohm, L.; Albers, J.; Feucht, H.; Grunwald, T.; Jürgen, B.; Schweder, T.; Hintsche, R. Automated Detection and Quantitation of Bacterial RNA by Using Electrical Microarrays. *Anal. Chem.* 2006, 78, 4794–4802.

## Supplementary Material



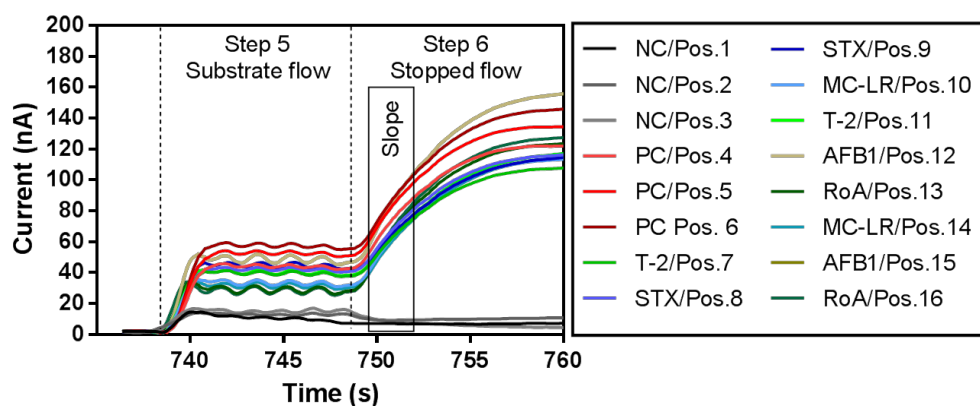
**Figure S1. Selection of the capture mAb for the detection of (A) MC-LR and (B) RoA.**

Left: Influence of the capture mAb concentration on the assay signal ( $n = 4$ , i.e., two biochips with each two target electrode positions). Right: Influence of the mAb type used as capture on assay sensitivity. Experiments were performed in singleplex format applying varied toxin concentrations and a defined concentration of the respective detection mAb. Detection mAb concentrations were (A) 150 ng/mL and (B) 300 ng/mL ( $n = 4$ , i.e., two biochips with each two target electrode positions). The selection of the most suitable capture mAb was performed in singleplex experiments applying the indirect competitive biochip assay with electrical biochips spotted with varying concentrations of mAb1 or mAb2, different toxin dilutions and a defined concentration of the corresponding detection mAb conjugated to biotin as described previously for STX, T-2 and aflatoxins [1].



**Figure S2. Raw data and mean absolute slopes as well as mean normalized slopes used for determination of assay specificity.**

Data were obtained from (A) 100 ng/mL STX, (B) 100 ng/mL T-2, (C) 100 ng/mL AFB1, (D) 100 ng/mL MC-LR, (E) 100 ng/mL RoA and (F) B0 (zero standard). Mean slope values were obtained from four independent measurements ( $n = 8$ , i.e., four biochips with each two target electrode positions). To calculate percent inhibition, mean normalized slope values were used.



**Figure S3. Amperogram of all 16 electrode positions for a zero standard measurement (B0).**

Following sample application and competition reaction as well as washing steps with assay buffer, the substrate is applied automatically to the processed biochip during the assay program in step 5. Then, the substrate flow is stopped (step 6) and electrochemical measurement is performed. After a delay of 1 sec, a 4 sec-measuring interval in the stopped flow mode is used to determine the absolute slope value for each electrode position by linear regression. For a better batch-to-batch comparison of different biochip production runs, the absolute slope value of each electrode position is normalized to the signals of the positive control (PC) and negative control (NC).

**Table S1. Optimal concentration of mAb1/mAb2-pairs for simultaneous detection of STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1.**

Toxin	Capture mAb		Detection mAb-bGAL conjugate	
	mAb type	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	mAb type	Dilution
STX	mAb2 1D8	400	mAb1 5F7-bGAL	1:2500
MC-LR	mAb2 4H6	200	mAb1 6A11-bGAL	1:3500
T-2	mAb1 2A12	100	mAb2 1D6-bGAL	1:750
RoA	mAb2 7F8	200	mAb1 5G11-bGAL	1:6000
AFB1	mAb1 2D1	400	mAb2 1G10-bGAL	1:7000

**Table S2. Main steps in the automated assay program for simultaneous toxin detection utilizing a direct, competitive immunoassay (total assay time: 13.4 min).**

Step	Process	Duration (s)	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	Equilibration with assay buffer	49	32
2	Sample + mAb-bGAL tracer cocktail flow	20	42
3	Competition reaction	594	42
4	Wash flow with assay buffer	74	42
5	Substrate flow	10	50
6	Stopped flow	15	50
7	Wash flow with assay buffer	41	32

**Table S3. Comparison of the here reported fiveplex biochip assay with other recently published methods for the detection of low molecular weight toxins employing epitope-mimicking molecules or alternative recognition elements or traditional toxin-protein conjugates for assay development.**

Toxin	Assay characteristics					Integration in a detection platform		Sample	Ref.
	Assay principle	Detection	LOD	Multi-plex	Assay time	Fully automated	Portable		
<b>Epitope-mimicking molecules</b>									
STX			1.2 ng/mL						
MC-LR	IDA gold electrode applying mAb1/mAb2-pairs as capture and detector	Electro-chemical	1.5 ng/mL	Yes	13.4 min	Yes	Yes	Serum	This study
T-2			0.4 ng/mL						
RoA			0.5 ng/mL						
AFB1			0.6 ng/mL						
FB1	Immunoassay with Ab2-Nb as capture and mAb1 with HRP-labeled secondary Ab as detector	Absorbance	0.15 ng/mL	No	1 h	No	No	Food, feed	[2]
AFB1	Magnetic-bead based assay with Ab1-Nb as capture and mimotope-HRP as tracer	Absorbance	0.13 ng/mL	No	35 min	No	No	Food	[3]
FB1	Microarray with immobilized synthetic mimotope and mAb1 as detector in combination with fluorophore-labeled secondary Abs	Fluorescence	11.1 ng/mL	No	3.5 h	No	No	Maize, wheat	[4]
<b>Alternative recognition elements</b>									
STX DA	Cell-based sensor using a combined IDA gold and potential electrode seeded with cardiomyocytes	Electro-chemical	5.19 ng/mL 7.16 ng/mL	Yes	30 min	No	Yes	Buffer	[5]
AFB1	Nanostructured AFB1-MIP membrane	Intrinsic Fluorescence	14 ng/mL	No	1 h	No	No	Waste water	[6]

AFB1	SPCE array immobilizing PT3C/MB-tagged aptamer	Electro-chemical	1.6 pg/mL	No	45 min	No	No	Coffee	[7]
<b>Traditional toxin-protein conjugates</b>									
AFB1 OA DON	Thin-film photodiode array with protein G beads bound anti-toxin Abs and fluorophore coupled BSA-toxin conjugates	Fluorescence	1 ng/mL 3 ng/mL 10 ng/mL	Yes	1 min	Yes	Yes	Corn	[8]
MCs CYN	Planar waveguide biosensor with toxin-BSA conjugates and fluorophore coupled mAbs	Fluorescence	0.4 ng/mL 0.7 ng/mL	Yes	10 min	Yes	Yes	Lake water	[9]
MC-LR STX DA	Disc-based biosensor with surface bound toxins and fluorophore labeled anti-toxin rAbs	Fluorescence	7.2 ng/mL 20 ng/mL 30 ng/mL	Yes	30 min	Yes	Yes	Lake water	[10]
Abbreviation: LOD = limit of detection; Ref. = reference; STX = saxitoxin; MC = microcystin; T-2 = T-2 toxin; RoA = roridin A; AFB1 = aflatoxin B1; FB1 = fumonisin B1; DA = domoic acid; OA = okadaic acid; CYN = cylindrospermopsin; OTA = ochratoxin A; ZEN = zearalenon; DON = deoxynivalenol; IDA = interdigitated array; SPCE = screen printed carbon electrode; Ab = antibody; mAb = monoclonal antibody; mAb1 = monoclonal toxin specific antibody; mAb2 = monoclonal anti-idiotypic antibody; Ab2-Nb = anti-idiotypic nanobody; Ab1-Nb = toxin specific nanobody; rAb = recombinant antibody; HRP = horseradish peroxidase; BSA = bovine serum albumin; PT3C = polythiophene-3-carboxylic acid; MB = methylene blue; MIP = molecularly imprinted polymer.									

## References

1. Schulz, K.; Pöhlmann, C.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Elßner, T. Electrochemical Biochip Assays Based on Anti-idiotypic Antibodies for Rapid and Automated On-Site Detection of Low Molecular Weight Toxins. *Front. Chem.* 2019, 7, doi:10.3389/fchem.2019.00031.
2. Shu, M.; Xu, Y.; Wang, D.; Liu, X.; Li, Y.; He, Q.; Tu, Z.; Qiu, Y.; Ji, Y.; Wang, X. Anti-idiotypic nanobody: A strategy for development of sensitive and green immunoassay for Fumonisin B1. *Talanta* 2015, 143, 388-393, doi:10.1016/j.talanta.2015.05.010.
3. Zhao, F.; Tian, Y.; Shen, Q.; Liu, R.; Shi, R.; Wang, H.; Yang, Z. A novel nanobody and mimotope based immunoassay for rapid analysis of aflatoxin B1. *Talanta* 2019, 195, 55-61, doi:10.1016/j.talanta.2018.11.013.
4. Peltomaa, R.; Benito-Pena, E.; Barderas, R.; Sauer, U.; González Andrade, M.; Moreno-Bondi, M.C. Microarray-Based Immunoassay with Synthetic Mimotopes for the Detection of Fumonisin B1. *Anal. Chem.* 2017, 89, 6216-6223, doi:10.1021/acs.analchem.7b01178.
5. Li, H.; Wei, X.; Gu, C.; Su, K.; Wan, H.; Hu, N.; Wang, P. A Dual Functional Cardiomyocyte-based Hybrid-biosensor for the Detection of Diarrhetic Shellfish Poisoning and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *Anal. Sci.* 2018, 34, 893-900, doi:10.2116/analsci.18P029.
6. Sergeeva, T.; Yarynka, D.; Piletska, E.; Lyytik, R.; Zaporozhets, O.; Brovko, O.; Piletsky, S.; El'skaya, A. Fluorescent sensor systems based on nanostructured polymeric membranes for selective recognition of Aflatoxin B1. *Talanta* 2017, 175, 101-107, doi:10.1016/j.talanta.2017.07.030.
7. Zejli, H.; Goud, K.Y.; Marty, J.L. An electrochemical aptasensor based on polythiophene-3-carboxylic acid assisted methylene blue for aflatoxin B1 detection. *Sens. Biosensing Res.* 2019, 25, 100290, doi:10.1016/j.sbsr.2019.100290.
8. Soares, R.R.G.; Santos, D.R.; Pinto, I.F.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R.; Chu, V.; Conde, J.P. Multiplexed microfluidic fluorescence immunoassay with photodiode array signal acquisition for sub-minute and point-of-need detection of mycotoxins. *Lab Chip* 2018, 18, 1569-1580, doi:10.1039/c8lc00259b.
9. Bickman, S.R.; Campbell, K.; Elliott, C.; Murphy, C.; O'Kennedy, R.; Papst, P.; Lochhead, M.J. An Innovative Portable Biosensor System for the Rapid Detection of Freshwater Cyanobacterial Algal Bloom Toxins. *Environ. Sci. Technol.* 2018, 52, 11691-11698, doi:10.1021/acs.est.8b02769.
10. Maguire, I.; Fitzgerald, J.; Heery, B.; Nwankire, C.; O'Kennedy, R.; Ducree, J.; Regan, F. Novel Microfluidic Analytical Sensing Platform for the Simultaneous Detection of Three Algal Toxins in Water. *ACS omega* 2018, 3, 6624-6634, doi:10.1021/acsomega.8b00240.



## IV. DISKUSSION

Aufgrund ihres hohen neuro-, hepato-, zytotoxischen bzw. kanzerogenen Potenzials stellen die niedermolekularen Biotoxine aus der Gruppe der PSP-Toxine, Microcystine, Trichothecene und Aflatoxine eine große Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar. Auch wenn in unseren Breitengraden akute Intoxikationen z. B. durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel nur ausnahmsweise (PSP-Toxine) zu erwarten sind, ist im Hinblick auf die Folgen einer chronischen Exposition der Nachweis einer möglichen Kontamination von großem Interesse. Zudem birgt die hohe Toxizität dieser Cyano- bzw. Mykotoxine aber auch die Gefahr, dass diese als biologische Kampfstoffe missbräuchlich eingesetzt werden. Unter analytischen Gesichtspunkten ist zudem zu berücksichtigen, dass jede dieser Toxingruppen aus einer hohen Anzahl an toxischen Kongeneren besteht. Daher sollte das bei Intoxikationsverdachtsfällen eingesetzte Testsystem idealerweise in der Lage sein, alle humantoxischen Kongenere schnell und zuverlässig vor Ort zu erfassen.

Bisher etablierte physikalisch-chemisch Nachweissysteme, wie HPLC-MS, sind zwar sehr sensitiv, benötigen aber in der Regel eine aufwendige, zeit- und kostenintensive Probenvorbereitung, was in Hinblick auf eine schnelle Detektion nachteilig ist. Ebenso eignen sich solche Verfahren aufgrund ihrer technischen Komplexität ausschließlich für die Verwendung im Labor und nicht für einen Vor-Ort-Einsatz. Im Gegensatz dazu ermöglichen immunbasierte Verfahren eine sensitive Analyse komplexer Matrices bei einem relativ geringen apparativen Aufwand. Hierzu entstand in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen Immunoassay-Formaten, die nicht nur im Labor Anwendung finden, sondern so konzipiert sind, dass sie z. B. direkt vor Ort von nicht-wissenschaftlichem Personal angewendet werden können. Zu den klassischen Vor-Ort-Testsystemen zählen LFAs, die durch eine einfache Handhabung, einen günstigen Preis sowie eine schnelle Messung (5-20 Min) überzeugen. In der Regel benötigen diese Schnelltests kein zusätzliches Auslesegerät. Neben den LFAs rückten Immunosensoren immer stärker in den Fokus der Vor-Ort-Analytik, da sie nicht nur aufgrund des hohen Miniaturisierungs- und Automatisierungsgrades eine schnelle und zuverlässige Analyse ermöglichen, sondern auch ähnlich sensitiv wie die klassischen Immunoassays im Mikrotiterplatten-Format sind. Allerdings ist die Mehrheit der bisher entwickelten Vor-Ort-Tests für den Einsatz im Bereich der Lebensmittel- und Umweltanalytik konzipiert und wurde nicht für die Anwendung bei klinischem Probenmaterial, das im Fall eines Vergiftungsgeschehens analysiert werden muss, getestet bzw. validiert.

Unabhängig davon wurde in den letzten Jahren im Bereich der immunochemischen Analytik niedermolekularer Toxine ein innovatives kompetitives Nachweiskonzept entwickelt bei dem toxinspezifische Antikörper (Ak1) und – im Gegensatz zu gängigen Immunoassays – korrespondierende anti-idiotypische Antikörper (Ak2 $\beta$ ) eingesetzt werden. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, klassisch kompetitive Formate, die markierte Toxine benötigen, durch rein Antikörper-basierte Verfahren zu ersetzen.

Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Ak2 $\beta$ -basierte elektrochemische Mikroarray-Testsysteme zum schnellen und zuverlässigen Vor-Ort-Nachweis von PSP-Toxinen, Microcystinen, Trichothecenen und Aflatoxinen zu entwickeln. Wichtige Aspekte bei der Entwicklung dieser Testverfahren waren die Charakterisierung der Antikörper bezüglich deren Eignung als Fänger- bzw. Detektionsantikörper, die Optimierung des Testformats, die Überprüfung der Assay-Parameter hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit sowie die Sicherstellung der Anwendbarkeit für klinische Probenmatrices.

In der Literatur wurde zwar vielfach die Herstellung anti-idiotypischer Antikörper beschrieben, wobei diese aber in früheren Arbeiten vorrangig mit dem Ziel entwickelt wurden, als Antikörper-basierte Vakzine zur aktiven Immunisierung eingesetzt zu werden (Chanh *et al.*, 1990; Chanh und Hewetson, 1993). Das Potenzial, Ak2 $\beta$  für analytische Zwecke zu verwenden, wurde lange Zeit als gering eingestuft, da bei einer Vielzahl der etablierten Ak2 $\beta$ -basierten Assays die Sensitivität im Vergleich zum klassischen Format deutlich verringert war. So beschrieben Tsutsumi *et al.* (1998) für MC-LR, dass die Sensitivität mehrerer auf monoklonalen Ak2 $\beta$  basierender EIAs bis zu siebenfach unter der des klassischen Assays lag. Zudem wiesen alle Ak2 $\beta$ -basierten Assays Hintergrundsignale von 20% auf, so dass selbst bei hoher Toxinkonzentration keine vollständige Hemmung stattfand. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die selektierten, als Ak2 verwendeten Antikörper eventuell nicht wirklich die an Ak2 $\beta$  gestellten Anforderungen erfüllten, d. h. das Paratop des Ak1 nicht vollständig abdeckten. Möglich wäre allerdings auch, dass die Affinität der Ak2 zum Ak1-Paratop relativ hoch war, so dass auch bei höheren Toxinkonzentrationen unter kompetitiven EIA-Bedingungen keine vollständige Verdrängung der Ak2 möglich war. Dieses Beispiel unterstreicht die Bedeutung einer effizienten, optimierten Screening-Strategie für die Selektion geeigneter Ak2 $\beta$  wie sie von Gayk (2019) realisiert wurde. Dass die Empfindlichkeit Ak2-basierter EIA-Systeme nicht nur von der Affinität des Ak1 zum nachgewiesenen Toxin, sondern auch von der Affinität des Ak2 zum Paratop des Ak1 bestimmt wird, liegt auf der Hand, wird aber oft unterschätzt.

## **1. Etablierung kompetitiver, anti-idiotypischer Antikörper-basierter Testsysteme auf elektrochemischen Mikroarrays**

Bisher wurden bei der Etablierung Ak2 $\beta$ -basierter Assays für niedermolekulare Toxine fast ausnahmslos kamelide VHH-Antikörper eingesetzt (**Tabelle 4**). Da insbesondere monoklonale Antikörper eine hohe Stabilität aufweisen und nach Etablierung stabiler Hybridoma einfach und schnell produziert werden können, ist es umso erstaunlicher, dass nur wenige auf monoklonale Ak2 $\beta$  basierende Assays beschrieben worden sind (**Tabelle 4**).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Etablierung Ak2 $\beta$ -basierter Testverfahren zum Nachweis von MC-LR, T-2/HT-2, RoA und Aflatoxinen monoklonale Ak2 $\beta$  verwendet, die im Rahmen des BMBF-geförderten Forschungsvorhabens „SensTox“ am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch entwickelt worden waren (BMBF, 2015; Gayk, 2019). Der Ak2 $\beta$  für STX stand aus einer früheren Arbeit am Lehrstuhl bereits zur Verfügung (Szkola *et al.*, 2014).

### **1.1. Eignung der eingesetzten Antikörper als Fänger- bzw. Detektionsmolekül**

Um einen Toxin-Nachweis mit hoher Sensitivität zu gewährleisten, standen zunächst Untersuchungen im Vordergrund, die eine Beurteilung der Eignung der eingesetzten Ak1 und Ak2 $\beta$  als Fang- und/oder Detektionsantikörper auf dem Biochip ermöglichen. Sowohl beim Aflatoxin- als auch beim T-2-Nachweis erwies sich die Variante am geeignetsten, bei der Ak1 als Fangantikörper und Ak2 $\beta$  als Detektionsantikörper fungierten. Hierbei konkurrieren freies Toxin und Ak2 $\beta$  direkt um die Bindung an den immobilisierten Ak1. Prinzipiell stimmen die erhaltenen Ergebnisse mit denen von Gayk (2019) für den Nachweis von AFM1 und T-2/HT-2 mittels direkt kompetitivem Ak2 $\beta$ -EIA im Mikrotiterplatten-Format überein. Während Gayk (2019) allerdings postulierte, dass sowohl Ak1 als auch Ak2 $\beta$  als Fang- oder Detektionsantikörper eingesetzt werden können, ergab sich für die Etablierung der Biochip-basierten Assays zum Teil ein anderes Bild. So war die Erstellung eines T-2-Nachweissystems, bei dem Ak2 $\beta$  als Fangantikörper und Ak1 als Detektionsantikörper fungiert, nicht möglich, da keine funktionellen Ak1-Biotin-Konjugate generiert werden konnten. Somit konnte unter den getesteten Bedingungen der T-2-spezifische Ak1 lediglich als Fangantikörper eingesetzt werden. Eine Optimierung der Biotinylierung des Ak1 hinsichtlich Spacerlänge, Anpassung des molaren Biotin-Überschusses oder Zusatz von Stabilisatoren

nach der Konjugation, könnte eine höhere Ausbeute an funktionellen Ak1-Biotin-Konjugaten begünstigen. Alternativ bestünde auch die Möglichkeit eine Biotin-Kopplung an den T-2-Detektionsantikörper via Thiol- oder Carboxylgruppen zu testen. Beim Aflatoxin-Nachweis ergaben sich hingegen Einschränkungen auf Seiten des Ak2 $\beta$ . Hierbei ging die Immobilisierung des Ak2 $\beta$  auf der Chipoberfläche mit einer inakzeptablen Reproduzierbarkeit des Assays einher. Dies ist jedoch ein häufiger beobachtetes Problem bei der Etablierung Antikörper-basierter Mikroarrays, da bei Immunoassays im Array-Format im Vergleich zu denen im Mikrotiterplatten-Format oftmals ein teilweiser oder gar vollständiger Verlust der biologischen Aktivität der Antikörper während der Immobilisierung auftritt (Romanov *et al.*, 2014). Der Einsatz höherer Spottingkonzentrationen verbesserte zwar das Signal/Rausch-Verhältnis, führte aber zu keiner stabileren Assay-Performance, so dass der verwendete Aflatoxin-Ak2 $\beta$  für eine direkte Immobilisierung auf der Goldoberfläche nicht geeignet schien. Grundsätzlich zeigte sich auch, dass während des Immobilisierungsprozesses zu allen Fangantikörpern BSA für die Stabilisierung des Testsystems hinzugegeben werden musste. Vermutlich kam es in Abwesenheit von BSA bei der Trocknung der gespotteten Chips und dem damit einhergehenden Verlust der Antikörper-Hydrathülle zu irreversiblen Konformationsänderungen. Ob BSA in der Lage ist, wie beispielweise Polyvinylalkohol (Wu und Grainger, 2006) oder Disaccharide (Kaushik und Bhat, 2003), zu einer verstärkten Hydratisierung der Antikörper und somit zur einer verbesserten Proteinstabilität während des Immobilisierungsprozesses beizutragen (Lee und Kim, 2002), ist derzeit jedoch nicht bekannt. Dennoch wurden durch den BSA-Zusatz nicht nur die Stabilität des Messsignals und damit die Nachweisgrenze deutlich verbessert, auch die Testempfindlichkeit erhöhte sich um den Faktor 2 (Daten nicht gezeigt). Ebenso berichtete Gayk (2019) von der Notwendigkeit, BSA bei der Antikörper-Immobilisierung einzusetzen. In Anbetracht dessen könnte der hohe Variationskoeffizient von 28% bei dem von Szkola *et al.* (2014) entwickelten Ak2 $\beta$ -basierten Chemilumineszenz-Mikroarray für STX auf das Fehlen eines stabilisierenden Agens während der Immobilisierung zurückzuführen sein.

Für den Antikörper-basierten Nachweis von STX, MC-LR und RoA ergaben sich hingegen keine Einschränkungen hinsichtlich der Möglichkeit Ak1 oder Ak2 $\beta$  als Fänger- bzw. Detektionsantikörper einzusetzen. Interessanterweise erwies sich bei allen drei Assays die Variante am sensitivsten, bei der Ak2 $\beta$  als Fangantikörper und Ak1 als Detektionsantikörper fungierte. Indem der Detektionsantikörper direkt in die Probe appliziert wurde, findet eine vorgeschaltete Bindungsreaktion zwischen freiem Toxin und Ak1-Detektionsantikörper statt. Demnach stehen in der eigentlichen

Kompetitionsreaktion zwischen immobilisiertem Ak2 $\beta$  und Toxin um die Bindung an den Ak1-Detektionsantikörper weniger freie Ak1-Bindungsstellen zur Verfügung, was mit einer verbesserten Testempfindlichkeit einhergehen könnte. Eine Steigerung der Testsensitivität wurde ebenfalls bei der Etablierung eines Fluoreszenz-basierten LFAs zum Nachweis von AFB1 und ZEN bei Einsatz von Ak2 $\beta$ -VHHs als Fangantikörper anstelle des Ak1 beobachtet (Tang *et al.*, 2017).

## 1.2. Etablierung indirekter und direkter Testformate

Für den Singleplex-Nachweis der lebensmittelrelevanten Toxine STX, AFB1 und T-2 wurde in Analogie zu den bereits etablierten Sandwich-Immunoassays für Proteotoxine ein indirektes Testprinzip mit einem biotinylierten Detektionsantikörper (Ak1- oder Ak2 $\beta$ -Biotin) und Streptavidin-konjugierter bGAL als Reporterenzym gewählt. Durch die Verwendung eines kommerziell erhältlichen sekundären Reporterenzym kann eine gleichbleibende Qualität und eine hohe Standardisierbarkeit der Detektion erzielt werden. Durch die konsekutive Testanordnung wird weiterhin verhindert, dass die Aktivität des Signal-generierenden Enzyms durch Bestandteile der Probenmatrix beeinflusst wird (Yang, 2012). Für das indirekt kompetitive Format wurden Nachweisgrenzen im unteren ng/mL-Bereich bei einer Gesamt-Assayzeit von 16,7 Min erreicht. Die Interassay-Reproduzierbarkeit lag mit einem Variationskoeffizient von unter 15% in einem akzeptablen Bereich. Ein Grund für die Chip-zu-Chip-Variabilität könnte der zugrundeliegende Spottingprozess sein, da das Aufbringen der Antikörper auf die Chipoberfläche im kontaktlosen Verfahren erfolgte. Diese Spottingtechnik war aufgrund der Beschaffenheit der interdigitalen Goldelektrode sowie zur Erreichung eines hohen Produktionsdurchsatzes erforderlich. Allerdings denaturieren hierbei Proteine leichter, was zu Unterschieden zwischen einzelnen Biochips führen kann (Barbulovic-Nad *et al.*, 2006). Darüber hinaus hat vermutlich auch die angewandte Immobilisierungstechnik einen wesentlichen Einfluss auf die Chip-zu-Chip-Variabilität. Die Fangantikörper wurden in dieser Arbeit mittels Physisorption auf die Goldelektrodenoberfläche aufgebracht, d. h. eine Absorption auf der Oberfläche erfolgte über intermolekulare und/oder Thiol-Gold-Wechselwirkung. Dies hat den Vorteil, dass die Antikörper ohne komplexe chemische Verfahren oder den Einsatz toxischer Reagenzien immobilisiert werden können. Allerdings hängt die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen stark von den Umgebungsbedingungen, wie pH, Ionenstärke und Temperatur ab (Kazuhiro *et al.*, 2008), so dass eine hoch reproduzierbare Immobilisierung von Antikörpern unter diesen Bedingungen nicht

immer erreicht werden kann. So kann z. B. der direkte Kontakt mit der Oberfläche zu einer Konformationsänderung und damit zu einer verringerten Aktivität des Antikörpers führen (Hlady und Buijs, 1996). Zudem sind die Antikörper nach einer physisorptionsvermittelten Immobilisierung zufällig an der Oberfläche orientiert. Infolgedessen kann es sein, dass innerhalb einer Population immobilisierter Antikörper die Bindungsstellen nicht frei zugänglich sind (Rusmini *et al.*, 2007). Eine bessere Verfügbarkeit der Antigenbindungsstelle kann beispielweise durch eine gerichtete Antikörper-Immobilisierung erreicht werden (Schramm *et al.*, 1993). So können unter Ausbildung kovalenter Gold-Thiol-Bindungen die Fangantikörper z. B. gerichtet und direkt auf der Goldelektrode immobilisiert werden, indem durch Verwendung eines milden Reduktionsmittels, wie Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), selektiv Disulfidbindungen in der Hinge-Region des Antikörpers reduziert werden (Sharma und Mutharasan, 2013; Kirley *et al.*, 2016). Auch wenn für einige Biosensoren gezeigt werden konnte, dass mit diesem Ansatz im Vergleich zur zufälligen Immobilisierung eine Erhöhung der Testsensitivität möglich ist (Peluso *et al.*, 2003; Tsai und Pai, 2009), kann prinzipiell auch bei diesem Verfahren eine Denaturierung der Antikörper aufgrund des direkten Kontakts mit der Oberfläche nicht ausgeschlossen werden. Ebenso könnte es zu unerwünschten Reduktionen anderer Disulfidbindungen im Antikörper kommen, die wiederum für die biologische Funktion essenziell sind. Ein anderer vielversprechender Ansatz zur gerichteten Immobilisierung, bei der ein direkter Kontakt des Antikörpers mit der Oberfläche vermieden wird, ist die Behandlung der Elektrode mit terminal funktionalisierten Thiolen (Reese und Fox, 1998). Dabei entsteht auf dem Chip eine geordnete reaktive Schicht (SAM), die je nach Art der funktionellen Gruppe eine gerichtete Kopplung des Antikörpers ermöglicht. Beispielweise beschrieben Solanki *et al.* (2010) einen elektrochemischen SAM-modifizierten Immunosensor zum Nachweis von OTA in Kaffee. Die Autoren verwendeten ein Thiol mit terminaler Aminogruppe, um den Ak1 Fc-spezifisch auf der Goldelektrode zu immobilisieren. Der Biosensor erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 0,005 ng/mL als hochsensitiv. Eine weitere Möglichkeit der Fc-spezifischen Antikörper-Immobilisierung ergibt sich durch die Verwendung einer zweiten reaktiven Proteinschicht, wie z. B. Protein A oder Protein G, die direkt auf der Elektrode aufgebracht wird und ihrerseits eine hohe Affinität für die Antikörper-Fc-Region besitzt (Bae *et al.*, 2005). Dennoch muss berücksichtigt werden, dass eine zusätzliche Modifizierung bzw. Behandlung der Elektrodenoberfläche – wie es für eine gerichtete Immobilisierung notwendig ist – im Vergleich zu einer zufälligen Anordnung der Antikörper deutlich aufwendiger und kostenintensiver ist.

Auch beim Multiplex-Nachweis der fünf bioterroristisch relevanten Toxine STX, MC-LR, AFB1, T-2 und RoA wurden die Antikörper ungerichtet mittels Physisorption an die Goldoberfläche gebunden, im Gegensatz zum Singleplex-Ansatz wurde aber hier ein direktes Testformat unter Verwendung kovalenter Antikörper-bGAL-Konjugate realisiert. Bei dieser Testvariante entfällt der Bindungsschritt des Reporterenzym über Biotin-Streptavidin-Interaktion, was eine schnellere als auch einfachere Durchführung der Toxindetektion ermöglicht. Da die Verwendung von bGAL als Reporterenzym in EIA-basierten Nachweisverfahren bisher eine eher untergeordnete Rolle spielt, musste zunächst eine Strategie zur Herstellung funktioneller Antikörper-bGAL-Konjugate entwickelt werden. Im Allgemeinen ist die Konjugation von Enzymen an Antikörper sehr gut etabliert, allerdings sind diese Methoden in der Regel für „kleine“ monomere Reporterenzyme, wie HRP (44 kDa), konzipiert. Die bGAL ist hingegen ein tetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von 540 kDa (Craven *et al.*, 1965). Folglich muss bei der Kopplung berücksichtigt werden, dass ein hochmolekularer Proteinkomplex entsteht, dessen Aktivität durch sterische Effekte beeinträchtigt sein könnte. In Anlehnung an Deelder und de Water (1981) sowie Liu *et al.* (2000) erfolgte die Kopplung der Detektionsantikörper über die freie Aminogruppe der Lysin-Seitenkette mit einem heterobisfunktionellen NHS-Ester-Maleimid-Crosslinker an Thiolgruppen der bGAL. Grundsätzlich zeigte sich, dass die Konjugate, bei denen der Antikörper deutlich im molaren Überschuss (5- vs. 2-facher Überschuss) eingesetzt wurde aufgrund eines sehr geringen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht einsetzbar waren (Daten nicht gezeigt). Ein Antikörper/bGAL-Verhältnis von 2:1 erwies sich hingegen als optimal. Insgesamt gelang es mit allen Detektionsantikörpern funktionelle Konjugate herzustellen. Wie zu erwarten war, konnte beim direkt kompetitiven Multiplex-Format keine signifikante Veränderung der Sensitivität im Vergleich zum indirekt kompetitiven Singleplex-Format festgestellt werden. Durch die Modifizierung des Testablaufs konnte aber die Gesamt-Assayzeit um 3,3 Min auf 13,4 Min verkürzt werden. Die Reproduzierbarkeit des direkt kompetitiven Assays lag mit einem Variationskoeffizient von maximal 11% in einem akzeptablen Bereich und zeigte im Vergleich zum indirekten Format sogar eine leichte Verbesserung – eventuell dadurch bedingt, dass die zusätzliche Varianz eines weiteren Bindungsschrittes eliminiert wurde. Auch Zhao *et al.* (2019) verglichen die Performance zweier Immunoassay-Formate unter Einsatz eines Mimotop-HRP-Konjugats bzw. Mimotop-Phagens plus Sekundärantikörper-Enzym-Konjugat für die Detektion von AFB1 in Weizen. Beide Assays waren ähnlich sensitiv, unterschieden sich aber deutlich hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit, wobei das direkte Format bei der Validierung besser abschnitt.

### 1.3. Beurteilung der Sensitivität und Spezifität

Das bis heute immer noch am meisten eingesetzte Vor-Ort-Testsystem der LFA (Tripathi *et al.*, 2018; Nolan *et al.*, 2019). Allerdings sind klassische LFA meist wenig sensitiv und derzeit auch nur begrenzt multiplexfähig (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Mohd Hanafiah *et al.*, 2017), was die Möglichkeit einer gleichzeitigen Analyse mehrerer Toxine in einer Probe stark einschränkt. Insbesondere beim Verdacht eines intentionalen Intoxikationsgeschehens ist es notwendig, parallel auf das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit anderer relevanter Toxine testen zu können. Zudem bergen kompetitive LFAs grundsätzlich die Gefahr, dass Testergebnisse falsch interpretiert werden, da bei diesem EIA-Typ ein fehlendes Messsignal ein positives Messergebnis darstellt. Die hier verwendete tragbare Biosensor-Plattform pBDi ermöglicht durch die automatische Probenanalyse und Software-gestützte Auswertung ein ebenso leicht zu bedienendes Vor-Ort-Testsystem, das vor allem keine Interpretationsspielräume bei den Testergebnissen zulässt. Zudem ermöglicht das Mikroarray-basierte Verfahren eine multiplexfähige Analytik.

Mit denen in dieser Arbeit entwickelten Singleplex- und Multiplex-Biochip-Assays wurden alle Toxine im unteren ng/mL-Bereich in weniger als 15 Min detektiert. Der Nachweis des cyanobakteriellen PSP-Toxins STX gelang auf der pBDi-Plattform mit einer Nachweisgrenze von 1,2 ng/mL. Lediglich ein kommerziell erhältlicher STX-LFA wurde bislang im Bereich der Erkennung biologischer Gefahrenlagen getestet (Komano *et al.*, 2011). Die postulierte Nachweisgrenze lag bei 12 ng/mL. Andere Vor-Ort-Detektionssysteme wurden hingegen vorrangig für die Anwendung im Bereich der Lebensmittelanalyse entwickelt. So validierten Jawaid *et al.* (2015) einen kommerziell verfügbaren LFA zum Nachweis von PSP-Toxinen in Muschelfleisch, der durch Verwendung eines Lesegeräts eine Nachweisgrenze von 0,1 ng/mL in Puffer aufweist. Einen chemilumineszenten Multiplex-Mikroarray etablierten Szkola *et al.* (2013), um den Gehalt an STX, Domoinsäure und Okadasäure in Muscheln zu überprüfen. Bei Multiplex-Messungen wurde eine Nachweisgrenze von 0,5 ng/mL STX, 1,4 ng/mL Domoinsäure und 0,6 ng/mL Okadasäure in Puffer erzielt.

Der Biochip-Assay zum Nachweis des cyanobakteriellen Microcystins MC-LR erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 1,5 ng/mL als ebenfalls sehr sensitiv. Andere Schnelldetektionssysteme wiesen ähnliche Sensitivitäten auf. Tippkötter *et al.* (2009) etablierten einen LFA mit einem monoklonalen Ak1-Antikörper, der an kolloidales Gold konjugiert war, und wiesen 5 ng/mL MC-LR in Wasserproben nach. Ebenfalls für die Anwendung im Bereich der Wasseranalytik gedacht, entwickelte die Firma



MBio Diagnostics ein Vor-Ort-Biosensor-System basierend auf planarer Wellenleiter-Technologie (Bickman *et al.*, 2018). Der Duplex-Mikroarray ermöglichte eine sensitive Detektion von 0,4 ng/mL MC-LR und 0,7 ng/mL Cylindrospermopsin innerhalb von 10 Min.

Für die Mykotoxine AFB1 und T-2 wurde mit dem Multiplex-Biochip-Assay eine Nachweisgrenze von 0,6 ng/mL AFB1 und 0,4 ng/mL T-2 erreicht, so dass dieser Assay eine ähnliche oder höhere Empfindlichkeit als bisher beschriebene LFAs besitzt. Beispielweise wurden mit einem Multiplex-LFA basierend auf amorphen Kohlenstoff-Nanopartikel-markierten Ak1 visuelle Nachweisgrenzen von 5 ng/mL T-2, 10 ng/mL Deoxynivalenol (DON) und 0,5 ng/mL ZEN erreicht (Zhang *et al.*, 2017). Xu *et al.* (2018) konnten mit verschiedenfarbigen Nanopartikel-markierten Ak1 die visuelle Auswertbarkeit von Multiplex-LFAs so vereinfachen, dass nach 20 Min bis zu 0,5 ng/mL AFB1, 30 ng/mL T-2 und 2 ng/mL ZEN mit bloßem Auge detektierbar waren. Im Bereich der Biosensorik entwickelten Oswald *et al.* (2013) einen sensitiven Chemilumineszenz-basierten Multiplex-Mikroarray, der in 19 Min 0,06 ng/mL AFB1, 0,07 ng/mL OTA, 2,5 ng/mL DON und 9,9 ng/mL Fumonisin B1 nachweist.

Der Mikroarray-basierte Nachweis des Typ-D-Trichothecens RoA erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 0,5 ng/mL ebenfalls als sehr sensitiv. Der hier verwendete Ak1 konnte bereits erfolgreich als Fangantikörper in einem klassischen LFA eingesetzt werden (Schneider *et al.*, 1991). Allerdings ließ sich dort lediglich eine visuelle Nachweisgrenze von 15 ng/mL bei einer Testdauer von 30 Min erreichen. Ein vergleichbares Biosensor-System für Typ-D-Trichothecene wurde bisher noch nicht beschrieben. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte RoA-Nachweis stellt somit eine der ersten mobilen Biosensor-basierten Detektionsmöglichkeiten für dieses Toxin dar.

Der wohl wichtigste Unterschied zwischen den hier etablierten Assays und den zuvor beschriebenen Vor-Ort-Screeningmethoden besteht darin, dass in dieser Arbeit Ak2 $\beta$  anstelle markierter Toxine als Assayreagenzien verwendet wurden. Dies hat den Vorteil, dass eine Exposition des Testanwenders gegenüber gesundheitsgefährdenden Assaykomponenten deutlich reduziert ist. Mit Hinblick auf die Herstellung solcher Tests ermöglichen monoklonale Antikörper zudem eine bessere Test-Standardisierung sowie eine langfristige Verfügbarkeit der Immunreagenzien (Lipman *et al.*, 2005). In der Literatur sind bisher lediglich zwei weitere Ak2 $\beta$ -basierte Schnelltests beschrieben (Szkola *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017). Tang *et al.* (2017) verwendeten Ak2 $\beta$  in Form von Ak2 $\beta$ -VHH-abbildenden Phagen für die Entwicklung eines zeitaufgelösten Fluoreszenz-LFAs zum Nachweis von AFB1 und ZEN in Mais. Hierzu dienten die Ak2 $\beta$ -VHHs als Fangmoleküle. Im kompetitiven Schritt wurden Lanthanoid-

gekoppelte Ak1 als Detektionsantikörper eingesetzt. Nach einer Assayzeit von 8 Min lag die Nachweisgrenze bei 0,05 ng/mL AFB1 und 0,07 ng/mL ZEN, wobei die Streifen tests bei 37°C inkubiert wurden. Außerdem ist für die Auswertung dieses LFAs ein tragbares Fluoreszenz-Spektralphotometer erforderlich. Bei dem von Szkola *et al.* (2014) entwickelten Ak2 $\beta$ -basierten Mikroarray für STX diente der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Ak2 $\beta$  ebenfalls als Fangantikörper. Der chemilumineszente Toxin-Nachweis bei Szkola *et al.* (2014) erfolgte im indirekten Format mit Streptavidin-konjugierter Poly-HRP. Bei einer Assayzeit von 18 Min wurde eine Nachweisgrenze von 2,3 ng/mL STX erzielt.

Letztlich liegt der Vorteil des hier beschriebenen Ak2 $\beta$ -basierten Multiplex-Biochips in der höheren Anzahl gleichzeitig Vor-Ort-nachweisbarer Toxine, wobei die Assay-Performance ähnlich oder besser im Vergleich zu den bisher existierenden Ak2 $\beta$ -basierten Schnelltests ist.

Neben einer hohen Sensitivität sollte ein Vor-Ort-Testsystem auch eine möglichst breitbandige Detektion der jeweiligen Toxingruppe ermöglichen und so im Idealfall alle toxischen Kongenere erfassen.

Bei den PSP-Toxinen bestimmen die funktionellen Seitengruppen maßgeblich deren Toxizität (Oshima *et al.*, 1993). Dabei sind die nicht-sulfatierten PSP-Toxine STX und NEO für den Menschen am toxischsten, gefolgt von den monosulfatierten Toxinen GTX-1 bis GTX-4 (Botana *et al.*, 2017). Die decarbamoylierten Varianten weisen eine geringe Toxizität auf. Der hier entwickelte Ak2 $\beta$ -basierte Biochip für PSP-Toxine ermöglicht die breitbandige Detektion der Kongenere STX, GTX-2, GTX-3, GTX-5, dc-STX, dc-GTX-2 und dc-GTX-3. Für den eingesetzten Ak1 konnte hingegen keine Reaktivität gegenüber den hydroxylierten Kongeneren NEO, GTX-1 oder GTX-4 nachgewiesen werden. Auch mit anderen kommerziell erhältlichen Tests ist derzeit kein immunchemisches Screening möglich, das alle toxischen PSP-Toxine einschließt (Etheridge, 2010). Der Grund dafür ist, dass PSP-Toxin-Antikörper äußerst subgruppenspezifisch reagieren (Garthwaite *et al.*, 2001; Fonfría *et al.*, 2007), so dass aus immunologischer Sicht die Familie der PSP-Toxine zusätzlich in eine STX- (nicht hydroxyliert) und NEO- (hydroxyliert) Gruppe unterteilt werden muss (Usleber *et al.*, 2001). Aus diesem Grund kombinierten Campbell *et al.* (2011) einen polyklonalen STX- sowie einen NEO-spezifischen Antikörper auf einer SPR-Chipoberfläche und führten so die Reaktivitätsprofile der beiden Antikörper in einem Assay zusammen. Mit Ausnahme von dc-STX und GTX-5 konnte damit das gesamte Spektrum der PSP-Toxine erfasst werden. Erst kürzlich berichtete die Firma SeaTox Research Inc

(Wilmington, USA) von der Entwicklung eines PSP-Toxin-EIAs unter Einsatz eines monoklonalen anti-NEO-Antikörpers, der eine hohe Kreuzreaktivität mit STX aufweist (McCall *et al.*, 2019). Nachteilig war allerdings, dass die Reaktivität gegenüber den Gonyautoxinen GTX-1 bis GTX-4 sehr gering war. Durch Behandlung der Probe mit L-Cystein konnten allerdings GTX-1/-4 in NEO und GTX-2/-3 in STX umgewandelt werden, so dass es letztlich möglich war, mit nur einem Antikörper alle toxischen PSP-Toxin-Kongenere nachzuweisen. Im Gegensatz dazu können zum Nachweis von Microcystinen Antikörper mit breiter Spezifität relativ leicht generiert werden. Da bei allen Microcystinen die toxikologischen Eigenschaften weitestgehend durch die AS Adda bestimmt wird (Harada *et al.*, 1990), konnten durch Einsatz von Adda-Analoga kongenerunabhängige Antikörper mit generischen Eigenschaften hergestellt werden (Fischer *et al.*, 2001; Zeck *et al.*, 2001), wobei dieses Verfahren patentrechtlich geschützt ist (US Patent No. 6967240B1). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Microcystin-Antikörper diente MC-LR-HRP als Immunogen. Der dabei erhaltene Ak1 besitzt eine breite Reaktivität und kann alle getesteten Microcystin-Kongenere sowie das toxische Struktur-Analogon Nodularin-R nachweisen, wobei eine hohe Reaktivität insbesondere für Arginin-haltige Kongenere besteht. Einen anderen Ansatz für die Etablierung eines breitbandigen Microcystin-Nachweissystems beschrieben Samdal *et al.* (2014), indem sie versuchten die Spezifität des Antikörpers für einzelne Microcystin-Kongenere zu minimieren. Durch die Verwendung einer Microcystin-Mischung als Immunogen wurde ein polyklonales Antikörperserum mit generischen Eigenschaften gewonnen, dessen Reaktivität gegenüber 18 getesteten Microcystin-Kongeneren bei 42-100% lag.

Bei den Aflatoxinen wird die toxische Potenz durch die C8-C9-Doppelbindung im terminalen Furan bestimmt (Essigmann *et al.*, 1977). Der hier etablierte Ak2 $\beta$ -basierte Biosensor für Aflatoxine erlaubt somit nicht nur einen breitbandigen Nachweis aller lebensmittelrelevanten Aflatoxine, sondern ermöglicht gleichzeitig aufgrund der hohen Kreuzreaktivitäten mit AFB1, AFM1 und AFG1 eine sehr sensitive Detektion der toxischsten Vertreter.

Beim T-2-Nachweis reagiert der monoklonale T-2-Ak1 neben T-2 auch mit dem toxischen Hauptmetaboliten HT-2. Die Reaktivitätsprofile der beiden Ak1 sind vergleichbar mit den von Gayk (2019) beschriebenen Ergebnissen im Mikrotiterplatten-Format. Die Untersuchung zur Spezifität der Typ-D-Trichothecene beschränkte sich aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Referenzmaterialien auf einige wenige Vertreter dieser Toxinfamilie. Der verwendete anti-RoA-Ak1 detektierte alle getesteten Kongenere der Typ-D-Trichothecene. In Übereinstimmung mit den

Ergebnissen von Dietrich *et al.* (1995) zeigten hierbei die Vertreter aus der Gruppe der Roridine die höchste Reaktivität.

Zudem zeigte sich, dass alle Antikörper hochspezifisch für ihre jeweilige Toxingruppe sind und keine unspezifische Bindung anderer Toxine stattfand.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit durch die Implementierung eines kompetitiven Ak2 $\beta$ -basierten Nachweiskonzepts auf einer elektrochemischen Vor-Ort-Mikroarray-Plattform ein breitbandiges Detektionssystem geschaffen werden, mit dem erstmalig bis zu fünf verschiedene niedermolekulare Toxingruppen sensitiv und hochspezifisch in weniger als 15 Min gleichzeitig detektiert werden können.

## 2. Anwendung der Mikroarray-Systeme für klinische Proben

Die in dieser Arbeit etablierten Nachweissysteme sollten für die direkte Toxindetektion in Urin- und/oder Blutproben angewendet werden. Hierbei ist zu beachten, dass Blut und Urin äußerst komplexe Matrices sind, die große Mengen an Proteinen, anderen Makromolekülen und Elektrolyte enthalten, die die Messgenauigkeit beeinflussen können. Außerdem unterscheiden sich die zu erwartenden Konzentrationen an Toxin in Serum und im Urin deutlich voneinander. Im Serum liegen diese im einstelligen ng/mL-Bereich, wohingegen nach einer Vergiftung deutlich höhere Konzentrationen von bis zu 100 ng/mL im Urin nachweisbar sind (Pouria *et al.*, 1998; Hooper *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2010; Coleman *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2019). Obwohl es derzeit keine Richtlinien für die Validierung einer Methode zum Nachweis von Toxinen in Körperflüssigkeiten gibt, muss dennoch sichergestellt werden, dass der eingesetzte Test ausreichend sensitiv und zuverlässig ist. Die implementierten Ak1 zeichnen sich durch eine – wie oben diskutiert – gewünschte breite, aber auch variable Kreuzreaktivität mit Vertretern der jeweiligen Toxingruppen aus. Dies bedeutet aber auch, dass in Abhängigkeit vom Toxinprofil der untersuchten Probe die Analysen zwangsläufig immer zu einer Über- oder Unterschätzung der tatsächlich vorliegenden Toxinkonzentration führen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Nachweise wurden daher als qualitative Screeningverfahren unter Berücksichtigung von Richtlinien validiert, die bei der Überprüfung von Methoden zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen eingesetzt werden (EC, 2002; CRLs, 2010). Prinzipiell erlauben die entwickelten Tests aber zumindest semiquantitative Aussagen, was für eine schnelle Diagnose einer potenziellen Vergiftung wichtig ist. Letztlich ist es – wie bei allen Screening-Verfahren – im Fall eines positiven Resultates unerlässlich, dass eine Bestätigung der Ergebnisse durch laborbasierte, unabhängige Verfahren erfolgt.

Für die Probenmatrix Urin konnten alle drei Singleplex-Testsysteme zum Nachweis von STX, AFM1 bzw. HT-2 erfolgreich anhand künstlich kontaminierter Proben mit einer Fehlerrate von 5% validiert werden. Mit Cut-Off-Werten von 40 ng/mL STX, 20 ng/mL HT-2 und 8 ng/mL AFM1 ist die Sensitivität der in dieser Form etablierten Testsysteme ausreichend, um insbesondere eine akute Intoxikation nachzuweisen. Ebenso gelang es mit dem Multiplex-Testsystem in künstlich kontaminierten Serumproben bis zu 6 ng/mL STX und MC-LR sowie bis zu 4 ng/mL HT-2, RoA und AFB1 eindeutig zu detektieren. Die Wiederfindung lag im Durchschnitt bei 80-115%. Lediglich der Nachweis von 6 ng/mL MC-LR führte bei einer Probe zu einem falsch-negativen Ergebnis. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors lag die im Assay getestete Konzentration von MC-LR bei 3 ng/mL und somit letztlich nur zweifach über der Nachweisgrenze von 1,5 ng/mL in Puffer. In Kombination mit einer Wiederfindung von weniger als 80% führte dies wahrscheinlich zu einem falsch-negativen Ergebnis von MC-LR bei einer von fünf Proben. Bei HT-2 zeigte sich im Serum ein hoher Matrixeinfluss, wohingegen dieses Phänomen bei der Matrix Urin nicht auftrat. Blutserum enthält im Vergleich zu Urin einen deutlich höheren Protein-Anteil, so dass möglicherweise durch eine unspezifische Wechselwirkung mit Serumproteinen die Bindung von HT-2 an den auf dem Chip immobilisierten Fangantikörper gestört sein könnte. Eine Beeinflussung der Bindung des Detektionsantikörpers an den T-2-Fangantikörper durch Bestandteile im Serum konnte hingegen ausgeschlossen werden, da der normalisierte Serum-B0-Wert bei ca. 117% lag.

Insgesamt war für die in dieser Arbeit untersuchten Probenmatrices Urin und Serum eine einfache Verdünnung der Proben mit einem geeigneten Probenpuffer ausreichend, um die untersuchten Cyano- und Mykotoxine zuverlässig einzeln oder simultan nachzuweisen. Falsch-positive Testergebnisse traten nicht auf. Dies ist zum einen ein weiterer Beleg dafür, dass aufgrund der hohen Robustheit elektrochemischer Biosensoren nur ein minimaler Aufwand zur Probenvorbereitung nötig ist (Jodra *et al.*, 2015) und zeigt zum anderen, dass die implementierten, auf Ak1/Ak2 $\beta$  basierenden Testsysteme eine hohe Toleranz gegenüber Probenmatrices und deren Störsubstanzen aufweisen.

Im Gegensatz zu physikalisch-chemischen Methoden sind bisher kaum Biosensorbasierte Testverfahren bekannt, die zum Toxin-Nachweis in klinischen Proben eingesetzt werden (Arce-López *et al.*, 2020). Oft beschränken sich diese auf den Einzeltxin-Nachweis und erlauben keine simultane Detektion verschiedener Toxingruppen. Beispielweise entwickelten Jiang *et al.* (2019) einen elektrochemischen Immunosensor für die Bestimmung von ZEN in Urin und Blutplasma. Für beide

Matrices wurde eine Nachweisgrenze von 5 pg/mL innerhalb von 20 Min sowie eine Wiederfindung von 90-110% postuliert. Hierzu mussten die Proben allerdings mit Acetonitril gefällt, unter Stickstoff getrocknet und in Puffer resuspendiert werden. Eine Alternative zum Immunosensor stellten Nameghi *et al.* (2016) vor. Unter Verwendung eines Aptamers konnte in einem Fluoreszenz-basierten Biosensor OTA in Serum mit einer Nachweisgrenze von 74,3 pg/mL nachgewiesen werden. Einen anderen hochsensitiven Aptamer-basierten Sensor, der elektrochemisch ausgelesen wird, entwickelten Abnous *et al.* (2017) zum Nachweis von AFB1 in Serumproben. Bei einer Wiederfindung von 95,4-108,1% lag die Nachweisgrenze bei 2,8 pg/mL, wobei die Testzeit 2,25 h betrug. Das eingesetzte Aptamer war äußerst spezifisch für AFB1 und zeigte keine nennenswerte Reaktivität mit anderen Aflatoxinen. Für einen Vor-Ort-Einsatz ist allerdings eine solch hohe Toxinselektivität nachteilig, da nicht alle toxischen Kongenere erfasst werden können.

Insgesamt ermöglichen die in dieser Arbeit entwickelten Singleplex- und Multiplex-Mikroarrays erstmalig ein schnelles, zuverlässiges und breitbandiges Vor-Ort-Screening verschiedener Toxingruppen in humanen Urin- und Blutserumproben.

Mittelfristig könnten die sensitiven und schnell durchzuführenden Ak2 $\beta$ -basierten Assays auch in der Lebensmittel- oder Umweltanalytik vor Ort eingesetzt werden und dort z. B. die klassisch kompetitiven Schnelltests ablösen. Darüber hinaus können zukünftig diese rein Antikörper-basierten Nachweise für niedermolekulare Toxine nun leicht mit Immunoassays für hochmolekulare Toxine auf einem Biochip kombiniert werden (Szkola *et al.*, 2014) – ein wichtiger Schritt zur Realisierung eines universellen und flexibel einsetzbaren Vor-Ort-Detektionssystems.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

### **Elektrochemische Mikroarrays basierend auf anti idiotypischen Antikörpern zum Vor-Ort-Nachweis von Cyanotoxinen und Mykotoxinen**

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Etablierung elektrochemischer Mikroarray-basierter Enzymimmunoassays (EIA) zum schnellen und sensitiven Vor-Ort-Nachweis von niedermolekularen Cyano- und Mykotoxinen, die aufgrund ihrer hohen toxischen Potenz von besonderer Relevanz für die öffentliche Gesundheit sind. Hierzu wurden monoklonale toxinspezifische (Ak1) und komplementäre anti-idiotypische Antikörper (Ak2 $\beta$ ) verwendet. Im Fokus der Untersuchungen standen das PSP-Toxin Saxitoxin (STX), das Microcystin MC-LR, die Trichothecene T-2-Toxin (T-2) und Roridin A (RoA) sowie Aflatoxin B1 (AFB1).

Zum einen wurden Singleplex-Mikroarrays für die lebensmittelrelevanten Toxine STX, T-2 bzw. Aflatoxine unter Anwendung eines indirekt kompetitiven Formats mit einer Gesamt-Assayzeit von 16,7 Min entwickelt. Die etablierten Assays erwiesen sich als hochsensitiv, die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,3 und 1,0 ng Toxin pro mL. Die Mikroarrays wurden auf der mobilen und vollautomatisierten Detektionsplattform pBDi (*portable BioDetector integrated*) ausgelesen. Im Hinblick auf die praktische Anwendbarkeit wurden die Biosensoren als qualitative Screeningverfahren anhand künstlich kontaminierter Urinproben erfolgreich validiert. Zum anderen wurde ein Multiplex-Mikroarray entwickelt, der basierend auf einem direkt kompetitiven Format die parallele Detektion der bioterroristisch relevanten Toxine STX, MC-LR, T-2, RoA und AFB1 erlaubt. Die Verwendung kovalenter Antikörper-Enzym-Konjugate ermöglichte eine schnellere und einfachere Durchführung des Tests, so dass die fünf Toxine sowohl einzeln als auch simultan bereits nach 13,4 Min hochsensitiv und hochspezifisch nachweisbar waren. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,4 und 1,5 ng Toxin pro mL. Zudem wurde die Anwendbarkeit des Testsystems für humanes Blutserum demonstriert. Des Weiteren konnte die hohe Gruppenspezifität der eingesetzten Antikörper gezeigt werden, so dass eine breitbandige Erkennung toxischer Kongenere und damit ein hohes Maß an diagnostischer Sicherheit erreicht wurde.

Somit können die etablierten Screeningverfahren beim Verdacht einer akzidentellen oder intentionalen Intoxikation der frühzeitigen und zuverlässigen Detektion von Cyano- und Mykotoxinen in klinischer Probenmatrices, wie Urin und Serum, dienen.

---

Insgesamt kann das Konzept des rein Antikörper-basierten (Ak1/Ak2 $\beta$ ), toxinfreien, kompetitiven Nachweises in der Zukunft auch auf andere diagnostische Bereiche der Medizin oder Rückstandsanalytik übertragen werden, bei denen eine mögliche Toxinexposition des Endnutzers vermieden werden soll.



## VI. SUMMARY

### **Electrochemical Microarrays Based on Anti-Idiotypic Antibodies for On-Site Detection of Cyanotoxins and Mycotoxins**

The present work describes the development and establishment of electrochemical microarray-based enzyme immunoassays (EIA) for rapid and sensitive on-site detection of low molecular weight cyanotoxins and mycotoxins which are particularly relevant to the public health due to their high toxicity. For this purpose, monoclonal toxin-specific antibodies (Ab1) and complementary anti-idiotypic antibodies (Ab2 $\beta$ ) were used. The studies focused on the PSP toxin saxitoxin (STX), the microcystin MC-LR, the trichothecenes T-2 toxin (T-2) and roridin A (RoA) as well as the aflatoxin B1 (AFB1).

On the one hand, singleplex microarrays for the food relevant toxins STX, T-2 as well as aflatoxins were developed using an indirect competitive assay format with a total assay of 16.7 min. The established assays enabled the sensitive detection of the toxins with detection limits ranging from 0.3 to 1.0 ng toxin per mL. Read-out of the microarrays was performed by using the portable and fully automated detection platform pBDi (*portable BioDetector integrated*). To demonstrate the applicability of the developed biosensors, the assays were validated as qualitative screening tools by using artificially contaminated urine samples. On the other hand, a multiplex microarray based on a direct competitive format was developed for the parallel detection of the bioterrorism relevant low molecular weight toxins STX, MC-LR, T-2, RoA and AFB1. The use of covalently linked antibody-enzyme conjugates resulted in a faster and simplified test setup. Thus, the five toxins could be detected either separately or simultaneously within 13.4 min, detection limits ranged from 0.4 to 1.5 ng toxin per mL. The practical application of the detection system was shown by identifying the toxins in artificially contaminated human blood serum. Furthermore, by demonstrating the high group specificity of the employed antibodies it could be proved that the developed assays enabled a broad range detection of multiple toxic congeners of a toxin group, thus, enhancing the diagnostic reliability of the method.

Therefore, the established screening assays can be used for efficient and reliable detection of cyanotoxins and mycotoxins in clinical samples, like human serum and urine, after intentional or natural occurring poisoning incidents.

Overall, the concept of solely antibody based (Ab1/Ab2 $\beta$ ), competitive, toxin-free assays can be applied, in future, to other diagnostic fields in medicine or residue analysis, in which exposure of the end-user to toxic assay reagents needs to be avoided.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abia, W.A.; Warth, B.; Sulyok, M.; Krska, R.; Tchana, A.; Njobeh, P.B.; Turner, P.C.; Kouanfack, C.; Eyongetah, M.; Dutton, M., *et al.* (2013). Bio-monitoring of mycotoxin exposure in Cameroon using a urinary multi-biomarker approach. *Food and Chemical Toxicology*, 62: 927-934.

Abnous, K.; Danesh, N.M.; Alibolandi, M.; Ramezani, M.; Emrani, A.S.; Zolfaghari, R. und Taghdisi, S.M. (2017). A new amplified  $\pi$ -shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1. *Biosensors and Bioelectronics*, 94: 374-379.

Abraxis. Abraxis Saxitoxin (PSP)- und Microcystin-ELISA. o.D.: <https://www.eurofintechologies.com/products/water.html>. (abgerufen am 04.01.2020).

AG. Australia Group Common Control List Handbook Volume II: Biological Weapons-Related Common Control Lists. Government, U.S., ed. Australia Group 2018: <https://australiagroup.net/en/documents/Australia-Group-Common-Control-List-Handbook-Volume-II.pdf>. (abgerufen am 30.08.2019).

Agrawal, M.; Yadav, P.; Lomash, V.; Bhaskar, A.S.B. und Lakshmana Rao, P.V. (2012). T-2 toxin induced skin inflammation and cutaneous injury in mice. *Toxicology*, 302: 255-265.

Akkoyun, A.; Kohen, V.F. und Bilitewski, U. (2000). Detection of sulphamethazine with an optical biosensor and anti-idiotypic antibodies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 70: 12-18.

Albers, J.; Grunwald, T.; Nebling, E.; Piechotta, G. und Hintsche, R. (2003). Electrical biochip technology - a tool for microarrays and continuous monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377: 521-527.

Ali, N.; Hossain, K. und Degen, G.H. (2018). Blood plasma biomarkers of citrinin and ochratoxin A exposure in young adults in Bangladesh. *Mycotoxin Research*, 34: 59-67.

Amuzie, C.J.; Islam, Z.; Kim, J.K.; Seo, J.-H. und Pestka, J.J. (2010). Kinetics of Satratoxin G Tissue Distribution and Excretion Following Intranasal Exposure in the Mouse. *Toxicological Sciences*, 116: 433-440.

Anfossi, L.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; D'Arco, G. und Giraudi, G. (2013). Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 467-480.

Anfossi, L.; Di Nardo, F.; Cavallera, S.; Giovannoli, C. und Baggiani, C. (2018). Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors*, 9: 2.

Aranda-Rodriguez, R.; Kubwabo, C. und Benoit, F.M. (2003). Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon*, 42: 587-599.

Arce-López, B.; Lizarraga, E.; Vettorazzi, A. und González-Peñas, E. (2020). Human Biomonitoring of Mycotoxins in Blood, Plasma and Serum in Recent Years: A Review. *Toxins*, 12: 147.

Asao, T.; Büchi, G.; Abdel-Kader, M.M.; Chang, S.B.; Wick, E.L. und Wogan, G.N. (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*, 85: 1706-1707.

Asao, T.; Büchi, G.; Abdel-Kader, M.M.; Chang, S.B.; Wick, E.L. und Wogan, G.N. (1965). The Structures of Aflatoxins B and G1. *Journal of the American Chemical Society*, 87: 882-886.

Azevedo, S.M.; Carmichael, W.W.; Jochimsen, E.M.; Rinehart, K.L.; Lau, S.; Shaw, G.R. und Eaglesham, G.K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 181-182: 441-446.

Bae, Y.M.; Oh, B.-K.; Lee, W.; Lee, W.H. und Choi, J.-W. (2005). Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 103-110.

Baertschi, S.W.; Raney, K.D.; Shimada, T.; Harris, T.M. und Guengerich, F.P. (1989). Comparison of rates of enzymatic oxidation of aflatoxin B1, aflatoxin G1, and sterigmatocystin and activities of the epoxides in forming guanyl-N7 adducts and inducing different genetic responses. *Chemical Research in Toxicology*, 2: 114-112.

Bailey, E.A.; Iyer, R.S.; Stone, M.P.; Harris, T.M. und Essigmann, J.M. (1996). Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 1535-1539.

Baliu-Rodriguez, D.; Kucheriavaia, D.; Palagama, D.S.W.; Lad, A.; O'Neill, G.M.; Birbeck, J.A.; Kennedy, D.J.; Haller, S.T.; Westrick, J.A. und Isailovic, D. (2020). Development and Application of Extraction Methods for LC-MS Quantification of Microcystins in Liver Tissue. *Toxins*, 12: 263.

Barbulovic-Nad, I.; Lucente, M.; Sun, Y.; Zhang, M.; Wheeler, A.R. und Bussmann, M. (2006). Bio-microarray fabrication techniques--a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26: 237-259.

Bartram, J. und Chorus, I. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Boca Raton, Florida, USA: *CRC Press*.

Bennett, J.W. und Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.

Bhattacharya-Chatterjee, M.; Chatterjee, S.K. und Foon, K.A. (2001). The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3: 63-69.

Bickman, S.R.; Campbell, K.; Elliott, C.; Murphy, C.; O'Kennedy, R.; Papst, P. und Lochhead, M.J. (2018). An Innovative Portable Biosensor System for the Rapid Detection of Freshwater Cyanobacterial Algal Bloom Toxins. *Environmental Science and Technology*, 52: 11691-11698.

Bona, C. und Köhler, H. (1984). Anti-idiotypic antibodies and internal images. In: Monoclonal and Anti-idiotypic Antibodies: Probes for Receptor Structure and Function. Venter, J.; Fraser, C. und Lindstrom, J. (Hrsg.). New York City, New York, USA: *Liss Inc.* 141-149.

Botana, L.M.; Hess, P.; Munday, R.; Nathalie, A.; DeGrasse, S.L.; Feeley, M.; Suzuki, T.; van den Berg, M.; Fattori, V.; Garrido Gamarro, E., *et al.* (2017). Derivation of toxicity equivalency factors for marine biotoxins associated with Bivalve Molluscs. *Trends in Food Science and Technology*, 59: 15-24.

Bragg, W.A.; Garrett, A.; Hamelin, E.I.; Coleman, R.M.; Campbell, K.; Elliott, C.T. und Johnson, R.C. (2018). Quantitation of saxitoxin in human urine using immunocapture extraction and LC-MS. *Bioanalysis*, 10: 229-239.

Brasel, T.L.; Campbell, A.W.; Demers, R.E.; Ferguson, B.S.; Fink, J.; Vojdani, A.; Wilson, S.C. und Straus, D.C. (2004). Detection of trichothecene mycotoxins in sera from individuals exposed to *Stachybotrys chartarum* in indoor environments. *Archives of Environmental Health*, 59: 317-323.

Brian, P.W.; Dawkins, A.W.; Grove, J.F.; Hemming, H.G.; Lowe, D. und Norris, G.L.F. (1961). Phytotoxic Compounds produced by *Fusarium equiseti*. *Journal of Experimental Botany*, 12: 1-12.

Bundesamt für Justiz. Ausführungsgesetz zu Artikel 26 Abs. 2 des Grundgesetzes - Anlage (zu § 1 Abs. 1) - Kriegswaffenliste. 2017: <https://www.gesetze-im-internet.de/krwaffkontrg/anlage.html>. (abgerufen am 12.11.2019).

Busam, L. und Habermehl, G.G. (1982). Accumulation of mycotoxins by *Baccharis coridifolia*: a reason for livestock poisoning. *Naturwissenschaften*, 69: 392-393.

Butler, J.E. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunoassay*, 21: 165-209.

Cagnin, S.; Caraballo, M.; Guiducci, C.; Martini, P.; Ross, M.; Santaana, M.; Danley, D.; West, T. und Lanfranchi, G. (2009). Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life. *Sensors*, 9: 3122-3148.

Cammann, K. (1977). Bio-sensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 287: 1-9.

Campàs, M.; Garibo, D. und Prieto-Simón, B. (2012). Novel nanobiotechnological concepts in electrochemical biosensors for the analysis of toxins. *Analyst*, 137: 1055-1067.

Campbell, K.; Stewart, L.D.; Doucette, G.J.; Fodey, T.L.; Haughey, S.A.; Vilarino, N.; Kawatsu, K. und Elliott, C.T. (2007). Assessment of specific binding proteins suitable for the detection of paralytic shellfish poisons using optical biosensor technology. *Analytical Chemistry*, 79: 5906-5914.

Campbell, K.; Rawn, D.F.K.; Niedzwiedek, B. und Elliott, C.T. (2011). Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 28: 711-725.

Campuzano, S.; Yáez-Sedeño, P. und Pingarrón, J.M. (2017). Electrochemical Affinity Biosensors in Food Safety. *Chemosensors*, 5: 8.

Carmichael, W. (2008). A world overview - One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria - Where do we go from here? In: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Hudnell, H.K. (Hrsg.). New York City, New York, USA: *Springer*. 105-125.

Carmichael, W.W.; Beasley, V.; Bunner, D.L.; Eloff, J.N.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K.; Krishnamurthy, T.; Min-Juan, Y.; Moore, R.E., *et al.* (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26: 971-973.

Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445-459.

Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.; An, J.S.; Molica, R.J.; Jochimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R. und Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109: 663-668.

Catterall, W.A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20: 15-43.

Catterall, W.A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiological Reviews*, 72: S15-S48.

Catterall, W.A.; Cestele, S.; Yarov-Yarovoy, V.; Yu, F.H.; Konoki, K. und Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49: 124-141.

CDC. Select agents and toxins list. 2002: <https://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html>. (abgerufen am 19.12.2019).

Chang, F.H.; Anderson, D.M.; Kulis, D.M. und Till, D.G. (1997). Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon*, 35: 393-409.

Chanh, T.C.; Rappocciolo, G. und Hewetson, J.F. (1990). Monoclonal anti-idiotypic induces protection against the cytotoxicity of the trichothecene mycotoxin T-2. *Journal of Immunology*, 144: 4721-4728.

Chanh, T.C.; Siwak, E.B. und Hewetson, J.F. (1991). Anti-idiotypic-based vaccines against biological toxins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108: 183-193.

Chanh, T.C. und Hewetson, J.F. (1993). Polyclonal anti-idiotypes induce specific anti-saxitoxin antibody responses. *Immunopharmacology*, 26: 225-233.

Chen, J.; Xie, P.; Li, L. und Xu, J. (2009). First Identification of the Hepatotoxic Microcystins in the Serum of a Chronically Exposed Human Population Together with Indication of Hepatocellular Damage. *Toxicological Sciences*, 108: 81-89.

Chen, L.; Giesy, J.P. und Xie, P. (2018). The dose makes the poison. *Science of the Total Environment*, 621: 649-653.

Cheung, K.K. und Sim, G.A. (1964). Aflatoxin G1: Direct Determination of the Structure by the Method of Isomorphous Replacement. *Nature*, 201: 1185-1188.

Choi, B.K.; Hercules, D.M. und Gusev, A.I. (2001). LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369: 370-377.

Chorus, I. und Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water - A guide to their public health consequences, monitoring and management. London, Vereinigtes Königreich: *E & FN Spon im Auftrag der WHO*.

Christensen, D.A. und Herron, J.N. (2009). Optical system design for biosensors based on CCD detection. *Methods in Molecular Biology*, 503: 239-258.

Chu, F. (1996). Recent studies on immunoassays for mycotoxin. In: Immunoassays for Residue Analysis. Beier, R. und Stanker, L. (Hrsg.). Washington DC, USA: *American Chemical Society*. 296-313.

Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, 58: 453-508.

Coleman, R.M.; Ojeda-Torres, G.; Bragg, W.; Fearey, D.; McKinney, P.; Castrodale, L.; Verbrugge, D.; Stryker, K.; DeHart, E.; Cooper, M., *et al.* (2018). Saxitoxin Exposure Confirmed by Human Urine and Food Analysis. *Journal of Analytical Toxicology*, 42: e61-e64.

Corley, R.A.; Swanson, S.P. und Buck, W.B. (1985). Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 1085-1089.

Craven, G.R.; Steers, E., Jr. und Anfinson, C.B. (1965). PURIFICATION, COMPOSITION, AND MOLECULAR WEIGHT OF THE BETA-GALACTOSIDASE OF ESCHERICHIA COLI K12. *Journal of Biological Chemistry*, 240: 2468-2477.

Creasia, D.A. und Lambert, R.J. (1989). Acute Respiratory Tract Toxicity of the Trichothecene Mycotoxin T-2 Toxin. In: Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects - Volume I. Beasley, V.R. (Hrsg.). Boca Rouge, Florida, USA: *CRC Press*. 161-170.

Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.

CRLs. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010 2010: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_vet-med-residues\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf). (abgerufen am 08.Oktober.2019).

Cundliffe, E.; Cannon, M. und Davies, J. (1974). Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71: 30-34.

Cundliffe, E. und Davies, J.E. (1977). Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11: 491-499.

Dalezios, J.; Wogan, G. und Weinreb, S. (1971). Aflatoxin P1: A New Aflatoxin Metabolite in Monkeys. *Science*, 171: 584-585.

Deelder, A.M. und de Water, R. (1981). A comparative study on the preparation of immunoglobulin-galactosidase conjugates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29: 1273-1280.

Dell'Aversano, C.; Hess, P. und Quilliam, M.A. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography--mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A*, 1081: 190-201.

Dharumadurai, D.; Shanmugapriya, S.; Thajuddin, N. und Annamalai, P. (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. In: Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology. Guevara-Gonzalez, R. (Hrsg.). Rijeka, Kroatien: *InTech*. 221-254.

Dietrich, R.; Schneider, E.; Usleber, E. und Märtlbauer, E. (1995). Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. *Natural Toxins*, 3: 288-293.

Díez-Quijada, L.; Prieto, A.I.; Guzmán-Guillén, R.; Jos, A. und Cameán, A.M. (2019). Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 125: 106-132.

Dill, K. und Ghindilis, A. (2009). Electrochemical Detection on Microarrays. In: *Microarrays: Preparation, Microfluidics, Detection Methods, and Biological Applications*. Dill, K.; Liu, R.H. und Grodzinski, P. (Hrsg.). New York City, New York, USA: *Springer*. 25-34.

Dincer, C.; Bruch, R.; Kling, A.; Dittrich, P.S. und Urban, G.A. (2017). Multiplexed Point-of-Care Testing - xPOCT. *Trends in Biotechnology*, 35: 728-742.

Dohnal, V.; Jezkova, A.; Jun, D. und Kuca, K. (2008). Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism*, 9: 77-82.

Dohnal, V.; Wu, Q. und Kuca, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88: 1635-1644.

Drummond, T.G.; Hill, M.G. und Barton, J.K. (2003). Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology*, 21: 1192-1199.

Dunne, L.; Daly, S.; Baxter, A.; Haughey, S. und O'Kennedy, R. (2005). Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for the Detection of Aflatoxin B1 Using Single-Chain Antibody Fragments. *Spectroscopy Letters*, 38: 229-245.

Eangoor, P.; Indapurkar, A.S.; Vakkalanka, M.; Yeh, J.S. und Knaack, J.S. (2017). Rapid and Sensitive ELISA Screening Assay for Several Paralytic Shellfish Toxins in Human Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 41: 755-759.

Eaton, D.L.; Monroe, D.H.; Bellamy, G. und Kalman, D.A. (1988). Identification of a novel dihydroxy metabolite of aflatoxin B1 produced in vitro and in vivo in rats and mice. *Chemical Research in Toxicology*, 1: 108-114.

EC (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Official Journal of the European Community*, L221: 8-36.

EC (2004). COMMISSION REGULATION (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 139: 5-205.

EC (2006). COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs *Official Journal of the European Union*, L364: 5-24.

EC (2013). COMMISSION RECOMMENDATION of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2103/165/EU). *Official Journal of the European Union*, 91: 12-15.

Ediage, E.N.; Di Mavungu, J.D.; Song, S.; Wu, A.; Van Peteghem, C. und De Saeger, S. (2012). A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 741: 58-69.

Ediage, N.E.; Di Mavungu, D.J.; Song, S.; Sioen, I. und Saeger, S. (2013). Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: A case study in Cameroon. *Environment International*, 57-58C: 50-59.

EFSA CONTAM (2017). Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *EFSA Journal*, 15: e04655.



- El Gamal, A.A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 1-25.
- Elsholz, B.; Wörl, R.; Blohm, L.; Albers, J.; Feucht, H.; Grunwald, T.; Jürgen, B.; Schweder, T. und Hintsche, R. (2006). Automated Detection and Quantitation of Bacterial RNA by Using Electrical Microarrays. *Analytical Chemistry*, 78: 4794-4802.
- Elsholz, B.; Nitsche, A.; Achenbach, J.; Ellerbrok, H.; Blohm, L.; Albers, J.; Pauli, G.; Hintsche, R. und Worl, R. (2009). Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex PCR products from biological agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1737-1743.
- Engvall, E. und Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8: 871-874.
- Eppley, R.M. und Bailey, W.J. (1973). 12,13-Epoxy- $\Delta^9$ -Trichothecenes as the Probable Mycotoxins Responsible for Stachybotryotoxicosis. *Science*, 181: 758-760.
- Eriksson, J.E.; Toivola, D.; Meriluoto, J.A.; Karaki, H.; Han, Y.G. und Hartshorne, D. (1990). Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173: 1347-1353.
- Essigmann, J.M.; Croy, R.G.; Nadzan, A.M.; Busby, W.F., Jr.; Reinhold, V.N.; Buchi, G. und Wogan, G.N. (1977). Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 1870-1874.
- Etheridge, S.M. (2010). Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon*, 56: 108-122.
- Etzel, R.A. (2002). Mycotoxins. *Journal of the American Medical Association*, 287: 425-427.
- Evans, M.H. (1969). Mechanism of saxitoxin and tetrodotoxin poisoning. *British Medical Bulletin*, 25: 263-267.
- Ezekiel, C.N.; Warth, B.; Ogara, I.M.; Abia, W.A.; Ezekiel, V.C.; Atehnkeng, J.; Sulyok, M.; Turner, P.C.; Tayo, G.O.; Krska, R., et al. (2014). Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: a pilot study using multi-urinary biomarkers. *Environment International*, 66: 138-145.
- Fan, K.; Xu, J.; Jiang, K.; Liu, X.; Meng, J.; Di Mavungu, J.D.; Guo, W.; Zhang, Z.; Jing, J.; Li, H., et al. (2019). Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China. *Environmental Pollution*, 248: 865-873.
- Fawell, J.K.; Mitchell, R.E.; Everett, D.J. und Hill, R.E. (1999). The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Human and Experimental Toxicology*, 18: 162-167.
- Feinberg, B. und McLaughlin, C. (1989). Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: *Trichothecene Mycotoxins: Pathological Effects*. Beasley, V.R. (Hrsg.). Boca Raton, Florida, USA: *CRC Press*. 27-36.
- Fischer, W.J.; Garthwaite, I.; Miles, C.O.; Ross, K.M.; Aggen, J.B.; Chamberlin, A.R.; Towers, N.R. und Dietrich, D.R. (2001). Congener-Independent Immunoassay for Microcystins and Nodularins. *Environmental Science and Technology*, 35: 4849-4856.

- Fonfría, E.S.; Vilariño, N.; Campbell, K.; Elliott, C.; Haughey, S.A.; Ben-Gigirey, B.; Vieites, J.M.; Kawatsu, K. und Botana, L.M. (2007). Paralytic shellfish poisoning detection by surface plasmon resonance-based biosensors in shellfish matrixes. *Analytical Chemistry*, 79: 6303-6311.
- Fontanillo, M. und Köhn, M. (2018). Microcystins: Synthesis and structure–activity relationship studies toward PP1 and PP2A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26: 1118-1126.
- Frank, H.K. (1974). Aflatoxine - Bildungsbedingungen, Eigenschaften und Bedeutung für die Lebensmittelwirtschaft. Hamburg, Deutschland: *B. Behr's*.
- Freeman, G.G. und Morrison, R.I. (1949). The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *The Biochemical Journal*, 44: 1-5.
- Galvano, F.; Galofaro, V. und Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079-1090.
- Gan, L.S.; Skipper, P.L.; Peng, X.C.; Groopman, J.D.; Chen, J.S.; Wogan, G.N. und Tannenbaum, S.R. (1988). Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1. *Carcinogenesis*, 9: 1323-1325.
- Gao, Y.; Zhou, Y. und Chandrawati, R. (2020). Metal and Metal Oxide Nanoparticles to Enhance the Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *ACS Applied Nano Materials*, 3: 1-21.
- García, C.; del Carmen Bravo, M.; Lagos, M. und Lagos, N. (2004). Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon*, 43: 149-158.
- García, C.; Rodriguez-Navarro, A.; Diaz, J.C.; Torres, R. und Lagos, N. (2009). Evidence of in vitro glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicon*, 53: 206-213.
- García, C.; Barriga, A.; Diaz, J.C.; Lagos, M. und Lagos, N. (2010). Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon*, 55: 135-144.
- Garthwaite, I.; Ross, K.M.; Miles, C.O.; Briggs, L.R.; Towers, N.R.; Borrell, T. und Busby, P. (2001). Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand. *Journal of AOAC International*, 84: 1643-1648.
- Gayk, L. Entwicklung und Anwendung auf antiidiotypischen Antikörpern basierender Verfahren zum Nachweis von Aflatoxinen und T-2 Toxin. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2019.
- Gerding, J.; Cramer, B. und Humpf, H.U. (2014). Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58: 2358-2368.
- Gerssen, A.; Pol-Hofstad, I.E.; Poelman, M.; Mulder, P.P.J.; van den Top, H.J. und de Boer, J. (2010). Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins*, 2: 878-904.

Gessner, B.D. und Middaugh, J.P. (1995). Paralytic shellfish poisoning in Alaska: a 20-year retrospective analysis. *American Journal of Epidemiology*, 141: 766-770.

Gessner, B.D.; Middaugh, J.P. und Doucette, G.J. (1997a). Paralytic shellfish poisoning in Kodiak, Alaska. *Western Journal of Medicine*, 167: 351-353.

Gessner, B.D.; Bell, P.; Doucette, G.J.; Moczydlowski, E.; Poli, M.A.; Van Dolah, F. und Hall, S. (1997b). Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon*, 35: 711-722.

Golden, J.P.; Taitt, C.R.; Shriver-Lake, L.C.; Shubin, Y.S. und Ligler, F.S. (2005). A portable automated multianalyte biosensor. *Talanta*, 65: 1078-1085.

Greer, B.; Meneely, J.P. und Elliott, C.T. (2018). Uptake and accumulation of Microcystin-LR based on exposure through drinking water: An animal model assessing the human health risk. *Scientific Reports*, 8: 4913.

Groopman, J.D.; DeMatos, P.; Egner, P.A.; Love-Hunt, A. und Kensler, T.W. (1992). Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-N7-guanine and serum aflatoxin-albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione in rats. *Carcinogenesis*, 13: 101-106.

Grove, J.F. (1993). Macrocyclic trichothecenes. *Natural Product Reports*, 10: 429-448.

Guan, D.; Li, P.; Cui, Y.; Zhang, Q. und Zhang, W. (2011). A competitive immunoassay with a surrogate calibrator curve for aflatoxin M1 in milk. *Analytica Chimica Acta*, 703: 64-69.

Gubala, V.; Harris, L.F.; Ricco, A.J.; Tan, M.X. und Williams, D.E. (2012). Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*, 84: 487-515.

Guengerich, F.P.; Johnson, W.W.; Ueng, Y.F.; Yamazaki, H. und Shimada, T. (1996). Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives*, 104 Suppl 3: 557-562.

Guengerich, F.P.; Arneson, K.O.; Williams, K.M.; Deng, Z. und Harris, T.M. (2002). Reaction of aflatoxin B(1) oxidation products with lysine. *Chemical Research in Toxicology*, 15: 780-792.

Guesdon, J.L.; Ternynck, T. und Avrameas, S. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 27: 1131-1139.

Hack, R.; Märtlbauer, E. und Terplan, G. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to the macrocyclic trichothecene roridin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2328-2330.

Hackett, J.D.; Wisecaver, J.H.; Brosnahan, M.L.; Kulis, D.M.; Anderson, D.M.; Bhattacharya, D.; Plumley, F.G. und Erdner, D.L. (2012). Evolution of Saxitoxin Synthesis in Cyanobacteria and Dinoflagellates. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 70-78.

Hall, S.; Strichartz, G.; Moczydlowski, E.; Ravindran, A. und Reichardt, P.B. (1990). The Saxitoxins - Sources, Chemistry, and Pharmacology. In: Marine Toxins - Origin, Structure, and Molecular Pharmacology. Hall, S. und Strichartz, G. (Hrsg.). Washington D.C., USA: *American Chemical Society*. 29-65.

Hansbauer, E.-M. Stationäre und mobile Verfahren zur Detektion und Differenzierung biologischer Toxine. Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin, 2016.

Harada, K.; Ogawa, K.; Matsuura, K.; Murata, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M.F.; Itezono, Y. und Nakayama, N. (1990). Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chemical Research in Toxicology*, 3: 473-481.

Harju, K.; Rapinoja, M.-L.; Avondet, M.-A.; Arnold, W.; Schär, M.; Burrell, S.; Luginbühl, W. und Vanninen, P. (2015). Optimization of Sample Preparation for the Identification and Quantification of Saxitoxin in Proficiency Test Mussel Sample using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Toxins*, 7: 4868-4880.

Härri, E.; Loeffler, W.; Sigg, H.P.; Stähelin, H.; Tamm, C.S.C. und Wiesinger, D. (1962). Über die Verrucarine und Roridine, eine Gruppe von cytostatisch hochwirksamen Antibiotica aus Myrothecium-Arten. *Helvetica Chimica Acta*, 45: 839-853.

Haschek, W.M. und Voss, K.A. (2013). Chapter 39 - Mycotoxins. In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicology Pathology (Third Edition). Haschek, W.M.; Wallig, M.A. und Rousseaux, C.G. (Hrsg.). Cambridge, Massachusetts, USA: *Academic Press*. 1187-1258.

He, J.; Fan, M.-T.; Liang, Y. und Liu, X.-J. (2010). Application of Anti-idiotypic Antibody in Small Molecules Immunoassay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38: 1366-1370.

Heinze, J. (1993). Ultramicroelectrodes in Electrochemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 32: 1268-1288.

Herron, J.N.; Caldwell, K.D.; Christensen, D.A.; Dyer, S.; Hlady, V.; Huang, P.; Janatova, V.; Wang, H.K. und Wei, A.P. (1993). Fluorescent immunosensors using planar waveguides. In Proceedings of OE/LASE'93: Optics, Electro-Optics, and Laser Application in Science and Engineering, Los Angeles, Californien, USA; 17.-22.01.1993; Advances in Fluorescence Sensing Technology; Lakowicz, J.R. und Thompson, R.B. (Hrsg.). 28-39.

Hesseltine, C.; Shotwell, O.; Ellis, J. und Stubblefield, R. (1966). Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriological Reviews*, 30: 795-805.

Heussner, A.H.; Winter, I.; Altaner, S.; Kamp, L.; Rubio, F. und Dietrich, D.R. (2014). Comparison of two ELISA-based methods for the detection of microcystins in blood serum. *Chemico-Biological Interactions*, 223: 10-17.

Heyndrickx, E.; Sioen, I.; Huybrechts, B.; Callebaut, A.; Henaux, S. und Saeger, S. (2015). Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environment International*, 84: 82-89.

Hille, B. (1975). The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. *Biophysical Journal*, 15: 615-619.

Hintsche, R.; Paeschke, M.; Wollenberger, U.; Schnakenberg, U.; Wagner, B. und Lisek, T. (1994). Microelectrode arrays and application to biosensing devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 697-705.

Hintsche, R.; Elsholz, B.; Piechotta, G.; Woerl, R.; Schabmueller, C.G.J.; Albers, J.; Dharuman, V.; Nebling, E.; Hanisch, A.; Blohm, L., *et al.* (2005). Fully Electrical Microarrays. In: Perspectives in Bioanalysis. Paleček, E.; Scheller, F. und Wang, J. (Hrsg.). *Elsevier*. 247-277.

Hlady, V. und Buijs, J. (1996). Protein adsorption on solid surfaces. *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 72-77.

Hoeger, S.J.; Dietrich, D.R. und Hitzfeld, B.C. (2002). Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environmental Health Perspectives*, 110: 1127-1132.

Holzappel, C.W.; Steyn, P.S. und Purchase, I.F.H. (1966). Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Letters*, 7: 2799-2803.

Hooper, D.G.; Bolton, V.E.; Guilford, F.T. und Straus, D.C. (2009). Mycotoxin detection in human samples from patients exposed to environmental molds. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 1465-1475.

Hu, L.; Liu, A.; Chen, W.; Yang, H.; Wang, X. und Chen, F. (2017). A non-toxic enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B1 using anti-idiotypic antibodies as substitutes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 1640-1645.

IARC. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, Frankreich: *IARC Press*.

IARC. (2010). Ingested Nitrate and Nitrite and Cyanobacterial Peptide Toxins. Lyon, Frankreich: *IARC Press*.

Iha, M.H.; Mini, C.A.; Okada, I.A.; Briganti, R.C. und Trucksess, M.W. (2017). The use of regenerated immunoaffinity columns for aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in peanut confection. *Journal of Chromatography A*, 1483: 1-7.

Jager, A.; Ramalho, F.; Zambelli, L. und Oliveira, C. (2011). Biomarker of Aflatoxin Exposure and Its Relationship with Hepatocellular Carcinoma. In: Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology. Guevara-Gonzalez, R. (Hrsg.). Rijeka, Kroatien: *InTech*. 108-126.

Janik, E.; Ceremuga, M.; Saluk-Bijak, J. und Bijak, M. (2019). Biological Toxins as the Potential Tools for Bioterrorism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 1181.

Jawaid, W.; Campbell, K.; Melville, K.; Holmes, S.; Rice, J. und Elliott, C. (2015). Development and Validation of a Novel Lateral Flow Immunoassay (LFIA) for the Rapid Screening of Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) from Shellfish Extracts. *Analytical Chemistry*, 87.

Jerne, N.K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Annales d'immunologie*, 125c: 373-389.

Jerne, N.K. (1984). Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunological Reviews*, 79: 5-24.

Jiang, K.; Nie, D.; Huang, Q.; Fan, K.; Tang, Z.; Wu, Y. und Han, Z. (2019). Thin-layer MoS<sub>2</sub> and thionin composite-based electrochemical sensing platform for rapid and sensitive detection of zearalenone in human biofluids. *Biosensors and Bioelectronics*, 130: 322-329.

Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, J.S.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.; Antunes, M.B.; de Melo Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S., *et al.* (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England journal of medicine*, 338: 873-878.

Jodra, A.; López, M. und Escarpa, A. (2015). Disposable and reliable electrochemical magnetoimmunosensor for Fumonisin simplified determination in maize-based foodstuffs. *Biosensors and Bioelectronics*, 64: 633-638.

Joshi, S.; Segarra-Fas, A.; Peters, J.; Zuilhof, H.; van Beek, T.A. und Nielen, M.W.F. (2016). Multiplex surface plasmon resonance biosensing and its transferability towards imaging nanoplasmonics for detection of mycotoxins in barley. *Analyst*, 141: 1307-1318.

Justino, C.I.L.; Duarte, A.C. und Rocha-Santos, T.A.P. (2017). Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. *Sensors*, 17: 2918.

Kamala, A.; Shirima, C.; Jani, B.; Bakari, M.; Sillo, H.; Rusibamayila, N.; Saeger, S.D.; Kimanya, M.; Gong, Y.Y.; Simba, A., *et al.* (2018). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin Journal*, 11: 311-320.

Kaushik, J.K. und Bhat, R. (2003). Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 26458-26465.

Kazuhiro, N.; Takaharu, S.; Yoichi, K.; Koreyoshi, I. und Hiroyuki, I. (2008). Recent Advances in Controlled Immobilization of Proteins onto the Surface of the Solid Substrate and Its Possible Application to Proteomics. *Current Proteomics*, 5: 161-175.

Kew, M.C. (2013). Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22: 305-310.

Kirley, T.L.; Greis, K.D. und Norman, A.B. (2016). Selective disulfide reduction for labeling and enhancement of Fab antibody fragments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480: 752-757.

Kirsch, J.; Siltanen, C.; Zhou, Q.; Revzin, A. und Simonian, A. (2013). Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. *Chemical Society Reviews*, 42: 8733-8768.

Knaack, J.S.; Porter, K.A.; Jacob, J.T.; Sullivan, K.; Forester, M.; Wang, R.Y.; Trainer, V.L.; Morton, S.; Eckert, G.; McGahee, E., *et al.* (2016). Case diagnosis and characterization of suspected paralytic shellfish poisoning in Alaska. *Harmful Algae*, 57: 45-50.

Köhler, H.; Kieber-Emmons, T.; Srinivasan, S.; Kaveri, S.; Morrow, W.J.W.; Müller, S.; Kang, C.-Y. und Raychaudhuri, S. (1989). Revised immune network concepts. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 52: 104-116.

Köhler, P.; Hanlin, R. und Beraha, L. (1975). Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from market pecans. *Applied and Environmental Microbiology*, 30: 581-583.

Komano, A.; Maruko, H.; Sekiguchi, H. und Seto, Y. (2011). Detection of saxitoxin in counterterrorism using a commercial lateral flow immunoassay kit. *Forensic Toxicology*, 29: 38-43.

Kondo, F.; Matsumoto, H.; Yamada, S.; Ishikawa, N.; Ito, E.; Nagata, S.; Ueno, Y.; Suzuki, M. und Harada, K. (1996). Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chemical Research in Toxicology*, 9: 1355-1359.

Kraus, S.; Kleines, M.; Albers, J.; Blohm, L.; Piechotta, G.; Püttmann, C.; Barth, S.; Nähring, J. und Nebling, E. (2011). Quantitative measurement of human anti-HCV Core immunoglobulins on an electrical biochip platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 1895-1901.

Krska, R.; Schubert-Ullrich, P.; Molinelli, A.; Sulyok, M.; MacDonald, S. und Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25: 152-163.

Kuhn, J. (2003). Biologische Waffen - über die Schwierigkeiten ihrer Herstellung, die Wahrscheinlichkeit ihrer Anwendung und Möglichkeiten sie zu kontrollieren. *Zeitschrift für Biopolitik*, 2: 169-180.

Kuiper-Goodmann, T.; Falconer, I. und Fitzgerald, J. (1999). Human health aspects. In: Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. Chorus, I. und Bartram, J. (Hrsg.). London, Vereinigtes Königreich: *Spon Press*. 113-153.

Kumar, P.; Mahato, D.K.; Kamle, M.; Mohanta, T.K. und Kang, S.G. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology*, 7: 2170-2170.

Kurtzman, C.P.; Horn, B.W. und Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaraii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 53: 147-158.

Landsteiner, K. und Jacobs, J. (1936). STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. II. *Journal of Experimental Medicine*, 64: 625-639.

Lee, C.-S. und Kim, B.-G. (2002). Improvement of protein stability in protein microarrays. *Biotechnology Letters*, 24: 839-844.

Legator, M. (1966). Biological effects of aflatoxin in cell culture. *Bacteriological Reviews*, 30: 471-477.

Lehane, L. (2001). Paralytic shellfish poisoning: a potential public health problem. *Medical Journal of Australia*, 175: 29-31.

Lei, J.; Li, P.; Zhang, Q.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Ding, X. und Zang, W. (2014). Anti-Idiotypic Nanobody-Phage Based Real-Time Immuno-PCR for Detection of Hepatocarcinogen Aflatoxin in Grains and Feedstuffs. *Analytical Chemistry*, 86: 10841-10846.

Li, R.; Meng, C.; Wen, Y.; Fu, W. und He, P. (2019). Fluorometric lateral flow immunoassay for simultaneous determination of three mycotoxins (aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol) using quantum dot microbeads. *Microchimica Acta*, 186: 748.

Li, Y.; Chen, J.-a.; Zhao, Q.; Pu, C.; Qiu, Z.; Zhang, R. und Shu, W. (2011). A Cross-Sectional Investigation of Chronic Exposure to Microcystin in Relationship to Childhood Liver Damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environmental Health Perspectives*, 119: 1483-1488.

Li, Z.; Sheng, W.; Liu, Q.; Li, S.; Shi, Y.; Zhang, Y. und Wang, S. (2018). Development of a gold nanoparticle enhanced enzyme linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies for the detection of fumonisin B1, B2, and B3 in maize. *Analytical Methods*, 10: 3506-3513.

Ligler, F.S. und Taitt, C.R. (2008). *Optical Biosensors (Second Edition)*. Amsterdam, Niederlande: Elsevier.

Lindenmann, J. (1973). Speculations on idiotypes and homobodies. *Annales d'immunologie*, 124: 171-184.

Lipman, N.S.; Jackson, L.R.; Trudel, L.J. und Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*, 46: 258-268.

Liu, B.-H.; Yu, F.-Y. und Chu, F.S. (1996). Anti-idiotypic and Anti-anti-idiotypic Antibodies Generated from Polyclonal Antibodies against Microcystin-LR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 4037-4042.

Liu, Y.; Elsholz, B.; Enfors, S.O. und Gabig-Ciminska, M. (2007). Confirmative electric DNA array-based test for food poisoning *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 55-64.

Liu, Y.; Ji, J.; Cui, F.; Sun, J.; Wu, H.; Pi, F.; Zhang, Y. und Sun, X. (2019). Development of a two-step immunochromatographic assay for microcystin-LR based on fluorescent microspheres. *Food Control*, 95: 34-40.

Liu, Z.; Gurlo, T. und von Grafenstein, H. (2000). Cell-ELISA using  $\beta$ -galactosidase conjugated antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 234: P153-P167.

Llewellyn, L.E.; Dodd, M.J.; Robertson, A.; Ericson, G.; de Koning, C. und Negri, A.P. (2002). Post-mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon*, 40: 1463-1469.

Lochhead, M.J.; Todorof, K.; Delaney, M.; Ives, J.T.; Greef, C.; Moll, K.; Rowley, K.; Vogel, K.; Myatt, C.; Zhang, X.-Q., *et al.* (2011). Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 3584-3590.

Luppa, P.B.; Bietenbeck, A.; Beaudoin, C. und Giannetti, A. (2016). Clinically relevant analytical techniques, organizational concepts for application and future perspectives of point-of-care testing. *Biotechnology Advances*, 34: 139-160.

MacKintosh, C.; Beattie, K.A.; Klumpp, S.; Cohen, P. und Codd, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, 264: 187-192.

Madhyastha, M.S.; Marquardt, R.R. und Abramson, D. (1994). Structure-activity relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay. *Toxicon*, 32: 1147-1152.

Malachová, A.; Stránská, M.; Václavíková, M.; Elliott, C.T.; Black, C.; Meneely, J.; Hajšlová, J.; Ezekiel, C.N.; Schuhmacher, R. und Krska, R. (2018). Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410: 801-825.



Matabaro, E.; Ishimwe, N.; Uwimbabazi, E. und Lee, B.H. (2017). Current Immunoassay Methods for the Rapid Detection of Aflatoxin in Milk and Dairy Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 808-820.

McCall, J.R.; Holland, W.C.; Keeler, D.M.; Hardison, D.R. und Litaker, R.W. (2019). Improved Accuracy of Saxitoxin Measurement Using an Optimized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Toxins*, 11: 632.

McCarthy, H.; Ottensmeier, C.H.; Hamblin, T.J. und Stevenson, F.K. (2003). Anti-idiotypic vaccines. *British Journal of Haematology*, 123: 770-781.

McDougal, P.G. und Schmuff, N.R. (1985). Chemical synthesis of the trichothecenes. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 47: 153-219.

McGrath, T.F.; Elliott, C.T. und Fodey, T.L. (2012). Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403: 75-92.

McLean, M. und Dutton, M.F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology and Therapeutics*, 65: 163-192.

McNamee, S.E.; Elliott, C.T.; Greer, B.; Lochhead, M. und Campbell, K. (2014). Development of a Planar Waveguide Microarray for the Monitoring and Early Detection of Five Harmful Algal Toxins in Water and Cultures. *Environmental Science and Technology*, 48: 13340-13349.

McPartlin, D.A.; Lochhead, M.J.; Connell, L.B.; Doucette, G.J. und O'Kennedy, R.J. (2016). Use of biosensors for the detection of marine toxins. *Essays in Biochemistry*, 60: 49-58.

Meister, U. (2008). Analysis of T-2 and HT-2 toxins in oats and other cereals by means of HPLC with fluorescence detection. *Mycotoxin Research*, 24: 31-39.

Meneely, J.P.; Campbell, K.; Greef, C.; Lochhead, M.J. und Elliott, C.T. (2013). Development and validation of an ultrasensitive fluorescence planar waveguide biosensor for the detection of paralytic shellfish toxins in marine algae. *Biosensors and Bioelectronics*, 41: 691-697.

Micheli, L.; Grecco, R.; Badea Doni, M.; Moscone, D. und Palleschi, G. (2005). An electrochemical immunosensor for AFM1 determination in milk using screen- printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 588-596.

Mohd Hanafiah, K.; Arifin, N.; Bustami, Y.; Noordin, R.; Garcia, M. und Anderson, D. (2017). Development of Multiplexed Infectious Disease Lateral Flow Assays: Challenges and Opportunities. *Diagnostics*, 7: 51.

Mykkänen, H.; Zhu, H.; Salminen, E.; Juvonen, R.O.; Ling, W.; Ma, J.; Polychronaki, N.; Kemiläinen, H.; Mykkänen, O.; Salminen, S., *et al.* (2005). Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. *International Journal of Cancer*, 115: 879-884.

Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Yoshida, F.; Ueno, Y. und Watanabe, M. (1997). Enzyme Immunoassay for Direct Determination of Microcystins in Environmental Water. *Journal of AOAC International*, 80: 408-417.

- Nakagawa, H.; Matsuo, Y.; McCormick, S. und Lim, C.W. (2018). Development of an LC-MS/MS Determination Method for T-2 Toxin and Its Glucoside and Acetyl Derivatives for Estimating the Contamination of Total T-2 Toxins in Staple Flours. *Journal of AOAC International*, 101: 658-666.
- Nameghi, M.A.; Danesh, N.M.; Ramezani, M.; Hassani, F.V.; Abnous, K. und Taghdisi, S.M. (2016). A fluorescent aptasensor based on a DNA pyramid nanostructure for ultrasensitive detection of ochratoxin A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408: 5811-5818.
- Naveed, A.; Rahman, S.U.; Arshad, M.I. und Aslam, B. (2018). Recapitulation of the anti-Idiotypal antibodies as vaccine candidate. *Translational Medicine Communications*, 3: 1.
- Nebling, E.; Grunwald, T.; Albers, J.; Schäfer, P. und Hintsche, R. (2004). Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays. *Analytical Chemistry*, 76: 689-696.
- Niwa, O.; Morita, M. und Tabei, H. (1990). Electrochemical behavior of reversible redox species at interdigitated array electrodes with different geometries: consideration of redox cycling and collection efficiency. *Analytical Chemistry*, 62: 447-452.
- Nolan, P.; Auer, S.; Spehar, A.; Elliott, C.T. und Campbell, K. (2019). Current trends in rapid tests for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36: 800-814.
- Ohta, T.; Nishiwaki, R.; Yatsunami, J.; Komori, A.; Suganuma, M. und Fujiki, H. (1992). Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 13: 2443-2447.
- OPCW. Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on Their Destruction. 2005: [https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC\\_en.pdf](https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_en.pdf). (abgerufen am 25.10.2019).
- Oshima, Y.; Blackburn, S. und Hallegraef, G. (1993). Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Marine Biology*, 116: 471-476.
- Osterbauer, P.J. und Dobbs, M.R. (2009). CHAPTER 55 - Neurobiological Weapons. In: Clinical Neurotoxicology - Syndromes, Substances, Environments. Dobbs, M.R. (Hrsg.). Philadelphia, Pennsylvania, USA: *Saunders Elsevier*. 631-645.
- Oswald, S.; Karsunke, X.; Dietrich, R.; Märklbauer, E.; Niessner, R. und Knopp, D. (2013). Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 6405-6415.
- Paeschke, M.; Dietrich, F.; Uhlig, A. und Hintsche, R. (1996). Voltammetric multichannel measurements using silicon fabricated microelectrode arrays. *Electroanalysis*, 8: 891-898.
- Parker, C.O.; Lanyon, Y.H.; Manning, M.; Arrigan, D.W.M. und Tothill, I.E. (2009). Electrochemical ImmunoChip Sensor for Aflatoxin M1 Detection. *Analytical Chemistry*, 81: 5291-5298.
- Paterson, R.R. (2006). Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research*, 110: 1003-1010.
- Peluso, P.; Wilson, D.S.; Do, D.; Tran, H.; Venkatasubbaiah, M.; Quincy, D.; Heidecker, B.; Poindexter, K.; Tolani, N.; Phelan, M., *et al.* (2003). Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Analytical Biochemistry*, 312: 113-124.

- Pereira, S.R.; Vasconcelos, V.M. und Antunes, A. (2013). Computational study of the covalent bonding of microcystins to cysteine residues--a reaction involved in the inhibition of the PPP family of protein phosphatases. *FEBS Journal*, 280: 674-680.
- Petrakova, A.; Urusov, A.; Voznyak, M.; Zherdev, A. und Dzantiev, B. (2015a). Immunochromatographic test system for the detection of T-2 toxin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51: 688-694.
- Petrakova, A.V.; Urusov, A.E.; Zherdev, A.V. und Dzantiev, B.B. (2015b). Magnetic ELISA of aflatoxin B1 – pre-concentration without elution. *Analytical Methods*, 7: 10177-10184.
- Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Oberemm, A.; Beattie, K.A.; Krause, E.; Codd, G.A. und Steinberg, C.E.W. (1998). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1425: 527-533.
- Pitschmann, V. und Hon, Z. (2016). Military Importance of Natural Toxins and Their Analogs. *Molecules*, 21: 556.
- Pöhlmann, C. und Elßner, T. (2017). Field-Based Multiplex Detection of Biothreat Agents. In Proceedings of Scientific International Conference on CBRNe (SICC), Rom, Italien; 22.-24.05.2017; Enhancing CBRNE Safety & Security: Proceedings of the SICC 2017 Conference; Malizia, A. und D'Arienzo, M. (Hrsg.). 31-39.
- Pollaro, L. und Heinis, C. (2010). Strategies to prolong the plasma residence time of peptide drugs. *MedChemComm*, 1: 319-324.
- Pomeranz, Y. (1994). Food Analysis - Theory and Practice. New York City, New York, USA: Springer.
- Pong, R.S. und Wogan, G.N. (1971). Toxicity and Biochemical and Fine Structural Effects of Synthetic Aflatoxins M1 and B1 in Rat Liver2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 47: 585-601.
- Posthuma-Trumpie, G.A.; Korf, J. und van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 569-582.
- Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R.L.; Barreto, V.T.S.; Ward, C.J.; Preiser, W.; Poon, G.K.; Neild, G.H. und Codd, G.A. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352: 21-26.
- Puerto, M.; Pichardo, S.; Jos, A. und Camean, A.M. (2009). Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicol*, 54: 161-169.
- Qian, G.S.; Ross, R.K.; Yu, M.C.; Yuan, J.M.; Gao, Y.T.; Henderson, B.E.; Wogan, G.N. und Groopman, J.D. (1994). A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 3: 3-10.

Quiel, A.; Jürgen, B.; Piechotta, G.; Le Foll, A.-P.; Ziebandt, A.-K.; Kohler, C.; Köster, D.; Engelmann, S.; Erck, C.; Hintsche, R., *et al.* (2010). Electrical protein array chips for the detection of staphylococcal virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1619-1627.

Quiel, A.; Jürgen, B.; Greinacher, A.; Lassen, S.; Wörl, R.; Witt, S. und Schweder, T. (2012). Sensitive detection of idiotypic platelet-reactive alloantibodies by an electrical protein chip. *Biosensors and Bioelectronics*, 36: 207-211.

R-Biopharm. R-Biopharm RIDASCREEN Aflatoxin B1- und T-2/HT-2-ELISA. o.D.: [https://food.r-biopharm.com/de/technologien/elisa/?fwp\\_analytes\\_fselect=mykotoxine](https://food.r-biopharm.com/de/technologien/elisa/?fwp_analytes_fselect=mykotoxine). (abgerufen am 04.01.2020).

Rapala, J.; Sivonen, K.; Lyra, C. und Niemelä, S.I. (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2206-2212.

Reese, S. und Fox, M.A. (1998). Self-Assembled Monolayers on Gold of Thiols Incorporating Conjugated Terminal Groups. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102: 9820-9824.

Ren, X.; Zhang, Q.; Wu, W.; Yan, T.; Tang, X.; Zhang, W.; Yu, L. und Li, P. (2019). Anti-idiotypic nanobody-phage display-mediated real-time immuno-PCR for sensitive, simultaneous and quantitative detection of total aflatoxins and zearalenone in grains. *Food Chemistry*, 297: 124912.

Reverté, L.; Campbell, K.; Rambla-Alegre, M.; Elliott, C.T.; Diogène, J. und Campàs, M. (2017). Immunosensor array platforms based on self-assembled dithiols for the electrochemical detection of tetrodotoxins in puffer fish. *Analytica Chimica Acta*, 989: 95-103.

Rinehart, K.L.; Namikoshi, M. und Choi, B.W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6: 159-176.

Rivasseau, C.; Racaud, P.; Deguin, A. und Hennion, M.-C. (1999). Evaluation of an ELISA Kit for the Monitoring of Microcystins (Cyanobacterial Toxins) in Water and Algae Environmental Samples. *Environmental Science and Technology*, 33: 1520-1527.

Robinson, J.; Guillemain, J. und Meselson, M. (1990). Yellow rain in Southeast Asia: the story collapses. In: Preventing a Biological Arms Race. Wright, S. (Hrsg.). Cambridge, Vereinigtes Königreich: *The MIT Press*. 220-2381.

Robison, T.S.; Mirocha, C.J.; Kurtz, H.J.; Behrens, J.C.; Weaver, G.A. und Chi, M.S. (1979). Distribution of tritium-labeled T-2 toxin in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1411-1413.

Rodriguez-Carrasco, Y.; Molto, J.C.; Manes, J. und Berrada, H. (2014). Exposure assessment approach through mycotoxin/creatinine ratio evaluation in urine by GC-MS/MS. *Food and Chemical Toxicology*, 72: 69-75.

Romanov, V.; Davidoff, S.N.; Miles, A.R.; Grainger, D.W.; Gale, B.K. und Brooks, B.D. (2014). A critical comparison of protein microarray fabrication technologies. *Analyst*, 139: 1303-1326.

Romero, A.d.C.; Ferreira, T.R.B.; Dias, C.T.d.S.; Calori-Domingues, M.A. und da Gloria, E.M. (2010). Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. *Food Control*, 21: 554-558.

- Rubert, J.; Soriano, J.M.; Mañes, J. und Soler, C. (2011). Rapid mycotoxin analysis in human urine: A pilot study. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2299-2304.
- Rudolph-Böhner, S.; Mierke, D.F. und Moroder, L. (1994). Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. *FEBS Letters*, 349: 319-323.
- Rushing, B.R. und Selim, M.I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124: 81-100.
- Rusmini, F.; Zhong, Z. und Feijen, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8: 1775-1789.
- Russmann, H. (2003). Toxine. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 46: 989-996.
- Sabbioni, G. (1990). Chemical and physical properties of the major serum albumin adduct of aflatoxin B1 and their implications for the quantification in biological samples. *Chemico-Biological Interactions*, 75: 1-15.
- Samdal, I.A.; Ballot, A.; Lovberg, K.E. und Miles, C.O. (2014). Multihapten approach leading to a sensitive ELISA with broad cross-reactivity to microcystins and nodularin. *Environmental Science and Technology*, 48: 8035-8043.
- Sapsford, K.E.; Taitt, C.R.; Fertig, S.; Moore, M.H.; Lassman, M.E.; Maragos, C.M. und Shriver-Lake, L.C. (2006). Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 2298-2305.
- Schena, M. (2005). Protein Microarrays. Sudbury, Massachusetts, USA: *Jones and Bartlett*.
- Schneider, E.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Usleber, E. und Terplan, G. (1991). Detection of aflatoxins, trichothecenes, ochratoxin a and zearalenone by test strip enzyme immunoassay: A rapid method for screening cereals for mycotoxins. *Food and Agricultural Immunology*, 3: 185-193.
- Schneider, E.; Curtui, V.; Seidler, C.; Dietrich, R.; Usleber, E. und Märtlbauer, E. (2004). Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153: 113-121.
- Schoenhard, G.L.; Lee, D.J.; Howell, S.E.; Pawlowski, N.E.; Libbey, L.M. und Sinnhuber, R.O. (1976). Aflatoxin B1 metabolism to aflatoxicol and derivatives lethal to *Bacillus subtilis* GSY 1057 by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver. *Cancer Research*, 36: 2040-2045.
- Schramm, W.; Paek, S.-H. und Voss, G. (1993). Strategies for the Immobilization of Antibodies. *ImmunoMethods*, 3: 93-103.
- Schütte, H.-R. (2000). Secondary Plant Substances: Trichothecenes. In: Progress in Botany: Genetics Physiology Systematics Ecology. Esser, K.; Kadereit, J.W.; Lüttge, U. und Runge, M. (Hrsg.). Berlin & Heidelberg, Deutschland: *Springer*. 269-281.
- Scussel, V.; Haas, P.; Gong, Y.; Turner, C. und Wild, C. (2006). Study of aflatoxin exposure in a Brazilian population using an aflatoxin - albumin biomarker. In Proceedings of 11th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins Bethesda, Maryland, USA; 17.-22.05.2004; 197-222.

Sharma, H. und Mutharasan, R. (2013). Half Antibody Fragments Improve Biosensor Sensitivity without Loss of Selectivity. *Analytical Chemistry*, 85: 2472-2477.

Soares, R.M.; Yuan, M.; Servaites, J.C.; Delgado, A.; Magalhães, V.F.; Hilborn, E.D.; Carmichael, W.W. und Azevedo, S.M.F.O. (2006). Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology*, 21: 95-103.

Solanki, P.R.; Kaushik, A.; Manaka, T.; Pandey, M.K.; Iwamoto, M.; Agrawal, V.V. und Malhotra, B.D. (2010). Self-assembled monolayer based impedimetric platform for food borne mycotoxin detection. *Nanoscale*, 2: 2811-2817.

Solfizzo, M.; Gambacorta, L.; Lattanzio, V.M.; Powers, S. und Visconti, A. (2011). Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol,  $\alpha$  and  $\beta$ -zearalenols and fumonisin B1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401: 2831-2841.

Spindel, S. und Sapsford, K.E. (2014). Evaluation of optical detection platforms for multiplexed detection of proteins and the need for point-of-care biosensors for clinical use. *Sensors*, 14: 22313-22341.

Steinem, C. und Janshoff, A. (2007). Piezoelectric Sensors. Berlin &, Heidelberg, Deutschland: Springer.

Stern, D.; Richter, M.; Schrick, L.; Lasch, P.; Keeren, K.; Polleichtner, A.; Lemmer, K.; Nitsche, A.; Grunow, R.; Herzog, C., *et al.* (2016). Vor-Ort-Nachweis bioterroristisch relevanter Agenzien - Schnelle Nachweismethoden für Viren, Bakterien und Toxine - Potenziale und Grenzen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 59: 1577-1586.

Stewart, I.; Webb, P.M.; Schluter, P.J. und Shaw, G.R. (2006). Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health*, 5: 6.

Stotts, R.R.; Namikoshi, M.; Haschek, W.M.; Rinehart, K.L.; Carmichael, W.W.; Dahlem, A.M. und Beasley, V.R. (1993). Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon*, 31: 783-789.

Straus, D.C. (2009). Molds, mycotoxins, and sick building syndrome. *Toxicology and Industrial Health*, 25: 617-635.

Sullman, S.F.; Armstrong, S.J.; Zuckerman, A.J. und Rees, K.R. (1970). Further studies on the toxicity of the aflatoxins on human cell cultures. *British Journal of Experimental Pathology*, 51: 314-316.

Sun, D.-D.; Gu, X.; Li, J.-G.; Yao, T. und Dong, Y.-C. (2015). Quality evaluation of five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits for detecting aflatoxin b1 in feedstuffs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28: 691-696.

Sun, Z.; Lu, P.; Gail, M.H.; Pee, D.; Zhang, Q.; Ming, L.; Wang, J.; Wu, Y.; Liu, G.; Wu, Y., *et al.* (1999). Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology*, 30: 379-383.

Swanson, S.P.; Rood, H.D., Jr.; Behrens, J.C. und Sanders, P.E. (1987). Preparation and characterization of the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol, and deepoxy scirpentriol. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2821-2826.

Sweeney, M.J. und Dobson, A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158.

Szkola, A.; Campbell, K.; Elliott, C.T.; Niessner, R. und Seidel, M. (2013). Automated, high performance, flow-through chemiluminescence microarray for the multiplexed detection of phycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 787: 211-218.

Szkola, A.; Linares, E.M.; Worbs, S.; Dorner, B.G.; Dietrich, R.; Martlbauer, E.; Niessner, R. und Seidel, M. (2014). Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *Analyst*, 139: 5885-5892.

Taitt, C.R.; Anderson, G.P.; Lingerfelt, B.M.; Feldstein, M.J. und Ligler, F.S. (2002). Nine-Analyte Detection Using an Array-Based Biosensor. *Analytical Chemistry*, 74: 6114-6120.

Tang, X.; Li, P.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Zhang, W. und Jiang, J. (2017). Time-Resolved Fluorescence Immunochemical Assay Developed Using Two Idiotypic Nanobodies for Rapid, Quantitative, and Simultaneous Detection of Aflatoxin and Zearalenone in Maize and Its Products. *Analytical Chemistry*, 89: 11520-11528.

Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A. und Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 121-131.

Thottumkara, A.P.; Parsons, W.H. und Du Bois, J. (2014). Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition*, 53: 5760-5784.

Tippkötter, N.; Stückmann, H.; Kroll, S.; Winkelmann, G.; Noack, U.; Scheper, T. und Ulber, R. (2009). A semi-quantitative dipstick assay for microcystin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394: 863-869.

Tola, M. und Kebede, B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food and Agriculture*, 2: 1191103.

Tomizaki, K.Y.; Usui, K. und Mihara, H. (2005). Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements. *ChemBioChem*, 6: 782-799.

Tripathi, P.; Upadhyay, N. und Nara, S. (2018). Recent advancements in lateral flow immunoassays: A journey for toxin detection in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58: 1715-1734.

Tsai, W.-C. und Pai, P.-J.R. (2009). Surface plasmon resonance-based immunosensor with oriented immobilized antibody fragments on a mixed self-assembled monolayer for the determination of staphylococcal enterotoxin B. *Microchimica Acta*, 166: 115-122.

Tsutsumi, T.; Nagata, S.; Yoshida, F. und Ueno, Y. (1998). Anti-idiotypic monoclonal antibodies against anti-microcystin antibody and their use in enzyme immunoassay. *Toxicon*, 36: 235-245.

Tucker, J.B. (2013). The Current Bioweapons Threat. In: Biopreparedness and Public Health. Radosavljevic, V.; Belojevic, G. und Rotz, L.D. (Hrsg.). Dordrecht, Niederlande: Springer. 7-16.

Turner, A.D. und Hatfield, R.G. (2012). Refinement of AOAC Official Method 2005.06 liquid chromatography-fluorescence detection method to improve performance characteristics for the determination of paralytic shellfish toxins in king and queen scallops. *Journal of AOAC International*, 95: 129-142.

Turner, A.D.; Dhanji-Rapkova, M.; O'Neill, A.; Coates, L.; Lewis, A. und Lewis, K. (2018). Analysis of Microcystins in Cyanobacterial Blooms from Freshwater Bodies in England. *Toxins*, 10: 39.

Turner, P.C.; Flannery, B.; Isitt, C.; Ali, M. und Pestka, J. (2012). The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutrition Research Reviews*, 25: 162-179.

Ueno, Y. (1980). Trichothecene Mycotoxins Mycology, Chemistry, and Toxicology. In: Advances in Nutritional Research. Draper, H.H. (Hrsg.). Boston, Massachusetts, USA: *Springer*. 301-353.

Ueno, Y. (1983). Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. Tokio, Japan: *Kodansha*.

Umweltbundesamt (2015). Empfehlung zum Schutz von Badenden vor Cyanobakterien-Toxinen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 58: 908-920.

Urusov, A.; Zherdev, A. und Dzantiev, B. (2010). Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 253-266.

Usleber, E.; Schneider, E. und Terplan, G. (1991). Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish. *Letters in Applied Microbiology*, 13: 275-277.

Usleber, E.; Schneider, E.; Terplan, G. und Laycock, M.V. (1995). Two formats of enzyme immunoassay for the detection of saxitoxin and other paralytic shellfish poisoning toxins. *Food Additives and Contaminants*, 12: 405-413.

Usleber, E.; Dietrich, R.; Bürk, C.; Schneider, E. und Märtlbauer, E. (2001). Immunoassay Methods for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *Journal of AOAC International*, 84: 1649-1656.

Usup, G.; Kulis, D.M. und Anderson, D.M. (1994). Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Natural Toxins*, 2: 254-262.

Van Apeldoorn, M.E.; van Egmond, H.P.; Speijers, G.J.A. und Bakker, G.J.I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 7-60.

Van Weemen, B.K. und Schuur, A.H. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15: 232-236.

Vesterkvist, P.S.; Misiorek, J.O.; Spooft, L.E.; Toivola, D.M. und Meriluoto, J.A. (2012). Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 cells. *Toxins*, 4: 1008-1023.

Vidal, A.; Mengelers, M.; Yang, S.; Saeger, S.D. und Boevre, M.D. (2018). Mycotoxin Biomarkers of Exposure: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 1127-1155.



Vidal, J.C.; Bonel, L.; Ezquerro, A.; Hernández, S.; Bertolín, J.R.; Cubel, C. und Castillo, J.R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 49: 146-158.

Voller, A.; Hultdt, G.; Thors, C. und Engvall, E. (1975). New serological test for malaria antibodies. *British Medical Journal*, 1: 659-661.

Wang, D.; Xu, Y.; Tu, Z.; Fu, J.H.; Xiong, Y.H.; Feng, F.; Tao, Y. und Lei, D. (2014). Isolation and characterization of recombinant variable domain of heavy chain anti-idiotypic antibodies specific to aflatoxin B1. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27: 118-121.

Wang, J.-S.; Tang, L.; Gentles, A. und Smith, E.E. (2016a). Pathogenic and toxic effects of biological threats agents. In: New developments in biological and chemical terrorism countermeasures. Kendall, R.J.; Presley, S.M. und Ramkumar, S.S. (Hrsg.). Boca Raton, Florida, USA: *CRC Press*. 45-71.

Wang, J. und Liu, X.M. (2007). Contamination of aflatoxins in different kinds of foods in China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 20: 483-487.

Wang, Y.; Li, P.; Majkova, Z.; Bever, C.R.S.; Kim, H.J.; Zhang, Q.; Dechant, J.E.; Gee, S.J. und Hammock, B.D. (2013). Isolation of Alpaca Anti-Idiotypic Heavy-Chain Single-Domain Antibody for the Aflatoxin Immunoassay. *Analytical Chemistry*, 85: 8298-8303.

Wang, Y.; Li, P.; Zhang, Q.; Hu, X. und Zhang, W. (2016b). A toxin-free enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of aflatoxins based on a VHH surrogate standard. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408: 6019-6026.

Wang, Y.; Zhang, L.; Peng, D.; Xie, S.; Chen, D.; Pan, Y.; Tao, Y. und Yuan, Z. (2018). Construction of Electrochemical Immunosensor Based on Gold-Nanoparticles/Carbon Nanotubes/Chitosan for Sensitive Determination of T-2 Toxin in Feed and Swine Meat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 3895.

Weller, M.G. (2013). Immunoassays and biosensors for the detection of cyanobacterial toxins in water. *Sensors*, 13: 15085-15112.

Wharton, R.; Feyereisen, M.; Gonzalez, A.; Abbott, N.; Hamelin, E. und Johnson, R. (2017). Quantification of saxitoxin in human blood by ELISA. *Toxicon*, 133.

Wharton, R.E. (2018). Quantification of Microcystin-LR in Human Urine by Immunocapture Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 31: 898-903.

WHO. (2017). Guidelines for drinking-water quality. Genf, Schweiz: *World Health Organization*.

Wiese, M.; D'Agostino, P.M.; Mihali, T.K.; Moffitt, M.C. und Neilan, B.A. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, 8: 2185-2211.

Wild, C. und Turner, P. (2001). Exposure biomarkers in chemoprevention studies of liver cancer. *IARC Scientific Publications*, 154: 215-222.

Wild, C.P.; Hudson, G.J.; Sabbioni, G.; Chapot, B.; Hall, A.J.; Wogan, G.N.; Whittle, H.; Montesano, R. und Groopman, J.D. (1992). Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in The Gambia, West Africa. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1: 229-234.

Wild, C.P.; Hasegawa, R.; Barraud, L.; Chutimataewin, S.; Chapot, B.; Ito, N. und Montesano, R. (1996). Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative carcinogenesis between animals and humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5: 179-189.

Williams, J.H.; Phillips, T.D.; Jolly, P.E.; Stiles, J.K.; Jolly, C.M. und Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1106-1122.

Wogan, G.N.; Edwards, G.S. und Newberne, P.M. (1971). Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Research*, 31: 1936-1942.

Wu, H.C. und Santella, R. (2012). The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. *Hepatitis monthly*, 12: e7238-e7238.

Wu, P. und Grainger, D.W. (2006). Comparison of hydroxylated print additives on antibody microarray performance. *Journal of Proteome Research*, 5: 2956-2965.

Wu, Q.; Dohnal, V.; Huang, L.; Kuca, K. und Yuan, Z. (2010). Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metabolism Reviews*, 42: 250-267.

Wu, Q.; Dohnal, V.; Kuca, K. und Yuan, Z. (2013). Trichothecenes: structure-toxic activity relationships. *Current Drug Metabolism*, 14: 641-660.

Wu, Q.H.; Wang, X.; Yang, W.; Nussler, A.K.; Xiong, L.Y.; Kuca, K.; Dohnal, V.; Zhang, X.J. und Yuan, Z.H. (2014). Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Archives of Toxicology*, 88: 1309-1326.

Xiao, H.; Clarke, J.R.; Marquardt, R.R. und Frohlich, A.A. (1995). Improved Methods for Conjugating Selected Mycotoxins to Carrier Proteins and Dextran for Immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2092-2097.

Xiulan, S.; Xiaolian, Z.; Jian, T.; Xiaohong, G.; Jun, Z. und Chu, F.S. (2006). Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods. *Food Control*, 17: 256-262.

Xu, L.; Zhang, Z.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Yu, L.; Wang, D.; Li, H. und Li, P. (2018). An On-Site Simultaneous Semi-Quantification of Aflatoxin B1, Zearalenone, and T-2 Toxin in Maize- and Cereal-Based Feed via Multicolor Immunochromatographic Assay. *Toxins*, 10: 87.

Yakes, B.J.; Prezioso, S.; Haughey, S.A.; Campbell, K.; Elliott, C.T. und DeGrasse, S.L. (2011). An improved immunoassay for detection of saxitoxin by surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156: 805-811.

Yang, H. (2012). Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16: 422-428.

Yang, X.; Zhou, L.; Tan, Y.; Shi, X.; Zhao, Z.; Nie, D.; Zhou, C. und Liu, H. (2017). Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method Coupled with Dispersive Solid-Phase Extraction for Simultaneous Quantification of Eight Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. *Toxins*, 9: 206.

Yike, I.; Distler, A.M.; Ziady, A.G. und Dearborn, D.G. (2006). Mycotoxin adducts on human serum albumin: biomarkers of exposure to *Stachybotrys chartarum*. *Environmental Health Perspectives*, 114: 1221-1226.

Yoshizawa, T.; Ohtsubo, K.; Sasaki, T. und Nakamura, K. (1986). Acute toxicities of satratoxins G and H in mice - A histopathological observation with special reference to the liver injury caused by satratoxin G. *JSM Mycotoxins*, 1986: 53-57.

Zeck, A.; Weller, M.G.; Bursill, D. und Niessner, R. (2001). Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst*, 126: 2002-2007.

Zemskov, I.; Altaner, S.; Dietrich, D.R. und Wittmann, V. (2017). Total Synthesis of Microcystin-LF and Derivatives Thereof. *The Journal of Organic Chemistry*, 82: 3680-3691.

Zhang, J.; Lei, J.; Xu, C.; Ding, L. und Ju, H. (2010). Carbon Nanohorn Sensitized Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of Microcystin-LR. *Analytical Chemistry*, 82: 1117-1122.

Zhang, W.; Liang, G.; Wu, L.; Tuo, X.; Wang, W.; Chen, J. und Xie, P. (2013). Why mammals more susceptible to the hepatotoxic microcystins than fish: evidences from plasma and albumin protein binding through equilibrium dialysis. *Ecotoxicology*, 22: 1012-1019.

Zhang, X.; Kuča, K.; Dohnal, V.; Dohnalová, L.; Wu, Q. und Wu, C. (2014a). Military potential of biological toxins. *Journal of Applied Biomedicine*, 12: 63-77.

Zhang, X.; Yu, X.; Wen, K.; Li, C.; Mujtaba Mari, G.; Jiang, H.; Shi, W.; Shen, J. und Wang, Z. (2017). Multiplex Lateral Flow Immunoassays Based on Amorphous Carbon Nanoparticles for Detecting Three Fusarium Mycotoxins in Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 8063-8071.

Zhang, Z.; Yu, L.; Xu, L.; Hu, X.; Li, P.; Zhang, Q.; Ding, X. und Feng, X. (2014b). Biotoxin sensing in food and environment via microchip. *Electrophoresis*, 35: 1547-1559.

Zhao, F.; Tian, Y.; Shen, Q.; Liu, R.; Shi, R.; Wang, H. und Yang, Z. (2019). A novel nanobody and mimotope based immunoassay for rapid analysis of aflatoxin B1. *Talanta*, 195: 55-61.

Zhu, J.Q.; Zhang, L.S.; Hu, X.; Xiao, Y.; Chen, J.S.; Xu, Y.C.; Fremy, J. und Chu, F.S. (1987). Correlation of dietary aflatoxin B1 levels with excretion of aflatoxin M1 in human urine. *Cancer Research*, 47: 1848-1852.

Zurawell, R.W.; Chen, H.; Burke, J.M. und Prepas, E.E. (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 8: 1-37.

## VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur der PSP-Toxine.....	9
Abbildung 2: Grundstruktur der Microcystine.....	11
Abbildung 3: Struktur der (A) Typ-A- und (B) Typ-D-Trichothecene. ....	13
Abbildung 4: Struktur der (A) B-Aflatoxine und (B) G-Aflatoxine. ....	16
Abbildung 5: Prinzip kompetitiver Immunoassays für niedermolekulare Toxine. ....	21
Abbildung 6: Konzept eines optischen Mikroarray-Sensorsystems basierend auf einem planaren Wellenleiter (Lochhead <i>et al.</i> , 2011). ....	27
Abbildung 7: Mikroarray-basierte Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi. ....	29
Abbildung 8: Aufbau des elektrischen Biochips und schematische Vergrößerung der Interdigital-Array-Goldelektrodenstruktur. ....	29
Abbildung 9: Prinzip der elektrochemischen Detektion mittels Redoxcycling. ....	31
Abbildung 10: Idiotop-Bindungseigenschaften der Ak2-Subtypen (A) Ak2 $\alpha$ , (B) Ak2 $\beta$ sowie (C) Ak2 $\gamma$ .....	32

**IX. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Eigenschaften hochtoxischer Cyano-bzw. Mykotoxine.....	5
Tabelle 2: Charakteristika von verschiedenen Biosensoren zum Nachweis von Cyano- bzw. Mykotoxinen. ....	25
Tabelle 3: Übersicht über bisher etablierte pBDi-Biochips. ....	30
Tabelle 4: Ak2 $\beta$ -basierte Assays zum Nachweis von Aflatoxinen, T-2, MC-LR und STX.....	34

## **X. DANKSAGUNG**

Ein großer Dank gilt an erster Stelle gleichermaßen Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer und Dr. Thomas Elßner für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit sowohl am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch als auch bei der Bruker Daltonik GmbH/Bruker Optik GmbH anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, aller notwendigen Arbeitsmittel und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Christopher Pöhlmann für die fachliche Betreuung der Arbeit bei der Bruker Daltonik GmbH/Bruker Optik GmbH. Vielen Dank, Christopher, für den gewährten Freiraum beim Experimentieren, die stetige Diskussionsbereitschaft und die große Unterstützung während der Praxis- und Schreibphase.

Ich danke sehr Dr. Richard Dietrich für die Betreuung meiner praktischen Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch. Vielen Dank, Ritchie, für die vielen fachlichen Anregungen, den stetigen Meinungs austausch und für die Versorgung mit Antikörpern und Referenzmaterialien.

Ich danke herzlich meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Applikation Catarina Burbli, Susann Richter, Gertrude Poech, Dr. Franziska Lange, Dr. Boris Burger, Dr. Florian Glasneck, Dr. Lutz-Peter Müller sowie Dr. Johannes Flachowsky für die äußerst kollegiale Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Vielen lieben Dank, Cati, Susann, Boris und Florian, für die schönen Momente innerhalb und auch außerhalb des Bruker-Kosmos. Ich werde mich vor allem an unsere gemeinsame Bürozeit in Gebäude 3 erinnern. Lieben Dank, Gertrude, für die tolle Zeit in Itzehoe. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Bruker Optik GmbH in Leipzig für die angenehme Zusammenarbeit.

Zusätzlich möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch für die schöne Zeit am Lehrstuhl danken. Ein großes Dankeschön geht an Dr. Laura Gayk und Dr. Stefanie Schwemmer für die tolle Zeit im Labor und Büro sowie für die gemeinsamen Ausflüge in München.

Zuletzt, aber nicht im geringeren Maße, möchte ich meiner Familie, meinem Freund Michel Biewend und meinen Freunden danken. Vielen Dank für die Liebe, den stetigen Zuspruch und den Rückhalt in jeglichen Lebenssituationen. Ohne euch wäre vieles nie möglich gewesen.