

Projekt H0550123:

En automatiserad immunkemisk metod för analys av jonoforantibiotika i foder och animalieprodukter

Bakgrund

Inom slaktkycklingproduktion används rutinmässigt tillsatser till foder för att förebygga i första hand coccidios. Dessa tillsatser är ofta av gruppen jonoforantibiotika, t ex narasin, monensin och lasalocid. Användning av dessa substanser är inte tillåten till andra djurslag som exempelvis värphöns. Livsmedelsverket har vid sin rutinkontroll påvisat spårämängder av narasin i ägg. Detta tyder på korskontamination mellan olika foderslag. En annan egenskap hos jonoforantibiotika är att substanserna tolereras i mycket olika grad av olika djur. Häst och svin kan nämnas som särskilt känsliga. Av bland annat dessa skäl är det viktigt att snabba, säkra och ekonomiska analysmetoder finns tillgängliga. Det aktuella projektet syftade till att utveckla en sådan analysmetod baserad på immunkemi tillämpad genom en ny miniaturiserad och automatiserad instrumentering (Gyrolab Bioaffy®).

Immunkemiska metoder kräver tillgång till antikroppar specifika mot analyten i fråga. Eftersom inga antikroppar mot narasin finns på marknaden var en av huvuduppgifterna med projektet att ta fram sådana. Polyklonala antikroppar mot narasin från kanin har tagits fram och testats preliminärt med ELISA. Lovande resultat erhöles. Även försök med att framställa mus-monoklonala antikroppar mot narasin har gjorts. Antikroppar kunde i detta fall inte tas fram. Ytterligare forskning krävs för att utreda orsaken till detta och modifiera processen så att monoklonala antikroppar kan framställas. Ett experiment med att miniaturisera och automatisera en immunkemisk analysmetod med redan tillgängliga antikroppar gjordes också. I detta fall valdes tylosin, som är ett vanligt förekommande antibiotikum in djuruppfödningen. Tylosin är en substans i samma storleksordning (mw:<1000) och den administreras ofta via foder.

Material och metoder

Immunkemiska metoder bygger på att effektiva antikroppar mot analyten finns tillgängliga. Inom projektets ram har försök att ta fram såväl monoklonala antikroppar från mus som polyklonala från kanin gjorts.

Framställning av antigen

Eftersom narasin är en liten molekyl, 765D, är det svårt att genom immunisering med enbart narasin få detekterbara antikroppstitrar, därför kopplades den kemiskt till ett större bärar-protein. Narasin konjugerades med KLH, Keyhole limpet hemocyanine (Sigma-Aldrich) ~~and~~ och BSA, bovint serumalbumin (Sigma-Aldrich) med en modifierad ester-metod enligt Peippo m fl (2004).

Framställning av monoklonala antikroppar

Möss, C57BL/6, Balb/C and CB17 immuniserades med 50 mikrogram Narasin-KLH-konjugat in 100 mikroliter PBS (fosfatbuffrad fysiologisk koksaltlösning) med lika volym "Freund's complete adjuvance", (Sigma-Aldrich) och boosterades med samma mängd antigen och "Freund's incomplete adjuvant" (Sigma-Aldrich) var fjärde vecka. När antikroppssvar mot narasin kan detekteras i serum från immuniserade möss (i ELISA) boosterades de en sista gång och avlivas 3-4 dagar senare. Cellsuspension från mjälten fuseras med SP2/0 celler med hjälp av PEG, polyethylene glycol. Hybridomen får växa till i selektionsmedium och testas för specificitet för narasin efter 2 - 4 veckor. Positiva kloner väljs ut, expanderas och klonas med "limiting dilution". Cellerna späds då så att de teoretiskt sås ut på 96-håls plattor med enbart en cell per brunn.

Serumprover och hybridom-supernatanter testades med ELISA för reaktivitet mot Narasin-BSA, BSA, Narasin-KLH och KLH. ELISA gjordes genom att "coata" 96-brunns mikrotiterplattor med 100 µl/brunn (10 µg/µl) av varje antigen, blockera med PBS-Tween och inkubera med spädningar av kaninserumet. Bundna mus-antikroppar detekterades med "Goat-anti-mouseIg-G-HRP" (BD Biosciences) och 1m mol/l

tetrametylbenzidine 0,1 mol/l kaliumcitrat . Reaktionen stoppades med 1mol/l svalvelsyra och absorbansen avlästes vid 405 nm i en Emax precision microplate reader (Molecular devices).

Framställning av polyklonala antikroppar

En kanin (New Zealand white/SVA) immuniserades med lika delar Narasin-KLH-konjugat (50 µg/250µl PBS, och "Freund's complete adjuvant" (Sigma-Aldrich). Kaninen gavs boosterdos var fjärde vecka med samma mängd antigen men med tillsats av "Freund's incomplete adjuvant" (Sigma-Aldrich).

Serumprover analyserades med ELISA för reaktivitet mot Narasin-BSA, BSA, Narasin-KLH och KLH för att detektera narasinspecifika antikroppar. ELISA gjordes genom att "coata" 96-brunns mikrotiterplattor med 100 µl/brunn (10 µg/µl) av varje antigen, blockera med PBS-Tween och inkubera med spädningar av kaninserumet. Bundna kanin-antikroppar detekterades med "Goat-anti-rabbitIG-G-HRP" (BIORAD) och 1m mol/ l tetrametylbenzidine i 0,1 mol/l kaliumcitrat . Reaktionen stoppades med 1mol/l svalvelsyra och absorbansen avlästes vid 405 nm i en Emax precision microplate reader (Molecular devices).

Försök med kommersiella antikroppar mot tylosin

Instrumentet Gyrolab Bioaffy® kan användas för att miniaturisera tester som normalt görs med ELISA. Genom att använda instrumentets "CD-laboratorium" där en skiva av CD-format präglats med mikrostrukturer för att precisionhantera flöden i nanoliterskala kan normala ELISA-reaktioner automatiseras och göras i en skala där förbrukning av reagens, prov och lösningsmedel kan reduceras i storleksordningen 100 gånger. För att testa instrumentets tillämpbarhet gjordes en "inhibition assay" för att detektera tylosin, ett annat antibiotikum som är vanligt inom uppfödning av livsmedelproducerande djur och som är vanligt att administrera via foder. Tylosin valdes också för att det finns kommersiella antikroppar att tillgå på marknaden.

100 µl Mus-anti-tylosin monoklonal antikropp, "Clone CH-2023, IgG" (Biodesign International) biotinylerades med "EZ-Link Sulfo-NHS.LC-Biotin (Pierce) efter avlägsnandet av natriumazid och immobiliserades till en mikro-kolonn på "CDn". 100 µl Får anti-Tylosin polyklonala antikroppar (Abcam) märktes med "Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit" (Molecular probes), efter avlägsnandet av natriumazid. Standardlösningar bereddes genom att späda Tylosin (Vetranal®, Sigma-Aldrich) med "Standard diluent (Gyros AB).

Biotinylerad mus anti-Tylosin monoclonal antikropp användes som fångande reagens (0,05 mg/ml) i Gyrolab Bioaffy® (Gyros AB). BSA-Tylosin-konjugat, 1:1000 (Biodesign International) sattes till standardlösningarna. Bundet konjugat detekterades med Alexa-inmärkta får anti-Tylosin polyklonala antikroppar (50 nmol/l) i Gyrolab Bioaffy® (Gyros AB).

Resultat

Monoklonala antikroppar

Lovande antikroppssvar i ELISA från de inledande immuniseringarna erhöles. Efter expansionen med "limiting dilution", i princip en monoklonal antikropp per brunn kunde inga positiva kloner återfinnas.

Polyklonala antikroppar

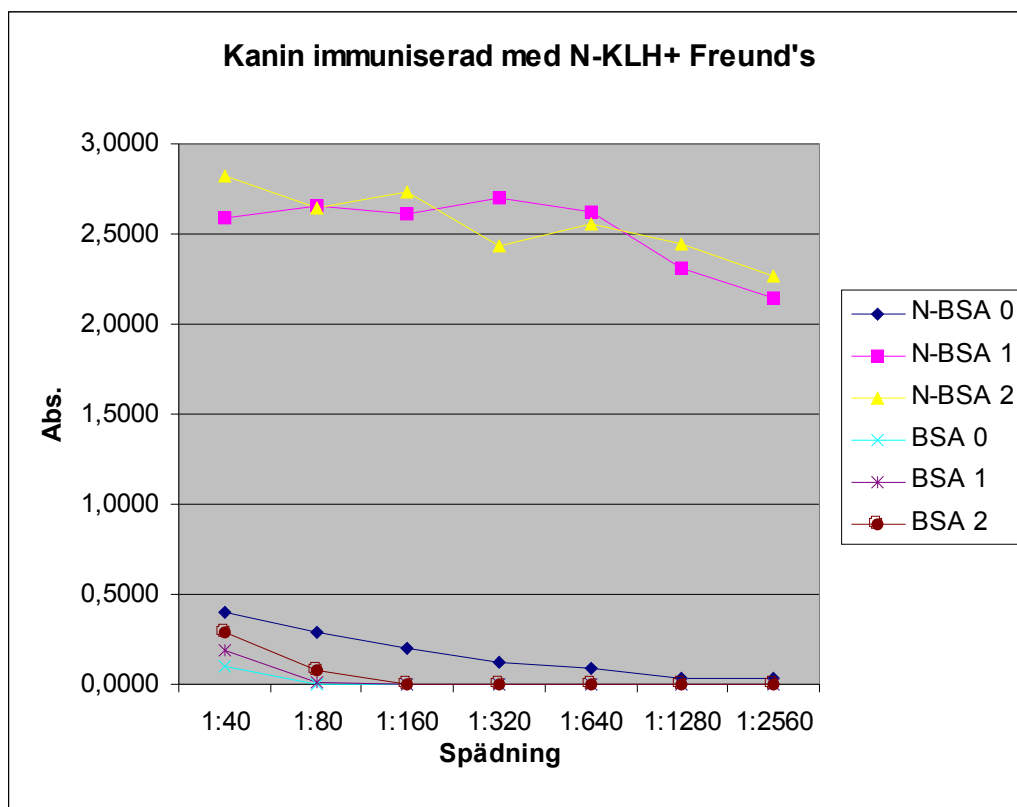
Resultaten från ELISA-försök med polyklonala antikroppar från kanin mot narasin presenteras i *figur 1a och b*. Narasin konjugerat till BSA gav starkt positiva svar både i serum från 2 och 4 veckor efter immunisering. Enbart BSA gav i stort sett ingen reaktion vilket tyder på specificitet mot narasin. Inte heller fanns något immunsvaret på "0-serumet", dvs ingen reaktion fanns innan immuniseringen av kaninen.

Figur 2 visar resultaten för ELISA-test med KLH och KLH-konjugerat narasin. I detta fall visades immunsvaret mot rent KLH efter både 2 och 4 veckor, medan såväl rent KLH som KLH konjugerat med

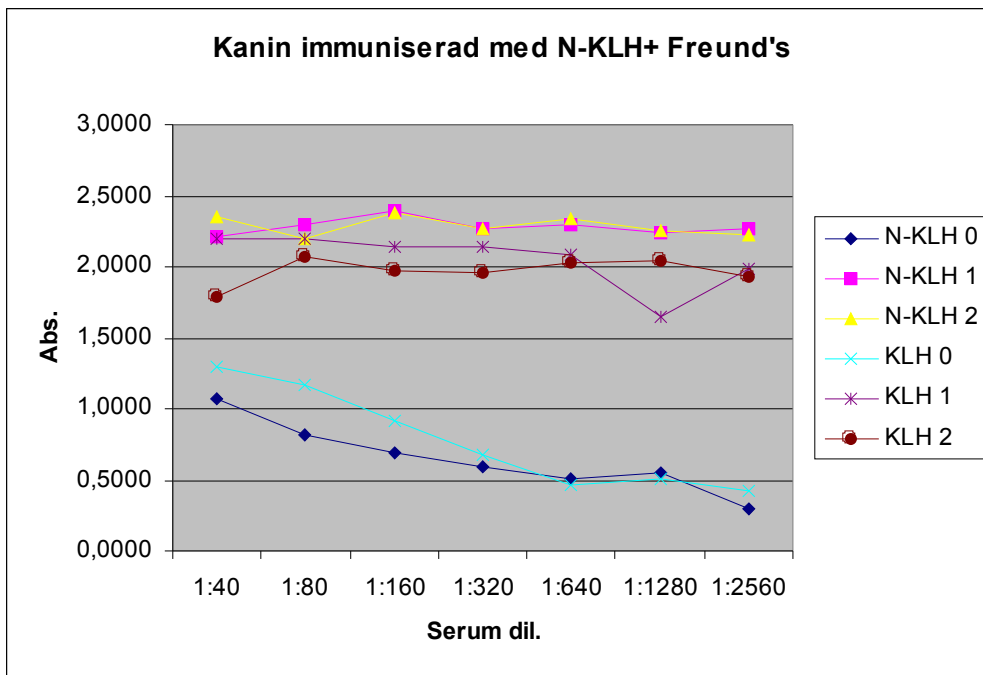
narasin svarade mycket måttligt på pre-immuniseringsserum "0". Även om signal fanns för rent KLH var immunsvaret starkare för narasin-KLH vid alla mätningar.

Försök med kommersiella antikroppar

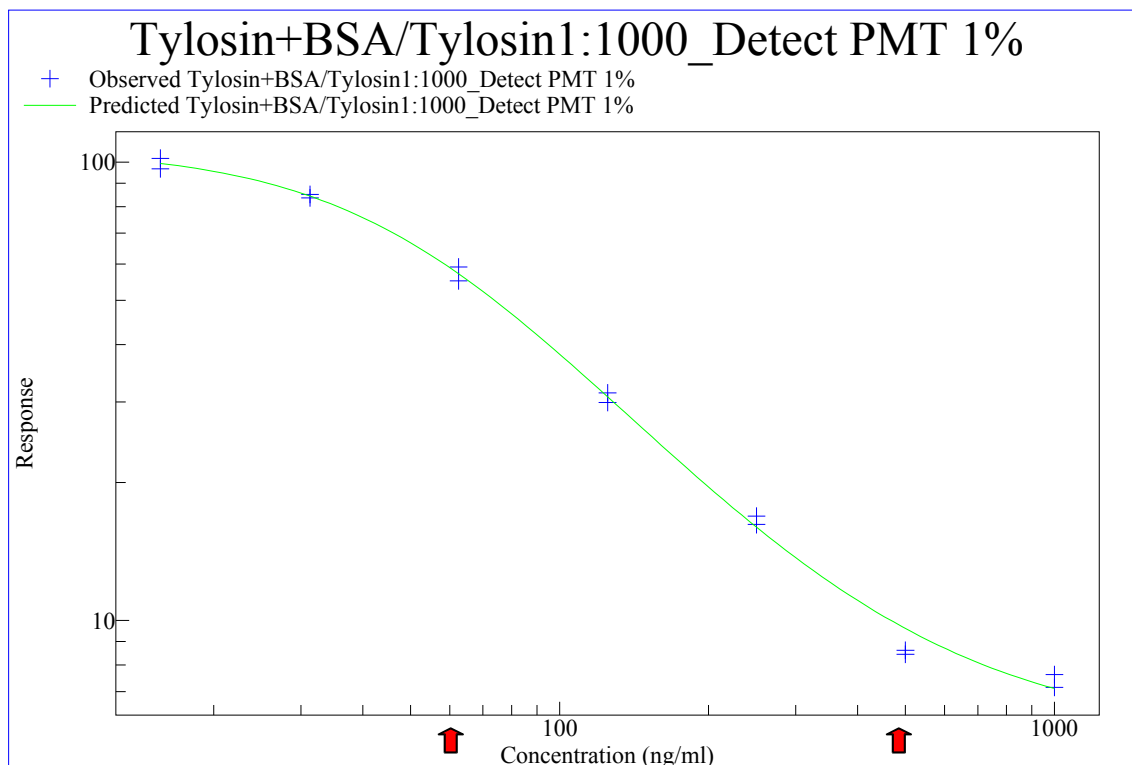
Resultaten från försöket att detektera tylosin i en nedskalad "inhibition assay" i Gyrolab Bioaffy® (Gyros AB) med kommersiellt tillgängliga antikroppar visas i *figur 2*. Med detta system kunde tylosin kvantifieras i området 60-500 µg/l.



Figur 1a. Resultat av ELISA-test av kanin anti-narasin-antikroppar. N-BSA är narasin konjugerat till BSA, BSA är endast okonjugerat BSA. Siffran 0, 1, 2 anger tiden efter immunisering där 0 före, 1 är efter 2 veckor och 2 är efter fyra veckor.



Figur 1b. Resultat av ELISA-test av kanin anti-narasin-antikroppar. N-KLH är narasin konjugerat till KLH, KLH är endast okonjugerat KLH. Siffran 0, 1, 2 anger tiden efter immunisering där 0 före, 1 är efter 2 veckor och 2 är efter fyra veckor.



Figur 2. Detektion av tylosin med en "inhibition assay" i en Gyrolab Bioaffy®. Det linjära koncentrationsområdet är indikerat med pilar.

Diskussion

Immunkemiska metoder bygger på att selektiva antikroppar finns att tillgå. Sådana antikroppar finns kommersiellt för många substanser. Tyvärr finns inte antikroppar mot narasin på marknaden utan

antikroppar har producerats i liten skala i forskningsprojekt. Tidigare har immunkemiska metoder för analys av narasin publicerats av bl a Peippo m fl (2004,2005). Ett mål med det aktuella projektet var att ta fram narasinspecifika antikroppar. Polyklonala antikroppar med specificitet för narasin konjugerat med BSA producerades och testades med ELISA. Narasin är en relativt liten moleky (mw: 765), för att få bra immunsvar konjugeras ofta substanser med stora proteiner som BSA. Resultaten visar att antikropparna som genererats via immunisering av kanin inte reagerar på enbart BSA. Detta är lovande. Ännu finns däremot inga resultat som visar att antikropparna är selektiva för fritt (okonjugerat) narasin, mer forskning krävs för att visa detta.

Försöken med att ta fram monoklonala antikroppar genom hybridom misslyckades trots att preliminära positiva resultat förelåg. Aktiviteten hos de monoklonala antikropparna gick dock av okänd anledning förlorad under expansionsfasen. Nya försök kommer att göras men utom ramen för det här rapporterade projektet.

Ett annat av projektets mål vara att utnyttja ett nytt instrument, Gyrolab Bioaffy® för immunkemiska analyser. Eftersom försöken med egenproducerade antikroppar inte hann slutföras på ett lyckosamt sätt inom projektet gjordes ett annat experiment ör att testa möjligheten att göra en automatiserad och miniaturiserad immunkemisk analysmetod. Kommersiellt tillgängliga antikroppar mot ett annat antibiotikum, tylosin testades genom att göra en konventionell ”sandwich”-typ assay i Gyrolab Bioaffy®. Tylosin kunde i detta första försök inte detekteras (data ej visade). Genom personlig kontakt med specialister från instrumenttillverkaren, Gyros AB, ändrades strategin till att producera ett ”inhibition”-typ test. Anledningen till detta var att erfarenhet visat att denna princip passar bättre än ”sandwich” för små molekyler (tylosin mw <1000). Resultaten från detta test var positiva och visade att instrumentet passar bra för denna typ av analyser.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen.

Ytterligare experiment och utredning krävs för att undersöka möjligheten att producera monoklonala antikroppar mot narasin varför publicering av resultat från detta projekt inte kan ske omedelbart. De preliminära resultaten är dock så intressanta att denna forskning kommer att utföras snarast så att publicering internationellt kan ske som förutskickats i projektplanen. Rapportering av uppnådda resultat kommer att ske via SJVs foderråd och populariserat via SLF som angivits i planen.

Referenser:

Peippo, P.Hagren, V., Lövgren, T. & Tuomola, M. 2004. Rapid Time-Resolved Fluoroimmunoassay for the Screening of Narasin and Salinomycin Residues in Poultry and Eggs. J.Agric. Food. Chem. 52:1824-1828.

Peippo, P. Lövgren, T., & Tuomola, M. 2005. Rapid screening of narasin residues in poultry plasma by time-resolved fluoroimmunoassay. Analytica Chimica Acta, 529:27-31.