

Afd. Organische Contaminanten 1984-05-04

RAPPORT 84.44

Pr.nr. 505.0421

Onderwerp: De mogelijkheden van de ELISA-
techniek als screeningsmethode
voor de bepaling van afla-
toxine B₁ in veevoeders en
grondstoffen

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. Organische
Contaminanten (4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie
(Humme), Projektbeheer, Projektleider (Traag).

Project: Ontwikkeling en verbetering van analysemethoden voor het bepalen van aflatoxine

Onderwerp: De mogelijkheden van de ELISA-techniek als screeningsmethode voor de bepaling van aflatoxine B₁ in veevoeders en grondstoffen

Doel:

Aan de hand van een literatuurstudie de mogelijkheden aangeven die de ELISA-techniek heeft ten opzichte van de bepaling van aflatoxine B₁ in veevoeders en grondstoffen.

Samenvatting:

ELISA als immunologische techniek wordt incidenteel toegepast voor aflatoxine B₁ bepaling. Dit beperkt zich vooral tot enkelvoudige grondstoffen (grondnotenschroot, kokosschroot, e.d.), matrixstoringsen zijn hier nihil. Bij samengesteld voeder (kalkoenkruiemel) werden veel storingsen uit de matrix waargenomen, zodat een intensieve clean-up benodigd is. Uitgebreid onderzoek naar de toepasbaarheid voor veevoeders zal nog moeten worden uitgevoerd gezien de schaarse literatuurgegevens. Vooralsnog lijkt de ELISA-techniek veel belovend als screeningsmethode.

Conclusies:

- De methode van Biermann en Terplan lijkt het meest geschikt om te dienen als screeningsmethode.
- In principe is het mogelijk met een geschikte voorbereiding 30-60 monsters per dag te analyseren.
- Het soort mikrotiterplaten is van grote invloed op de detectiegrens (Nunc- en Greinerplaten lijken geschikter dan Costarplaten).
- Antiserum en conjugaat zijn niet commercieel verkrijgbaar.
- Katoenschroot en kalkoenkruiemel vereisen een uitgebreide, tijdrovende voorzuivering, vrijwel identiek aan een HPLC-voorzuivering.
- Grondnotenschroot, kokosschroot en mais kunnen bepaald worden na een korte simpele extractie.
- Beschreven detectiegrenzen variëren van 0,1-2,5 µg/kg met recoveries van 70-100%.
- Er zijn nauwelijks gegevens bekend omtrent de bepaling van aflatoxine B₁ in samengestelde voeders.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra ✓
Medewerker/Samensteller: J.M.P. van Trijp
Projectleider: W.A. Traag

W.A. Traag

Inleiding

Binnen de EEG geldt vanaf 1 januari 1984 voor aanvullende diervoeders voor melkvee een aflatoxine B₁ (AFB₁) tolerantie van 10 µg/kg (Derde Richtlijn van de commissie van 28 juli 1983 inhoudende een wijziging van de bijlage bij Richtlijn 74/63/EEG).

De in ons laboratorium aangevoerde AFB₁-monsters worden gescreend met een HPLC-methode met post-column derivatisering. Met deze methode is het op dit moment mogelijk 75-100 monsters per week te verwerken.

Door het verlagen van de tolerantie (van 20 naar 10 µg/kg) is er een behoefte ontstaan om tot een snellere screeningsmethode met een grotere capaciteit te komen.

In dit opzicht lijken de immunologische technieken, met Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) in het bijzonder, veelbelovend.

Via het PUDOC is op dit gebied een aantal literatuurreferenties verkregen.

Immunologische technieken

De grondslag van iedere immunologische bepaling is de antigeen-antilichaam reactie. Dit is een specifieke reactie, doordat een antilichaam molecuul zich vrijwel uitsluitend bindt met het antigeen waartegen het is opgewekt. Van de bekende immunologische technieken zijn Radio Immuno Assay (RIA) en ELISA geschikt om met lage concentraties (ng-pg niveau) te werken (1).

Indien de beide methodes op een rijtje gezet worden, kan het volgende opgemerkt worden (1):

Beide methodes zijn in principe zeer gevoelig, waarbij de reproduceerbaarheid goed is te noemen.

De voor uitvoering van RIA's benodigde apparatuur is gespecialiseerd en duur, terwijl voor ELISA metingen algemene enzym-analysatoren kunnen worden gebruikt, welke aanmerkelijk goedkoper zijn. De reagenskosten voor een RIA liggen beduidend hoger dan bij een ELISA. De RIA-reagentia hebben ook een kortere "shelf-life time".

Gezien de potentieel aanwezige gevaren bij het werken met radioactief materiaal, is naast dit nadeel een hieraan gekoppeld nadeel, dat een RIA een gespecialiseerd type laboratorium verlangt, terwijl de ELISA in principe op elk laboratorium kan worden uitgevoerd.

Gezien het voorgaande is de aandacht in dit rapport uitsluitend op de ELISA techniek gericht.

Principe ELISA-techniek

De ELISA-techniek kent verschillende varianten namelijk het competitieprincipe, de "sandwich" techniek, het titratieprincipe, het inhibiti-principe en het immuno enzymometrisch principe (1).

Het competitieprincipe is voor ons van belang, (zie ook figuur 1), deze techniek wordt hieronder besproken. Voor wat betreft de overige technieken wordt verwezen naar de literatuur (1).

Een polystyreen buis of een mikrotiterplaat (figuur 3) wordt gecoat met een bekende hoeveelheid antilichaam (antistof). Nadat de coating gewassen is wordt de monsteroplossing met onbekend AFB1 (antigeen) gehalte in de polystyreenbuis of in het putje van de mikrotiterplaat gebracht. Direct daarop wordt enzymgelabeld AFB1 (conjugaat) toegevoegd. Gelabeld (conjugaat) en ongelabeld AFB1 (antigeen) concurreren nu om het aan de wand gebonden antilichaam. Na deze incubatie wordt de buis of de plaat opnieuw gewassen en de gebonden hoeveelheid conjugaat wordt bepaald door het toevoegen van een substraat. Het substraat vormt met het conjugaat-antilichaam-complex een gekleurd produkt hetgeen colorimetrisch of visueel bepaald kan worden (5). Naarmate er meer kleur ontwikkeld is, is er minder antigeen (AFB1) uit het monster aanwezig. Het verband tussen de kleurontwikkeling en het antigeen (AFB1) gehalte in het monster is, voor het competitieprincipe, grafisch weergegeven in figuur 2.

Reagentia ELISA-techniek

- Omdat AFB1 op zich niet antigeen is door zijn geringe molecuulgrootte ($M=312$), is het nodig AFB1 te koppelen met een eiwit. Dit eiwit is humaan serum albumine (2) of runder serum albumine (3). Om de koppeling te kunnen bewerkstelligen wordt AFB1 eerst omgezet in een oxime (2,3,4).

Dit oxime vormt een complex met het serum albumine. Door immunisatie van konijnen, teweegebracht door middel van herhaalde injecties van dit complex, wordt een antiserum verkregen. Na zuivering van dit antiserum wordt de titer bepaald, hetgeen een maat is voor de "sterkte" van het antiserum. Typische titerwaarden schommelen tussen de 5000-10000.

- Het vormen van het enzym gebonden antigeen (conjugaat) geschiedt door AFBI oxime te markeren met Horse Radish Peroxidase (mierikswortelperoxidase) (2,3,4). Voor dit conjugaat zijn als substraat meerdere stoffen toepasbaar, zoals twee zeer veel toegepaste substraten: s-aminosalicylzuur (kleurloos - bruin) en o-phenyleendiamine (kleurloos - oranje) (5).

Literatuurgegevens ELISA-toepassingen AFBI bepaling

Door Biermann en Terplan (6) is een door hun ontwikkelde methode (2) toegepast op monsters grondnotenmeel. Als detectiegrens werd aangegeven 100 pg/g (0,1 ppb). Recovery op 10x de detectiegrens was ca. 90% met een variatiecoëfficiënt van 5-10%.

El Nahib et al (3) vermelden gegevens over mais, tarwe en pindakaas. Op 5-6 ppb niveau werd resp. voor mais, tarwe en pindakaas een recovery percentage bereikt van 80,0%, 86,6% en 94,8% met een gemiddelde variatiecoëfficiënt van ca. 20%. Opgegeven detectiegrens 0,025 ng per bepaling (ca. 2,5 ppb).

Door Margry (7) is in een rapport zijn bevindingen vastgelegd met de methode van Biermann en Terplan (6). Het betrof hier oriënterend onderzoek met grondnotenschroot, kokosschroot, katoenschroot, mais en kalkoenkruimel. Grondnotenschroot, kokosschroot en mais bleken na een korte voorzuivering (methanol-extractie en centrifugatie) bruikbaar voor een snelle screening.

Voor katoenschroot bleek een uitgebreide voorzuivering nodig te zijn. Kalkoenkruimel bleek niet geschikt vanwege te uitgebreide voorzuivering. Voor de diverse methodes zijn maximale recoveries bereikt van 70-100% bij een detectiegrens van 1,8 µg/kg. Aangetekend werd dat door het gebruik van ander fabrikaat mikrotiterplaten (Nunc of Greiner) in plaats van Costar, de detectiegrens waarschijnlijk nog verder verlaagd kan worden (tot 0,1 µg/kg).

Margry was in staat met ELISA 24 analyses per 7 uur uit te voeren. Voor HPLC bleek dat 12 analyses per 16 uur te zijn.

Technische mogelijkheden binnen het RIKILT

Binnen het RIKILT is op de afdeling Diergeneesmiddelen alle apparatuur voorhanden die deze ELISA-techniek nodig heeft. Binnen deze afdeling is reeds enige ervaring opgedaan met de competitie methode tijdens het ontwikkelen van een ELISA-techniek voor sulfadimidine in vlees.

Voor het toepassen van de ELISA worden polystyreen mikrotiterplaten gebruikt met 96 putjes (figuur 3). De buitense rij wordt voor monsters en standaarden niet gebruikt, ter voorkoming van randeffecten. Van de resterende 60 putjes worden 20 stuks gebruikt voor standaarden.

Indien ervan uitgegaan wordt dat monsters in viervoud aangezet worden (in tweevoud is ook goed bruikbaar) kunnen per plaat ca. 40 monsters geanalyseerd worden. Worden nog twee verdunningsstappen opgebracht dan zijn ca. 3 monsters per plaat te analyseren.

Indien één persoon ca. 10 mikrotiterplaten per dag verwerkt (opbrengtijd per plaat ca. 15', incubatietijd ca. 1 uur plus nog spoeltijd met buffer en de reactie/meting van het substraat) is het mogelijk per dag 30 (60 bij aanzetten in duplo) monsters te analyseren.

De verwachting is in de praktijk dat er moeilijkheden qua tijd ontstaan met de voorbereiding en extractie van de monsters. Hierdoor kan het aantal te analyseren monsters per dag lager uitvallen.

Margry (7) geeft al aan dat de voorbereiding sterk afhankelijk is van de aard van het monster. De praktijk zal hieromtrent nader uitsluitsel moeten verschaffen.

Conclusies

- De methode van Biermann en Terplan lijkt het meest geschikt om te dienen als screeningsmethode.
- In principe is het mogelijk met een geschikte voorbereiding 30-60 monsters per dag te analyseren.
- Het soort mikrotiterplaten is van grote invloed op de detectiegrens (Nunc- en Greinerplaten lijken geschikter dan Costarplaten).
- Antiserum en conjugaat zijn niet commercieel verkrijgbaar.

- Katoenschroot en kalkoenkruimel vereisen een uitgebreide, tijdrovende voorzuivering, vrijwel identiek aan een HPLC-voorzuivering.
- Grondnotenschroot, kokosschroot en mais kunnen bepaald worden na een korte simpele extractie.
- Beschreven detectiegrenzen variëren van 0,1-2,5 µg/kg met recoveries van 70-100%.
- Er zijn nauwelijks gegevens bekend omtrent de bepaling van AFBl in samengestelde voeders.

Aanbevelingen

- De mogelijkheid ter verkrijging van antiserum en conjugaat dient nagegaan te worden.
- Er dient nader onderzoek verricht te worden naar matrixinvloeden vanuit samengestelde voeders.

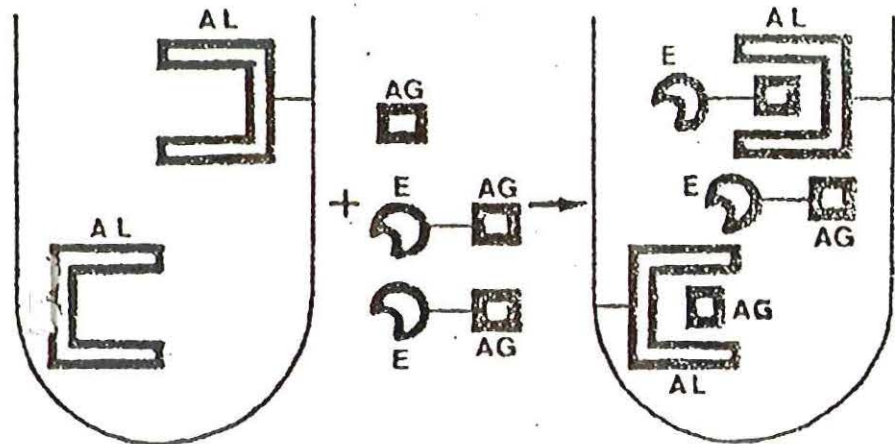
Literatuurreferenties

1. Anonymus, Analyse 35, 6 (1980).
2. Biermann A. und Terplan G. Archiv für Lebensmittelhygiene; 31, 51-56 (1980).
3. El-Nahib, Ossama; Pestha, James J. and Clu, Frin S. J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 64 (5), 1077-1082 (1981).
4. Pestha, J.J.; Gaux, P.K. and Clu, F.S. Applied and Environmental Microbiology; 40 (6), 1027-1031 (1980).
5. Van Egmond, H.P. Determination of Mycotoxins in Developments in Food Analysis, Techniques - 3, edited by R.D. King (pp. 99-144).
6. Biermann A. und Terplan G. Archiv für Lebensmittelhygiene; 33, 17-20 (1982).
7. Margry, R.J.C.F. CCL-rapport (CCL-Immun. 83.001), Cehave NV Veghel (1983).

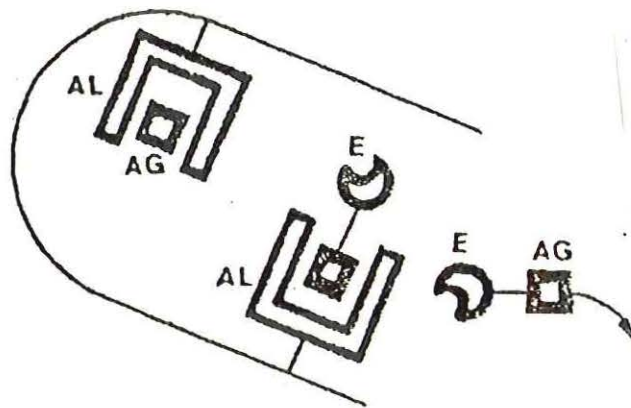
Verklarende woordenlijst

- Antigeen - het te bepalen organisch contaminant, b.v. Aflatoxine B₁.
- Antilichaam - door een dierlijk of menselijk lichaam gemaakte
Antistof afweerstof dat specifiek reageert met één type antigeen.
- Conjugaat - enzym gebonden antigeen resp. enzym gemerkt antigeen.
- ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
- Mikrotiterplaat - polyvinylchloride of polystyreenplaat met 96 ondiepe putjes waarin de monsteroplossingen en reagentia gebracht worden.
- RIA - Radio Immuno Assay.
- Substraat - stof die samen met enzym van het conjugaat een (gekleurd) reactieprodukt geeft.
- Titer - een waarde die aangeeft hoe sterk de standaard antilichaamoplossing verdund moet worden, om de helft van de maximale extinctie te bereiken.

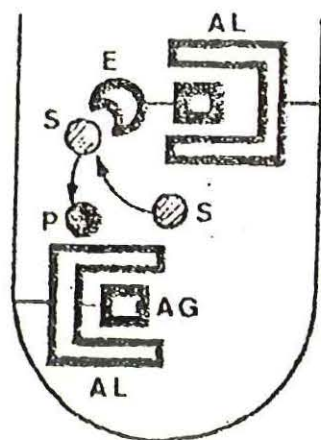
Figuur 1 ELISA competitieprincipe



Stap 1 Koppelen antilichaam aan vaste drager AG en AG/E concurreren om AL-plaatsen



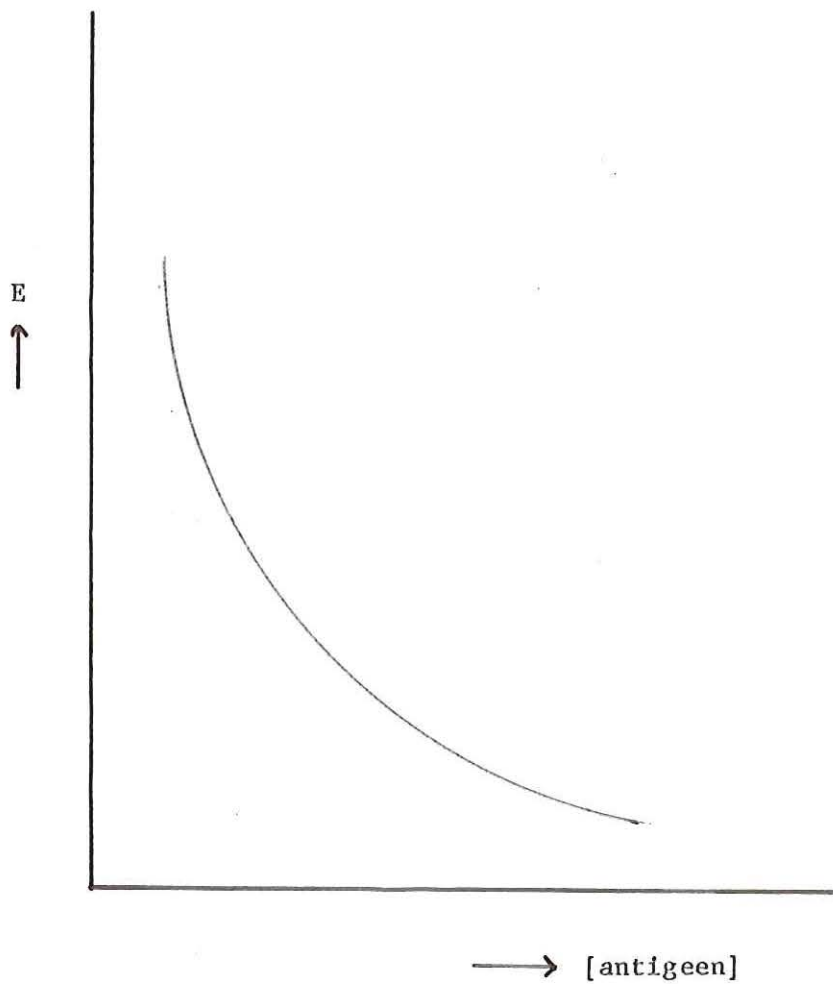
Stap 2 Scheiding vrij en antilichaam gebonden AG



AL : antilichaam
 AG : vrij antigeen
 E-AG : enzym gebonden
 antilichaam (conjugaat)
 S : substraat
 P : gekleurd reactie-
 patroon

Stap 3 Toevoeging substraat voor enzymreactie

Figuur 2 Grafisch verband tussen de extinctie en de antigeenconcentratie bij het competitieprincipe.



Figuur 3 Mikrotiterplaat

