

Project 505.0420

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van microbiële
toxinen

Projectleider: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rapport 88.83

November 1988

Beperkte evaluatie van een ELISA
kit voor het bepalen van Diarrhetic
Shellfish Poisons, met name okadaïnezuur

J.M.P. van Trijp en W.A. Traag

1e druk november 1988

Medewerker: drs R.J.A. Paulussen

Goedgekeurd door: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1988, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-
produkten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronver-
melding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

produktcoördinator dierlijke produkten

projectleider (ir L.G.M.Th. Tuinstra)

afdeling (5)

projectbeheer

circulatie

bibliotheek

drs R.J.A. Paulussen

dr G. Vos

EXTERN:

Directie Landbouwkundig Onderzoek

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Agralin

CL-RVV

RIVO, dr P. Hagel

J. de Boer

ABSTRACT

Beperkte evaluatie van een ELISA kit voor het bepalen van Diarrhetic Shellfish Poisons, met name okadaïnezuur

Limited evaluation of an ELISA-kit for the detection of Diarrhetic Shellfish Poisons (DSP), okadaic acid in particular (in Dutch)

Report 88.83 November 1988

J.M.P. van Trijp and W.A. Traag

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

1 table, 3 figures, 1 annexe, 4 references

An ELISA-kit from Japanese origin was tested with four suspect mussel-samples. All samples proved to be positive. A confirmation and a re-analysis were in this stadium not possible, but are considered in the future. The ELISA-kit seems useful as a screeningtest for Diarrhetic Shellfish Poisons, hereby substituting the present day rat-bioassay.

Keywords: Diarrhetic Shellfish Poisons, ELISA, screeningtest,
okadaic acid

()

()

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIALEN EN METHODEN	8
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	9
LITERATUUR	11
BIJLAGE	
A IMMUNOASSAY OF DIARRHETIC SHELLFISH POISON	

()

()

SAMENVATTING

In Nederland worden sinds 25 jaar soms toxines in mosselen aangetoond die zijn oorsprong vinden in een soort fytoplankton (*dinophysis acuminata*). Dit gif blijft in de mossel aanwezig, maar verdwijnt na enkele weken verwateren in de Oosterschelde. Bij consumptie van dergelijke giftige mosselen treden diarretische verschijnselen op; deze verschijnselen hebben hun naam aan de toxines gegeven: Diarrhetic Shellfish Poisons (DSP). Tot op heden is het gebruikelijk verdachte mosselen te screenen met een rat bioassay. Omdat het gebruik van proefdieren beperkt dient te worden en daar met genoemde methode slechts een beperkt aantal monsters onderzocht worden, bestaat er behoefte aan een analytische methode.

Naast een reeds in ontwikkeling zijnde methode met gebruik van HPLC is er zeer recentelijk een ELISA-kit van Japanse origine op de markt gekomen voor de bepaling van DSP.

Deze kit is getest met een viertal mosselen welke positief waren bevonden met de rat bio-assay. Er zijn gehalten gemeten van 800-1500 µg/kg op produktbasis. De cijfers moeten met de nodige reserve benaderd worden omdat de resultaten niet geconfirmeerd zijn. Een blanco monster mosselen werd ook met de test blanco bevonden.

Als praktische bepalingsgrens werd 200 µg/kg produkt vastgesteld. De kit maakt de indruk zeer bruikbaar te zijn als screeningsmethode, de prijs is fl. 480,- (prijspeil november 1988) voor 20 tests.

()

()

1 INLEIDING

In de afgelopen 25 jaar is diverse malen aangetoond dat Nederlandse mosselen besmet waren met een destijds onbekend toxine (1,2). Onderzoek in Japan (3,4) wees uit dat het hier gaat om een diarretisch toxine, dat geproduceerd wordt door een fytoplankton soort (*dinophysis acuminata*). Het geïdentificeerde toxine is bekend geworden als okadainezuur. In de loop van de tijd zijn ook derivaten van okadainezuren diarretisch actief gebleken. De gehanteerde verzamelnaam voor deze groep verbindingen is Diarrhetic Shellfish Poisons (DSP), figuur 1. De binnen Nederland op de markt gebrachte mosselen van Nederlandse oorsprong zijn vrij van DSP. Mosselen uit de Waddenzee worden een aantal weken verwaterd in de Oosterschelde waarbij eventueel aanwezige DSP uit de mosselen verdwijnt.

Indien blijkt dat de hoeveelheid fytoplankton (*dinophysis acuminata*) in het zeewater toeneemt wordt er rekening gehouden met het vóórkomen van DSP toxines in mosselen.

De controle op aanwezigheid van DSP, welke gebeurt na toename van het fytoplankton vindt plaats, op het RIVO te IJmuiden. Het RIVO maakt hiervoor gebruik van een rat bioassay, deze werkt als volgt:

De ratten krijgen, na 24 uur vasten, een mengsel van verdachte mosselen met rattenvoeder te eten, waarna aan de hand van het gedrag van de ratten (diarree e.d.) wordt bepaald of de mosselen al of niet besmet zijn.

Omdat het gebruik van proefdieren beperkt dient te worden en daar met genoemde methode slechts een beperkt aantal monsters onderzocht kunnen worden, bestaat er behoefte aan een analytische methode. Binnen de afdeling Organische Contaminanten van het RIKILT wordt dan ook gezocht naar een analytisch alternatief. Momenteel is een HPLC methode in ontwikkeling die echter gebruik moet maken van een onstabiel derivateringsreagens (9-anthryl-diazomethaan-ADAM).

Voorts is het verkrijgen van voldoende okadainezuur standaard een groot probleem gebleken.

Recentelijk is daarom een alternatieve methode getest welke als screeningsmethode gebruikt kan worden in plaats van de rat bioassay; een ELISA-kit van Japanse makelij.

Mede gezien het feit dat er slechts één kit ter beschikking stond (rechtstreeks vanuit Japan betrokken) is de proefopzet uiterst beperkt gebleven.

In bijlage A is de volledige tekst van de kit gegeven.

Door de fabrikant worden de eigenschappen geclaimd zoals vermeld in figuur 2.

Opgemerkt dient te worden dat er voor de kruisreactiviteit van DTX3 geen gegevens vermeld zijn in figuur 2.

2 MATERIALEN EN METHODEN

Getest is een ELISA-kit van de fa. UBE Industries, Ltd. Corporated Research and Development Division, ARK Mori Bldg, 12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 107 Japan. Binnen Europa beschikt de firma over een vertegenwoordiging in Londen en Düsseldorf.

Eén kit bestaat uit 20 test, met een prijs van 30.000 yen (ca. fl. 480,- prijspeil november 1988). In bijlage A is de exacte samenstelling van de kit vermeld.

Een viertal mosselmonsters, welke eerder door het RIVO-IJmuiden met de rat bioassay positief bevonden waren, werd geselecteerd (zie tabel 1). Eén gram monstermateriaal plus 5 ml 90% methanol werd gehomogeniseerd in een Sorvall Omnimixer gedurende 1 minuut. Het extract werd gefiltreerd door een Schleicher und Schüll vouwfilter (595 1/2). Vervolgens is het extract getest met behulp van de ELISA zoals vermeld in bijlage A (vanaf punt (2)).

Een drietal monsters is in simplo gebracht, één monster in duplo. Als controle is in simplo een blanco monster geanalyseerd en in duplo een oplossing van 45% methanol in water.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

In tabel 1 zijn de meetresultaten gegeven in extinctie-eenheden. De meetwaarden zijn omgerekend naar $\mu\text{g}/\text{kg}$ in het monster met behulp van de opgestelde ijklijn (figuur 3).

Zoals vermeld in de bijlage A komt een standaard van 20 µg/kg overeen met 200 µg/kg op monsterbasis, hetzelfde geldt voor de andere standaard (200 µg/kg = 2000 µg/kg op monster basis).

De vier geanalyseerde monsters blijken alle binnen de twee standaarden te vallen, ofwel binnen het gebied waar een lineair verband bestaat tussen de concentratie en de extinctie. het blanco monster mosselen heeft een concentratie < 200 µg/kg. Als praktisch afsnijpunt/detectiegrens is 200 µg/kg goed bruikbaar. UBE stelt de detectiegrens op 100 µg/kg (op produktbasis), gezien de ijlijn is deze waarde minder praktisch om te hanteren.

Zoals verder uit de tabel en figuur 3 blijkt, is in overeenstemming met het RIVO in alle monsters okadainezuur en/of DTX1 aangetoond. Aan concentraties moet geen groot gewicht worden toegekend aangezien drie monsters in simplo zijn aangezet en één in duplo. Dit geeft direct de beperkingen van de proefopzet aan. Gezien de beschikbaarheid van één kit is een uitgebreid testprogramma niet mogelijk geweest. Tevens is door het ontbreken van een adequate HPLC-analyse het (nog) niet mogelijk om een confirmatie uit te voeren.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

De resultaten duiden er op dat de kit zeker bruikbaar is met als praktische detectiegrens 200 µg/kg op produktbasis. Echter het gebruikte antilichaam vertoont geen reactiviteit met DTX3. Waardoor mosselen welke alleen besmet zijn met DTX3 een vals negatief resultaat opleveren.

De kit zal vooral als screeningsmethode bruikbaar zijn, zodat de rattenbioassay mogelijk kan vervallen.

Het is echter wel noodzakelijk een geschikte confirmatiemethode voorhanden te hebben op basis van b.v. HPLC.

Voorts verdient het experiment te zijner tijd herhaald te worden waarbij dan tevens de mogelijkheid moet bestaan een confirmatie uit te voeren voor zowel okadainezuur als de derivaten.

Aanbevolen wordt om in samenwerking met het RIVO het volgende seizoen de kit te gebruiken naast de rattenbioassay.

Tabel 1. Resultaten van een viertal monsters besmette mosselen en een blanco monster mosselen verkregen met de DSP-kit, aangevuld met bevindingen van het RIVO

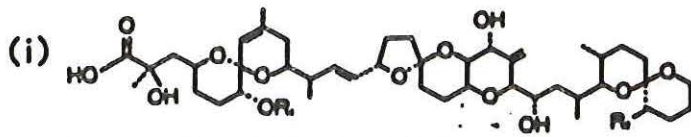
RIKILT nummer	Omschrijving	RIVO**	Extinctie	Okadainezuur (µg/kg)
88/5/5117	mossel Scandinavië 1987-11-24	++	0,20 0,47*	1530
88/5/5118	mossel Ierland 1987-09-09	++	0,20	1530
88/5/5119	mossel Ierland 1987-09-09	++	0,25	1200
88/5/5120	mossel Scandinavië 1987-11-24	++	0,31	800
88/23521	blanco mossel		0,47	< 200
-	negatieve controle (MeOH/H ₂ O-45/55)		0,58 0,60	0,0
-	20 ppb standaard (= 200 ppb okadainezuur op produktbasis)		0,40	200
-	200 ppb standaard (= 2000 ppb okadainezuur op produktbasis)		0,13	2000

* meetwaarde is niet betrouwbaar door pipetteerfout

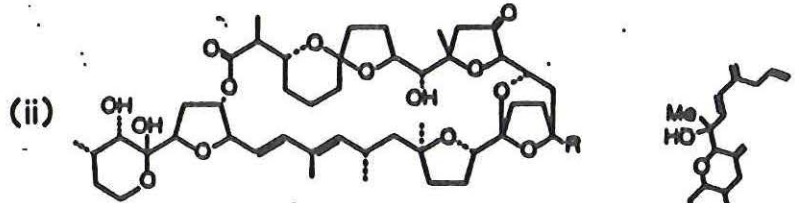
** interpretatie RIVO: ++ = zeer toxisch

LITERATUUR

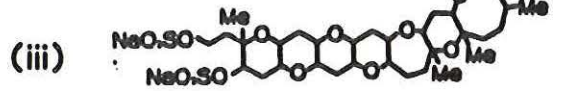
1. Kat, Marie
Diarretische mosselvergiftiging in Nederland gerelateerd aan het
voorkomen van *dinophysis acuminata*
De Ware(n) Chemicus 13, 25-29 (1983)
2. Kat, Marie
Diarrhetic Mussel Poisoning in the Netherlands related to the
Dinoflagellate *Dinophysis Acuminata*
Anthonie van Leeuwenhoek 49, 417-427 (1983)
3. Yasumoto T. et al
Identification of *Dinophysis fortii* as the Causative Organism of
Diarrhetic Shellfish Poisoning
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46 (11), 1405-1411 (1980)
4. Murata M. et al
Isolation and Structural Elucidation of the Causative Toxine of
the Diarrhetic Shellfish Poisoning
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48 (4), 549-552 (1982)



Okadaic acid (OA) : R₁=H, R₂=H
 Dinohysistoxin-1 (DTX₁) : R₁=H, R₂=CH₃
 Dinohysistoxin-3 (DTX₃) : R₁=scyl, R₂=CH₃



Pectenotoxin-1 (PTX₁) : R=CH₂OH
 Pectenotoxin-2 (PTX₂) : R=CH₃
 Pectenotoxin-3 (PTX₃) : R=CHO



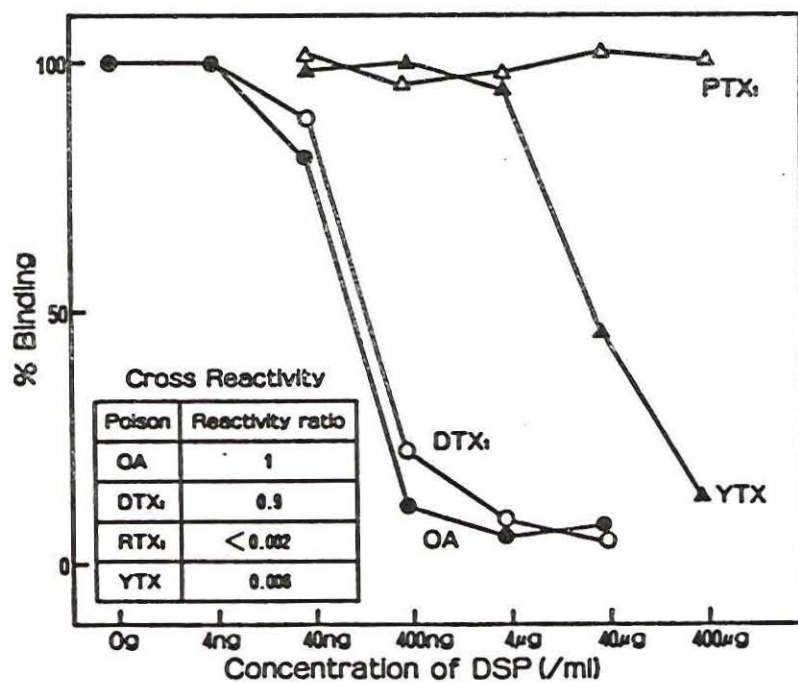
(i) Okadaic acid and its derivatives
 (OA, DTX₁, DTX₃)

(ii) Pectenotoxin derivatives
 (PTX_{1, 2, 3})

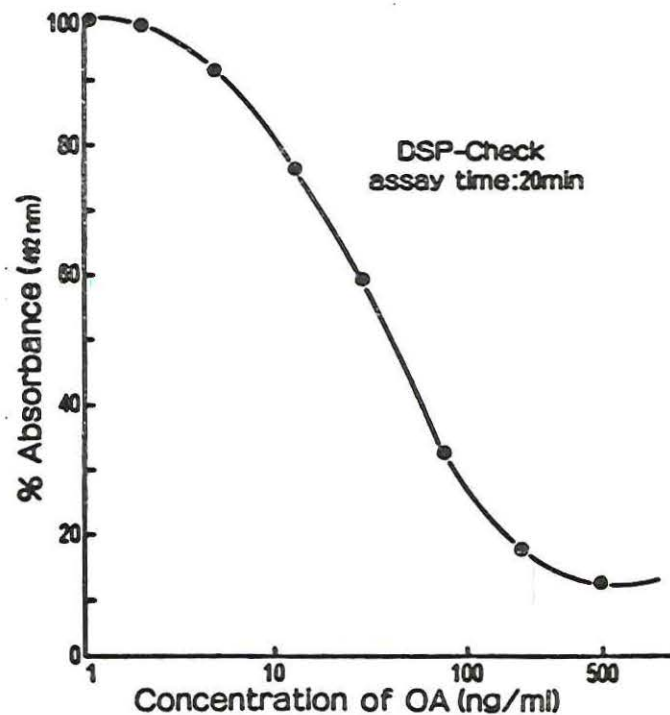
(iii) Yessotoxin
 (YTX)

Figure 1

■ CROSS REACTIVITY OF MONOCLONAL ANTIBODY

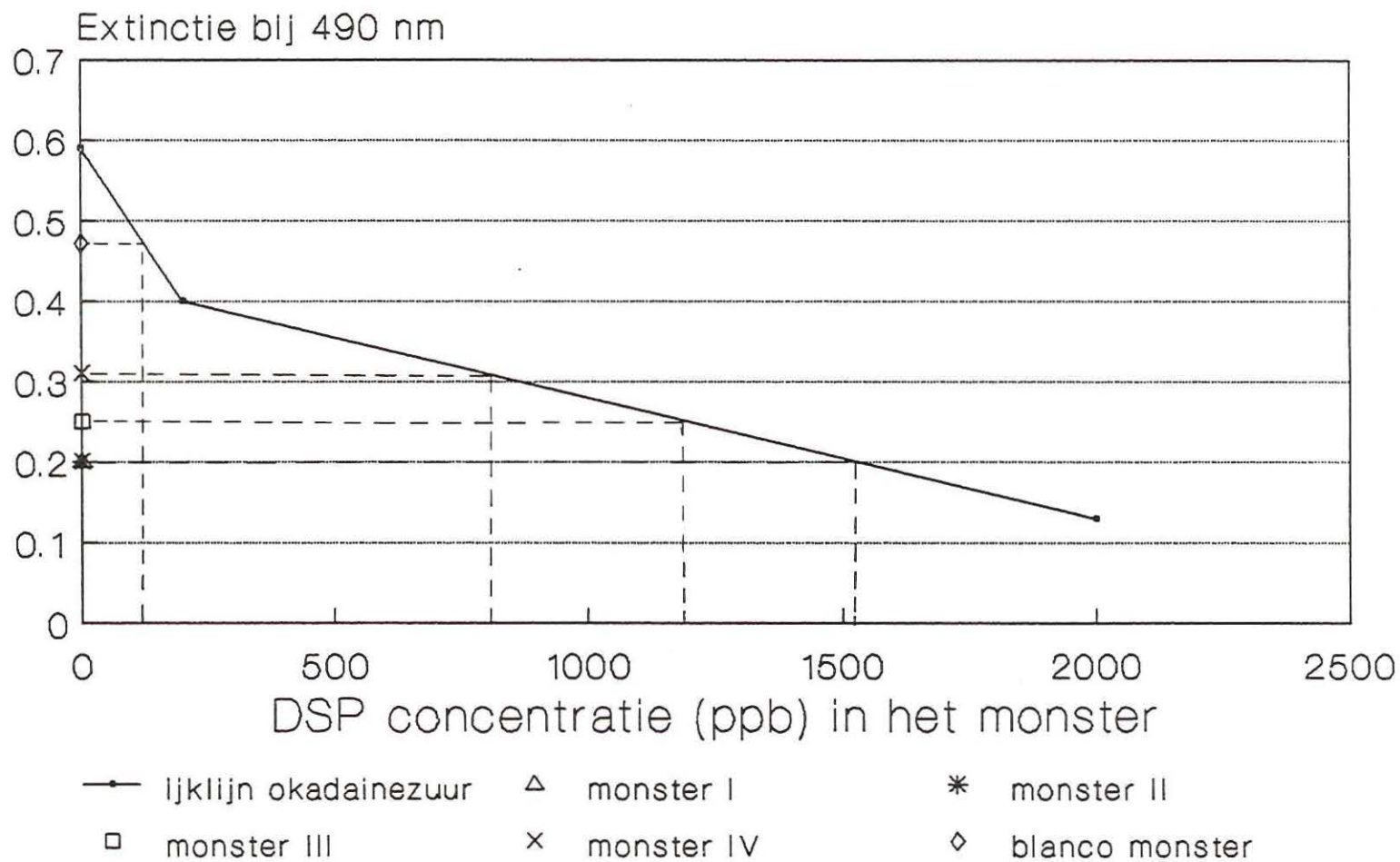


■ STANDARD CURVE



Figur 2

ijklijn DSP-check



Figuur 3

IMMUNOASSAY OF DIARRHETIC SHELLFISH POISON

下痢性貝毒の免疫アッセイ

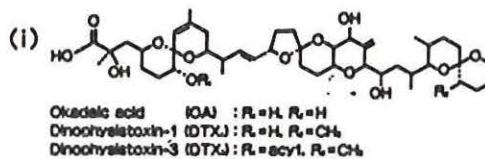
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) was first described in Japan as a new kind of a seafood disease. This is caused by eating mussels or scallops which are contaminated by poisonous plankton. At present, these poisons in shellfish are detected by bioassays using a large number of mice, which are very laborious and time-consuming.

UBE Industries, Ltd. has developed a monoclonal antibody specific to Okadaic acid (OA) and its derivative (DTX₁), which are major one among poisons, and immunoassay kit for detection of OA and DTX₁ using this antibody. This immunoassay kit (DSP-Check) enables more simple and easy, and time-saving detection of OA and DTX₁.

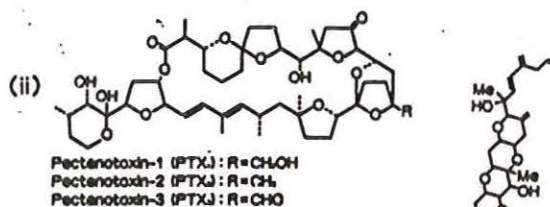
COMPONENTS OF DIARRHETIC SHELLFISH POISON

Prof. Yasumoto of Tohoku University has proved that Diarrhetic shellfish poisons consist of three major components.

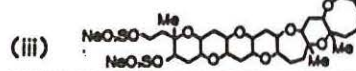
(i) Okadaic acid and its derivatives
(OA, DTX₁, DTX₃)



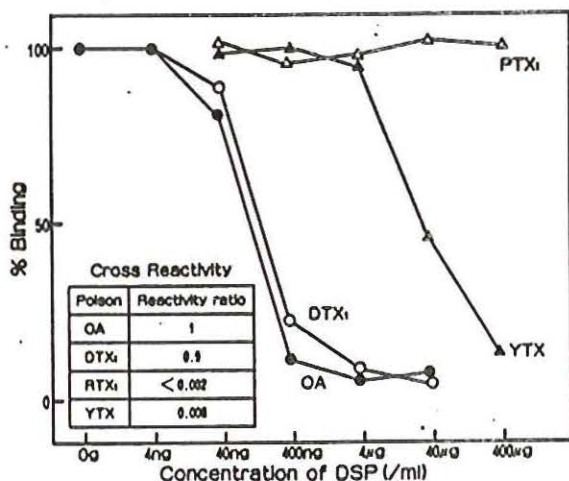
(ii) Pectenotoxin derivatives
(PTX_{1, 2, 3})



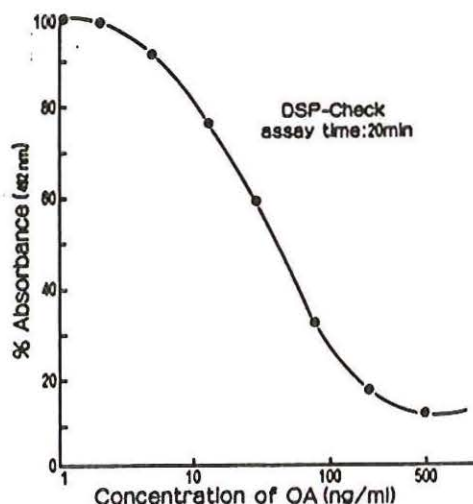
(iii) Yessotoxin
(YTX)



CROSS REACTIVITY OF MONOCLONAL ANTIBODY



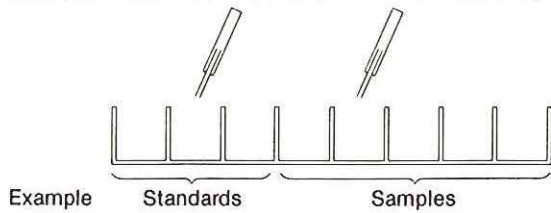
STANDARD CURVE



DSP-Check for Diarrhetic Shellfish Poison Quick Test

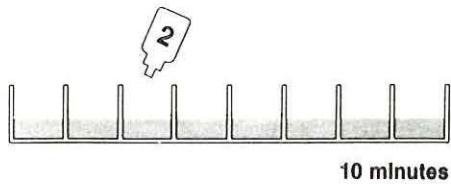
Easy Procedure

1



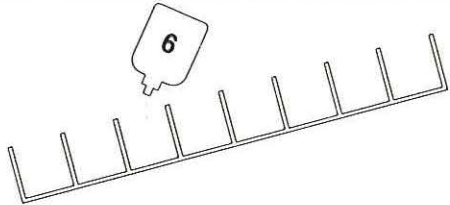
Dispense standards (7,8) and sample extracts (50 μ l) into each well using disposable pipettes.

2



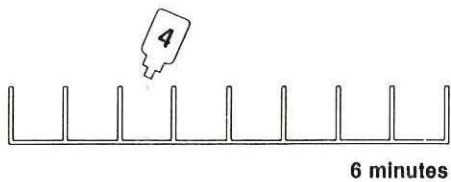
Add one drop of enzyme conjugated antibody (2).
Incubate for **10 minutes**.

3



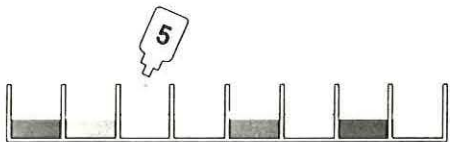
Discard the solution from wells.
Wash wells four times with washing solution (6).

4



Add one drop of chromogen (4) mixed with
substrate solution (3).
Incubate for **6 minutes** under the dark.

5



Add one drop of stopping reagent (5).

6



Compare the samples' color with the standards' for
qualitative analysis.
Measure the absorbance at 492 nm with micro
reader for quantitative analysis.

Detection range

10 ppb ~ 300 ppb

Shellfishes

Scallop, mussel, pullet etc.

Storage

2 ~ 8°C

Packaging

1 kit 20 tests

UBE INDUSTRIES, LTD.

Corporate Research & Development Division

Diagnostics Development Group

ARK Mori Bldg., 12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 107 Japan.

Phone: (03) 505-9245 Fax: (03) 505-9234 Telex: 2224645 UBE TKJ

DSP-Check

Quick Test Kit for Diarrhetic Shellfish Poison

“DSP-Check” detects okadaic acid (OA), which is a diarrhetic shellfish poison(DSP), within 20 minutes by competitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) using the monoclonal antibody with high specificity against OA.

Kit components	20 tests
① Reaction plate(1 x 8 well)	3 plates
② Enzyme conjugated monoclonal anti-OA	1 vial
③ Substrate solution	1 vial
④ Chromogen	1 vial
⑤ Stopping reagent	1 vial
⑥ Washing solution	1 vial
⑦ OA standard I (20ppb)	1 vial
⑧ OA standard II (200ppb)	1 vial
⑨ Disposable micropipette	26 pipettes

Measurement protocol

(1) Preparation of samples

- 1)Place 1~10g of shellfish or midgut of shellfish into a blender.
- 2)Add 5 times of 90% methanol solution by volume to the amount of the sample used.
- 3)Blend for 1~2 minutes.
- 4)Filter the extract through the appropriate filter paper.

(The supernatant of centrifuged sample extract is also applicable.)

“This filtrate is used in the following ELISA step after doubled with pure water”

(2)ELISA step

① Preparation

- 1)Add 5 ml of 45% methanol solution into OA standard ⑦ and ⑧ vials exactly(The indicated line on the bottle corresponds to 5ml), then cap the bottle and shake vigorously by hand. In this way, vial ⑦ gives 20 ppb standard solution and vial ⑧ 200 ppb.
- 2)Dissolve chromogen ④ with whole substrate solution ③ and leave the solution under the dark.
- 3)Add washing solution ⑥ into enzyme conjugated monoclonal anti-OA ② up to the indicated line on the vial. It is recommended to shake the vial several times by hand.

These mixed solutions should be consumed at the same time.

② Assay procedure

“In order to wash the hole of the nozzle, several drops of the solution in the vial should be discarded from every vial (②, ④, ⑤, ⑥) before use.”

1)Antigen - antibody reaction

50 μ l of OA standard solution (20 ppb and 200 ppb) and the sample solution prepared above should be placed into each well using the disposable micropipette in the kit (see the example below).

Immediately add 1 drop of enzyme conjugated antibody solution and allow to stand for 10 minutes at room temperature.

It is recommended that the plates are quickly moved to and fro on the table.

2)Washing the wells

Remove the solution from each well and wash the wells four times with the washing

solution. It is recommended that small quantity of liquid left at the bottom of well should be eliminated by flipping the plate by hand.

3)Color development

Add 1 drop of chromogen solution ④ and allow to stand for 6 minutes at room temperature under the dark.

4)Stopping the the reaction

Add 1 drop of stopping reagent ⑤ into each well. And the plates should be quickly moved to and fro on the table.

5)Judgement

Compare the samples' color with that of OA standards(20 ppb and 200 ppb) with the naked eyes within 5 to 10 minutes after stopping the reaction (The higher the concentration of OA is, the lighter the color is). When the original sample was extracted according to this manual, 20 ppb of OA standard solution corresponds to 200 ppb in the original sample as 5 fold of extracting solution against the sample was used on extraction step and moreover the filtrate was diluted to double. Therefore, 200 ppb of OA standard solution corresponds to 2 ppm in the original sample.

We recommend "UBE Handy Reader" for the quantitative analysis of OA.

Quantification of OA using "UBE Handy Reader"

1)Making standard curve

Plot the absorbance (%) against the concentration of OA standard solution (20,200 ppb) on semi-logarithm graph paper.

2)Quantification of OA

Quantify the concentration of OA of each sample from the absorbance using the standard curve.

Example

A	B	C	D	E	F	G	H
20ppb	200ppb	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(200ppb in sample)	(2ppm in sample)						

Detection limit and range

Detection limit: 10ppb Detection range: 10~300ppb

(ppb of OA included in original sample) = (reading value from standard curve) x (volume[ml] of extracting solution) x 2 / (wt.[g] of ground sample used)

Shellfishes

scallop, mussel, pullet etc.

[Caution]

OA is poisonous compound and must be handled with special care. Rubber gloves and safety glasses should be worn throughout the assay. All materials must be detoxified including disposable micropipettes and reaction plates, by placing in 5% by volume hypochloride solution for at least one hour.

Ube Industries Ltd, Research and Development, Diagnostics Development Group

Address; ARK Mori Building, 12-32, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo 107, Japan

TEL (03) 505-9245 FAX (03) 505-9234 TELEX 222-4645 UBE TK J