
Status quo “effect-based bioassays” in the EU

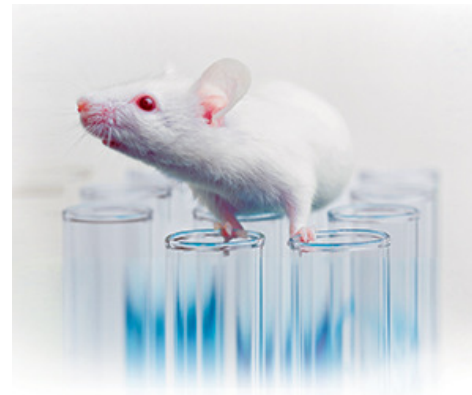
Stefan Weigel, Toine Bovee, Mariel Pikkemaat

BfR Symposium wirkungsbezogene Analytik in der
Leensmittelüberwachung, Berlin, 18.10.2012



Historie

- Älteste Variante der wirkungsbezogenen Analytik in der Lebensmittelüberwachung: der Vorkoster
- (Noch) aktuelle Variante: Maus-Bioassay für Algentoxine
- Ethische (und methodische) Bedenken
→ Entwicklung neuer Ansätze



Wirkungsbezogene Analytik

- Verbindung von biologischen Wirkungstests mit chemischer Identifizierung zum Aufspüren potentiell schädlicher Stoffe
 - Probenvorbereitung/Extraktion
 - bioanalytischer Wirkungstest
 - (evtl.) Fraktionierung, bioassay-directed
 - chemische Identifizierung (instrumentelle Analytik)
 - Bestätigung im bioanalytischen Wirkungstest

Status quo

■ Forschung

- BioCop (FP6)
- CONffIDENCE (FP7)
- nationale Projekte

■ Praxis

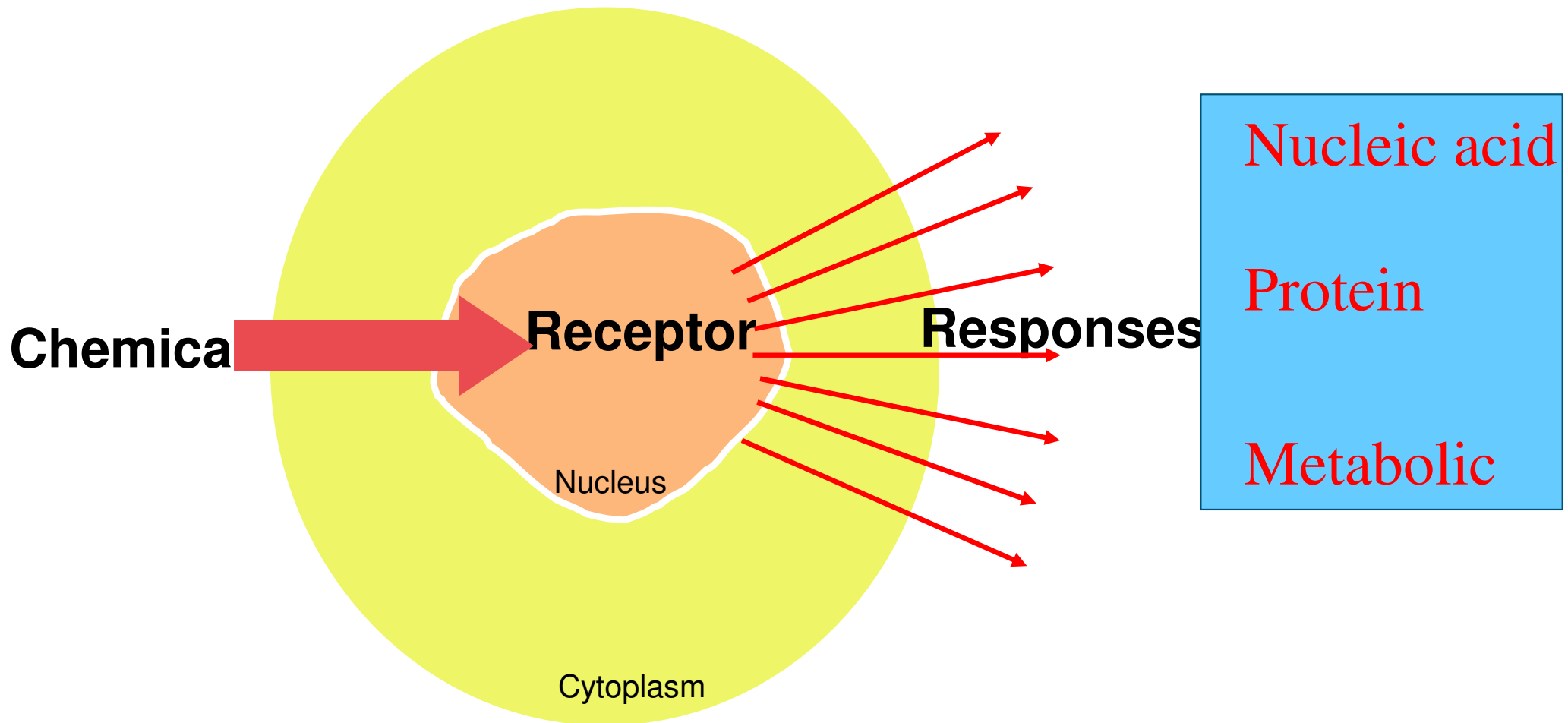
- Mikrobiologische Hemmstofftests
- Zelltests (z.B. DR-CALUX, YES, REA, RAA)
- Maus-Bioassay Aigentoxine



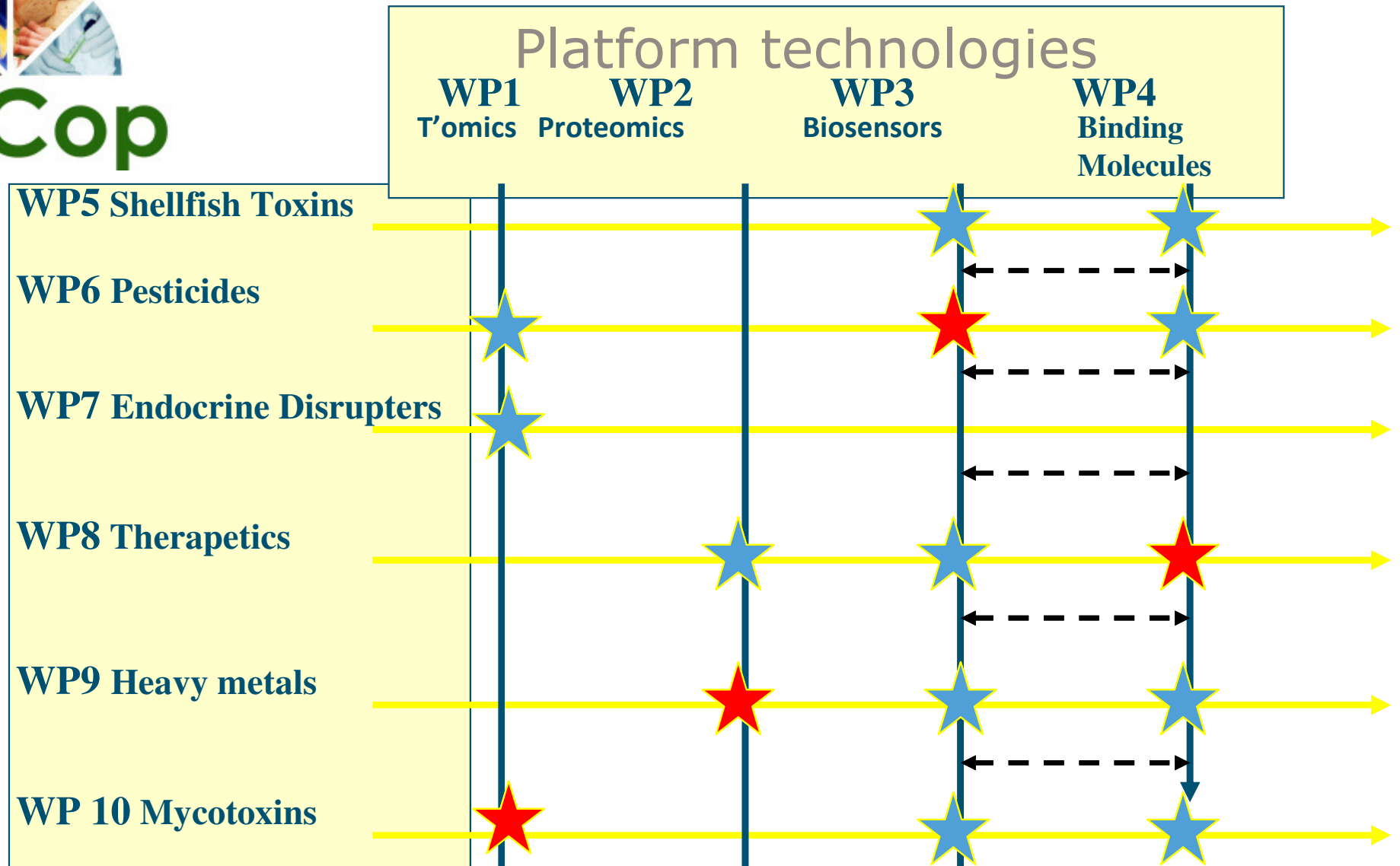
“New technologies to screen multiple chemical contaminants in food”

■ Ziel:

- Entwicklung neuer Schnelltestverfahren zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer chemischer Kontaminanten/Rückstände in Lebensmitteln



BioCop Matrix

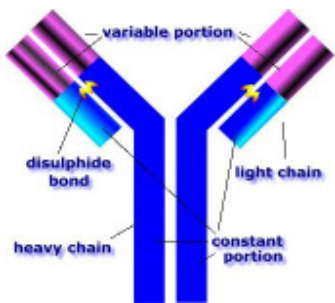


BioCop binders

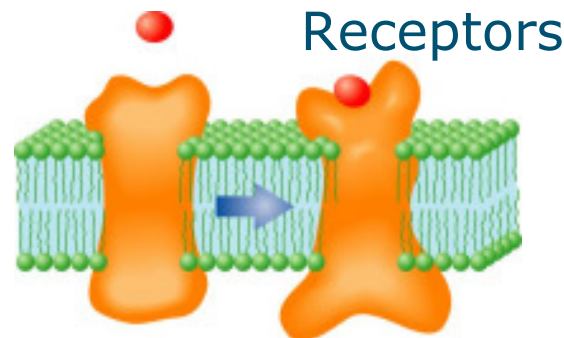


BioCop

A prerequisite for high quality detection methods based on measuring molecular interactions is having high quality binding proteins



Antibodies



Receptors



'artificial binders'

Enormous efforts in BioCop to produce a range of unique binding proteins



- Transcriptomics
 - Microarrays für Phytoöstrogene und Mycotoxine
- Metabolomics
 - Biomarker für steroidale Wachstumsförderer
- Immunochemisch
 - Fluorchinolon-Antibiotika
 - Paralytic shellfish poisons (PSP)

CONFIDENCE

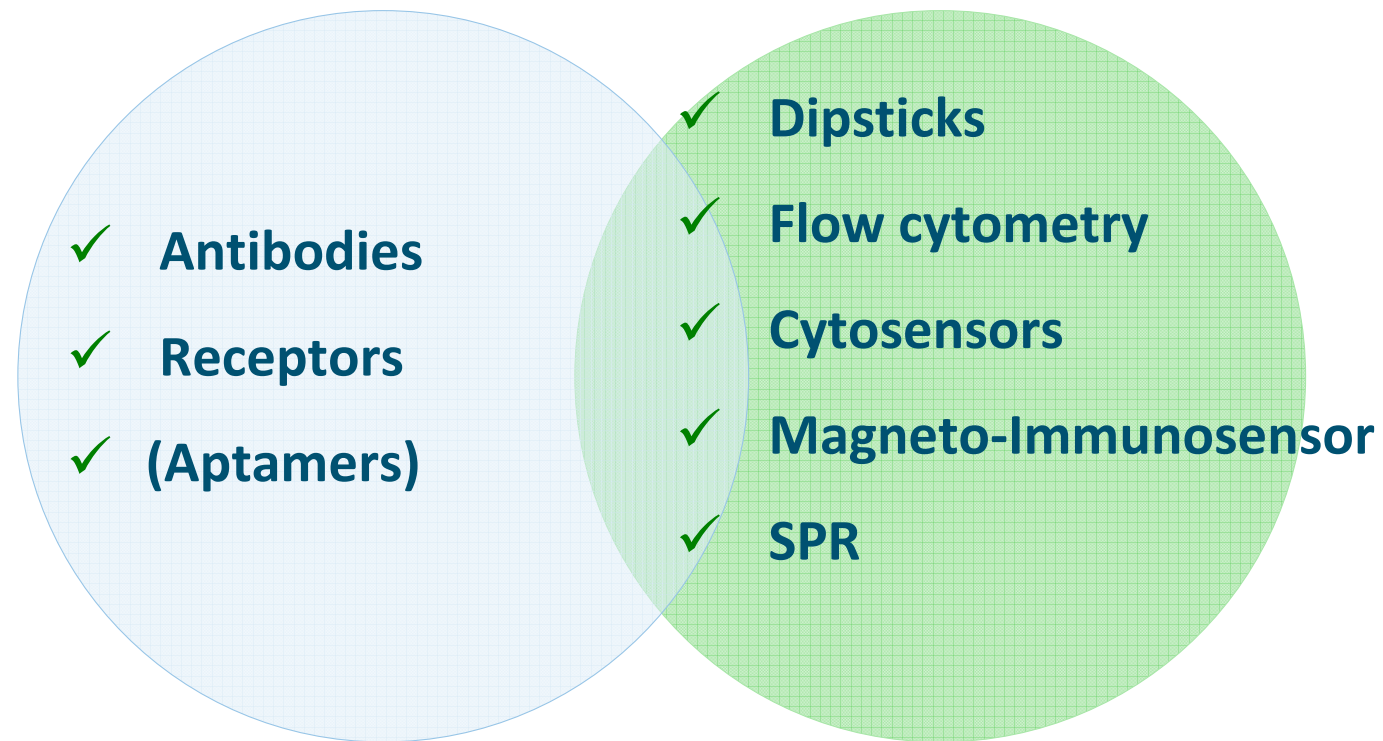


CONTaminants in *food and feed*: Inexpensive DETection for Control of Exposure

- Ziel: Kosteneffiziente Methoden zum Nachweis von Rückständen und Kontaminanten in Futter- und Lebensmitteln
 - multiplex
 - screening
 - Möglichst früh in der Kette
 - Produkt(eingangs)kontrolle (Betriebe)
 - Offizielle Überwachung



■ Bio-analytical detection



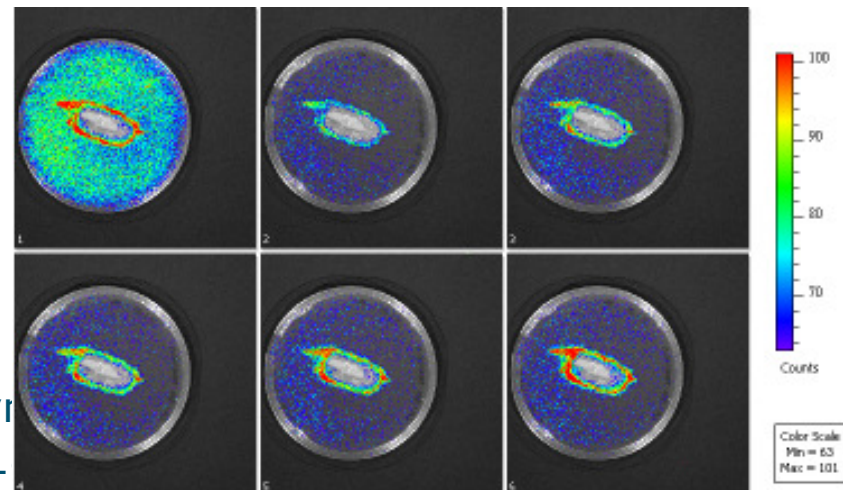
Bio-molecule

Platform

CONFIDENCE



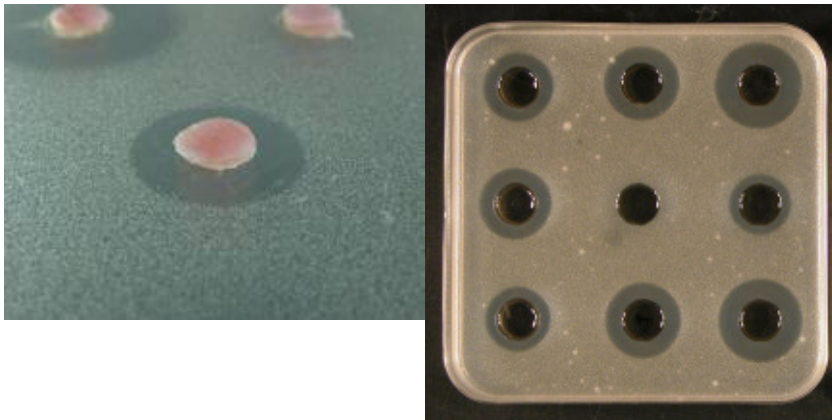
- Cytosensor für anorganisches Arsen
 - luminescent recombinant cells having firefly luciferase as a reporter
 - controlled by a specific metal species inducible promoter
 - successfully applied in water analysis
 - adaptation to food/feed failed: extracts not compatible with assay or recoveries low and of low reproducibility



Microbiological inhibition tests

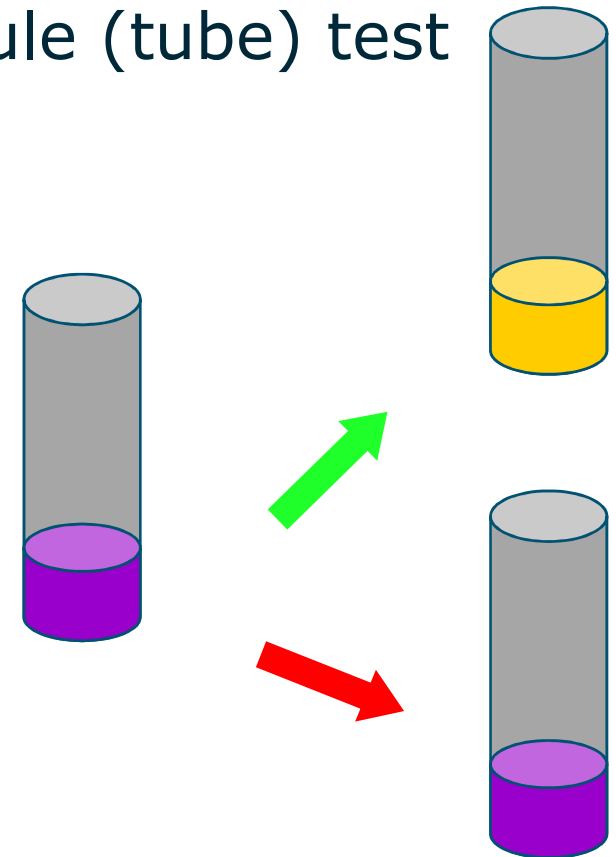
- Widely used for detection of antibiotic residues, e.g. in National Monitoring Plans

(Multi)plate test



e.g. EU 4 plate test

Ampoule (tube) test



e.g. Premi Test,
Delvo Test

Mikrobiologische Hemmstofftests

■ Vorteile

- kostengünstig (5-15 €)
- keine aufwendigen Geräte nötig
- einfache und schnelle Probenvorbereitung
- Nachweis biologisch aktiver Metaboliten und unbekannter Substanzen, breites Spektrum

■ Nachteile

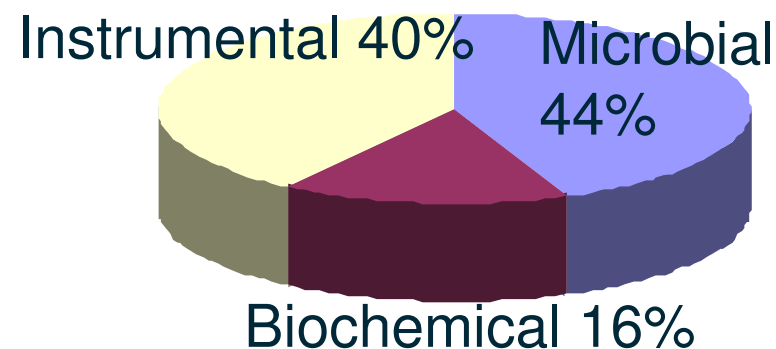
- lange Inkubation
- LoD oft > MRL → hohe Rate falsch negativer Ergebnisse

Proficiency test results 2009

- 23 laboratories (> 23 methods)
- Matrix: minced beef

I	II	III
blank	280 µg/kg flumequine	120 µg/kg lincomycin + 230 µg/kg spectinomycin

False negative results	
Overall result	53 %
Microbiological methods	73 %
Biochemical methods	50 %
Instrumental methods	22 %



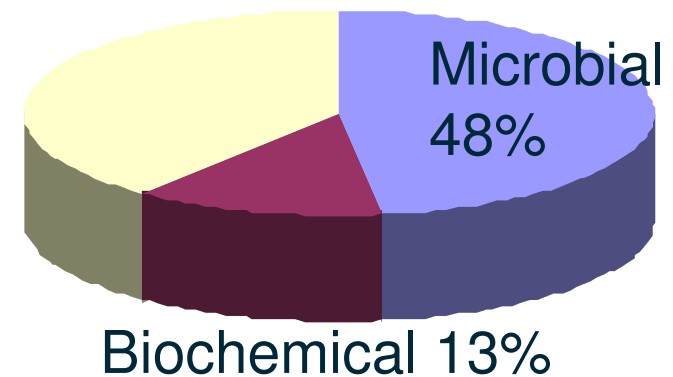
Proficiency test results 2010

- 34 laboratories (> 34 methods)
- Matrix: minced beef

I	II	III
blank	120 µg/kg oxytetracycline	120 µg/kg sulfadimidine, 90 µg/kg S.chloropyridazine, (5 µg/kg dapsone)

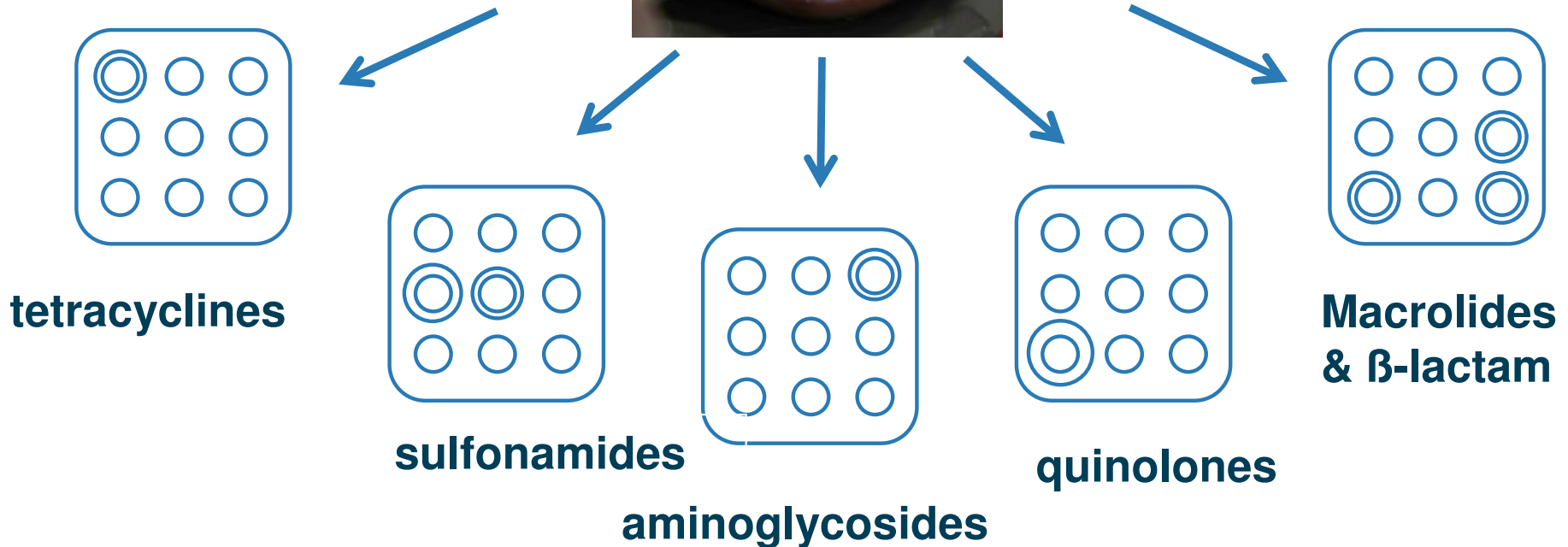
False negative results	
Overall result	33 %
Microbiological methods	38 %
Biochemical methods	25 %
Instrumental methods	23 %

Instrumental 39%



Nouws Antibiotic Test (NAT)

MRL
compliance

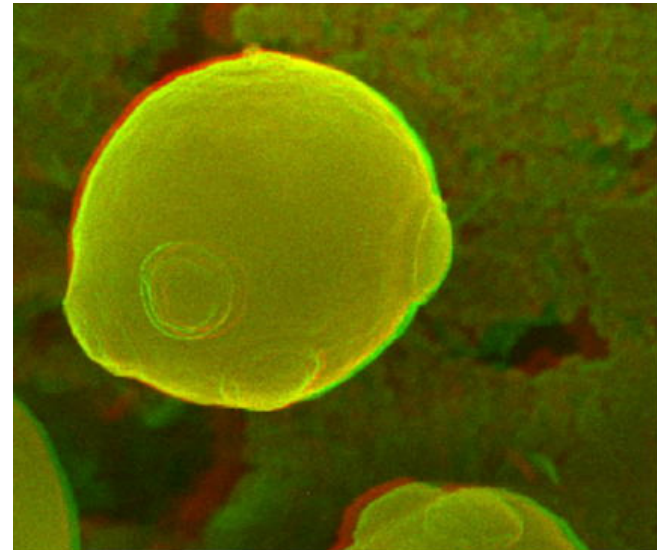


Zelltests

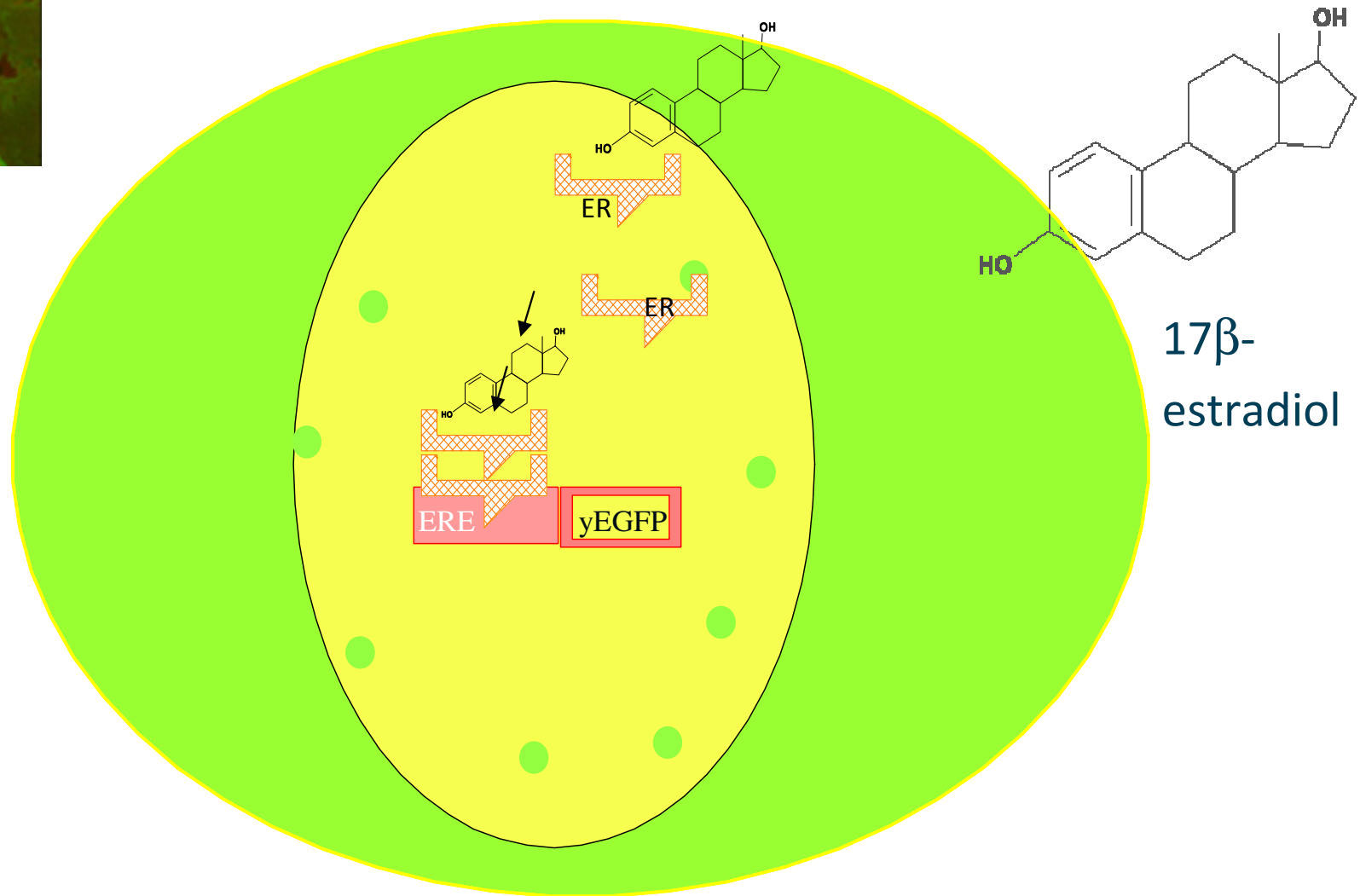
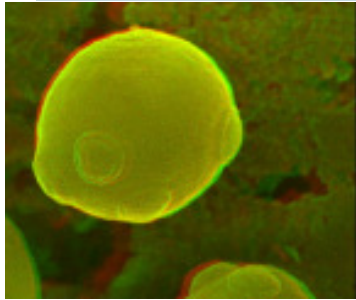
- CALUX (Chemically Activated Luciferase Gene Expression)
 - DR CALUX, Ah-Rezeptor, für Cl-Dioxine, PCB, etc.
 - ER, AR CALUX, Östrogen-, Androgenrezeptor, für östrogen/androgen wirksame Substanzen
- RIKILT Estrogen Assay (REA), Androgen Assay (RAA)
 - Hefezellassay
 - validiert, praxiserprobt
- Weitere, z.B. YES (Yeast Estrogen Screen)

RIKILT estrogen assay (REA)

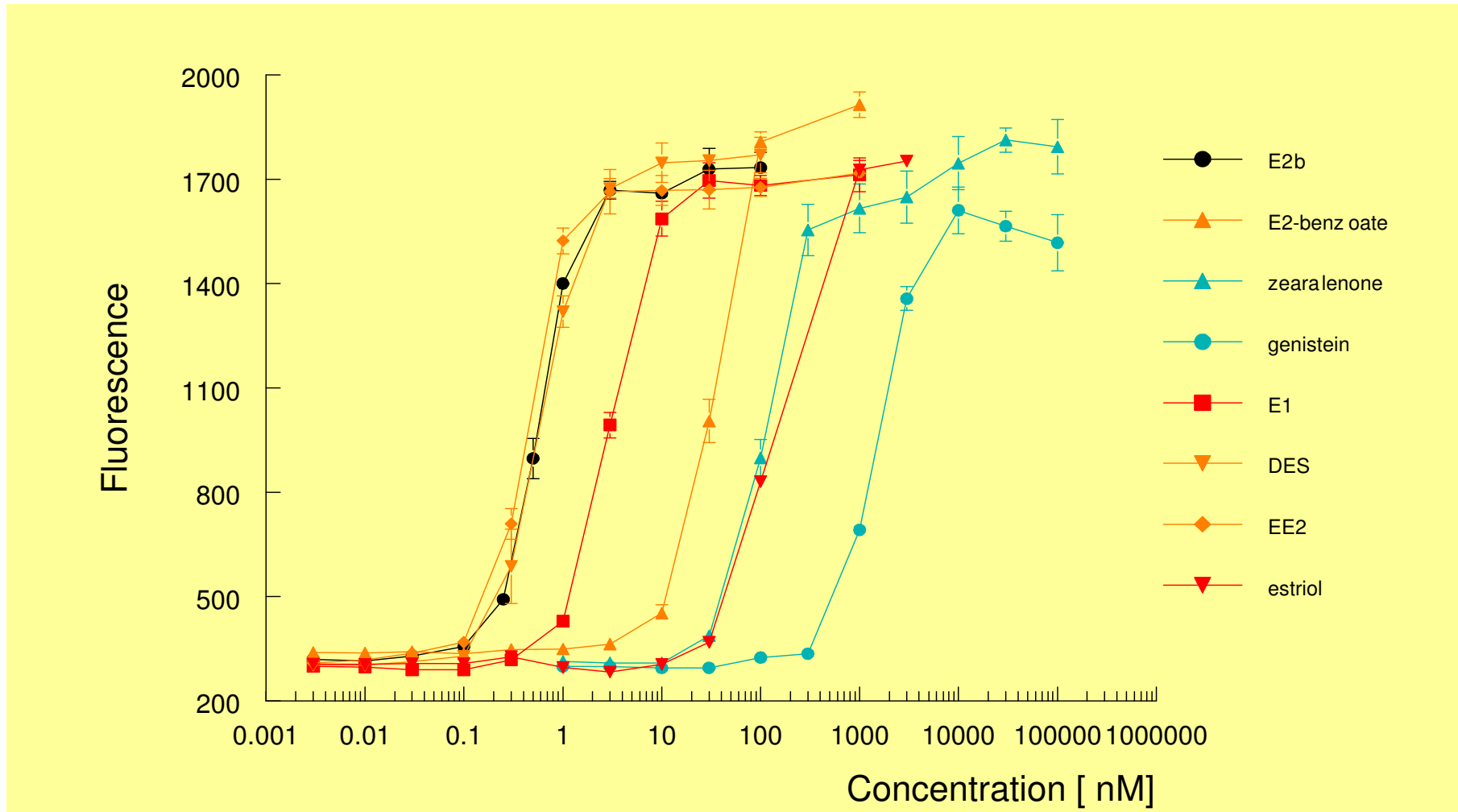
- Yeast cell assay
- Introducing a gene construct → so yeast expresses the human estrogen receptor α (hER α)
- Introducing a reporter gene construct → so yeast expresses a green fluorescent protein (yEGFP) upon activation of the hER α



Principle of the yeast estrogen assay



Response to different estrogens in the REA



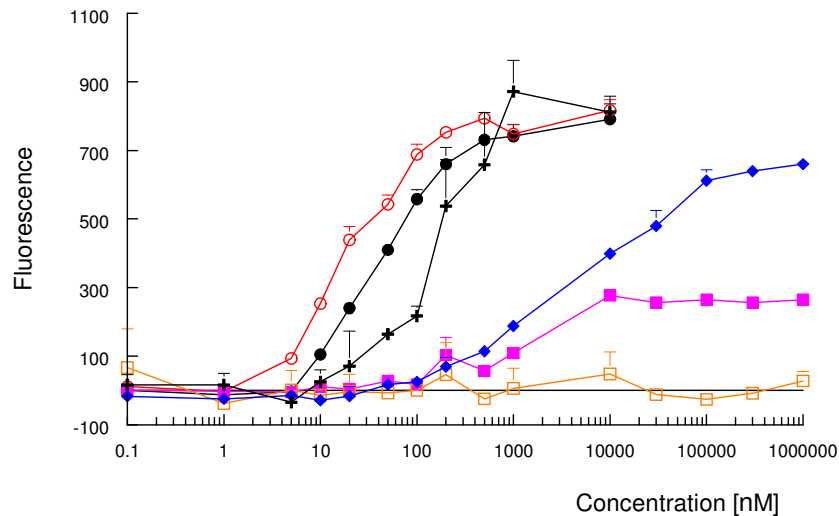
Bovee et al., *Gene* **325** (2004) 187-200

Bovee et al., *JSBMB* **91** (2004) 99-109

Further yeast based hormone bioassays

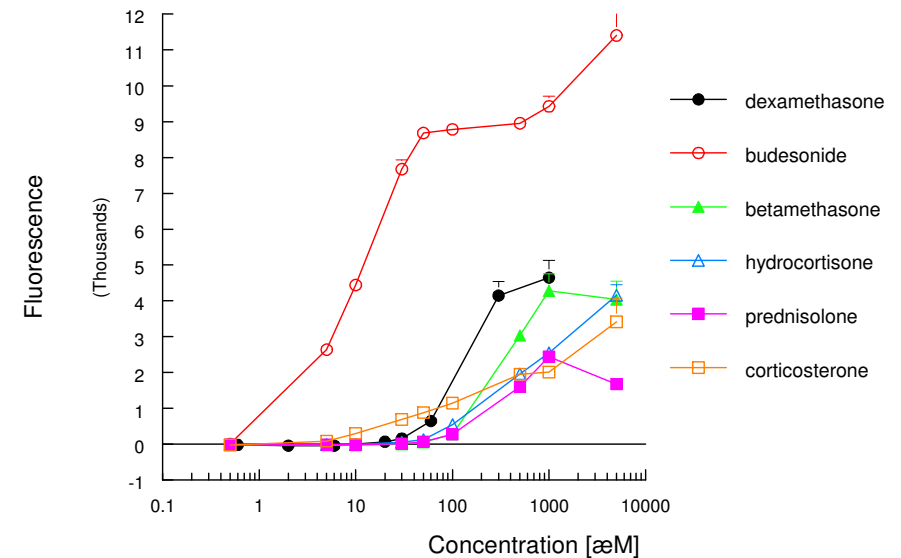
- Similarly we developed a yeast **androgen** bioassay and yeast **corticoid** bioassay

androgen



● 17β-T ○ DHT ■ Prog □ Dex ◆ 17β-E2 ✦ Bold

corticoid



Bovee et al., *ABC* 389 (2007) 1549-1558
Bovee et al., *ABC* 401 (2011) 873-882

Validation REA

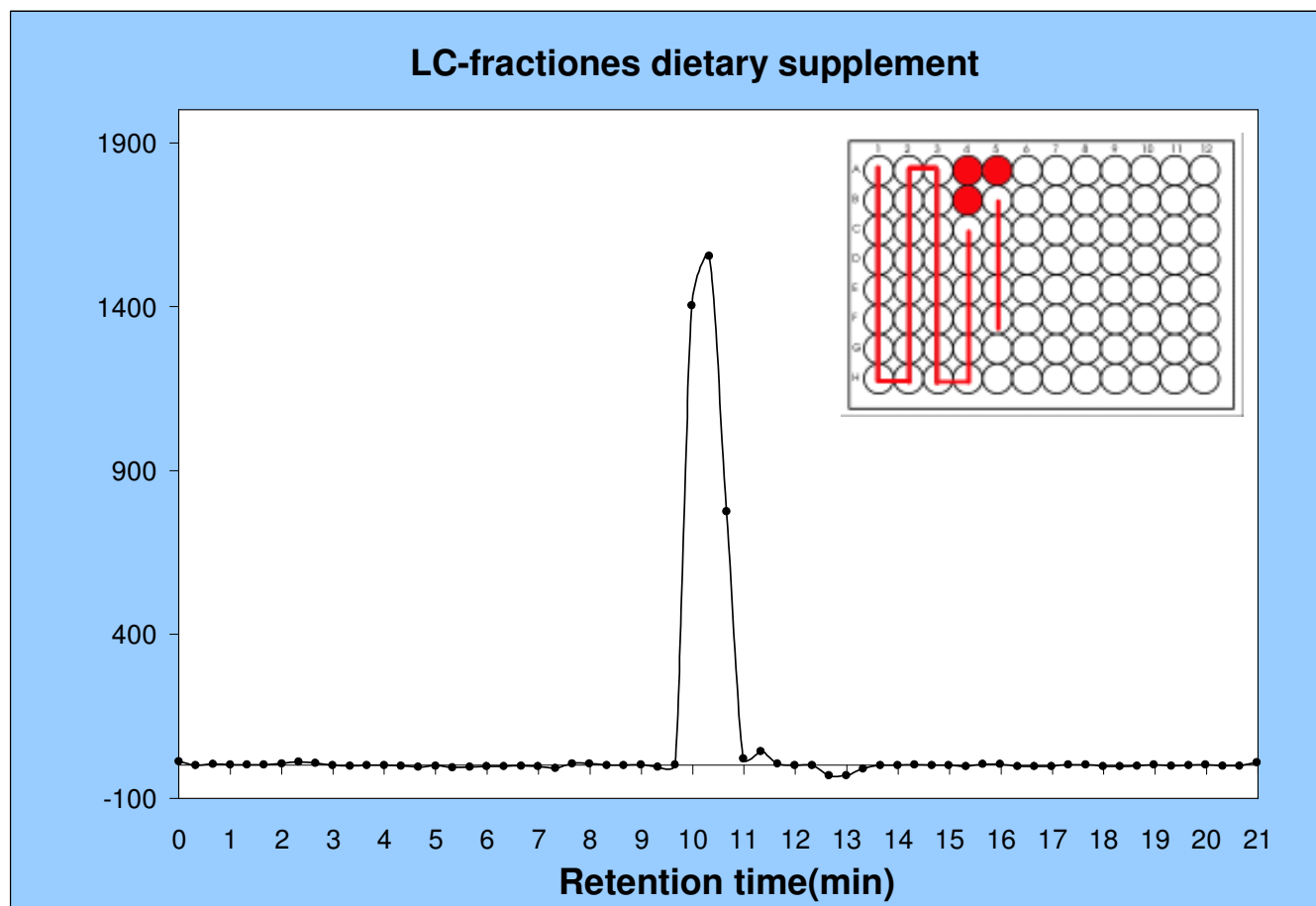
- in-house validation ✓
- inter-laboratory validation ✓
- comparison with routine GC-MS monitoring ✓
- Calf urine samples (>120 samples, real practice, blind study, Netherlands): bioassay screening vs GC-MS
 - one sample false negative (contained about 1 ppb of 17α E2 and even less E1) and “5.6 % false positives” (or did GC-MS miss something?).
- Calves treated with E2: bioassay screening urine vs GC-MS analysis (104 samples, Italy)
 - 83 true positives, 18 true negatives, only three false negatives (containing > 1ppb E2, however, at least one of these was rather false positive in GC-MS), and 0 false positives.

Case study: Dietary supplements

- Dietary supplements → analysed by LC-MS/MS for 49 steroids.
 - 18 supplements - 11 positive and 7 negative
 - out of 7 negatives 2 supplements show androgenic activity in the yeast androgen bioassay

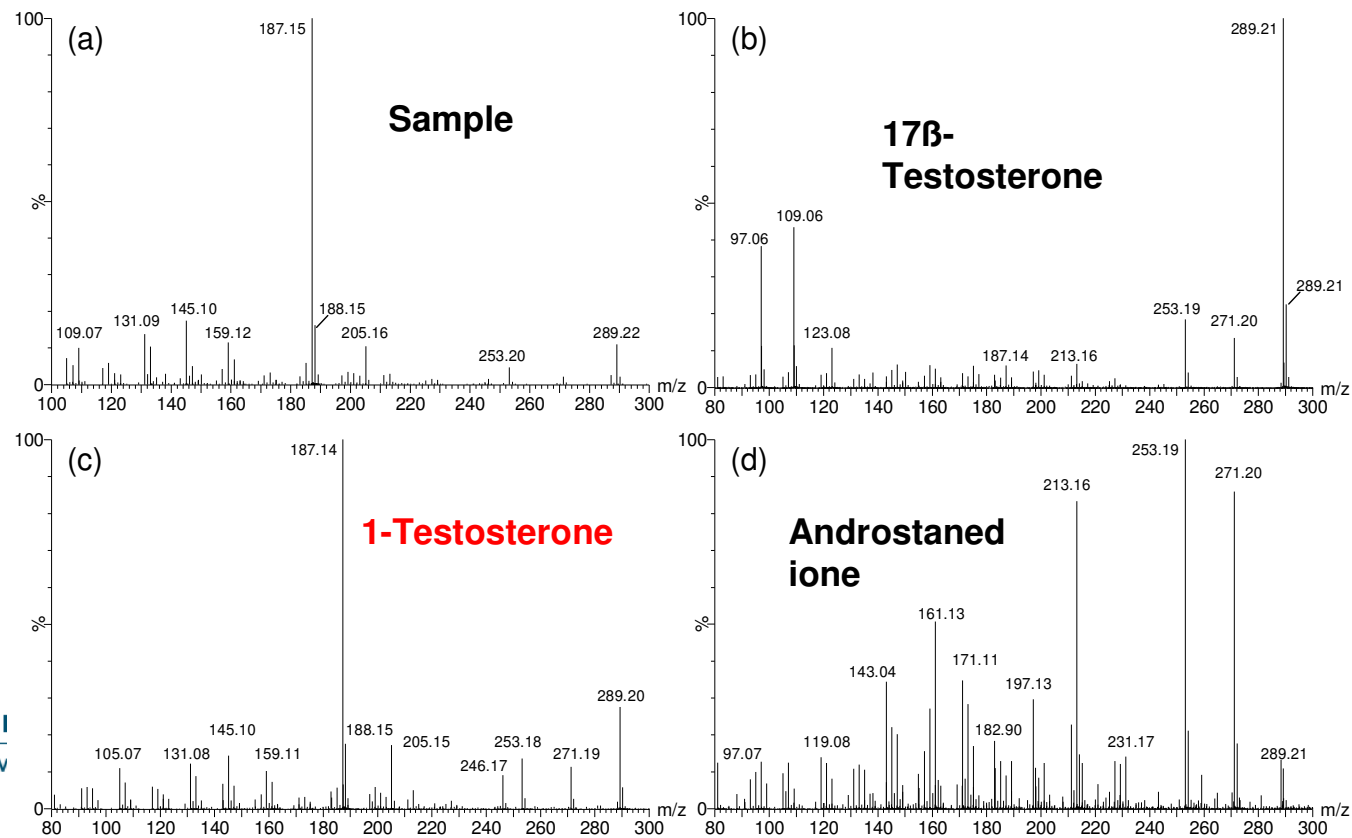


Bioassay directed fractionation



LC-MS/MS identification

- One sample contained 1-testosterone
- The other one contained 4-androstene-3 β ,17 β -diol and 5-androstane-3 β ,17 β -diol
- 2 out of 18 samples screened false negative with LC-MS

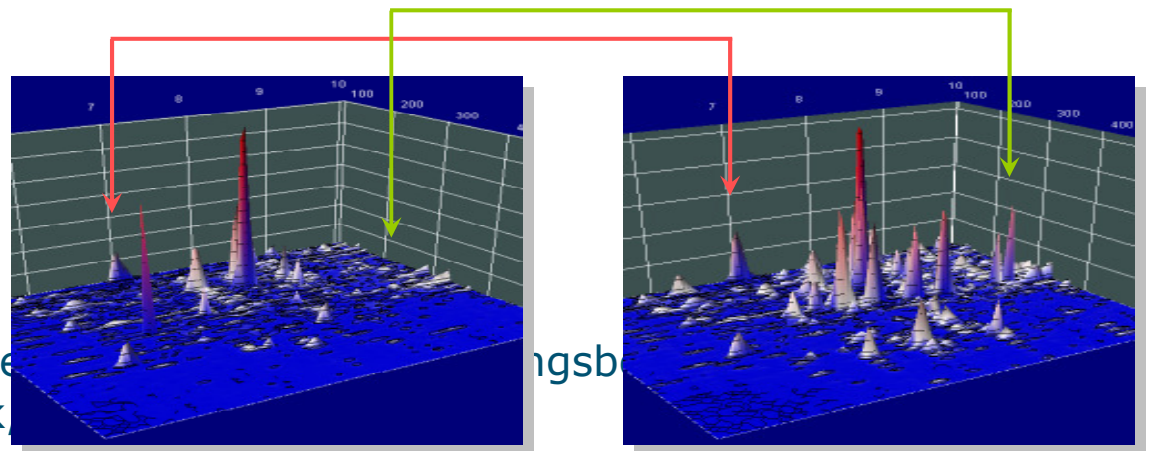


Herausforderung: chem. Identifizierung

- Bioaktive Fraktionen können tausende potentiell effektverursachende Substanzen enthalten
- Charakterisierungsmöglichkeiten:
 - NMR (hohe Gehalte)
 - GC-/LC-MS/MS (breite target-Analytik)
 - High resolution + mass accuracy
Massenspektrometrie (ToF, FT-ICR/Orbitrap)
- Verifizierung mit Referenzsubstanz nötig, validierte LC-/GC-MS Methode

Herausforderung: chem. Identifizierung

- Hoher Zeit-/Arbeitsaufwand, Expertise nötig
- Teilweise Automatisierung
- Metabolomics-Ansatz
- Datenreduktion, alignment
- in Vergleich mit Negativprobe Auffinden der Unterschiede
- Kopplung an Datenbanken (Exaktmassen)
- Suchalgorithmen



Zusammenfassung

- Stärke effektbasierter Assays ist die Detektion von Wirkung
- Nachweis von unbekanntem/unerwarteten Substanzen
 - Designerdrugs
 - Altwirkstoffe
 - aktive Metaboliten

Zusammenfassung

- Wirkungsbezogene Bioanalytik ist komplementär zu instrumenteller Analytik
- Für Positivbefunde chemisch-analytische Identifizierung und Bestätigung nötig
- Einige Assays erfolgreich validiert und in der Praxis erprobt

Ausblick

- Robustheit vieler Assays insbesondere für Realproben noch unzureichend
- Finden von wirkungsrelevanten biologischen Erkennungselementen und deren Einbettung in Bioassays anspruchsvoll
- Gesetzliche Voraussetzungen unterstützen die wirkungsbezogene Analytik nicht

→ Umdenken nötig

Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit

Kontakt:
stefan.weigel@wur.nl

