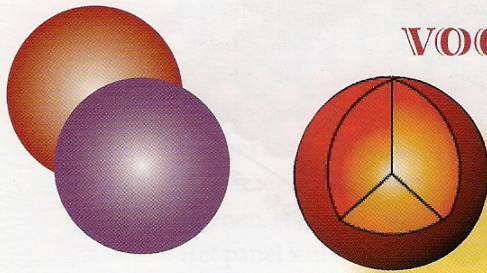


Serologie met de Luminex[®] technologie:

miniaturisering zonder oplossing voor discrepanties in testresultaten



R. Boot

LIS-RIVM, ron.boot@rivm.nl

Serologische technieken worden veel toegepast in kwaliteitscontrole van proefdieren. Het is vooral serologie in het onderzoek op virale infecties (9), maar in principe is serologie ook bruikbaar voor andere micro-organismen zoals bacteriën (1).

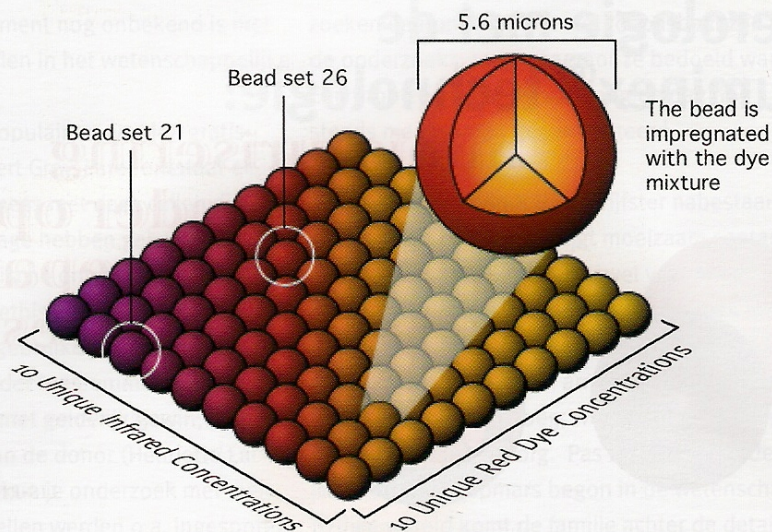
Probleem bij onderzoek van kleine knaagdieren is het kleine volume serum dat per dier kan worden verkregen. Het aantal testen dat er mee kan worden gedaan is beperkt en na afloop is meestal nauwelijks wat materiaal over voor herhaling van testen of confirmatieonderzoek. Indien er te weinig serum is van een dier voor het uitvoeren van alle testen, zijn er slechts twee mogelijkheden.

- 1 Meer muizen bloeden: bij een steekproefgrootte van 9-10 zoals geadviseerd door FELASA (9) wordt het aantal dan 18-20.
- 2 Aantrekkelijker is als de test kan worden uitgevoerd met een (veel) kleiner serumvolume. Met andere woorden als de techniek nog verder kan worden geminiaturiseerd.

Sinds enige jaren bestaat de laatste mogelijkheid dankzij de ontwikkeling van de zogenoemde Luminex[®]-technologie.

Luminex[®]-technologie

- Deze technologie is ontwikkeld door Luminex Corp. (Austin Texas, USA). De technologie maakt gebruik van microscopisch kleine polystyreen bolletjes (*microspheres of microbeads*; diameter 5.6 μm) die intern zijn gelabeld (gevuld) met twee fluorescerende stoffen (*fluorophores*, Afb. 1). Wanneer deze stoffen worden bestraald door een 635 nm rode laser gaan ze licht uitzenden met een golflengte van 658 of 712 nm.
- Het is mogelijk de 658-nm/712-nm emissieverhouding zo te variëren, dat een groot aantal, bijvoorbeeld 100 verschillende fluorescentieprofielen kunnen worden verkregen (Afb. 1 www.panomics.com/images/96_2_Bead_v1.jpg).



- Er zijn dan dus 100 verschillende bolletjes die elk aan hun emissieverhouding kunnen worden herkend.
- Een bolletje kan worden gecoat met verschillende zaken.
- Het kan worden gecoat met een antigeen, waar een specifieke antistof aan kan binden.
- Het kan ook worden gecoat met een antistof, waar een antigeen aan kan binden of meer in het algemeen een stof (analyt) die men wil aantonen/meten (bijvoorbeeld cytokinen; eiwitten; oligonucleotiden).
- De binding tussen antigeen en antistof wordt zichtbaar gemaakt net als bij een conventionele ELISA, namelijk met een conjugaat, gericht tegen immunoglobuline van de diersoort. Dit conjugaat is gelabeld met een derde *fluorophore* genaamd phycoerythrine die licht uitzendt na bestraling met een tweede laser. De reactie kan worden gekwantificeerd.
- Er zijn polystyreen bolletjes verkrijgbaar die gecoat zijn met antigene epitopen van verschillende micro-organismen.
- Er zijn ook ongecoate bolletjes te koop; die naar believen met eigen antigenen kunnen worden gecoat.
- Antigeen-gecoate bolletjes kunnen worden gemengd (2000-2500 bolletjes per antigeen) in een reactievat.
- Hieraan wordt vervolgens 1-5 μl te testen serum toegevoegd.
- Het hele proces wordt uitgevoerd in een apparaat, bijvoorbeeld een Luminex-analyzer (Afb. 2)
- De eerste laser stelt de identiteit van het bolletje aan de hand van de emissieverhouding. De tweede laser meet phycoerythrine als teken dat antistoffen aan antigeen zijn gebonden.



- * In de huidige ELISA moet op ieder antigeen afzonderlijk worden getest. Het aantrekkelijke van de nieuwe technologie is dat in een heel klein volume serum tegelijkertijd antistoffen kunnen worden gemeten tegen meerdere antigenen. Het testpanel kan heel gemakkelijk naar behoefte worden gevarieerd. Het panel kan bestaan uit antigenen van verschillende virussen, maar ook uit verschillende antigenen van een bepaald virus, bijvoorbeeld de virus specifieke VP- en genus specifieke NS-eiwitten van parvovirussen.
- * In de literatuur komt toepassing van de Luminex-technologie voor onder verschillende aanduidingen, zoals de multiplex fluorescent immunoassay (MFI), multiplex microbead immunoassay (MMIA) en de multiplexed fluorometric immunoAssay™ (MFIA™) van Charles River Labs.
- * Er is inmiddels een aantal publicaties over toepassing van de technologie in het serologisch onderzoek van proefdieren, vooral dat op virale infecties. Deze publicaties claimen in het algemeen dat de gevoeligheid en de specificiteit van de testen gelijk en dikwijls groter is dan van conventionele ELISA (6, 7, 8).

Validatie

- Het ligt voor de hand dat de technologie of een variant daarvan in de komende jaren zal worden toegepast door testlaboratoria die actief zijn in de proefdierwereld.
- Slimme technologie garandeert niet dat testuitslagen meer valide zijn dan die werden behaald met een 'oude' methode.
- De beperkingen van de nieuwe technologie zijn dezelfde als die van de huidige ELISA, zoals fout-positieve testen door niet-specifieke binding van antistoffen.
- Ruim tien jaar geleden zijn door de FELASA aanbevelingen geformuleerd voor de kwaliteit van laboratoria die testen uitvoeren in het kader van de kwaliteitscontrole van proefdieren (5). Van belang zijn vooral vakdeskundigheid en de toepassing van gevalideerde methoden.
- Voorafgaand aan het gebruik van nieuwe technologie moeten de resultaten worden vergeleken met die van de huidige, 'klassieke' serologie.
- Dit moet in principe per test, dat wil zeggen per 'antigeen-diersoort-combinatie'
- De vraag rijst dan: 'hoe goed is de 'klassieke' serologie'?

- De huidige testmethoden zijn vooral de ELISA en de IFA.
- Beide methoden zijn de opvolgers van nog oudere en vaak minder gevoelige methoden zoals de complementbindingstest (CF), de hemagglutinatie remmingstest (HAI) en de directe agglutinatie.
- De serologiegeschiedenis gaat zover terug dat het moeilijk en meestal wellicht onmogelijk is te achterhalen hoe goed het fundament onder vooral de virale serologie is.
- Er lijkt reden dit fundament opnieuw te onderzoeken ondermeer door toepassing van moleculaire technieken bij het confirmatieonderzoek (2).

Standaardisatie

Bekend probleem bij toepassing van serologie met behulp van ELISA en IFA is het optreden van verschillen in resultaten tussen laboratoria (3, 4). Deze zijn verklaarbaar uit onder andere de keuze van de virusstam voor de antigeenbereiding; de methode van kweek (op welke cellen, hoe lang, hoe geoogst) en zuivering van het antigeen. Zelfs bij gebruik van dezelfde middelen komen verschillen voor, o.a. door de keuze van controlesera, conjugaten, serumverduunningen, de gewenste gevoeligheid en specificiteit van de test.

Standaardisatie kan worden bevorderd door gebruik te maken van kant en klare antigeen gecoate bolletjes of testkits van een beperkt aantal leveranciers. Het aantal leveranciers is nu nog betrekkelijk klein. Standaardisatie wordt lastiger indien testlaboratoria zelf beads gaan coaten met eigen antigenen. Dan ontstaat geheide variatie door verschillen in wijze van antigeenbereiding. De Luminex-technologie lost het probleem van verschillen in testresultaten tussen laboratoria niet op.

Literatuur

- 1 Boot R. *Development and validation of ELISAs for monitoring bacterial and parasitic infections in laboratory rodents and rabbits*. Scand J Lab Animal Science 28; 2001: 44-50
- 2 Boot R. *Ook positieve virale serologie dient te worden geconfirmeerd*. Biotechniek 2009; 48: 167-170
- 3 Giammanco A, Nardone A, Pebody R et al. *European sero-epidemiology network 2: standardisation of immunoassay results for pertussis requires homogeneity in the antigenic preparations*. Vaccine 2008; 26: 4486-4493
- 4 Guy EC, Robertson JN, Cimmino M, et al. *European interlaboratory comparison of Lyme borreliosis serology*. Zentralblatt fuer Bakteriologie 1998; 287: 241-247
- 5 Homberger F, Boot R, Feinstein R et al. *FELASA guidance paper for the accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories*. Laboratory Animals 33 (1999) suppl. 1; S19 - S39.
- 6 Khan IH, Kendall LV, Ziman M et al. *Simultaneous serodetection of 10 highly prevalent mouse infectious pathogens in a single reaction by multiplex analysis*. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 513 - 519
- 7 Khan IH, Mendoza S, Yee J et al. *Simultaneous detection of antibodies to six nonhuman-primate viruses by multiplex microbead immunoassay*. Clin Vaccine Immunol 2006; 13: 45 - 52
- 8 Michel A, Waterboer T, Kist M, Pawlita M. *Helicobacter pylori multiplex serology*. Helicobacter 2009; 14: 525 - 35
- 9 Nicklas W, Baneux P, Boot R et al. *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. Lab. Animals 2002; 36: 20 - 42