projectnr. 4110.000
Ontwikkeling van screeningsmethoden voor dierbehandelingsmiddelen
projectleider: W. Haasnoot

Rapport 95.06 februari 1995

ONTWIKKELING VAN EEN VELDTEST VOOR DE BEPALING VAN ß-AGONISTEN IN URINE

W. Haasnoot*, L. Streppel#, G. Cazemier*, M. Salden#, P. Stouten*,
A. Kemmers Voncken* en P. van Wichen#.

* RIKILT-DLO
# Euro-Diagnostica BV

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telefax 08370-17717

Copyright 1995, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
auteurs
programmaleiders (5x)
projectleider
public relations en secretariaat (2x)
bibliotheek (3x)
leesplanken (2x)
J. de Jong
A.H. Roos
M.L. Essers
R. Schilt
F.A. Huf

EXTERN:

Algemene Inspectie Dienst, Kerkrade
Algemene Inspectie Dienst, West (4x)
Algemene Inspectie Dienst, Oost (4x)
Algemene Inspectie Dienst, Zuid (4x)
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Milieu, Kwaliteit en Gezondheid
Euro-Diagnostica BV (10x)
Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (Drs. H.J. Tankink)
Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees, Centraal Laboratorium
TNO-Voeding: Instituut voor Biotechnologie en Chemie (Prof. Dr. J. van der Greef en Dr. C.J.M. Arts)
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (Dr. R.W. Stephany en Dr. L.A. van Ginkel)

ABSTRACT

Ontwikkeling van een veldtest voor de bepaling van ß-agonisten in urine

Development of an on-site tube test for the determination of ß-agonists in urine (in Dutch)

Report 95.06 February 1995

W. Haasnoot*, L. Streppel#, G. Cazemier*, M. Salden#, P. Stouten*,
A. Kemmers Voncken* and P. van Wichen#.

* DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands
Euro-Diagnostica BV, PO Box 2820, 7303 GC Apeldoorn, The Netherlands

8 figures, 5 tables, 23 pages, 9 references

An on-site screening test for the detection of ß-agonists in urine is developed. The test is based on the principle of an enzyme immunoassay in polystyrene tubes. Results can be obtained by visual interpretation or by measurement with a differential photometer. The total time required to perform the test is about 20 min. Due to speed and simplicity, the test can be performed in slaughter- and farmhouses. The test detects several ß-agonists; clenbuterol, salbutamol, mabuterol, mapenterol, bromobuterol, tulobuterol, carbuterol, terbutaline, pirbuterol, cimbuterol and cimaterol.
The test is applied in the laboratory and for on-site screening of in total 249 bovine urine samples. Positive urine samples with a level of 3 ng/ml clenbuterol and higher can be detected with this on-site test. Due to the difference in sensitivity between the on-site test and the laboratory methods (action level 1-2 ng/ml, depending on the ß-agonist), the on-site test can be used only as supplement to the applied control system (microtitre plate EIA for screening followed by GC-MS confirmation). The detection of suspected samples at the place of sampling can result in a more effective control of the illegal use of ß-agonists.

Keywords: ß-agonists, urine, on-site test, enzyme immunoassay.

INHOUD blz

SAMENVATTING 5

1 INLEIDING 6

2 METHODEN VAN ONDERZOEK EN MONSTERMATERIAAL 7

2.1 Huidige controle 7

2.1.1 Screeningsmethoden 7

2.1.2 Bevestigingsmethode 10

2.2 Veldtest 10

2.2.1 Samenstelling veldtest 11

2.2.2 Werkwijze veldtest 11

2.3 Monstermateriaal 12

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE 12

4 CONCLUSIE 22

LITERATUUR 23

SAMENVATTING

Voor het onderzoek van urinemonsters op de aanwezigheid van ß-agonisten is een veldtest ontwikkeld. Deze veldtest is gebaseerd op dezelfde immunochemische techniek als toegepast bij de screening in het laboratorium (de zgn. competitieve enzym immunoassay, EIA). Door het gebruik van buisjes (in plaats van een microtiterplaat), druppelflesjes (in plaats van pipetten) en een draagbare spectrofotometer is de laboratoriumtest dusdanig vereenvoudigd dat uitvoering buiten het laboratorium mogelijk is. De gevoeligheid en de snelheid van de EIA zijn aangepast. Hierdoor is het mogelijk om de veldtest direct (zonder voorbewerking) op urinemonsters uit te voeren en binnen circa 20 minuten een uitslag te verkrijgen. De veldtest reageert met een aantal ß-agonisten (clenbuterol, salbutamol, mabuterol, mapenterol, broombuterol, cimbuterol, tulobuterol, carbuterol, terbutaline, pirbuterol en cimaterol) met een kruisreactiviteit die overeenkomt met die van de in het laboratorium toegepaste screeningsmethode.

Het testresultaat kan visueel worden beoordeeld er wordt echter de voorkeur gegeven aan een meting van de kleurintensiteit met een draagbare spectrofotometer.

De kleurintensiteit van urinemonsters wordt vergeleken met een controlestandaard (3 ng salbutamol/ml) en uitgedrukt in een procentuele relatieve intensiteit t.o.v. deze controlestandaard.

De veldtest is toegepast op 249 urinemonsters en de resultaten zijn vergeleken met die verkregen met de gebruikelijke laboratoriummethoden. Van de 249 monsters zijn met de laboratoriummethoden 185 monsters negatief bevonden, in 56 monsters is clenbuterol en in 8 monsters is mabuterol aangetoond. Bij een in de veldtest gehanteerde actiegrens van 80% relatieve intensiteit zijn geen fout positieve resultaten verkregen. Bij deze actiegrens wordt 95% van de monsters met een clenbuterolgehalte groter dan 3 ng/ml (n=40) als verdacht beoordeeld.

Bij een actiegrens van 80% relatieve intensiteit is de veldtest minder gevoelig dan de methoden gebruikt in het laboratorium waar een actiegrens van 1-2 ng/ml (afhankelijk van de ß-agonist) wordt gehanteerd.

In 1994 zijn door de Algemene Inspectie Dienst (AID) bij 27 bedrijven urinemonsters met ß-agonisten aangetroffen. Van het totaal aantal in die bedrijven genomen monsters (n=558) werd bij 65% ß-agonisten aangetoond. Bij 75% van die positieve monsters werd een gehalte groter dan 3 ng/ml gevonden en deze zouden bij een actiegrens van 80% relatieve intensiteit door de veldtest worden herkend als verdacht. Om de kans op het aantreffen van verdachte urinemonsters zo groot mogelijk te houden wordt aanbevolen om minimaal de helft van het aantal genomen monsters ter plekke te onderzoeken.

Door het verschil in detectiegrens tussen de veldtest en de laboratoriummethoden kan de veldtest alleen gebruikt worden als aanvulling op de huidige controle. Het in de stal vinden van verdachte urinemonsters kan aanleiding geven tot een uitgebreide monstername en resulteren in een meer gerichte en effectieve controle op illegaal gebruik van ß-agonisten.

1 INLEIDING

In het RIKILT-DLO worden urinemonsters onderzocht op de aanwezigheid van ß-agonisten in het kader van de opsporing door de Algemene Inspectie Dienst (AID). In het begin (1988) is alleen gecontroleerd op de aanwezigheid van clenbuterol met een actiegrens van 10 ng/ml. In 1990 zijn andere ß-agonisten (salbutamol, mabuterol, terbutaline en cimaterol) aan de controle toegevoegd en is de actiegrens verlaagd tot 3 ng/ml. Deze actiegrens is in 1992 wederom verlaagd tot 2 ng/ml en bedraagt nu 1-2 ng/ml (afhankelijk van de ß-agonist) terwijl tevens andere ß-agonisten zoals broombuterol en mapenterol in het onderzoek zijn opgenomen. Naast een toenemend aantal ß-agonisten en een steeds lagere actiegrens is het monsteraanbod binnen het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij gestegen van ca. 200 in 1988 tot ca. 10.000 in 1994. Om dit grote aantal monsters te kunnen onderzoeken wordt een tweestaps keuringssysteem toegepast. De monsters worden eerst onderzocht met screeningsmethoden (microtiterplaat enzyme immuno-assays [EIA]; Haasnoot e.a. 1990, 1991 en 1994) en de hierbij verdacht bevonden monsters worden geanalyseerd met een bevestigingsmethode (gaschromatografie in combinatie met massa-spectrometrie; Schilt e.a. 1990, van Rhijn e.a. 1994).
Met behulp van de EIA's kan geen onderscheid worden gemaakt tussen de afzonderlijke ß-agonisten. Om de identiteit van de aanwezige ß-agonist vast te stellen dienen de met de EIA's verdacht bevonden monsters bevestigd te worden met de GC-MS methode. Deze screening- en bevestigingsmethoden zijn alleen toepasbaar in een laboratorium. Door een screening op de plaats van monstername (stal of slachthuis) toe te passen kan de controle aanzienlijk efficiënter worden.

Mede op verzoek van de Algemene Inspectie Dienst (AID) is een veldtest voor de screening van urinemonsters op de aanwezigheid van ß-agonisten ontwikkeld. Om een stabiele testkit te kunnen produceren is een samenwerking tussen RIKILT-DLO en de firma Euro-Diagnostica BV (Apeldoorn) opgezet. De in dit rapport beschreven veldtest maakt gebruik van dezelfde techniek als bij de screeningtesten die in het laboratorium worden toegepast (enzyme immunoassay). De handelingen die echter nodig zijn om een dergelijke test in een laboratorium te kunnen uitvoeren dienden te worden vereenvoudigd en te worden versneld. Doelstelling was dat een veldtest binnen 30 minuten uitvoerbaar zou zijn, de gevoeligheid van de laboratoriumtesten zou benaderen en door AID controleurs zou kunnen worden uitgevoerd.

In dit rapport wordt allereerst een beschrijving gegeven van de in het laboratorium toegepaste tweestaps controle (screening en bevestiging). Daarna wordt de ontwikkeling van de veldtest beschreven en vervolgens worden de resultaten verkregen met de veldtest vergeleken met die verkregen met de laboratoriummethoden.

2 METHODEN VAN ONDERZOEK EN MONSTERMATERIAAL

2.1 Huidige controle

Urinemonsters worden in het laboratorium eerst onderzocht met screeningsmethoden (Enzyme Immunoassays) en de daarbij verdacht bevonden monsters worden opnieuw onderzocht met een bevestigingsmethode (GC-MS).

2.1.1 Screeningsmethoden

In het RIKILT-DLO is voor het aantonen van ß-agonisten in urine en andere monstermaterialen (veevoeder, lever, ogen, faeces, vlees etc.) een aantal screeningsmethoden ontwikkeld.
De hierbij gebruikte techniek (enzyme immunoassay [EIA]) maakt gebruik van in een konijn opgewekte antilichamen tegen een ß-agonist gekoppeld aan een (voor het konijn vreemd) eiwit (runder serumalbumine). Het RIKILT-DLO beschikt over antilichamen opgewekt tegen clenbuterol, salbutamol en zeer recent tevens fenoterol. Voor de uitvoering van een EIA wordt tevens gebruik gemaakt van een ß-agonist gekoppeld aan een enzym (Horse Radish Peroxidase [HRP]). Voor het in dit rapport beschreven onderzoek wordt gebruik gemaakt van salbutamol-HRP. De antisera en het salbutamol-HRP zijn de essentiële reagentia in de EIA. Om in het laboratorium snel en veel monsters tegelijk te kunnen onderzoeken werden EIA's ontwikkeld waarbij gebruik werd gemaakt van 96 wells microtiterplaten. Zo'n microtiterplaat EIA werkt als hierna beschreven (zie figuur 1).

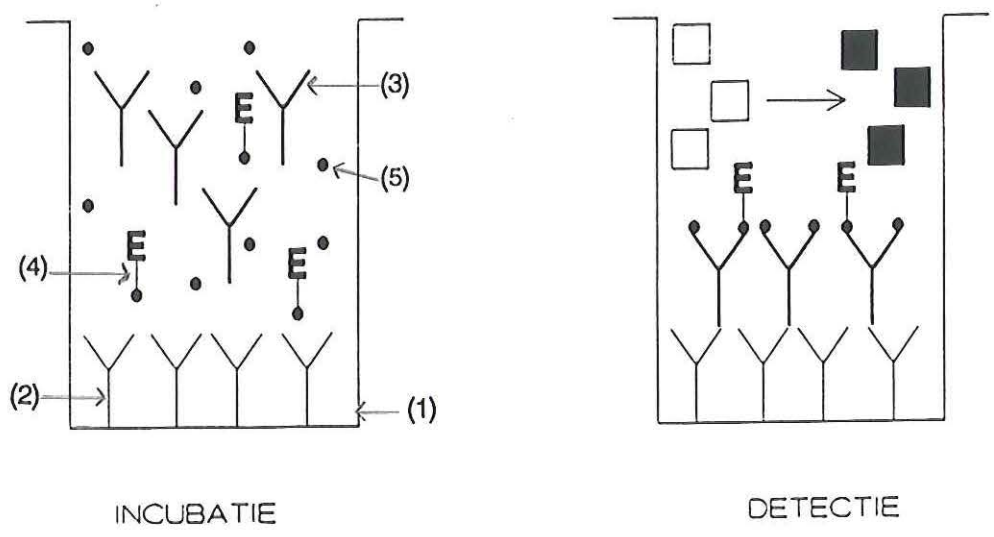
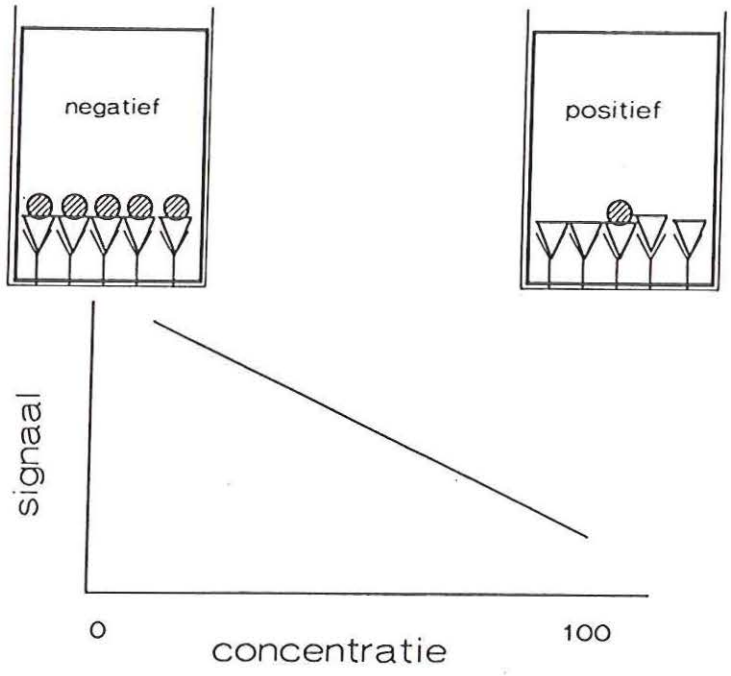


Fig. 1: Principe van een microtiterplaat EIA. (1) wand van de microtiterplaat of buis; (2) anti-konijnen IgG's opgewekt in een schaap; (3) specifieke IgG's (anti-clenbuterol en/of anti-salbutamol); (4) salbutamol gekoppeld aan HRP; (5) ß-agonist in standaard of monster.

Aan de wand van een microtiterplaat (1) worden anti-konijnen IgG's ((2) opgewekt in een schaap) geabsorbeerd. Na het inbrengen van de monsters (5) wordt een vaste hoeveelheid enzym gelabeld salbutamol ((4) salbutamol-HRP) aan de wells van de microtiterplaat toegevoegd. Als laatsten worden de antilichamen (3), opgewekt in een konijn tegen clenbuterol en/of salbutamol, toegevoegd. Het in een monster aanwezige ß-agonist gaat met het salbutamol-HRP een competitie aan (competitieve EIA) om het aantal bindingsplaatsen van de toegevoegde antilichamen ((3) anti-clenbuterol en/of anti-salbutamol). Deze antilichamen worden via de anti-konijnen IgG's (2) aan de wand van de microtiterplaat gebonden. De optimale competitieomstandigheden zijn >1 uur bij 4°C. De overmaat aan reagentia en restanten van het monster worden weggewassen. Vervolgens wordt de hoeveelheid gebonden salbutamol-HRP gemeten door toevoegen van een kleurreagens bestaande uit een substraat (peroxide) en een chromogeen (tetramethylbenzidine). Het gebonden salbutamol-HRP verandert het kleurloze chromogeen in een blauw gekleurd product. Door toevoegen van een stopreagens (0,1 M fosforzuur) verandert de kleur in geel. De mate van kleuring wordt fotometrisch bepaald bij 450 nm. De intensiteit van de kleur is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid ß-agonisten in het monster of de standaard (zie figuur 2).



Figuur 2. Principe van een competitieve EIA waarbij een negatief monster een hoog signaal en een positief monster een laag signaal geeft.

In de huidige controle van urinemonsters op de aanwezigheid van ß-agonisten worden twee EIA's gebruikt (Clenbuterol- en de Mix-EIA). In de clenbuterol-EIA (RSV A0688) wordt gebruik gemaakt van antilichamen opgewekt in een konijn tegen clenbuterol-BSA. In de Mix-EIA (RSV A0687) wordt

een mengsel gebruikt van antilichamen opgewekt tegen clenbuterol- en salbutamol-BSA. Beide EIA's maken gebruik van salbutamol-HRP als enzymlabel. Daarnaast is een specifieke EIA ontwikkeld voor de bepaling van fenoterol (Haasnoot e.a. 1994). In Tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de mate van kruisreactiviteit van de EIA's voor diverse ß-agonisten. Hieruit blijkt dat de Clenbuterol- en de Mix-EIA niet reageren met fenoterol en ractopamine. De fenoterol-EIA reageert alleen met fenoterol en ractopamine. Op dit moment zijn er geen aanwijzingen dat fenoterol en ractopamine in Europa worden toegepast. Verscheidene studies (Jones e.a., 1988; Adeola e.a., 1990 en 1992; He e.a., 1993) hebben echter aangetoond dat met name ractopamine een herverdelend effect (meer vlees en minder vet) heeft bij varkens.

Tabel 1: Kruisreactiviteiten van de door RIKILT-DLO ontwikkelde EIA's voor ß-agonisten.

ß-agonist	Percentage kruisreactiviteit		
	Clenbuterol-EIA	Mix-EIA	Fenoterol-EIA
Clenbuterol	100	170	<0,1
Cimbuterol	60	110	<0,1
Salbutamol	5	100	<0,1
Broombuterol	100	100	<0,1
Mapenterol	80	90	<0,1
Mabuterol	70	70	<0,1
Tulobuterol	2	50	<0,1
Carbuterol	5	40	<0,1
Terbutaline	4	40	<0,1
Pirbuterol	4	30	<0,1
Cimaterol	6	10	<0,1
Fenoterol	<0,1	<0,1	100
Ractopamine	<0,1	<0,1	20

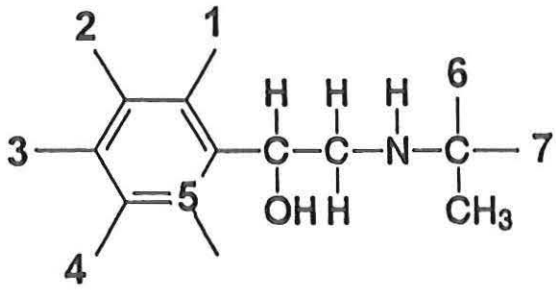
De Clenbuterol-EIA reageert goed met stoffen die sterk op clenbuterol lijken (zie Tabel 2). Deze EIA reageert met stoffen waarbij één van de chlooratomen wordt vervangen door een CF_3 groep (mabuterol) of beide chlooratomen worden vervangen door broom (broombuterol). Het vervangen van de butylgroep door een pentylgroep (mapenterol) en het introduceren van een nitrilgroep (CN) (cimbuterol) heeft ook geen groot negatief effect op de kruisreactiviteit.

Met de clenbuterol-EIA kunnen vijf ß-agonisten met een goede gevoeligheid worden bepaald. Deze EIA reageert minder met die ß-agonisten welke fenolgroepen bevatten (salbutamol, pirbuterol, carbuterol en terbutaline) of indien de tertiaire butylgroep is vervangen door een propylgroep (cimaterol) en indien de aminegroep en een chlooratoom zijn vervangen door waterstofatomen (tulobuterol).

Om voor fenolhoudende ß-agonisten een betere gevoeligheid te verkrijgen werden antilichamen opgewekt tegen salbutamol aan de test toegevoegd. Na enkele experimenten werd gekozen voor een mengverhouding van 15:1 (anti-salbutamol:anti-clenbuterol; v/v). Het gevolg hiervan was dat de gevoeligheid van salbutamol, pirbuterol, carbuterol en terbutaline maar ook van clenbuterol,

tulobuterol en cimbuterol toenam. Met deze Mix-EIA kunnen dus meer ß-agonisten met een grotere gevoeligheid dan met de Clenbuterol-EIA worden waargenomen.

Tabel 2: Structuren van de bekende ß-agonisten



ß-agonist	GROEP OP POSITIE 1	2	3	4	5	6	7
Clenbuterol	H	Cl	NH_2	Cl	C	CH_3	CH_3
Mabuterol	H	Cl	NH_2	CF_3	C	CH_3	CH_3
Broombuterol		H Br		NH_2	Br	C	CH_3 CH_3
Mapenterol	H	Cl	NH_2	CF_3	C	CH_3	CH_2-CH_3
Tulobuterol	Cl	H	H	H	C	CH_3	CH_3
Cimaterol	H	CN	NH_2	H	C	CH_3	H
Cimbuterol	H	CN	NH_2	H	C	CH_3	CH_3
Salbutamol	H	CH_2OH	OH	H	C	CH_3	CH_3
Pirbuterol	H	CH_2OH	OH	H	N	CH_3	CH_3
Carbuterol	H	NH-CO-NH_2	OH	H	C	CH_3	CH_3
Terbutaline	H	OH	H	OH	C	CH_3	CH_3
Fenoterol	H	OH	H	OH	C	H	CH_2-C_6H_6-OH
Ractopamine		H H		OH	H	C	H CH_2-CH_2-C_6H_6-OH

2.1.2 Bevestigingsmethode

De bij dit onderzoek gebruikte bevestigingsmethode (GC-MS) wordt uitvoerig beschreven in het RIKILT-DLO Rapport 94.29.

2.2 Veldtest

De in dit rapport beschreven veldtest gaat uit van hetzelfde principe als dat van de in het laboratorium gebruikte screeningsmethoden (EIA). Gekozen werd voor de Mix-EIA omdat met deze test de meeste ß-agonisten met de grootste gevoeligheid kunnen worden waargenomen. Om de test te vereenvoudigen werd de microtiterplaat vervangen door buisjes. Om de test goed te kunnen hanteren werd een passend buizenrekje gezocht. De in het laboratorium gebruikte pipetten werden vervangen door druppelflesjes. Daarnaast werd de gevoeligheid en de snelheid

van de test aangepast. Om een stabiele testkit te kunnen fabriceren werd bij het ontwikkelen van de veldtest nauw samengewerkt met de firma Euro-Diagnostica BV (Apeldoorn).

2.2.1 Samenstelling veldtest

De testkit (ß-Adrenergic-Agonist-EIA; TUBE TEST, Euro-Diagnostica BV, Apeldoorn) bevat de volgende ingrediënten: een buizenrekje (voor 6 buisjes), plastic wegwerppipetjes, 12 met antilichamen gecoate buisjes (vacuum verpakt) en 6 druppelflesjes met: gevriesdroogd salbutamol-HRP (flesje B), salbutamol standaardoplossing (3 ng/ml; controle standaard (flesje C)), een positieve controle standaard (50 ng clenbuterol/ml (flesje D)), ééncomponent substraat/chromogeenoplossing (TMB (flesje E)), verdunningsbuffer (flesje F) en stopoplossing (1 M fosforzuur (flesje G)).

2.2.2 Werkwijze veldtest

Als eerste wordt het gevriesdroogde salbutamol-HRP (flesje B) opgelost door het toevoegen van verdunningsbuffer (flesje F). Het benodigde aantal buisjes (aantal urinemonsters + controlestandaard) wordt in het rekje geplaatst. In het buisje op de eerste positie in het rekje (aangeduid met een "S") worden twee druppels van de controlestandaard (flesje C) toegevoegd. In de overige buisjes worden met behulp van de bijgeleverde wegwerppipetjes twee druppels van de urinemonsters gebracht. Van het in oplossing gebrachte salbutamol-HRP (flesje B) worden aan alle buisjes vier druppels toegevoegd en door ca. tien seconden zwenken van het rekje wordt de inhoud van de buisjes gemengd. Na tien minuten (eerste incubatie) worden de buisjes geleegd en vijf keer gewassen (tot de rand vullen en legen) met leidingwater. Na de laatste keer wassen worden de buisjes "drooggeslagen" (de buisjes in het rekje ondersteboven houden en een neerslaande beweging maken) en de open einden drooggemaakt met een tissue. Vervolgens worden zes druppels van de substraatoplossing (flesje E) aan ieder buisje toegevoegd. Na vijf tot tien minuten kan een blauw gekleurde oplossing worden waargenomen.

<u>Visuele interpretatie:</u>
De kleur van de buisjes met monsters wordt vergeleken met de kleur van het buisje met controlestandaard (eerste positie). Monsters met een kleur gelijk aan of donkerder dan de controlestandaard worden negatief beschouwd. Monsters met een lichtere blauwe kleur worden verdacht beschouwd.

<u>Instrumentele interpretatie:</u>
Aan alle buisjes worden vijf druppels van de stopoplossing (flesje G) toegevoegd en door zwenken

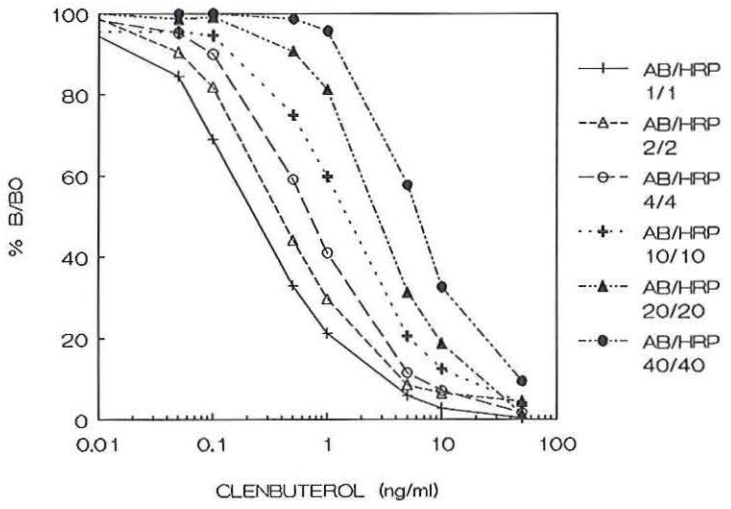
van het rekje wordt de inhoud van de buisjes gemengd. De blauwe kleur verandert in geel. De intensiteit van de gele kleur wordt gemeten met een differentiaal spectrofotometer (Artel, USA, 450 nm filter). Monsters met een gelijke of grotere extinctie dan die van de controlestandaard worden negatief beschouwd en monsters met een lagere extinctie worden verdacht beschouwd.

2.3 Monstermateriaal

Tijdens het in dit rapport beschreven onderzoek werden 249 urinemonsters onderzocht met de veldtest. Deze monsters werden door de AID genomen in de periode september tot december 1994 op verschillende bedrijven. In een aantal gevallen werd een deel van de monsters ter plekke of in de buurt van de plaats van monstername met de veldtest onderzocht. Alle monsters waren afkomstig van oudere runderen (afgemolken koeien en meststieren).

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

Vergeleken met de Clenbuterol-EIA heeft de Mix-EIA een grotere gevoeligheid voor meerdere ß-agonisten. Deze Mix-EIA werd dan ook gekozen om tot veldtest om te zetten. Voordat de screening in het laboratorium kan plaatsvinden worden de urinemonsters eerst gecentrifugeerd om vaste deeltjes te verwijderen, daarna op pH gebracht (7 ± 0,5) en vervolgens vijf keer verdund met een buffer. De doelstelling van een veldtest is om het aantal handelingen zo gering mogelijk te houden en gekozen werd voor een directe bepaling (zonder monstervoorbehandeling). Hiervoor diende de gevoeligheid van de EIA aangepast te worden. De in de test gebruikte hoeveelheden van de essentiële reagentia (mengsel van anti-clenbuterol en anti-salbutamol en salbutamol-HRP) bepalen de gevoeligheid van de test.

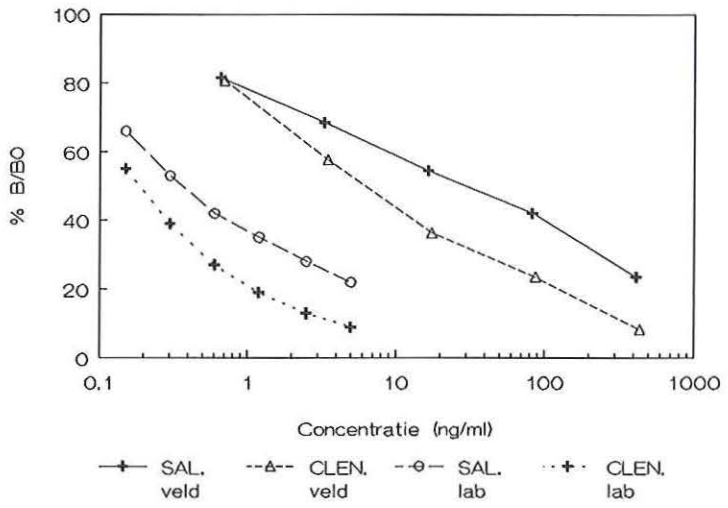


Figuur 3: Invloed van de hoeveelheid antiserum en enzym-conjugaat op de gevoeligheid van de clenbuterol-EIA. AB/HRP (1/1) zijn de normale hoeveelheden. AB/HRP (2/2) is een twee keer hogere concentratie, enz.

Bij een EIA wordt in het algemeen gestreefd naar een zo gevoelig mogelijke test. Met de Clenbuterol-EIA wordt een calibratiecurve tussen 0,1 en 5 ng clenbuterol/ml gebruikt (zie figuur 3; AB/HRP (1/1)). Bij de Mix-EIA wordt een vergelijkbare curve verkregen tussen 0,1 en 5 ng salbutamol/ml. Voor de veldtest en de introductie van niet voorbehandelde urinemonsters zijn dergelijke curven te gevoelig (grotere kans op fout positieve resultaten). Door meer van de essentiële reagentia in de test te brengen kan de gevoeligheid worden veranderd (zie figuur 3). Door bijvoorbeeld veertig keer meer reagentia (AB/HRP 40/40) aan de test toe te voegen wordt een curve verkregen die het meest gevoelig is in het gebied van 1 tot 50 ng/ml. Ten opzichte van de normaal toegepaste combinatie (AB/HRP 1/1) is de gevoeligheid van de curve een factor tien verschoven. Een vergelijkbare verschuiving werd waargenomen bij de Mix-EIA. Door het gebruiken van meer reagentia werd de gevoeligheid van de veldtest verschoven naar het gewenste concentratiegebied (zie figuur 4).

In de Clenbuterol- en de Mix-EIA worden actiegrenzen gehanteerd van respectievelijk 3,5 ng clenbuterol/ml en 7 ng salbutamol/ml.

Deze actiegrenzen komen overeen met ca. 1 ng clenbuterol/ml urine bepaalt met de GC-MS. Het verschil tussen de EIA en GC-MS resultaten wordt gedeeltelijk veroorzaakt door het meten van achtergrond maar ook door het meten van in urine voorkomende metabolieten van ß-agonisten. De actiegrens voor de veldtest zou vergelijkbaar aan de Mix-EIA moeten zijn.

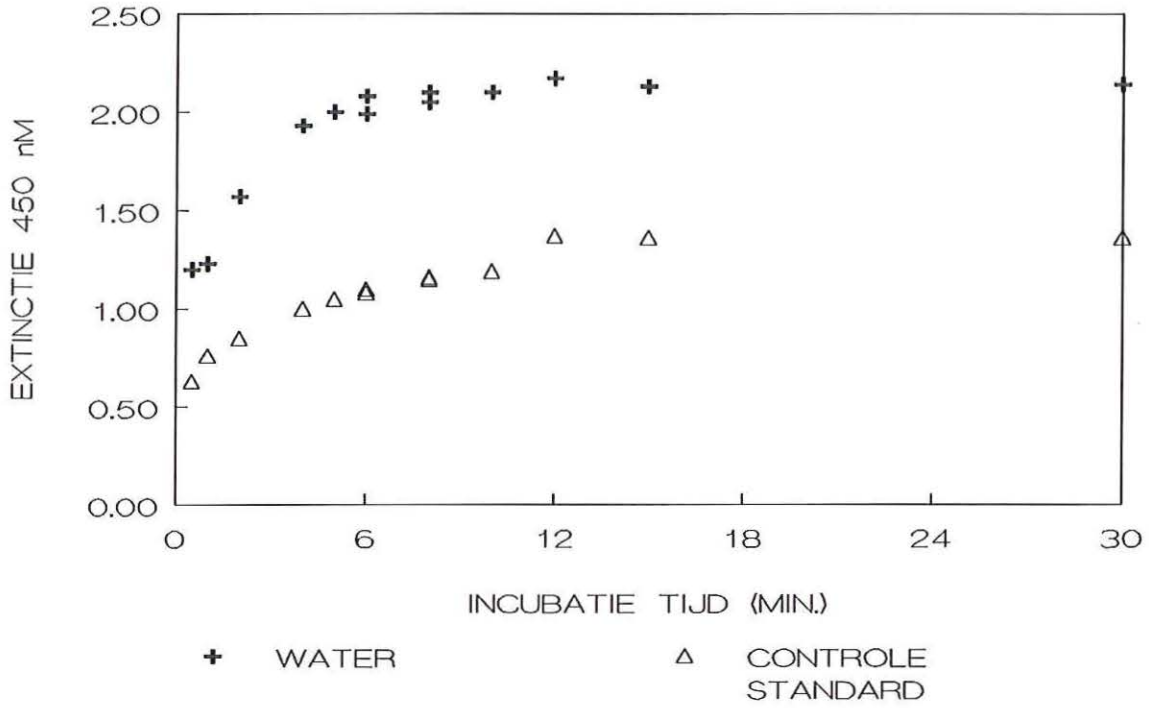


Figuur 4: Vergelijking van de gevoeligheid van de laboratorium- met de veldtest voor salbutamol en clenbuterol.

Bij de laboratoriumtesten worden de antilichamen als laatsten, na het inbrengen van monsters/standaarden en het salbutamol-HRP, aan de test toegevoegd om een eerlijke competitie tussen de in het monster/standaard aanwezige ß-agonist en het salbutamol-HRP om het aantal bindingsplaatsen aan de antilichamen te verkrijgen. In de veldtest zijn, om het aantal handelingen te beperken, de buisjes al gecoat met deze antilichamen. Door het eerst inbrengen van de monsters en vervolgens het salbutamol-HRP toe te voegen onstaat een "oneerlijke" competitie waarbij de ß-agonisten in het monster/standaard in het voordeel zijn ten opzichte van het salbutamol-HRP.

Een ander belangrijk verschil tussen de veld- en de laboratoriumtest is de tijdsduur. In het laboratorium wordt na het inbrengen van de monsters/standaarden en het salbutamol-HRP

minimaal één uur (bij 4°C) gewacht om de competitie te laten plaatsvinden. Het doel was dat de uitvoering van de veldtest veel sneller zou zijn. Doordat in de veldtest meer reagentia (overmaat) worden toegepast is een kortere incubatie mogelijk. In figuur 5 is te zien dat 0,5 minuut na het toedienen van het monster en het salbutamol-HRP al ongeveer de helft van de uiteindelijk maximale kleur wordt verkregen. Gekozen werd voor een eerste incubatietijd van tien minuten.



Figuur 5: Relatie tussen de eerste incubatietijd, na toedienen monster/standaard en salbutamol-HRP, en de uiteindelijk verkregen kleur (absorptie).

Na het wassen van de buisjes en het toedienen van het kleurreagens (flesje E) is na een paar minuten al een blauwe kleur van de controlestandaard (3 ng/ml) waarneembaar. Geadviseerd wordt om de visuele beoordeling binnen 5-10 minuten uit te voeren. Hierdoor komt de totale tijd nodig voor de uitvoering van de test op ca. 20 minuten.

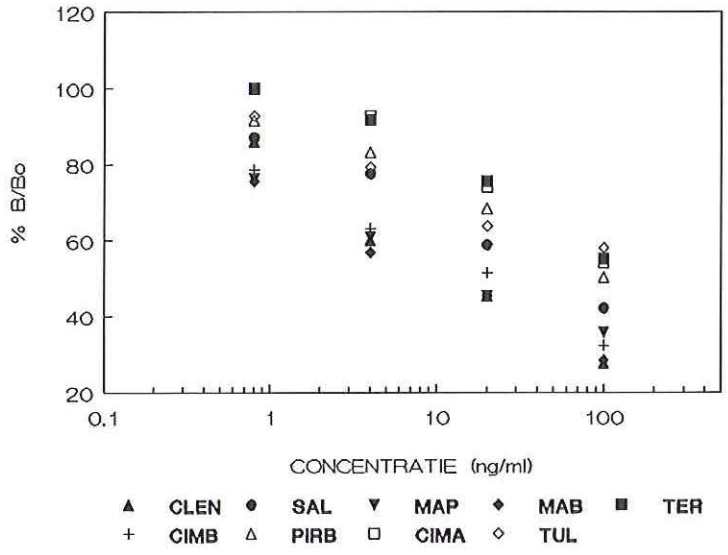
De stabiliteit van de veldtest wordt grotendeels bepaald door het instabiele salbutamol-HRP. Om die reden werd het salbutamol-HRP gevriesdroogd en dient deze voor het in gebruik nemen van de kit in oplossing gebracht te worden door het toevoegen van een bijgeleverde verdunningsbuffer. Het gevriesdroogde salbutamol-HRP is, mits bewaard bij 4-8°C, maanden houdbaar. Het in oplossing gebrachte salbutamol-HRP is, mits bewaard bij 4-8°C, ca. 5 dagen houdbaar en mede om die reden werd gekozen voor een kit met een beperkt aantal buisjes (12) met de bedoeling dat een kit na het oplossen van het salbutamol-HRP opgemaakt wordt.

Bij de veldtest is ten opzichte van de laboratoriumtest (Mix-EIA) een aantal veranderingen

aangebracht (meer reagentia, kortere incubatietijd en een "oneerlijke" competitie). Om te controleren of deze veranderingen enig effect heeft op de reactiviteit van de veldtest voor andere ß-agonisten heeft werd een aantal ß-agonisten getest (zie figuur 6). Vergeleken met salbutamol reageert de veldtest meer gevoelig voor een aantal ß-agonisten (clenbuterol, mapenterol, mabuterol en carbuterol). Berekend op het niveau van de controlestandaard (3 ng salbutamol/ml) reageert deze groep van ß-agonisten ca. vijf keer zo gevoelig (500%), tulobuterol ongeveer gelijk (100%), pirbuterol twee keer ongevoelig (50%) en terbutaline en cimaterol vijf keer zo ongevoelig (20%). De kruisreactiviteit is met de veldtest niet zo nauwkeurig vast te stellen, maar in grote lijnen komt deze overeen met die van de Mix-EIA.

In de laboratoriumtest wordt een reeks van standaarden gebruikt om een calibratiecurve te maken waarmee concentraties in monsters worden berekend. In de laboratoriumtest (96 plaatsen) is daar ruimte genoeg voor. Vanwege het beperkt aantal handelingen en buisjes werd in de veldtest gekozen voor één standaard (3 ng salbutamol/ml; controlestandaard) waarmee de monsters worden vergeleken.

Bij een visuele beoordeling van de blauwe kleur worden monsters met een gelijke of meer intense blauwe kleur negatief beschouwd. Monsters met minder kleur worden verdacht beschouwd.



Figuur 6: Kruisreactiviteit bepaalt met de veldtest.
CLEN=clenbuterol; SAL=salbutamol; MAP=mapenterol; MAB=mabuterol; TER= terbutaline; CIMB=cimbuterol; PIRB=pirbuterol; CIMA=cimaterol; TUL=tulobuterol

Na de visuele beoordeling is het mogelijk om de intensiteit van de kleur te meten. Hiervoor worden vijf druppels stopoplossing (1 M fosforzuur) aan de buisjes toegevoegd. De kleur verandert hierdoor van blauw naar geel. De intensiteit van de gele kleur wordt gemeten met een draagbare Differential Spectrophotometer (Artel, USA; 450 nM). Het bereik van deze meter ligt tussen 0 en 2,59. Afhankelijk van verschillende omstandigheden (incubatietijd en -temperatuur) zal het controlemonster een uitslag geven tussen 0,8 en 1,3 eenheden. Als in plaats van de controlestandaard 2 druppels water aan de test worden toegevoegd wordt een maximaal signaal (B0) verkregen tussen 1,7 en 2,2 eenheden. Vergeleken met dit maximale signaal geeft de controlestandaard een relatieve intensiteit van 57 ± 7% (n=18).

Hierbij wordt de volgende formule gebruikt:

$$\text{formule 1:} \quad \frac{\text{signaal controlestandaard}}{\text{signaal blanco (water)}} \times 100\% = \text{relatieve intensiteit t.o.v. blanco}$$

De controlestandaard geeft dus een signaal midden in de curve.
Naast de controlestandaard wordt een positieve controle (50 ng/ml) bijgeleverd (flesje D). Deze standaard is alleen bedoeld om aan te tonen dat de test werkt in aanwezigheid van een ß-agonist. Deze positieve controle geeft een signaal van 0,5-0,7 eenheden en volgens formule 1 een relatieve intensiteit van ca. 33 %.

Urinemonsters De controlestandaard (3 ng salbutamol/ml) wordt gebruikt om monsters te beoordelen. De resultaten van de veldtest worden uitgedrukt in een aan deze controlestandaard gerelateerde intensiteit volgens formule 2.

$$\text{formule 2:} \quad \frac{\text{signaal monster}}{\text{signaal controlestandaard}} \times 100\% = \text{relatieve intensiteit t.o.v. controlestandaard}$$

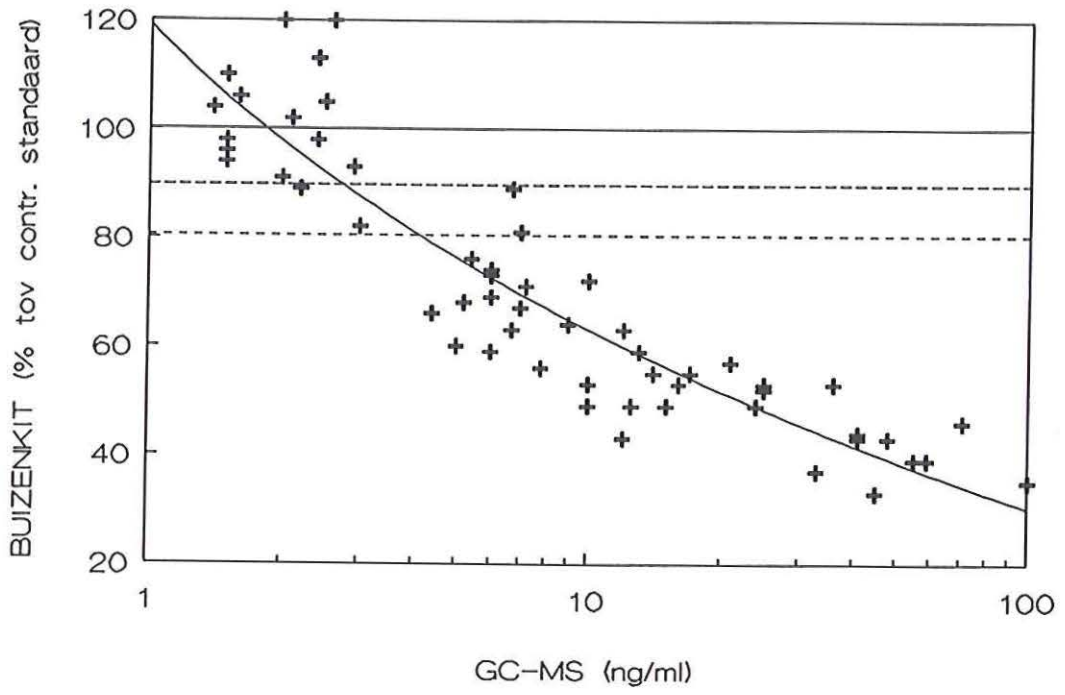
Negatieve monsters zouden een uitslag moeten geven van groter dan of gelijk aan 100% en positieve monsters een uitslag kleiner dan 100%. De controlestandaard ligt ongeveer in het midden van het bereik van de veldtest. Negatieve monsters kunnen een maximale relatieve intensiteit geven tot ca. 200% en positieve monsters kunnen een minimale relatieve intensiteit geven tot ca. 30%.

Tabel 3: Urinemonsters met mabuterol

Monster	Gehalte gevonden met GC-MS (ng/ml)	Relatieve intensiteit veldtest
1	20 mabuterol	67 %
2	2,5 mabuterol	102 %
3	2,1 mabuterol	111 %
4	2,2 mabuterol	108 %
5	2,0 mabuterol	108 %
6	2,5 mabuterol	106 %
7	4,5 mabuterol	80 %
8	2,5 mabuterol + 4,0 clenbuterol	79 %

In de periode van september tot december 1994 zijn met de veldtest 249 urinemonsters onderzocht. Alle monsters werden tevens onderzocht met de twee laboratorium screeningsmetho-

den (Clenbuterol- en Mix-EIA) en verdacht bevonden monsters (>3,5 ng/ml in de Clenbuterol-EIA en/of > 7 ng/ml in de Mix-EIA) werden onderzocht met de bevestigingsmethode (GC-MS).
Van de 249 monsters werden er uiteindelijk 185 als negatief beschouwd. In 56 monsters werd clenbuterol gevonden en in 8 monsters mabuterol. Van de 56 monsters waarin clenbuterol werd gevonden gaven 8 monsters in de veldtest een uitslag van >100% (fout negatief; zie figuur 7). De gehalten aan clenbuterol in deze 8 monsters varieerden van 1,3 tot 2,4 ng/ml. In de overige 48 monsters varieerden de gehalten aan clenbuterol van 1,5 tot 100 ng/ml. De correlatie tussen de uitslag van de veldtest en de GC-MS is goed (r= 0,916; zie figuur 7).



Figuur 7: Vergelijking van de resultaten verkregen met de veldtest en de bevestigingsmethode voor positieve urinemonsters (clenbuterol).

Urinemonsters met gehalten tussen 2,0 - 2,5 ng mabuterol/ml geven een uitslag van >100% (fout negatief; zie tabel 3). Hogere gehalten aan mabuterol (>4,5 ng/ml) geven een uitslag ruim onder de 100%.
In de negatieve urinemonsters werden met de Clen-EIA waarden gevonden tussen <0,5 en 4,2 ng/ml (clenbuterol-equivalenten; zie figuur 8a). Eén van deze monsters gaf een uitslag hoger dan de actiegrens van 3,5 ng/ml (fout positief).
In dezelfde urinemonsters werden met de Mix-EIA waarden gevonden tussen <0,5 en 20 ng/ml (salbutamol-equivalenten; zie figuur 8b). Met de Mix-EIA gaven 19 monsters een uitslag groter dan de actiegrens van 7 ng/ml terwijl hier met de GC-MS geen ß-agonisten in werden gevonden (fout positief).

De veldtest gaf met deze negatieve monsters waarden tussen 200 en 83% relatieve intensiteit. Bij deze test gaven 18 monsters een uitslag kleiner dan 100% (fout positief; zie figuur 8a en 8b).
Bij het gebruik van de veldtest in de stal zijn, afhankelijk van het vervolg, fout positieve resultaten ongewenst. Door het aanpassen van de actiegrens van 100 naar bijvoorbeeld 90 of 80% relatieve intensiteit wordt het aantal fout positieve resultaten sterk verminderd maar neemt het aantal fout negatieve uitslagen toe (zie Tabel 4).

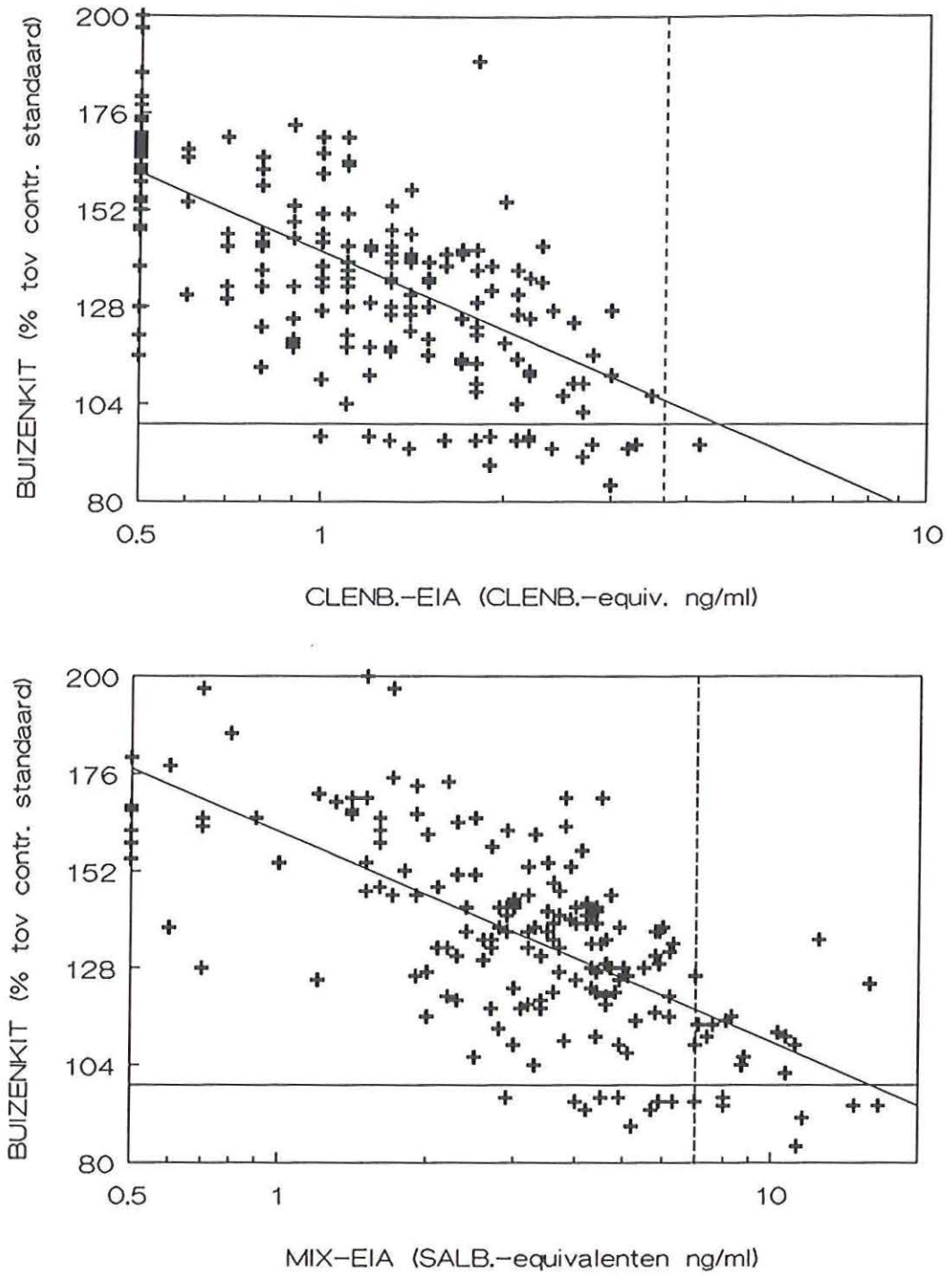
Tabel 4: Aantal fout positieve en fout negatieve uitslagen verkregen met de veldtest bij verschillende actieniveaus.

Actieniveau veldtest	Aantal fout positieven (% van totaal)	Fout negatieven aantal (% van totaal)	niveau (ng/ml)
100 %	18 (9,7%)	8 (4,3%)	1,4 - 2,3
90 %	3 (1,6%)	14 (7,6%)	1,4 - 2,8
80 %	0 (0 %)	18 (9,7%)	1,4 - 6,5

Bij een actiegrens van 80% relatieve intensiteit worden geen fout positieve uitslagen gevonden. Bij deze actiegrens worden, op twee uitzonderingen na, de monsters met een clenbuterolgehalte groter dan 3 ng/ml (n=40) positief bevonden.
Een actiegrens van 80% lijkt gewenst indien de kans op fout positieve uitslagen zo laag mogelijk gehouden moet worden.

In 1994 werden door de AID bij 27 bedrijven urinemonsters genomen waarin ß-agonisten aangetoond zijn. In Tabel 5 wordt een overzicht gegeven van de verdeling van de met GC-MS gevonden gehalten in die monsters per bedrijf. Gemiddeld werd van alle genomen monsters 63% positief gevonden met de bevestigingsmethode. Van de positieve monsters heeft 77% een gehalte groter dan 3 ng/ml. Bij een actiegrens van 80% relatieve intensiteit zullen met de veldtest deze monsters als verdacht worden beoordeeld. De monsters met gehalten <3 ng/ml (23%) zullen bij deze actiegrens van de veldtest als negatief worden beoordeeld. Van de 27 bedrijven zijn er 4 waarbij alle positieve monsters een gehalte hadden van <3 ng/ml. Deze bedrijven zouden dus met de veldtest als negatief worden beschouwd. Bij 3 van deze bedrijven werd maar in 1 monster (van een totaal aantal van respectievelijk 17, 18 en 24) clenbuterol aangetoond.
Bij onderzoek van urine van de overige 23 bedrijven zal de veldtest bij een onderzoek op locatie verdachte monsters kunnen lokaliseren. Het vinden van verdachte urinemonsters op lokatie is wel afhankelijk van het aantal ter plekke onderzochte monsters.
Bij zeven bedrijven werden in alle positief bevonden monsters een gehalte >3 ng/ml gevonden. Deze bedrijven zouden ongeacht het aantal op lokatie onderzochte monsters als verdacht

aangemerkt worden. Bij de overige 16 bedrijven varieert de kans op het vinden van verdachte monsters (>3 ng/ml) van 4 op de 17 monsters (24%) tot 39 op de 40 monsters (98%).
Daarom wordt aanbevolen om minimaal de helft van alle genomen monsters ter plekke te onderzoeken.



Figuur 8: Vergelijking van de resultaten verkregen met de veldtest en de laboratorium screeningsmethoden met negatieve urinemonsters. A. Clenbuterol-EIA. B. Mix-EIA.

Tabel 5: Verdeling van de met GC-MS gevonden gehalten aan clenbuterol en mabuterol in urinemonsters van 27 bedrijven.

BEDRIJF NR.	AANTAL URINE MONSTERS	AANTAL POSITIEVE MONSTERS	AANTAL MONSTERS MET EEN GEHALTE (ng/ml) <3	3-5	>5
1	30	29	6	5	18
2	12	5	0	3	2
3	11	5	2	3	0
4	13	8	1	2	5
5	10	10	0	0	10
6	13	13	0	0	13
7	19	16	6	5	5
8	31	30	6	6	18*
9	22	14	2	0	12**
10	14	14	0	0	14
11	20	12	6	3	3
12	18	1	1	0	0*
13	6	2	1	0	1
14	11	8	3	2	3
15	10	6	0	0	6
16	63	46	13	9	24
17	50	40	1	5	34
18	10	6	2	1	3
19	55	23	3	10	10
20	5	5	5	0	0
21	38	30	11	8	11
22	45	14	1	3	10
23	24	1	1	0	0
24	13	13	0	0	13
25	17	1	1	0	0
26	34	17	13	2	2
27	9	8	0	1	7
Totaal aantal monsters	603	377	85	68	224
Gemiddeld % van positieve monsters:			23	18	59

* mabuterol
** mabuterol+ clenbuterol

4 CONCLUSIES

De in het laboratorium gebruikte screeningsmethode (Mix-EIA) voor het aantonen van meerdere ß-agonisten (clenbuterol, mabuterol, cimbuterol, salbutamol, broombuterol, mapenterol, tulobuterol, carbuterol, terbutaline, pirbuterol en cimaterol) in urine is omgezet tot een in het veld (slachthuis of stal) toepasbare test (veldtest). Door de samenwerking tussen RIKILT-DLO en Euro-Diagnostica BV is een commercieel verkrijgbare testkit ontwikkeld die voldoet aan de vooraf gestelde eisen (stabiliteit, eenvoud van uitvoering en gevoeligheid). De test herkent urinemonsters met gehalten groter dan 3 ng clenbuterol/ml en is daarmee minder gevoelig dan de in het laboratorium toegepaste methoden waarbij een actiegrens van 1-2 ng/ml wordt gehanteerd. Het gebruik van de veldtest is zinvol omdat in 77% van de in 1994 positief bevonden urinemonsters een gehalte groter dan 3 ng/ml werd gevonden.

Om een reëele kans te houden op het vinden van verdachte monsters in een verdachte situatie (ook bij bedrijven waar monsters met lage gehalten worden gevonden) wordt aanbevolen om minimaal de helft van het aantal genomen monsters ter plekke te onderzoeken.

Door het verschil in detectiegrenzen tussen de veldtest en de laboratoriummethoden kan de veldtest alleen gebruikt worden als aanvulling op de huidige controle. De toepassing van de veldtest kan resulteren in een meer effectieve controle.

De veldtest is tot nu toe altijd uitgevoerd door of in het bijzijn van RIKILT-DLO medewerkers. Het lijkt zinvol om voor de toekomstige gebruikers (controleurs) trainingsdagen te organiseren om meer ervaring op te doen en mogelijke foutenbronnen te kunnen herkennen en het interpreteren van resultaten onder de knie te krijgen.

Testen voor het aantonen van ß-agonisten zijn door veranderende eisen en nieuw gevonden stoffen nooit afgerond. Het RIKILT-DLO zal onderzoek blijven uitvoeren naar verbeteringen/aanvullingen met betrekking tot deze test en nieuwe testvormen (b.v. striptesten).

LITERATUUR

Haasnoot, W., Bruchem van, G.D., Hamers, A.R.M, & Schilt, R. (1990).
De ontwikkeling van een multiscreeningsmethode voor ß-agonisten in urine.
RIKILT-DLO rapport 90.51.

Haasnoot, W., Schilt, R, & Frijns, L.M.H. (1991).
Vergelijking van een screenings- en een bevestigingsmethode voor de bepaling van ß-agonisten in urine.
RIKILT-DLO rapport 91.18.

Haasnoot, W., Stouten, P., Lommen, A., Cazemier, G., Hooijerink, H. & Schilt, R. (1994).
Determination of fenoterol and ractopamine in urine by enzyme immunoassay.
Analyst, December 1994, vol. 119, 2675-2680.

Schilt, R., Haasnoot, W., Jonker, M.A., Hooijerink, H. & Paulussen, R.J.A. (1990).
Determination of beta-agonistic drugs in feed, urine and tissue samples of cattle with immuno-affinitychromatography and GC-MS.
Proceedings of the Euro-Residue conference, Noordwijkerhout, 1990, 320-325.

Rhijn van, J.A. & Heskamp, H.H. (1994).
GC-MS bepaling van ß-agonisten met behulp van gelijktijdige bepaling van twee verschillende derivaten.
RIKILT-DLO rapport 94.29.

Jones, D.J., Waitt, W.P., Mowrey, D.H. & Anderson, D.B. (1988).
Effect of ractopamine hydrochloride on the growth performance and carcass compositon of finishing pigs fed cornsoy diets with 5% added fat.
J. Anim. Sci., 1988, 66 (suppl. 1): 324.

Adeola, O., Darko, E.A., He, P. & Young, L.G. (1990).
Manipulation of porcine carcass composition by ractopamine.
J. Anim. Sci., 1990, 68, 3633.

Adeola, O., Ball, R.O. & Young, L.G. (1992).
Porcine skeletal muscle myofibrillar protein synthesis is stimulated by ractopamine.
J. Nutr., 1992, 122, 488.

He, P., Aherne, .X., Thompson, J.R., Schaefer, A.L. & Merrill, J.K. (1993).
Effect of ractopamine on carcass characteristics and joint-cartilage soundness in finishing pigs.
Can. J. Anim. Sci., 1993, 73, 169.