

Snelle on-site en multi-analiet diagnostische testen voor microbiologische voedselveiligheid

7-6-2017, Aart van Amerongen



AgriFoodTop Symposium, Wageningen

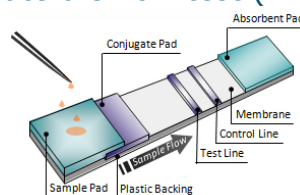
Detectie van risicofactoren

- Voedselveiligheid is afhankelijk van tijdige detectie van chemische, biologische en/of microbiologische risicofactoren
- Per test wordt meestal één factor tegelijk bepaald

- In een well van een ELISA test



- Met een laterale flow test ('zwangerschapstest')



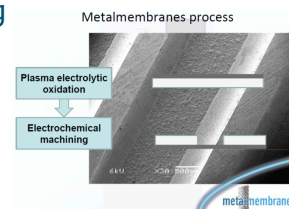
Detectie van risicofactoren

■ Trends in diagnostiek:

- Multi-analiet diagnostische devices
 - Per test detectie van meerdere analieten
 - Efficiëntie / Kostenbesparing
 - Met ± 5 analieten beantwoording van 70-90% van de diagnostische vraag
- On-site detectie
 - Tijdige analyse; direct inspelen op situatie
 - Efficiëntie / Kostenbesparing



■ Zeer belangrijk: Monstervoorbewerking

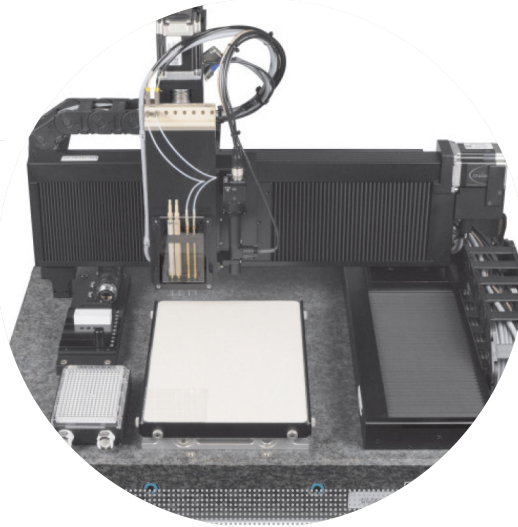


Microbiologische voedselveiligheid

■ Recent twee Topsector A&F projecten gestart:

- AF-16138: "Multi-analyte diagnostic methods to detect food pathogens"
 - ELDC, Scienion Duitsland, Han University of Applied Sciences, Wageningen Food & Biobased Research
- AF-16141: "Rapid at-line detection of environmental *Listeria* in the food industry"
 - BiosparQ, Metal Membranes, Mecon, Nestlé Zwitserland, Cargill US, Heijs Food Products, Wageningen Food & Biobased Research
 - Arla Foods Denemarken,
 - Wageningen FBR: monstervoorbewerking

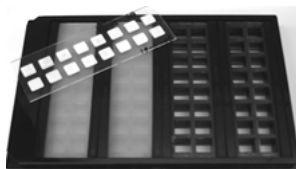
Printen van biomoleculen



BioSensing & Diagnostics (Wageningen FBR)

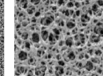
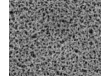
■ (Multi-analiet) testprocedures:

- Laterale flow devices met meerdere lijnen
- Microarrays op glaasjes met nitrocellulose pads
- Laterale flow devices met een microarray van spots
- Flow through devices met een microarray van spots
- Microarrays in de wells van ELISA-platen

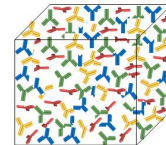


Printen van biomoleculen

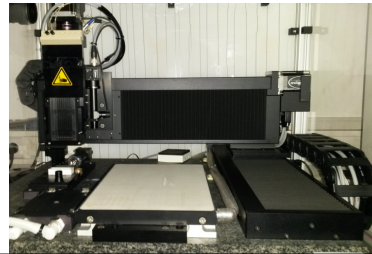
- 3D substraat: nitrocellulose
 - Grotere bindingscapaciteit per membraan oppervlakte/volume
- Scienion S3 non-contact microarrayer:
 - Tot 8 print-nozzles
 - Druppels vanaf 100 picoliter
 - Diameter van de spots 100-200 μm
 - Flexibele testprocedures
 - Controle luchtvochtigheid



1 cm² of a flat surface will bind $\pm$ 1 μg of IgG



1 cm³ of a 3D NC volume will bind 30 - 200 μg of IgG

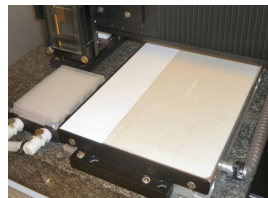


Printen van biomoleculen

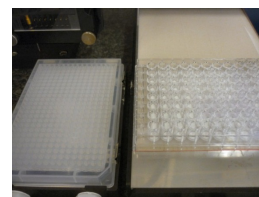
- Scienion S3 flexibel vacuum deck
 - BSD applicaties:



Glaasjes met nitrocellulose pads



Nitrocellulose membraanstroken



ELISA-platen met transparante of nitrocellulose bodem



Nitrocellulose laterale flow membranen

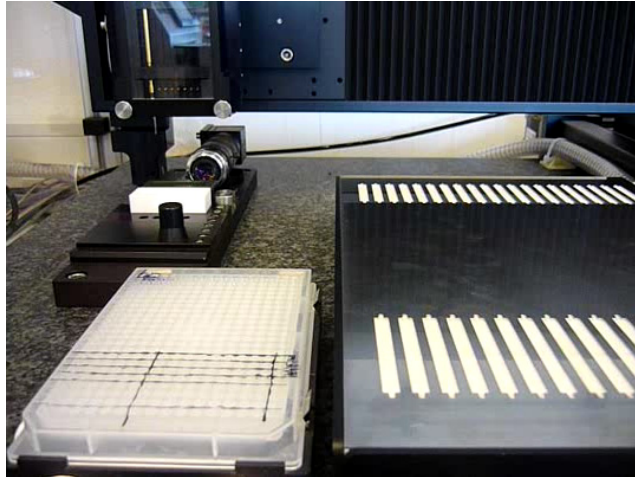


Biosensor chips

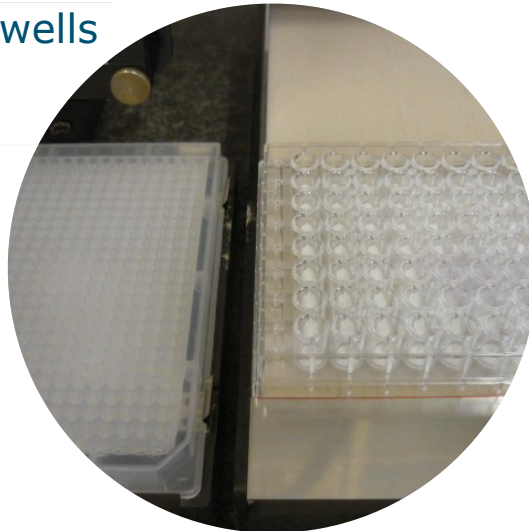


Printen van biomoleculen

- Printen van antilichamen op laterale flow membranen



Microarrays in de wells van ELISA-platen



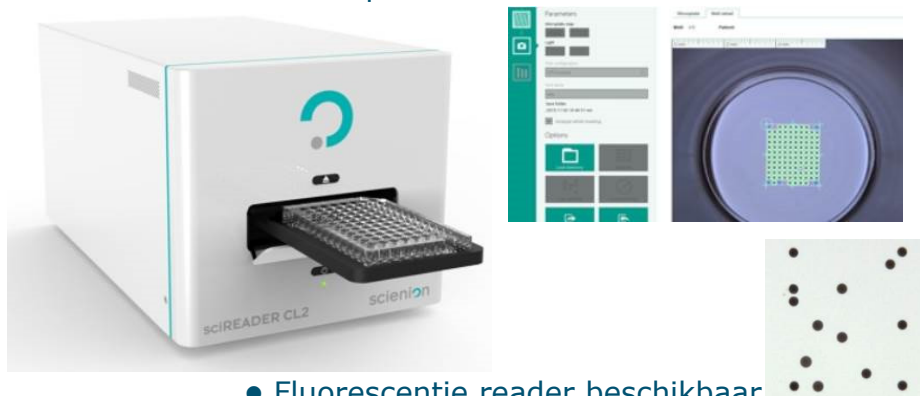
Microarrays in de wells van ELISA-platen

- Allerlei plaatmaterialen getest; beste resultaten:
 - Microtiter filtratieplaten met nitrocellulose of cellulose-acetaat bodem



Microarrays in de wells van ELISA-platen

- Uitvoering:
 - sciREADER CL2 plaat-reader



- Fluorescentie reader beschikbaar
- Chemi-luminescentie reader in ontwikkeling

Microarrays in de wells van ELISA-platen

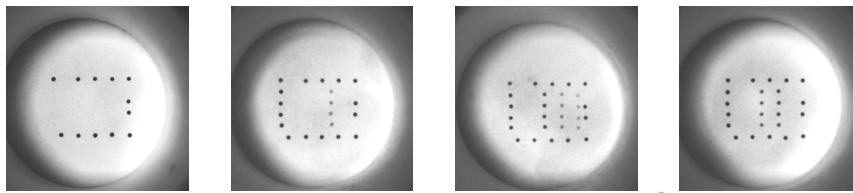
- Voorbeeld: amplicon-detectie van genen die coderen voor virulentiefactoren van Verotoxigene *E.coli* (VTEC)

- Layout (10x6):

●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

- α-AlexaFluor
- α-Digoxigenin
- α-DNP
- α-FITC
- α-TexasRed
- pos.control (IgG-biotin)
- neg.control

- Images van wells:



Microarrays in de wells van ELISA-platen

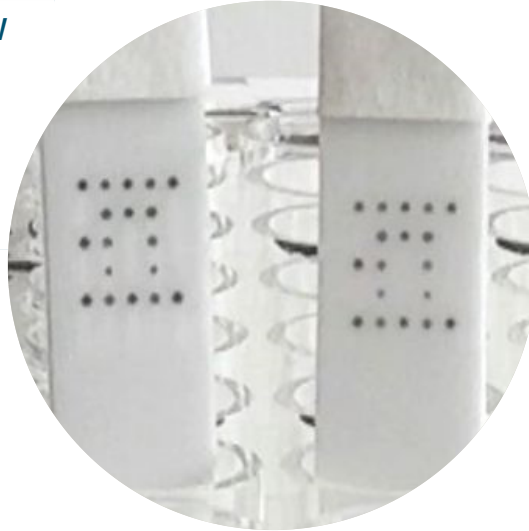
- Project AF-16138 (Multi-analyte diagnostic methods):
 - Combinatie van Microarray-ELISA met filtratie van het monster en reagentia door de wells
- Grotere monster-volumes mogelijk; tot 2 mL t.o.v. 100 µL in een normale ELISA
- Snel; vergelijkbaar met laterale flow (flow through) testen
- Incubatietijden tot 10-maal sneller



Merck/Millipore Filtratieplaat MSHAN4510; 96-wells plaat met 0.45 µm porie-grootte; Mixed Cellulose Esters membraan op een Millipore Vacuum Manifold

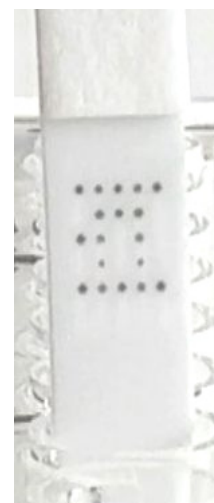


Snelle Lateral flow Microarray ImmunoAssay (LMIA)



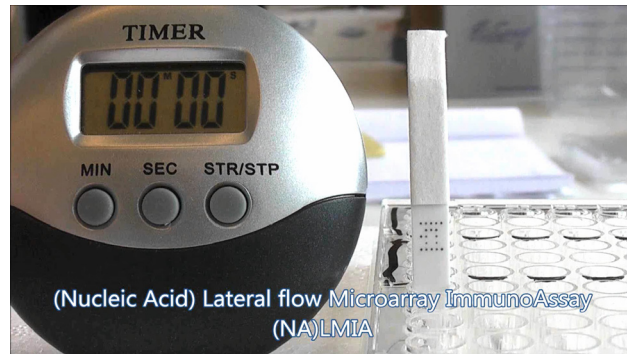
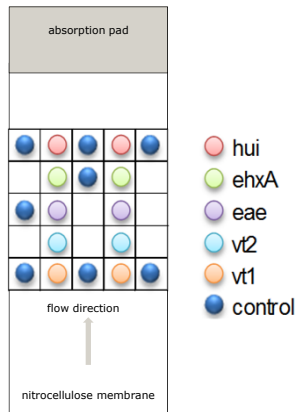
Lateral flow Microarray ImmunoAssay (LMIA)

- Microarray van 5 x 5 spots
- Geprinte antilichamen: 40 nanoliter
 - < 1 nanoliter is mogelijk
- Uitvoering gelijk aan laterale flow met lijnen
- In plaats van 1 μL antilichaam als lijn in de test (€ 0.05):
 - 40 nL tot < 1 nL per antilichaam
 - 25 to 1000 keer goedkoper



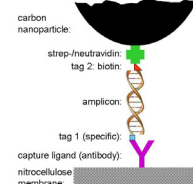
Nucleic Acid LMIA VTEC virulentiefactoren

■ Microarray layout:



Verotoxigenic *E. coli* virulence factors:

Multiplex PCR	hui:	α-Cy5
	ehxA:	α-DNP
	eae:	α-DIG
	vt2:	α-FITC
	vt1:	α-TxR
	control:	IgG-biotin



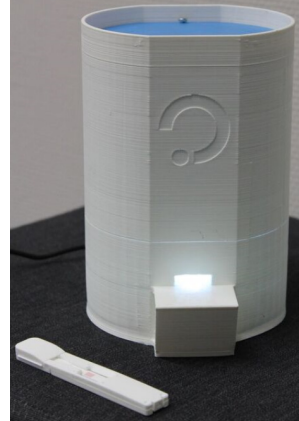
Reading spots in laterale flow assays



Real-time video reader

Analyse van LMIA spots door video recording

- Gesloten box met digitale video-camera en een LED-belichting in een ring-vorm

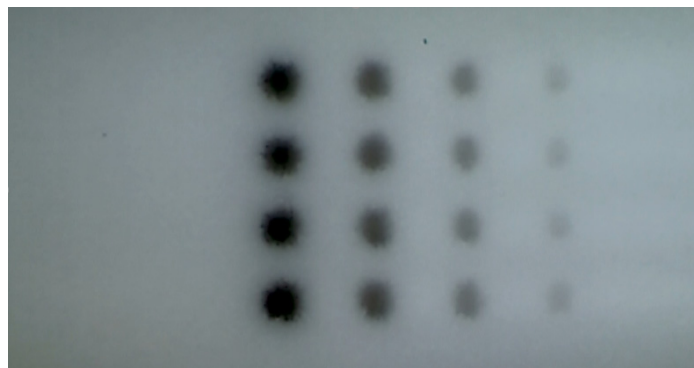


Samenwerking met HAN University of Applied Sciences:
Jeroen Veen (Digital Signal Processing, Healthcare Technology),
Hugo Arends (Embedded Vision Design)



Analyse van LMIA spots door video recording

- Finaal doel: Kwantificeren van biomarkers
- Detectie van een bloed-biomarker
- Verdunningsreeks van antilichamen

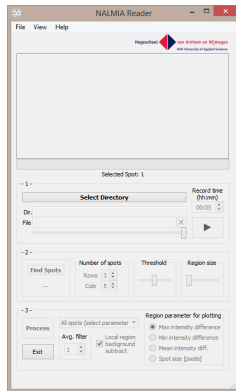


Versnelde video van 5 minuten test

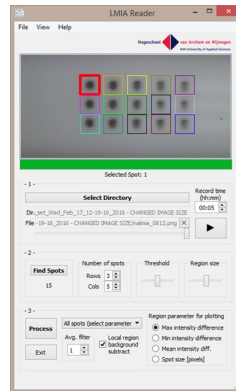


Analyse van LMIA spots door video recording

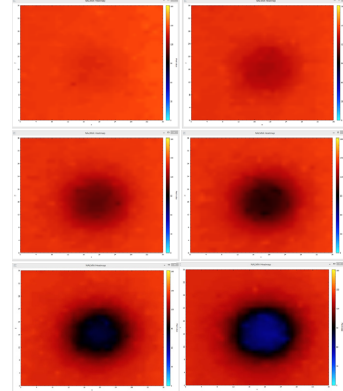
■ Enkele software opties:



User interface



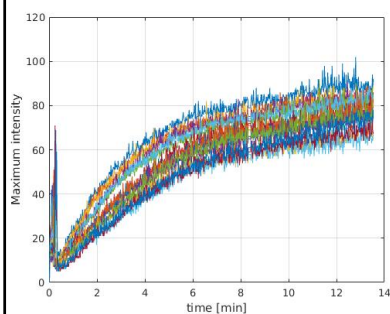
Spots worden herkend



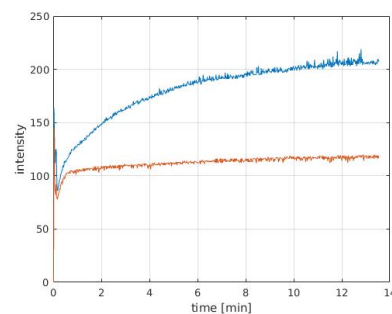
Heat maps

Analyse van LMIA spots door video recording

■ Analyse van de toename van spot-signalen in de tijd



Multi-spot intensiteitstoename



Single spot analyse

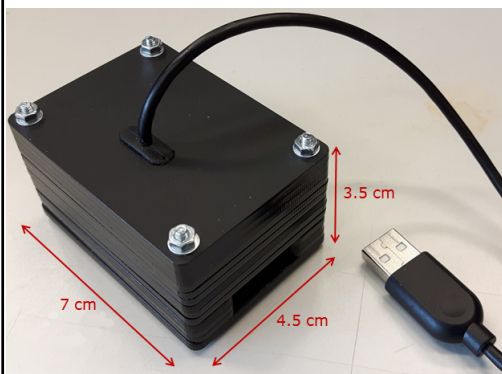
Analyse van LMIA spots door video recording

- Finale video reader heeft een kleine behuizing (5x5x5 cm)
 - LED-technologie met ring-verlichting
 - Real-time video reading
 - Data transfer interface (Wifi / Bluetooth / NFC)
 - Lage kosten (€ 50 tot € 250)
- Additionele ontwikkeling: smartphone app die data ontvangt van de video reader en verstuurd naar server/platform/computer

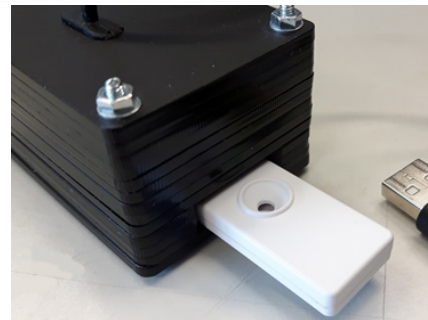


Analyse van LMIA spots door video recording

- Stand van zaken:



Jeroen Veen, HAN - Arnhem

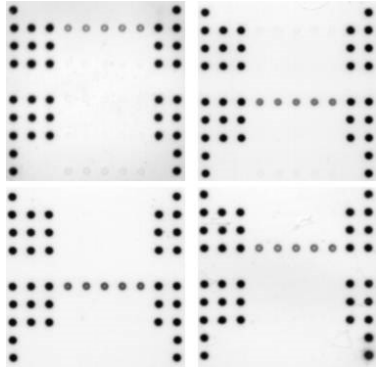


Optie:



Topsector A&F projecten

- Looptijd projecten tot eind 2019
- Open voor additionele bedrijfspartijen



Hartelijk dank voor
uw aandacht



aart.vanamerongen@wur.nl