Immunoassays: Toepassing in waterkwaliteitsonderzoek

Samenvatting

In het waterkwaliteitsonderzoek wordt voor de detectie van organische microverontreinigingen en vooral van pesticiden in drinkwater, oppervlakte- en grondwater momenteel gebruik gemaakt van conventionele methoden zoals GC en HPLC. Door hun fysisch-chemische eigenschappen en de zeer lage concentraties van pesticiden die gemeten moeten worden (EG norm < 0,1 μmg/l) zijn deze conventionele methoden tijdrovend en kostbaar. Een nieuwe methode, de immunoassay, biedt goede perspectieven voor toepassing in het waterkwaliteitsonderzoek. De immunoassay is snel, gevoelig, betrouwbaar en kostenbesparend. In principe kan voor iedere in water oplosbare organische verbinding (> 300 D) een immunoassay ontwikkeld worden.

Aan de hand van een literatuurstudie is een inventarisatie uitgevoerd van de tot nu toe ontwikkelde immunoassays voor pesticiden. In een praktijkonderzoek werden ook enkele commercieel verkrijgbare immunoassaykits uitgetest. In watermonsters van diverse oorsprong (drinkwater, oppervlakte- en grondwater) werden aldicarb en atrazine gemeten. Vergelijking van de resultaten van de verschillende kits toonde aan, dat vooral in het lage concentratiegebied de kits verschillen kunnen opleveren. Van enkele (n=6) watermonsters waren GC-waarden bekend waarvan voor 4 monsters de waarden zeer goed vergelijkbaar bleken. De conclusie is, dat de immunoassay zeker toepassingsmogelijkheden biedt binnen het waterkwaliteitsonderzoek.

In Nederland worden aan de kwaliteit van oppervlaktewater en drinkwater hoge eisen gesteld. De waterkwaliteitsbeheerders (RWS en lagere overheden) streven naar een zo schoon mogelijk produkt. Een uitgebreide kwaliteitscontrole vindt plaats van zowel het drinkwater als de grondstoffen oppervlakte- en grondwater. Wat betreft verontreinigende organische stoffen en vooral bepaalde pesticiden schieten conventionele methoden zoals GC en HPLC echter soms te kort.



MW. P. M. M. MEULENBERG
Wetenschappelijk Adviesbureau
ELTI Support
Nijmegen



DR. P. G. M. STOKS
NV WRK
Nieuwegein



IR. W. H. MULDER
RIZA/DBW
Lelystad

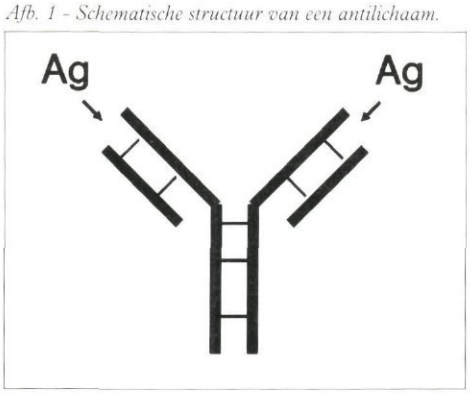
De oorzaak hiervoor is gelegen in de zeer lage concentraties van de verbindingen en hun fysisch-chemische eigenschappen. Op het gebied van het meten van pesticiden in watermonsters is een nieuwe ontwikkeling gaande. Een methode, die goede perspectieven biedt en tegemoet zou kunnen komen aan de problemen die inherent zijn aan de conventionele methoden, is de immunoassay. Deze methode is ontwikkeld en wordt al lange tijd met succes toegepast in de klinische chemie. Op vele plaatsen worden pogingen ondernomen om de immunoassay ook toe te passen op het gebied van milieuverontreinigingen. Wat betreft de gevoeligheid, nauwkeurigheid en herhaalbaarheid zit de immunoassay tenminste op hetzelfde niveau als GC en HPLC, terwijl de specificiteit kan variëren afhankelijk van de gebruikte materialen. Het grote voordeel van de immunoassay is, dat in zeer korte tijd en met lage kosten een groot aantal monsters op bepaalde verbindingen getest kan worden.

Omdat in Nederland in de waterwereld de immunoassay een nog relatief onbekende methode is, wordt hier het principe van de immunoassay uitgelegd. Toegespitst op, maar niet beperkt tot, het meten van pesticiden in waterige monsters zal een overzicht gegeven worden van de immunoassays die tot nu toe ontwikkeld zijn. Een aantal kits is ook al commercieel op de markt. In een praktijkonderzoek werd een aantal van deze commerciële kits uitgetest op diverse watermonsters. De resultaten hiervan worden ook besproken.

De immunoassay: het principe

Afbeelding 1 toont schematisch het basisprincipe van een immunoassay, namelijk de specifieke binding van een antigen aan een antilichaam. Antilichamen zijn serum eitwitten, die geproduceerd worden door het immuunsysteem van een organisme. Immunisatie met een antigen, dat is een lichaamsvreemde stof, induceert de produktie van antilichamen, die specifiek zijn voor dat antigen. Voor het opwekken van antilichamen worden proefdieren gebruikt, bij voorkeur konijnen. Uit het bloed van dergelijke proefdieren kunnen de antilichamen geïsoleerd worden voor toepassing in een immunoassay.

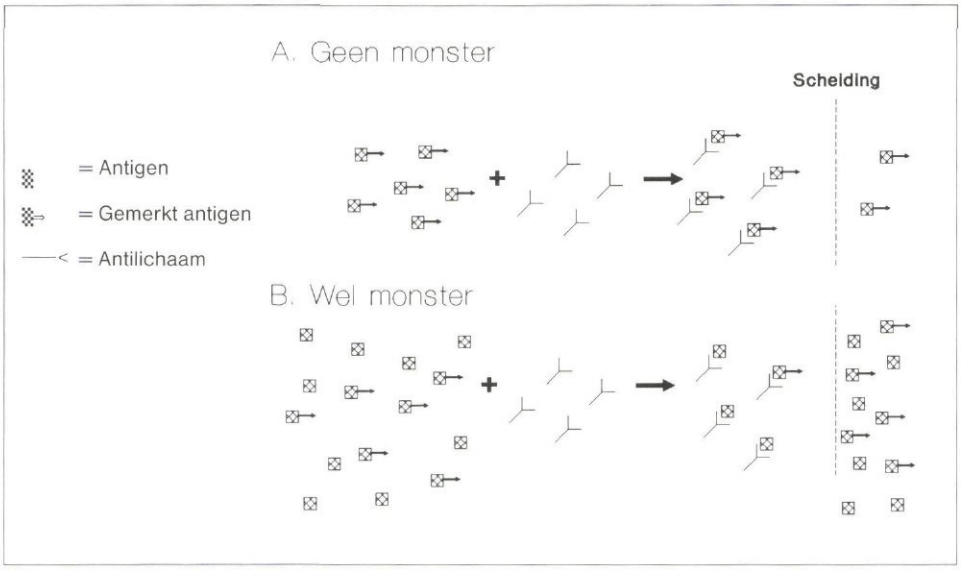
Afb. 1 - Schematische structuur van een antilichaam.



Legenda

Een antilichaam is een immunoglobuline en bestaat uit 4 polypeptideketens, die gerangschikt zijn in de typische Y-vorm. De korte poten bevatten een hoog-variabele aminozuurvolgorde en aan de uiteinden hiervan bevinden zich de antigenbindingsplaatsen.

Een immunoassay is in feite een chemisch reactie die in een reageerbuis uitgevoerd kan worden en verloopt via de wet van de massawerking. In de klinische chemie, waar de immunoassay werd ontwikkeld, werd en wordt deze methode gebruikt voor bijvoorbeeld het kwantitatief meten van hormonen in bloed/plasma. Voor kwantificering van een hoeveelheid analiet is een meetbaar signaal nodig. In de beginjaren werd de immunoassay uitgevoerd volgens het in afbeelding 2 weergegeven principe. Het te meten antigen werd radioactief (^{3}H, ^{125}I, ^{14}C) gemerkt en gebruikt als signaalgevend bestanddeel. Het reactiemengsel bestond uit een beperkte concentratie antilichaam, een beperkte hoeveelheid gemerkt antigen en een monster met een onbekende hoeveelheid antigen. Gemerkt en ongemerkt antigen gaan een competitie aan voor de beperkte hoeveelheid bindingsplaatsen op de antilichamen. Kwantificering vindt plaats door bijvoorbeeld in het geval van radio-isotopen de hoeveelheid gebonden radioactiviteit te meten. Hiervoor is een scheiding nodig van de vrije en de gebonden fase. De ratio van gebonden tot



Afb. 2 - Principe van de immuno-assay.

Legenda

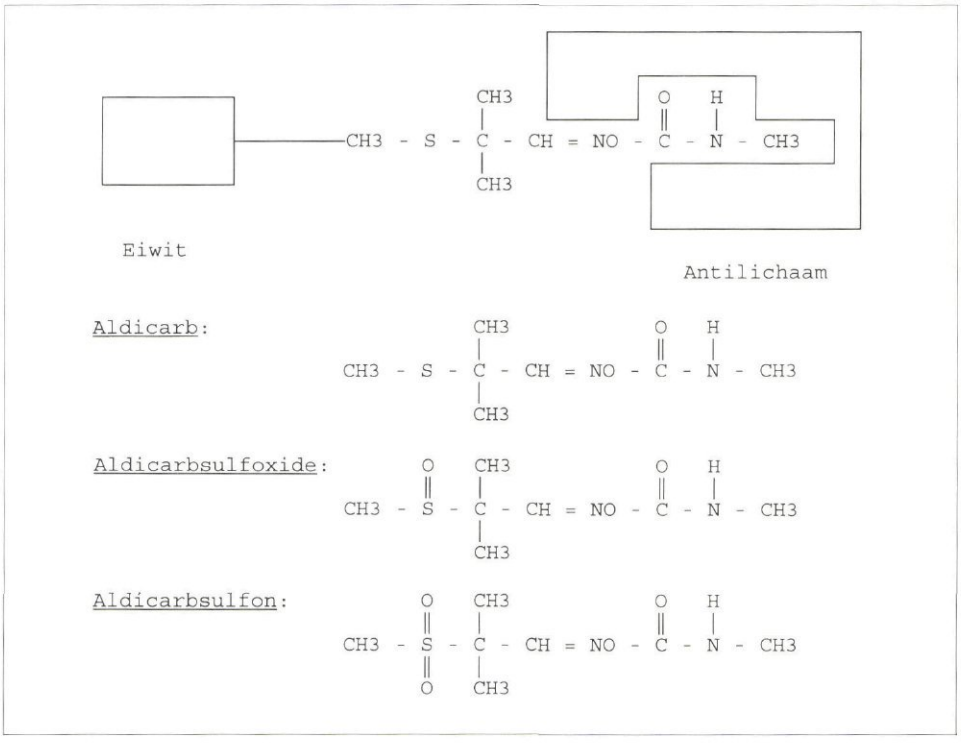
Bovenstaande afb. geeft de competitieve immunoassay weer. Gemerkt en niet-gemerkt antigen (monster) wedijveren voor een beperkt aantal bindingsplaatsen op het antilichaam. Na scheiding van de vrije en de gebonden fase geeft de verhouding totaal:gebonden signaal een maat voor de concentratie antigen in het monster.

totaal toegevoegde hoeveelheid radioactiviteit is dan een maat voor de hoeveelheid antigen in het te meten monster.
In de loop van de tijd zijn de radioisotopen door hun gevaar voor de gezondheid en de ermee samenhangende afvalproblemen vervangen door onder andere fluorescerende, fosforescerende en enzym-gekoppelde verbindingen. Vooral enzym-gekoppelde verbindingen, die met een substraat een spectrofotometrisch meetbaar signaal leveren, worden op het moment veel toegepast.
Een variatie op het bovenstaande principe is, dat niet het antigen maar het antilichaam voorzien wordt van een signaalgevende groep. Verder wordt op het moment veel gebruik gemaakt van een vaste drager, waarop of antigen of antilichaam gehecht wordt. Een voorbeeld hiervan is de zogenaamde ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Het antilichaam kan in dit geval gehecht zijn aan een vaste drager, zoals de wand van een polystyreen reactiebuisje of een microtiterplaat. Incubatie met monster of standaard en enzym-gekoppeld antigen wordt gevolgd door wassen (scheiden van vaste en vrije fase). Signaalvorming geschiedt door het toevoegen van enzym-substraat.

Pesticiden immunoassays

In navolging van de toepassingen in de klinische chemie is een aantal jaren geleden gestart met de ontwikkeling van immunoassays voor pesticiden. De voordelen boven conventionele methoden zijn onder andere:
- er kan direct in een waterig monster gemeten worden; voorzuivering of opwerking is meestal niet nodig;
- er is slechts een klein volume nodig (50-500 μl);
- de detectiegrens ligt in de grootte-orde van nanogrammen per liter;
- de methode is snel; in 10-120 minuten kan een serie tot 100 monsters gemeten worden;
- in principe kunnen alle klassen van verbindingen gemeten worden;
- de bepaling kan zowel stofspecifiek als groepspecifiek opgezet worden;
- de methode is zeer kostenbeperkt, ongeveer 10% van chromatografische methoden.

De nadelen van de immunoassay hebben te maken met:
- de lange ontwikkeltijd voor een bepaalde assay;
- in tegenstelling tot GC of HPLC is (nog) geen multiresidu analyse mogelijk;
- onverwachte en soms onverklaarbare



Afb. 3 - Kruisreactiviteit van anti-aldicarb-antilichaam.

Legenda

Schematische weergave van mogelijke kruisreactiviteit van een antilichaam dat opgewekt werd tegen een aan een eiwit gekoppeld aldicarb-antigen. De twee metabolieten aldicarbsulfoxide en aldicarbsulfon worden goed gebonden door het antilichaam, dat is opgewekt tegen het methylamino-uiteinde van aldicarb.

resultaten kunnen optreden; analoog aan GC of HPLC kunnen bijvoorbeeld vals positieve signalen veroorzaakt worden door verontreinigd materiaal of door matrixeffecten van het monster;
- het optreden van kruisreactiviteit inherent aan het werken met antilichamen.

Vooral dit laatste punt wordt vaak aangehaald als argument tegen het gebruik van de immunoassay. Omdat antilichamen opgewekt worden in levende organismen, bij voorkeur zoogdieren, is de specificiteit sterk afhankelijk van diverse omstandigheden. Illustratief is de immuniteit tegen het griepvirus bij de mens. Na een periode van griep is een persoon immuun tegen het bewuste infecterende griepvirus, maar niet tegen andere, soms sterk overeenkomende griepvirussen. Voor het opwekken van antilichamen tegen vooral kleine moleculen zoals pesticiden moet een antigen gemodificeerd worden om effect te hebben. Deze modificatie bepaalt in belangrijke mate de specificiteit van de geproduceerde antilichamen. Stel dat men een antilichaam tegen aldicarb wil opwekken. Omdat deze verbinding te klein is om het immuunsysteem in werking te stellen, kan aldicarb gekoppeld worden aan een eiwit en vervolgens als complex geïnjecteerd worden in een proefdier. Wanneer een antilichaam geïnduceerd wordt, dat bindt aan de methylaminogroep zal dit antilichaam in een immunochemische reactie ook de metabolieten van aldicarb zoals bijvoorbeeld aldicarbsulfoxyde, aldicarbsulfon en aldicarbsulfonitril kunnen binden. Dit principe is schematisch weergegeven in afbeelding 3.
Een brede specificiteit van een bepaald antilichaam kan in een immunoassay echter ook voordelen hebben. In bijvoorbeeld het geval van pesticiden die gemakkelijk afgebroken worden en zeker die waarvan de metabolieten toxisch zijn, geeft een bepaling die naast de moederverbindingen ook afbraakprodukten kan meten, een beter beeld van de mate van verontreiniging van (water)monsters.
De immunoassay is in feite een indirecte meetmethode. De concentratie van een te meten stof wordt bepaald aan de hand van de verhouding van gebonden tot totaal toegevoegd signaal. De gevoeligheid van de methode is daarom afhankelijk van de efficiëntie van de signaalmeting. De in de immunoassay toegepaste signalen, radioactiviteit, enzymreacties, fluorescentie, fosforescentie, etc., maken het mogelijk om zeer kleine veranderingen in signaal te detecteren. Dit heeft tot gevolg dat een zeer lage detectiegrens mogelijk is.

Er is al een aantal overzichtsartikelen verschenen over de voor- en nadelen en de toepassingsmogelijkheden van immunoassays voor pesticiden/milieuverontreinigende stoffen [1-6]. Hierin wordt ook aandacht besteed aan de technieken voor antilichaamproduktie en de validatie van immunoassays.

Om een indruk te geven welke immunoassays er tot nu toe al ontwikkeld zijn, is in tabel I een opsomming gegeven van de pesticiden, ingedeeld naar klassenverbindingen, met daarbij behorend het type immunoassay, de matrix waarin

TABEL I – *Overzicht van immunoassays voor pesticiden.*

Verbinding	Uitvoering	Matrix	Detectielimiet		Ref.
Organochloorpesticiden					
Aldrin	RIA	water	700	pg	[8]
Dieldrin	RIA	water	150	pg	[8]
Endosulfan	ELISA	water	3	µmg/l	[9]
Endosulfan	EIA	water	3	ng/ml	[10]
Picloram	EIA	water, urine, bodemextracten plantenextracten	5	ng/ml	[11]
	RIA	idem	50	ng/ml	
Pentachloorfenol	ELISA	water	30	mg/l	[12]
Organofosforpesticiden					
Paraoxon	ELISA	buffer, serum	27,5 275	ng/l buffer ng/l serum	[13]
Paraoxon	ELISA	buffer	1	µmg/l	[14]
Parathion	RIA	voedselextract	10-20	ng	[15]
		serumextract	10-20	ng	
		buffer	4	ng	
Parathion	ELISA	bodemextract	1,0	mmg/l	[16]
		buffer	0,2	mmg/l	
Soman	ELISA	serum, melk	–		[17]
		buffer	39	ng/ml	
Carbamaten					
Aldicarb	ELISA	plasma, serum, urine, speeksel, fruitsap	0,3	mg/l	[18]
Dithiocarbamaten/ Thiocarbamaten					
Molinaat	ELISA	water	3	ng/ml	[19]
Molinaat	ELISA	water, lucht, bodemextract	1	µg/l	[20]
Molinaat	ELISA	water	21	µg/l	[21]
		buffer	1	µg/l	
Cloorfenoxycarbonzuren					
2,4-D	RIA	water	0,1	ng/ml	[22]
2,4-D	EIA	water	5	ng/ml	[23]
Chloorfenoxycarbonzuren					
2,4-D	ELISA	water, urine	100	µg/l	[24]
	RIA	idem	50	µg/l	
Diclofopmethyl	EIA	bodemextract, voedselextract	23	ng/ml	[25]
Gehalogeneerde nitro-aromaten					
Trifluralin	ELISA	buffer	0,1	mg/l	[26]
Pyrethroiden					
Bio-allethrin	Prec.	serum	10	µg/ml	[27]
Permethrin	ELISA	vleesextract	50	µg/kg	[28]
Carboximides					
Iprodion	ELISA	voedselextract	0,03	mg/kg	[29]
Triazines					
Ametryn	EIA	water	0,011	µg/ml	[30]
Atrazine	EIA	water, bodemextract	0,1	µg/l	[30]
Atrazine	ELISA	water bodemextract	0,05	µg/l	[31]
OH-Atrazine	ELISA	water	0,05	µg/l	[32]
Atrazine	ELISA	water	1	ng/l	[33]
Propazine	ELISA	water	0,1	ng/l	[33]
Atrazine	ELISA	water, plantenextract bodemextract	0,1 10	µg/l µg/l	[34]
Propazine	ELISA	idem	0,05 5	µg/l µg/l	[34]
Atrazine	ELISA	water	0,1	ng/ml	[35]
Atrazine	ELISA	water	0,03	µg/l	[36]
De-ethylatrazine	ELISA	water	0,01	µg/l	[37]
De-isopropylatrazine	ELISA	water	0,01	µg/l	[37]
Simazine	ELISA	bodemextract	2	µg/l	[38]
Aniliden					
Alachloor	ELISA	water	0,3	µg/l	[39]
Metalaxyl	ELISA	groentenextract	25	µg/l	[40]
Aniliden					
Metazachloor	EIA	buffer	0,03	µg/l	[41]
Metolachloor	ELISA	water	0,5	µg/l	[42]
Amidochloor	ELISA	water	0,5	µg/l	[42]
Butachloor	ELISA	water	0,5	µg/l	[42]
Aromatische Chlooramines					
Diflubenzuron	ELISA	water, melk	1	µg/l	[43]
Diflubenzuron	EIA	melk	2,0	µg/l	[44]
		buffer	0,5	µg/l	
Penfluron	EIA	buffer	0,2	µg/l	[44]
Methabenzthiazuron	ELISA	water	0,05	µg/l	[45]
Benzimidazolen					
Benomyl	RIA	voedselextract	1	ng	[46]
Benomyl	ELISA	voedselextract	0,35	mg/l	[47]
Thiabendazool	ELISA	voedselextract	0,05	ng/ml	[47]
Benomyl	ELISA	fruitsap	10	ng/ml	[48]
Dipyridiliumverbindingen					
Paraquat	RIA	serum	0,25	ng/ml	[49]
Paraquat	ELISA	water	2	µg/l	[50]
Paraquat	ELISA	lucht-plasma, urine-water	0,5 9	mg/m^3-2 ng/ml ng/ml-0,1 ng/ml	[51]
Morfolinoverbindingen					
Fenpropimorf	ELISA	buffer	13	pg/ml	[52]
Triazoolverbindingen					
Triadimefon	ELISA	fruitextract	2	ng/ml	[53]
Triazolen	ELISA	ethanol	12	µg/l	[54]
Diversen					
Clomazon	ELISA	bodemextract	1	µg/l	[55]
Norflurazon	ELISA	water	1	ng/ml	[56]
Triasulfuron	ELISA	bodemextract	0,1	µg/kg	[57]
Sulfonamide	ELISA	buffer	2	nmol/l	[58]

Legenda bij tabel I

RIA = Radio Immuno Assay; EIA = Enzyme Immuno Assay; ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; Prec. = Precipitatie assay.

gemeten werd en voor zover bekend de detectielimiet. Tabel I geeft een compact up-to-date overzicht van de ontwikkeling van immunoassays voor pesticiden. De gegevens zijn noodzakerlijkerwijs beperkt weergegeven. Zo is bijvoorbeeld de mate van kruisreactiviteit niet aangegeven.

Bovendien is niet aangegeven in welke mate een referentiemethode gebruikt werd om een immunoassay te valideren. Hiervoor wordt verwezen naar de desbetreffende artikelen.

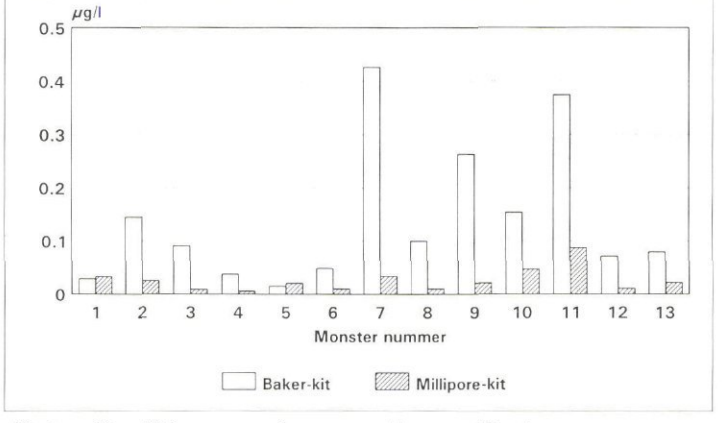
Wat betreft de detectielimiet is de weergave niet consistent. Soms wordt deze weergegeven als de laagst detecteerbare hoeveelheid, soms als de laagst detecteerbare concentratie. Dit is ook het gevolg van de wijze waarop een detectielimiet wordt bepaald, namelijk aan de hand van een standaardreeks of aan de hand van praktijkmonsters. Zoals blijkt uit tabel I, vertoont een gestandaardiseerde buffer een veel grotere gevoeligheid dan een onbekende monstermatrix. Doorgaans wordt de gevoeligheid van de immunoassays, evenals nauwkeurigheid en herhaalbaarheid, echter bepaald met behulp van toevoegingen van de te meten verbindingen aan praktijkmonsters.

Niet alle immunoassays in tabel I zijn specifiek ontwikkeld voor watermonsters. Het zal echter duidelijk zijn, dat bijvoorbeeld een bloedmonster of een extract van bodem, voedsel of planten hooguit meer onverwachte problemen kan opleveren. Aanpassing aan meting in watermonsters is in de praktijk zeer goed mogelijk.

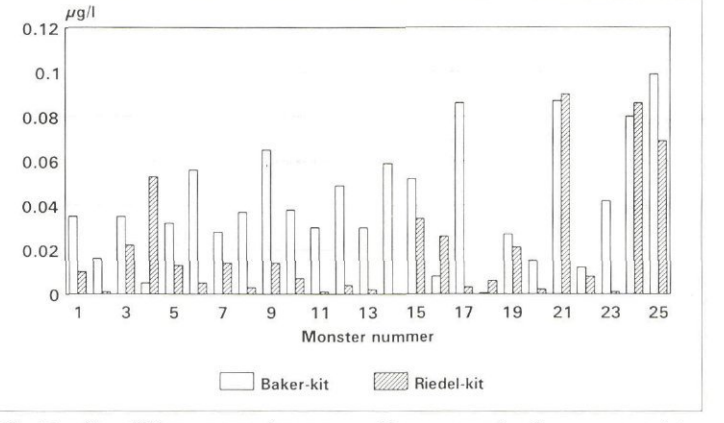
Immunoassaykits

Door enkele firma's worden in Nederland al immunoassays voor pesticiden in kitvorm op de markt gebracht. Al deze kits zijn gebaseerd op ELISA's. Om de toepassingsmogelijkheden te evalueren werden enkele van dergelijke kits uitgetest. Voor dit onderzoek werden diverse watermonsters verzameld: grondwater, oppervlaktewater en drinkwater. In deze monsters werden atrazine en aldicarb bepaald met verschillende immunoassaykits. Twee verschillende uitvoeringsvormen werden gebruikt. Zowel atrazine als aldicarb werden gemeten met een kit van Baker (Deventer). Dit zijn buisuitvoeringen, waarbij antilichaam gecoat is op magnetiseerbare bolletjes. Scheiding van vrije en gebonden fase vindt plaats met behulp van een sterke magneet. Verder werd voor de meting van aldicarb een kit van Millipore (Etten-Leur) gebruikt en voor de meting van atrazine een kit van Riedel-de-Haën (Woerden). Beide zijn in microtiterplaatuitvoering, waarbij microtiterplaten zijn gecoat met antilichaam. Scheiding van vrije en gebonden fase vindt plaats door spoelen. Signaalmeting vindt in alle gevallen spectrofotometrisch plaats bij 450 nm. De resultaten van het onderzoek zijn weergegeven in afbeelding 4. Alle monsters werden op aldicarb getest met de kit van Baker. Zestien monsters bleken beneden de detectielimiet van de bepaling (0,05 μg/l). Van de 30 monsters gemeten met de aldicarbkit van Millipore bleken er 14 beneden de detectielimiet (0,05 μg/l). Bijna alle monsters konden getest worden met de atrazinekits. Vier van de 52 gemeten monsters lagen met de kit van Baker beneden de detectielimiet (0,01 μg/l) en 1 van de 69 monsters gemeten met de Riedel-kit (0,0003 μg/l).

In afbeelding 4 zijn alleen de data opgenomen van de monsters die telkens met twee verschillende kits gemeten konden worden. Zoals blijkt uit afbeelding 4.a. geeft de Baker-kit hogere aldicarbwaarden dan de Millipore-kit. Hiervoor zijn twee mogelijke oorzaken. Aan de ene kant kan kruisreactiviteit een rol spelen.

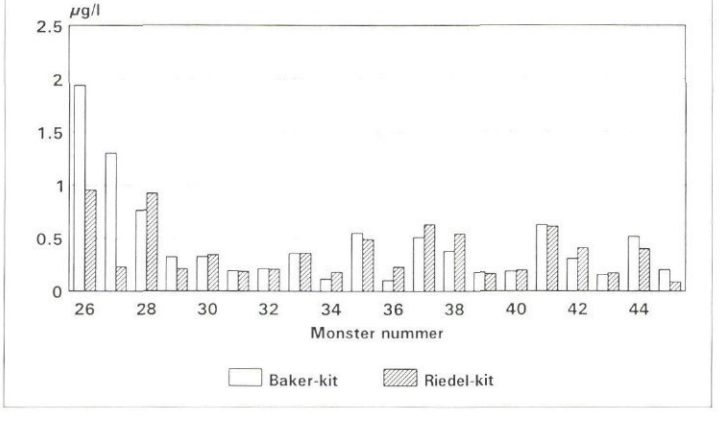


Afb. 4.a. - Vergelijking van twee immunoassaykits voor aldicarb.

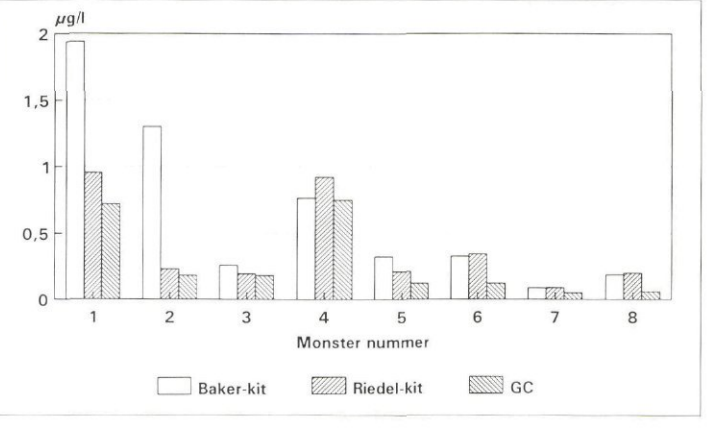


Afb. 4.b. - Vergelijking van twee immunoassaykits voor atrazine (lage concentraties).

Afb. 4.c. - Vergelijking van twee immunoassaykits voor atrazine (hoge concentraties).



Afb. 4.d. - Vergelijking atrazineconcentraties met GC en immunoassaykits.



Legenda bij afbeelding 4

Afb. 4.a. geeft de waarden die gevonden werden met ELISA's voor aldicarb in diverse watermonsters. De monsternummering is in willekeurige volgorde. In de meeste gevallen geeft de Baker-kit (Baker BV, Deventer) hogere waarden dan de Millipore-kit (Millipore BV, Etten Leur).

Afb. 4.b. geeft de waarden < 0,1 μg/l) op dezelfde manier geproduceerd als aangegeven voor afb. 4.a., gemeten met de Baker-kit en de Riedel-kit (Riedel-de-Haën, Woerden).

Afb. 4.c. is vergelijkbaar met afb. 4.b., maar geeft de waarden voor atrazine < 0,1 μg/l in de watermonsters.

Afb. 4.d. vertoont de vergelijking van atrazineconcentraties in enkele watermonsters, die zowel met immunoassay als met GC werden gemeten.

Deze 'storing' is afhankelijk van de specificiteit van de gebruikte antilichamen. Aan de andere kant is er een verschil in de standaarden. In de Baker-kit worden standaarden van aldicarb bijgeleverd (1-10-100 μg/l), terwijl in de Millipore-kit aldicarbsulfon als standaard (1-5-20 μg/l) wordt bijgeleverd. Aldicarbsulfon is één van de belangrijkste metabolieten van aldicarb. Van vijf van de watermonsters werd door het toeleverende laboratorium (DWZH) ook een GC-waarde bijgevoegd. Deze waarden lagen echter alle onder de detectiegrens (< 0,02 μg/l), terwijl vier van deze monsters met de Baker- en de Millipore-kits waarden geven tussen 0,04 en 0,145 μg/l resp. 0,01 en 0,03 μg/l. Nadere details van de 'performance' van deze GC-metingen waren niet voorhanden. Verschillen tussen beide methoden kunnen een gevolg zijn van specificiteit en/of efficiëntie (recovery).

De resultaten van de atrazinemetingen zijn voor de overzichtelijkheid verdeeld over twee grafieken. In afbeelding 4.b. zijn de monsters met een waarde < 0,1 μg/l bijeen gezet; in afbeelding 4.c. die met een waarde > 0,1μg/l. Het blijkt, dat in het lage gebied de Baker-kit hogere waarden oplevert dan de kit van Riedel-de-Haën. Dit is waarschijnlijk een gevolg van een verschil in gevoeligheid van de kits. Door verschillen in de standaardreeks, 10-25-50-100-500-1.000 ng/l in de Riedel-kit en 0,1-1-5 μg/l in de Baker-kit, verschillen de detectielimieten. In het lage gebied zal de Riedel-kit betrouwbaardere waarden geven.
Van 10 watermonsters was ook een GC-waarde door het toeleverende laboratorium (DWZH, WWM) bijgeleverd, waarvan er twee beneden de detectiegrens (< 0,03 μg/l) lagen. Een vergelijking van de waarden van atrazine gemeten met GC en met beide kits is weergegeven in afbeelding 4.d. Het blijkt, dat de Baker-kit twee uitschieters geeft. Voor het overige liggen de waarden dicht bij elkaar.

In het onderzoek werd voor de evaluatie van de kits ook aandacht besteed aan parameters zoals herhaalbaarheid en precisie. Voor een bespreking van de resultaten hiervan wordt verwezen naar een al gepubliceerd rapport [7].

Conclusie

Zoals blijkt uit tabel I zijn voor een groot aantal pesticiden al immunoassays ontwikkeld. De meest toegepaste uitvoeringsvorm is de ELISA. Gezien de EG-norm (< 0,1 μg/l) voor drinkwater, die voor individuele pesticiden ligt op een niveau van 0,1 μg/l, lijken de immunoassays voor triazines het best geschikt voor toepassing in de praktijk. Het uitgevoerde onderzoek naar de concentratie van aldicarb en atrazine in diverse watermonsters laat zien, dat er nogal verschillen kunnen optreden in waarden, die gevonden worden met verschillende commercieel verkrijgbare kits, vooral in het lage bereik. Vergelijking van met immunoassays gevonden atrazinewaarden met GC-waarden geeft echter aan, dat met behulp van kits betrouwbare bepalingen mogelijk zijn.

In de literatuur zijn enkele onderzoeken beschreven waarbij gebruik gemaakt werd van immunoassays voor atrazine. Zo werd bijvoorbeeld door de groep van Hock [34] nagegaan wat de invloed was van het gebruik van atrazine op verontreiniging van diverse watermilieus en in welke mate deze verbinding terecht kwam in waterplanten en waterbodems.
Bushway *et al.* [1991, (59)] hebben in Bohemen in een landbouwgebied waar veel atrazine gebruikt wordt bij de teelt van mais, aardappel en tarwe, bekeken wat het effect hiervan was op verontreiniging van kreek- en drinkwater. Zij vonden in het kreekwater in de nabijheid van dorpen enorme concentraties aan atrazine tot > 10.000 μg/l, terwijl in het drinkwater waarden tot 3 μg/l werden aangetoond. In dit onderzoek werd HPLC als referentiemethode gehanteerd. Er bleken zeer goede overeenkomsten te zijn tussen de resultaten van beide methoden. Een andere toepassing van zo'n immunoassay is beschreven door Leavitt *et al.* [1991, (60)]. In een gebied in Michigan waar voornamelijk mais geteeld wordt, werd onderzoek verricht naar de persistentie van atrazine in de bodem. Het bleek, dat een half jaar na toepassing in sommige gevallen nog meer dan 50% van de oorspronkelijke hoeveelheid in bodemmonsters terug te vinden was.

Toepassing van immunoassays voor pesticiden in de waterkwaliteiscontrole kan op diverse manieren plaatsvinden. Voor verbindingen, die niet of moeilijk met conventionele methoden te meten zijn, kan wanneer mogelijk een commerciële kit gebruikt worden of een immunoassay ontwikkeld worden. Op deze manier kan de immunoassay een aanvulling zijn in de monitoringprogramma's (lange termijn trendonderzoek). Bij calamiteiten of in tijden van een hoog gebruik van een bepaald pesticide of een groep gerelateerde verbindingen kan de immunoassay als screeningsmethode gebruikt worden. Dezelfde toepassing is ook denkbaar in de evaluatie van waterzuiveringsprogramma's. In onderzoeksprojecten is het bovendien mogelijk om de persistentie van pesticiden te bekijken. Alvorens een immunoassay algemeen toegepast kan worden is een degelijke evaluatie nodig. In Duitsland is men hier al mee bezig. Zo worden door de universiteit van München ringonderzoeken georganiseerd voor de bepaling van atrazine in watermonsters. De resultaten van de eerste twee ronden van ringonderzoek zijn al gepubliceerd [61]. Bovendien wordt er gewerkt aan standaardisatie van immunoassaymethoden. Een dergelijke aanpak voor Nederland verdient zeker aanbeveling. Belangrijk hierbij is het om diverse typen watermonsters te testen en te vergelijken met gestandaardiseerde referentiemethoden. Coördinatie van onderzoeksprogramma's is daarbij uit overwegingen van effectiviteit en efficiëntie ook aan te bevelen.

Literatuur

1. Cheung, P. Y. K., Gee, S. J. and Hammock, B. D. (1988). *Pesticide immunoassay as a biotechnology.* ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc. 362:217-229.
2. Harrison, R. O., Geen, S. J. and Hammock B. D. (1988). *Immunochemical methods of pesticide residue analysis.* ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc. 379:316-330.
3. Vanderlaan, M., Watkins, B. E. and Stanker, L. (1988). *Environmental monitoring by immunoassay.* Envirn. Sci. Technol. 22(3): 247-254.
4. Knopp, D., Dobberkau, H.-J. und Degenkolb,

H. (1989). *Immunoassays. Leistungsfähige Analysenmethoden für die umwelttoxikologische Forschung und Praxis.* Z. gesamte Hyg. 35(3):122-125.
5. Hammock, B. D. *et al.* (1990). *Immunochemical technology in environmental analysis.* ASC Symp. Ser. Am. Chem. Soc. 442:112-139.
6. Seiber, J. N., Li, Q. X., Emon, J. M. van (1990). *Barriers to adopting immunoassays in the pesticide analytical laboratory.* ACS Symp. Ser. Am. chem. Soc. 442:156-167.
7. Meulenberg, P. M. M. (1992). *Immunoassays: Toepassing in waterkwaliteitsonderzoek.* Uitgave ELTI Support, Nijmegen.
8. Langone, J. J. and Vunakis, H. (1975). *Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin.* Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10:163-171.
9. Dreher, R. M. and Podratzki B. (1990). *Development of an enzyme immunoassay for endosulfan and its degradation products.* J. Agric. Food Chem. 36:433-437.
10. Reck, B. and Frevert, J. (1990). *Competitive- and inhibition-type immunoassay for determination of endosulfan.* ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc. 442:193-198.
11. Deschamps, R. J. A., Hall, J. C., and McDermott, M. R.(1990). *Polyclonal and monoclonal enzyme immunoassays for picloram detection in water, soil, plants and urine.* J. Agric. Food Chem. 38:1881-1886.
12. Emon, J. van, and Gerlach, R. W. (1992). *Evalutaion of a pentachlorophenol immunoassay for environmental water samples.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48:635-642.
13. Hunter, K. W. Jr., and Lenz, D. E. (1982). *Detection and quantification of the organophosphate insecticide paraoxon by competitive inhibition enzyme immunoassay.* Life Sci. 30:355-361.
14. Brimfield, A. A. *et al.* (1985). *Mouse monoclonal antibodies against paraoxon: Potential reagents for immunoassay with constant immunochemical characteristics.* J. Agric. Food Chem. 33:1237-1242.
15. Ercegovich, C. D. *et al.* (1981). *Development of a radio-immunoassay for parathion.* J. Agric. Food Chem. 29:559-563.
16. Wong, J. M. *et al.* (1991). *Method for the analysis of 4-nitrophenol and parathion in soil using supercritical fluid extraction and immunoassay.* J. Agric. Food Chem. 39:1802-1807.
17. Erhard, M. H. *et al.* (1989). *Development of an ELISA for detection of organophosphorus compound using monoclonal antibodies.* Arch. Toxicol. 63:462-468.
18. Brady, J. F. *et al.* (1989). *Enzyme immunoassay for aldicarb.* ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc. 382:262-284.
19. Gee, S. J. *et al.* (1988). *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the thiocarbamate herbicide molinate.* J. Agric. Food Chem. 36:863-870.
20. Li, Q. X. *et al.*(1989). *Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a gas chromatographic procedure for the determination of molinate residues.* Anal. Chem. 61:819-823.
21. Harrison, R. O. *et al.*(1989). *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the direct analysis of molinate (Ordam) in rice field water.* Food Agric. Immunol. 1(1):37-51.
22. Rinder, D. F. and Fleeker, J. R. (1981). *A radio-immunoassay to screen for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in surface water.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26:375-380.
23. Fleeker, J. (1987). *Two enzyme immunoassays to screen for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water.* J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70(5):874-878.
24. Hall, J. Ch. *et al.* (1989). *Immunoassay for the detection of 2,4-D and picloram in river water and urine.* J. Agric. Food Chem. 37:981-984.
25. Schwalbe, M., Dorn, E. and Beyermann, K. (1984). *Enzyme immunoassay and fluoroimmunoassay for the herbicide diclofop-methyl.* J. Agric. Food Chem. 32:734-741.
26. Riggle, B. (1991). *Development of a preliminary enzym-linked immunosorbent assay for the herbicide trifluralin.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46:404-409.
27. Wing, K. D., Hammock, B. D. and Wustner, D. A. (1978). *Development of an S-bioallethrin specific antibody.* J. Agric. Food Chem. 26:1328-1333.
28. Stanker, L. H. *et al.* (1989). *An immunoassay for pyrethroids: Detection of permethrin in meat.* J. Agric. Food Chem. 37:834-839.
29. Newsome, W. H. (1987). *Determinatin of iprodion in foods by ELISA.* In: Pesticide Science and Technology pp. 349-352.
30. Huber, S. J. (1985). *Improved solid-phase enzyme immunoassay systems in the ppt range for atrazine in fresh water.* Chemosphere 14:1795-1803.
31. Bushway, R. J. *et al.*(1988). *Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40:647-654.
32. Schlaeppi, K. M., Föry, W. and Ramsteiner, K. (1989). *Hydroxyatrazine and atrazine determination in soil and water by enzyme-linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies.* J. Agric. Food Chem. 37:1532-1538.
33. Wittmann, C. and Hock, B. (1989). *Improved enzyme immunoassay for the analysis of s-triazines in water samples.* Food Agric. Immunol. 1:211-224.
34. Wittmann, C. and Hock, B. (1990). *Evaluation and performance characteristics of a novel ELISA for the quantitative analysis of atrazine in water, plants an soil.* Food Agric. Immunol. 2:65-74.
35. Dunbar, B., Riggle, B. and Niswender, G. (1990). *Development of enzyme immunoassay for the detection of triazine herbicides*J. Agric. Food Chem. 38:433-437.
36. Wüst S, and Hock B. (1992). *A sensitive enzyme immunoassay for the detection of atrazine based upon sheep antibodies.* Anal. Lett. 25:1025-1037.
37. Wittmann, C. and Hock, B. (1991). *Development of an ELISA for the analysis of atrazine metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine.* J. Agric. Food Chem. 39:1194-1200.
38. Goh, K. S. *et al.* (1992). *ELISA of simazine in soil: Application for a field leaching study.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48:30-36.
39. Feng, P. C. C. *et al.* (1990). *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for alachlor and its application to the analysis of environmental water samples.* J. Agric. Food Chem. 38:159-163.
40. Newsome, W. H. (1985). *An enzyme-linked immunosorbent assay for metalaxyl in foods.* J. Agric. Food Chem. 35:528-530.
41. Scholtz, H. and Hock, B. (1991). *Development of an enzyme immunoassay for the determination of metazachlor.* Anal. Lett. 24:413-427.
42. Feng, P. C. C., Horton, S. R. and Ray Sharp C. (1992). *A general method for developing immunoassays to chloroacctanilide herbicides.* J. Agric. Food Chem. 40:211-214.
43. Wie, S. I. and Hammock, B. D. (1992). *Development of enzyme-linked immunosorbent assays for residue analysis of diflubenzuron and BAY Sir 8514.* J. Agric. Food Chem. 30:949-957.
44. Wie, S. I. and Hammock, B. D. (1984). *Comparison of coating and immunizing antigen structure on the sensitivity and specificity of immunoassays for benzoylphenylurea insecticides.* J. Agric. Food Chem. 36:1294-1301.
45. Kreissig, S., Hock, B. and Stöcker, R. (1991). *An enzyme immunoassay for the determination of methabenzthiazuron.* Anal. Lett. 24:1729-1739.
46. Newsome, W. H., Shields, J. B. (1981). *A radio-immuno-assay for benomyl and methyl 2-benzimidazolcarbamate on food crops.* J. Agric. Food Chem. 29:220-222.
47. Newsome, W. H. and Collins, P. G. (1987). *Enzyme-linked immunosorbent assay of benomyl and thiabendazole in some foods.* J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:1025-1027.
48. Bushway, R. J., Savage, S. A. and Ferguson, B. S. (1990). *Determination of methyl 2-benzimidazolecarbamate in fruit juice by immunoassay.* Food Chem. 35:51-58.
49. Fatori, D. and Hunter, W. M. (1980). *Radio-immunoassay for serum paraquat.* Clin. Chim. Acta 100:81-90.
50. Emon J. H. van, Seiber, J. N. and Hammock, B. D. (1985). *Applications of immunoassay to paraquat and other pesticides.* ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc. 276:307-316.
51. Emon, J. H., van, Hammock, B. and Seiber, J. N. (1986). *Enzyme-linked immunosorbent assay for paraquat and its application to exposure analysis.* Anal. Chem. 58:1866-1873.
52. Jung, F., Meyer, H. H. D. and Hamm, R. T. (1989). *Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the fungicide fenpropimorph.* J. Agric. Food Chem. 37:1183-1187.
53. Newsome, W. H. (1986). *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for triadimefon in foods.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36:9-14.
54. Forlani, F., Arnoldi, A. and Pagani, S. (1992). *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for triazole fungicides.* J. Agric. Food Chem. 40:328-331.
55. Dargar, R. V., Tymonko, J. M., Werf, P. van der (1991). *Clomazone measurement by enzyme-linked immunosorbent assay.* J. Agric. Food Chem. 39:813-819.
56. Riggle, B. and Dunbar, B. (1990). *Development of enzyme immunoassay for the detection of the herbicide norflurazon.* J. Agric. Food Chem. 38:1922-1925.
57. Schlaeppi, J-M. A., Meyer, W. and Ramsteiner, K. A. (1992). *Dertermination of triasulfuron in soil by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay.* J. Agric. Food Chem. 40:1093-1098.
58. Sheth, H. B. and Sporns, P. (1991). *Development of a single ELISA for detection of sulfonamides.* J. Agric. Food Chem. 39:1696-1700.
59. Bushway, R. J. *et al.* (1991). *Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography for the analysis of atrazine in water form Czechoslovakia.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21:365-370.
60. Leavitt, R. A. *et al.* (1991). *Assessing atrazine persistence in soil following a severe drought.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46:22-29.
61. Hock, B. *et al.* (1991). *Enzyme immunoassay for the determination of s-triazines in water samples: two interlaboratory tests.* Anal. Lett. 24:529-549.

● ● ●

Ontwerp NPR 6268 ter kritiek gepubliceerd

Het Nederlands Normalisatie-instituut heeft ter kritiek de ontwerp NPR 6268 'Bacteriologisch onderzoek van water – Algemene principes bij kwaliteitsborging van bacteriologisch onderzoek van water' gepubliceerd.
Kritiek op dit ontwerp wordt verwacht vóór 1 januari 1994. Exemplaren van de ontwerp NPR 6268 zijn tegen vergoeding verkrijgbaar bij het Nederlands Normalisatie-instituut, Postbus 5059, 2600 GB Delft, telefoon 015 - 69 03 90.