Inmunoensayos para cianotoxinas

Simposio de Cianobacterias y Cianotoxinas. Impacto ambiental Implicaciones en Salud Pública y Potencial Biofarmacéutico

Guadalajara, Mexico – 28 mayo-4 junio 2018

Beatriz Brena, Ph. D
Profesor Agregado de Bioquímica, Facultad de Química,
Universidad de la República, Uruguay

Esquema de la clase

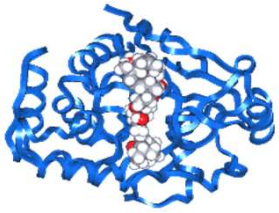
- Inmunoensayos:
  - principio de funcionamiento
  - como se generan
  - que información producen
  - que cuidados hay que tener
  - diferentes formatos

- Cómo se comparan sus resultados con respecto a métodos analíticos (HPLC, MALDI-TOF).

Distintas metodologías para la determinación de cianotoxinas

•Métodos biológicos

•Métodos bioquímicos



bioensayos

•Métodos Inmunológicos

Bastante generales
sensibles , sencillos

•Métodos Instrumentales

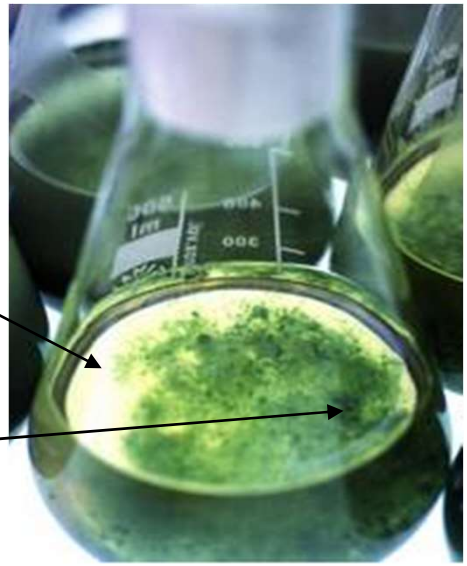
Métodos fisicoquímicos

Consideraciones previas sobre el muestreo

Donde tomar la muestra?

- Es muy difícil tomar una muestra representativa en presencia de floraciones.
- Para la evaluación de riesgos es importante muestrear y analizar las zonas de acumulaciones.
- Dependiendo del objetivo del estudio puede interesar tomar muestras a diferentes profundidades y a diferentes horas del dia.

¿Qué toxinas medimos?



Toxinas libres

Toxinas intracelulares

Toxina total

Los distintos métodos analíticos determinan toxinas en solución

Se requieren métodos muy sensibles para poder detectar los valores guía para agua potable o recreacional

Valores guía de la OMS

Microcistinas

Agua potable

< 1 μg/L MC-LR

Aguas recreacionales (niveles de riesgo)

Bajo: 2-4 μg/L, efectos de irritación piel, alergia

Medio: 20 μg/L, posible hepatotoxicidad por ingestión

Alto: 20-2000 μg/L espumas (scums)

EPA United States Environmental Protection Agency

Office of Water
820F15003
June 2015

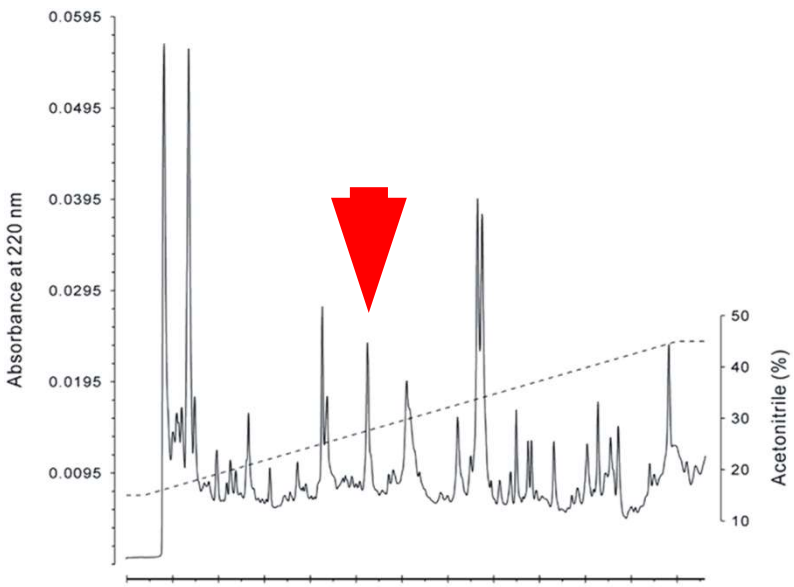
2015 Drinking Water Health Advisories for Two Cyanobacterial Toxins

10-DAY HEALTH ADVISORIES	LEVEL
Microcystins	
Children pre-school age and younger (under 6 years old)	0.3 μg/L
School-age children (6 years and older)	1.6 μg/L
Cylindrospermopsin	
Children pre-school age and younger (under 6 years old)	0.7 μg/L
School-age children (6 years and older)	3.0 μg/L

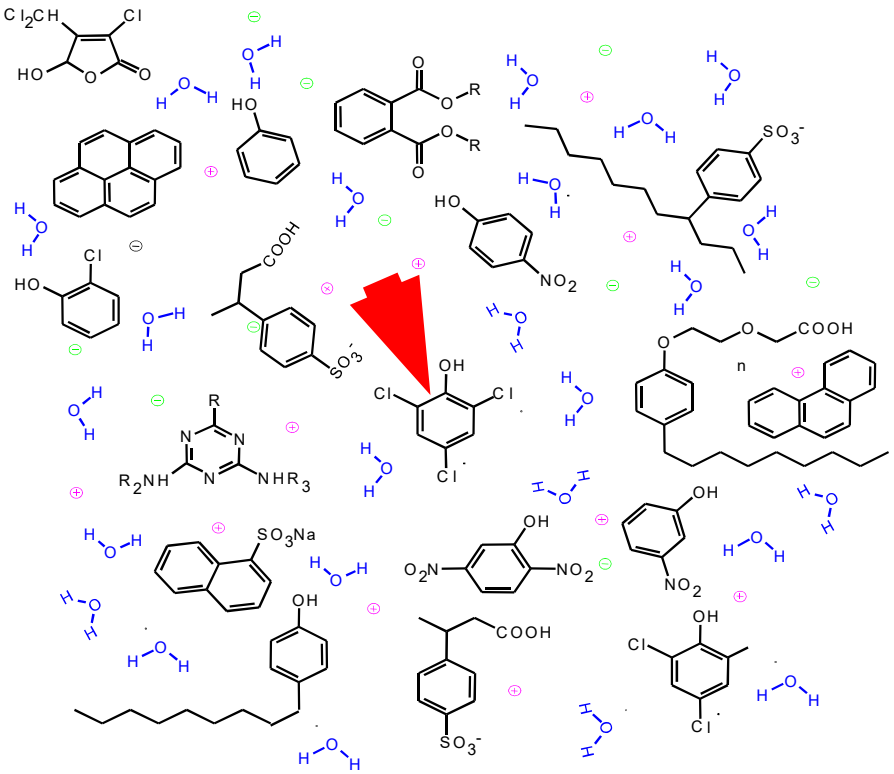
Table 1. U.S. EPA's National 10-Day Health Advisories

Los inmunoensayos (ELISA) como herramientas analíticas

Análisis instrumental: Separación

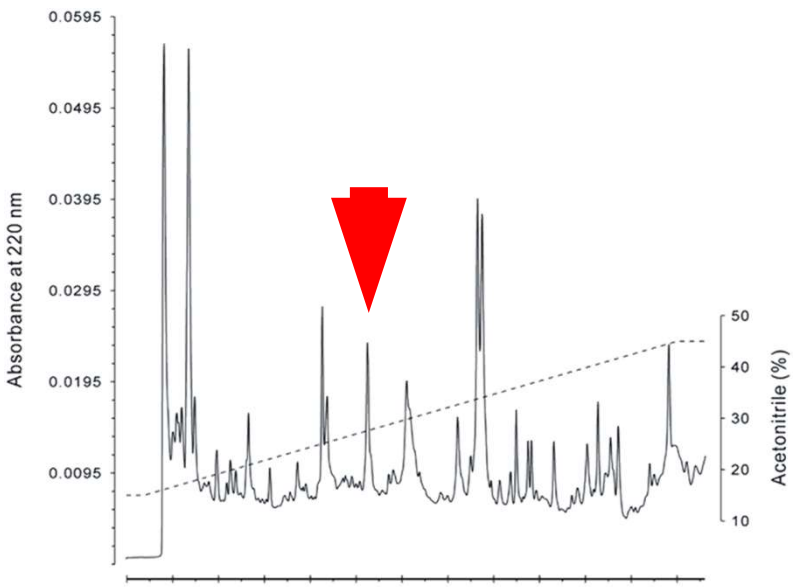


Inmunoensayos: Reconocimiento específico

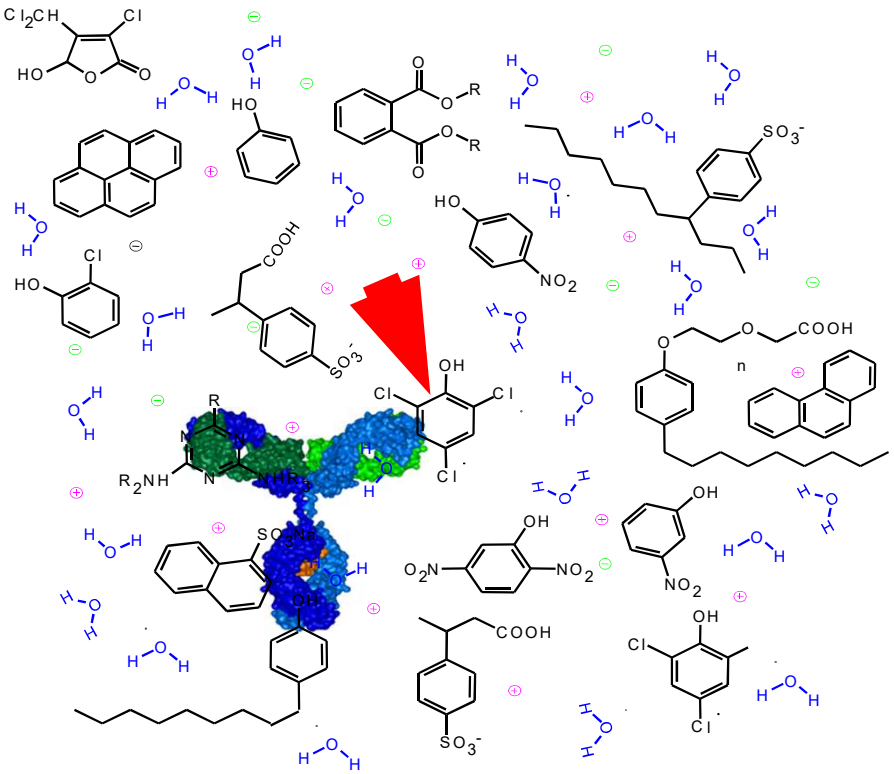


Los inmunoensayos (ELISA) como herramientas analíticas

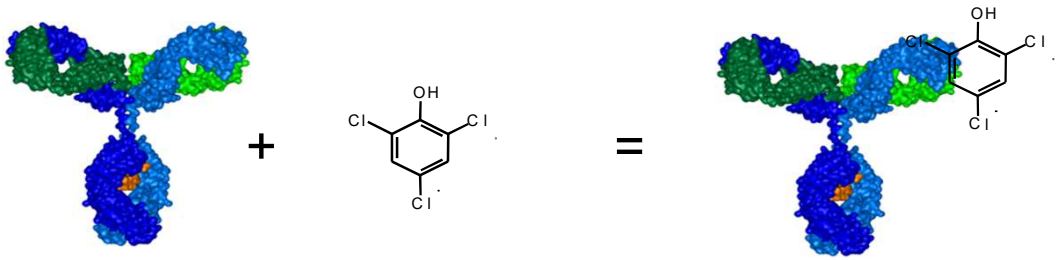
Análisis instrumental: Separación



Inmunoensayos: Reconocimiento específico



Los inmunoensayos como herramientas analíticas



Ab (anticuerpo) + Ag (analito) $\rightleftharpoons$ Ac-Ag

CARACTERÍSTICAS CLAVE DE LA UNIÓN Ag-Ac

- **Alta Afinidad (Baja K_D) 10^{-9}- 10^{-11}**
- **Especificidad: amplia o de grupo**

Los inmunoensayos como herramientas analíticas

- **Ventajas**

- Alta sensibilidad y especificidad
- Menor pretratamiento de la muestra
- Permite el procesamiento en paralelo de un alto número de muestras
- Adaptables a aplicaciones de campo
- Simples y fáciles de instrumentar en laboratorios con poco equipamiento
- **Costo-efectivos…..Bajo costo?**

Costo/ muestra análisis contratados

LC-MS/MS	**150-400 USD**
ELISA	**20-150 USD**

http://neiwpcc.org/neiwpcc_docs/Cyano-ServicesList-2016_FINAL.pdf

- **Desventajas**

- Largo tiempo de desarrollo
- Un ensayo por compuesto o grupo de compuestos
- Posible efecto matriz?

Los inmunoensayos permiten obtener datos con muy baja una baja inversión inicial y bajo costo operativo.

Costo/ muestra análisis en el laboratorio propio

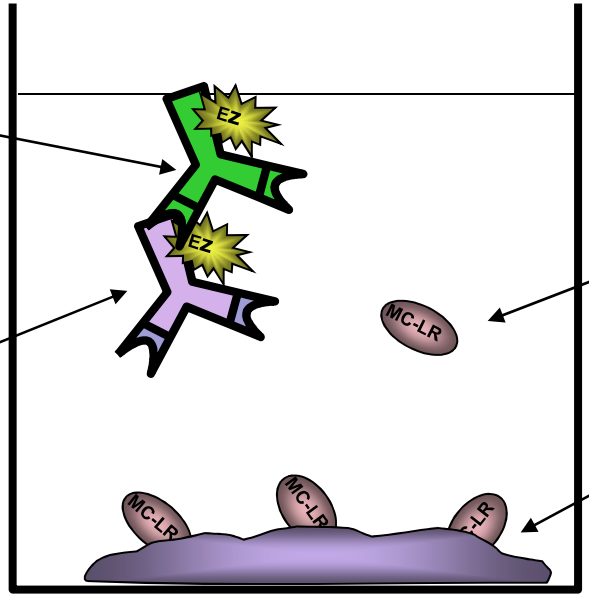
ELISA comercial	USD 20 – 50
ELISA desarrollo propio*	**< USD 1**

***No incluye el costo de desarrollo**

Ejemplo de un inmunoensayo para microcistinas

Segundo anticuerpo

Anticuerpo



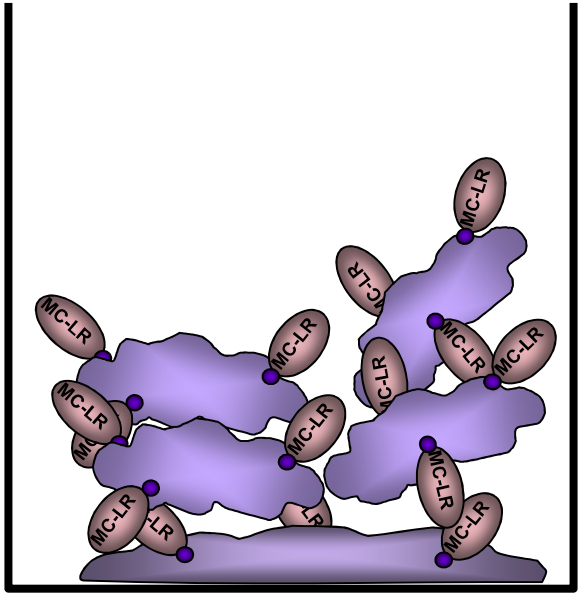
Microcistina presente en la muestra a medir

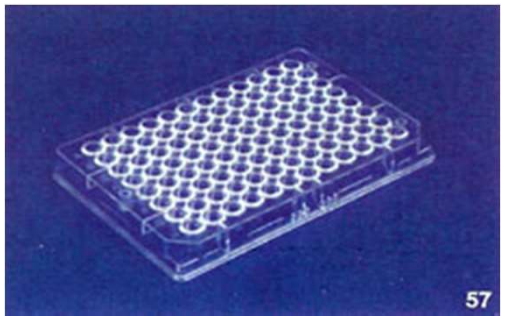
Antígeno de competición: microcistina unida covalentemente a una proteína (carrier)

En el formato que se muestra la microcistina libre e inmovilizada compiten por el anticuerpo.

En otros formatos, el anticuerpo se encuentra inmovilizado, y un conjugado microcistina-enzima y la microcistina de la muestra compiten por la unión al mismo.

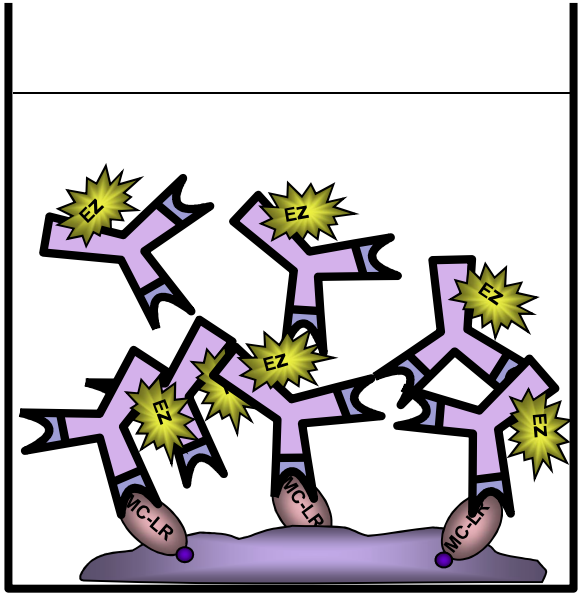
El inmunoensayo para microcistina es un ensayo de competición por el anticuerpo entre la microcistina libre (en la muestra) e inmovilizada (adsorbida en la placa)





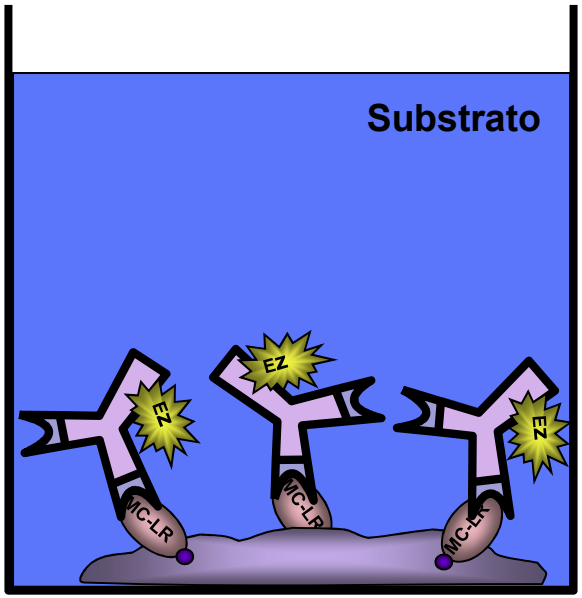
Sensibilización de la placa

El inmunoensayo para microcistina es un ensayo de competición por el anticuerpo entre la microcistina libre (en la muestra) e inmovilizada (adsorbida en la placa)

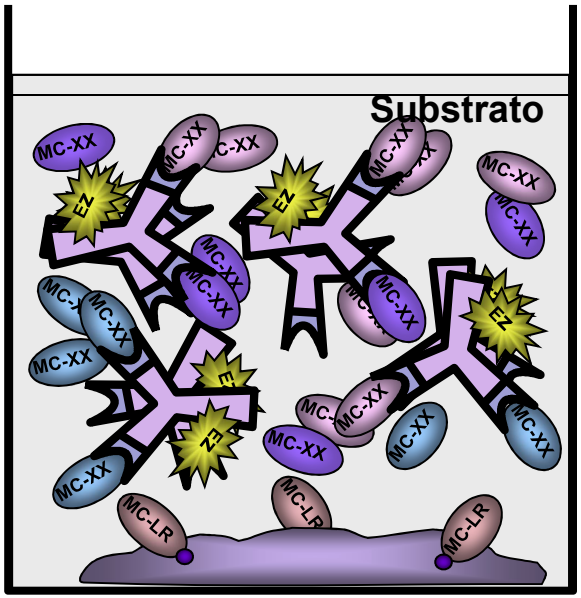


En auscencia de MC

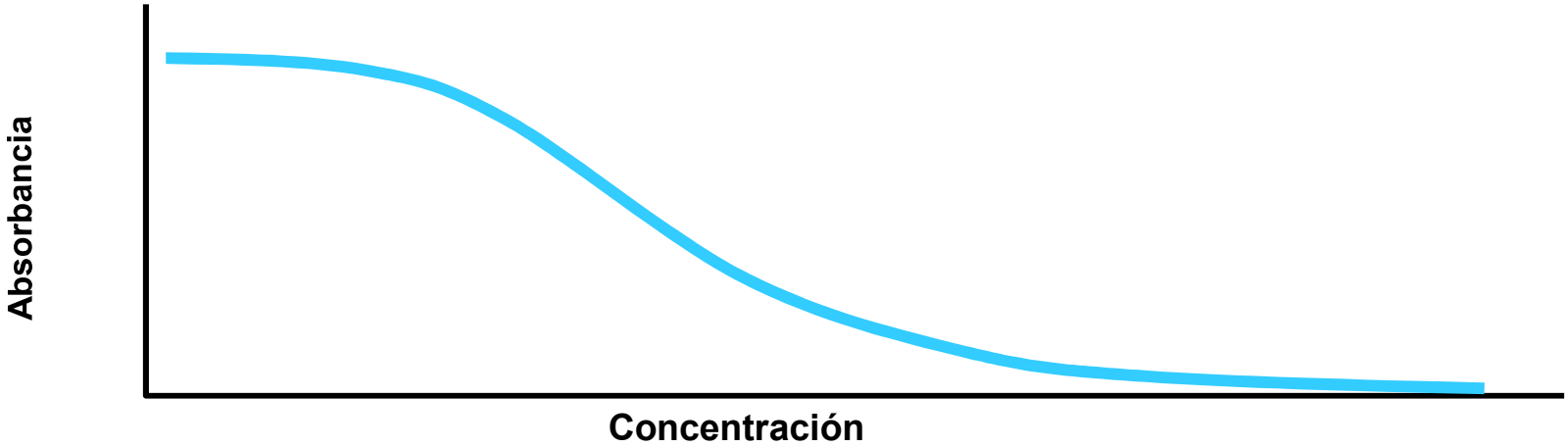
El inmunoensayo para microcistina es un ensayo de competición por el anticuerpo entre la microcistina libre (en la muestra) e inmovilizada (adsorbida en la placa)



En auscencia de MC

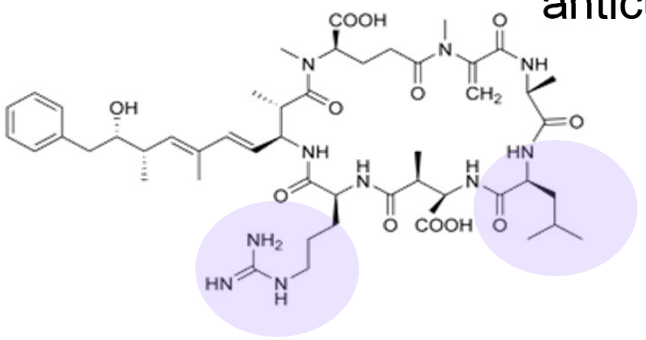


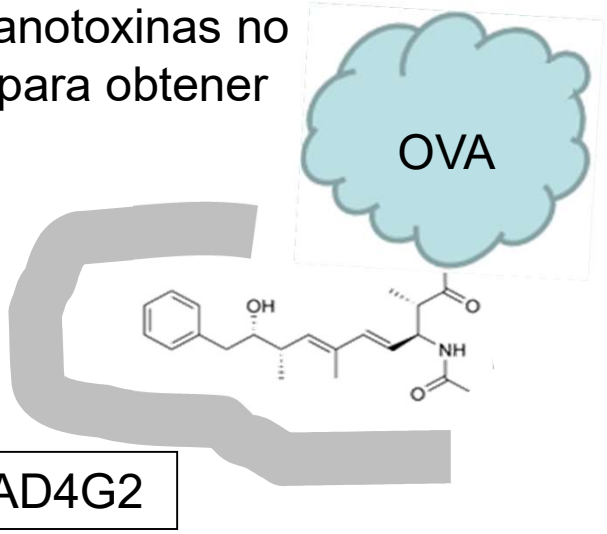
En prescencia de MC

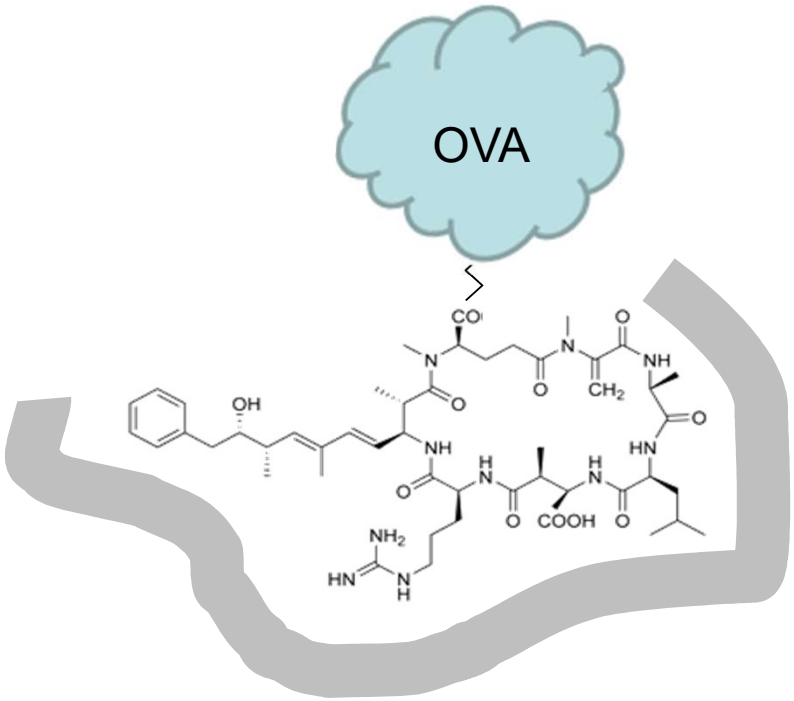


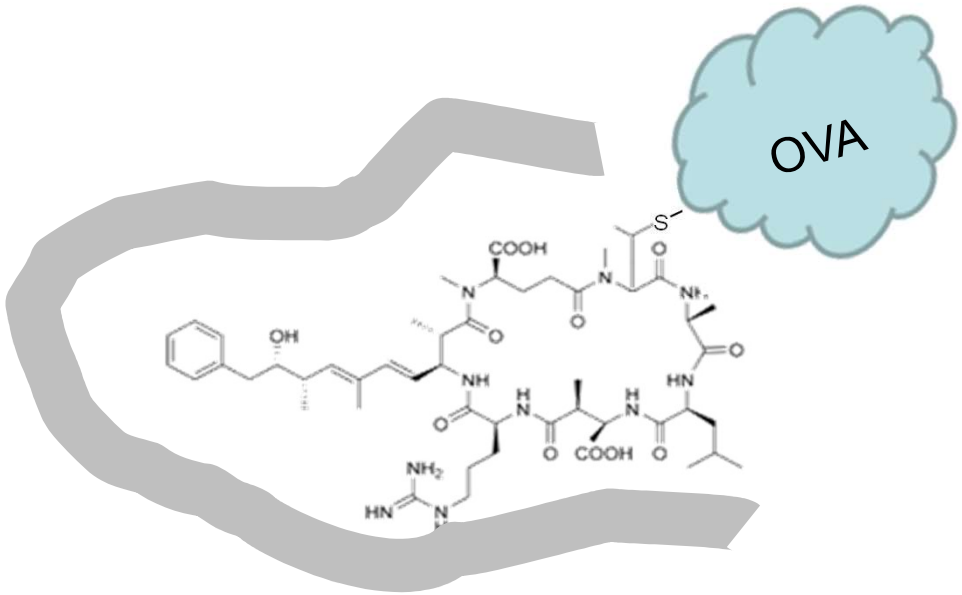
Etapas en el desarrollo de un inmunoensayo: conjugación a proteínas carrier

Las moléculas pequeñas como las microcistinas y otras cianotoxinas no son immunogénicas y deben ser conjugadas a proteínas para obtener anticuerpos

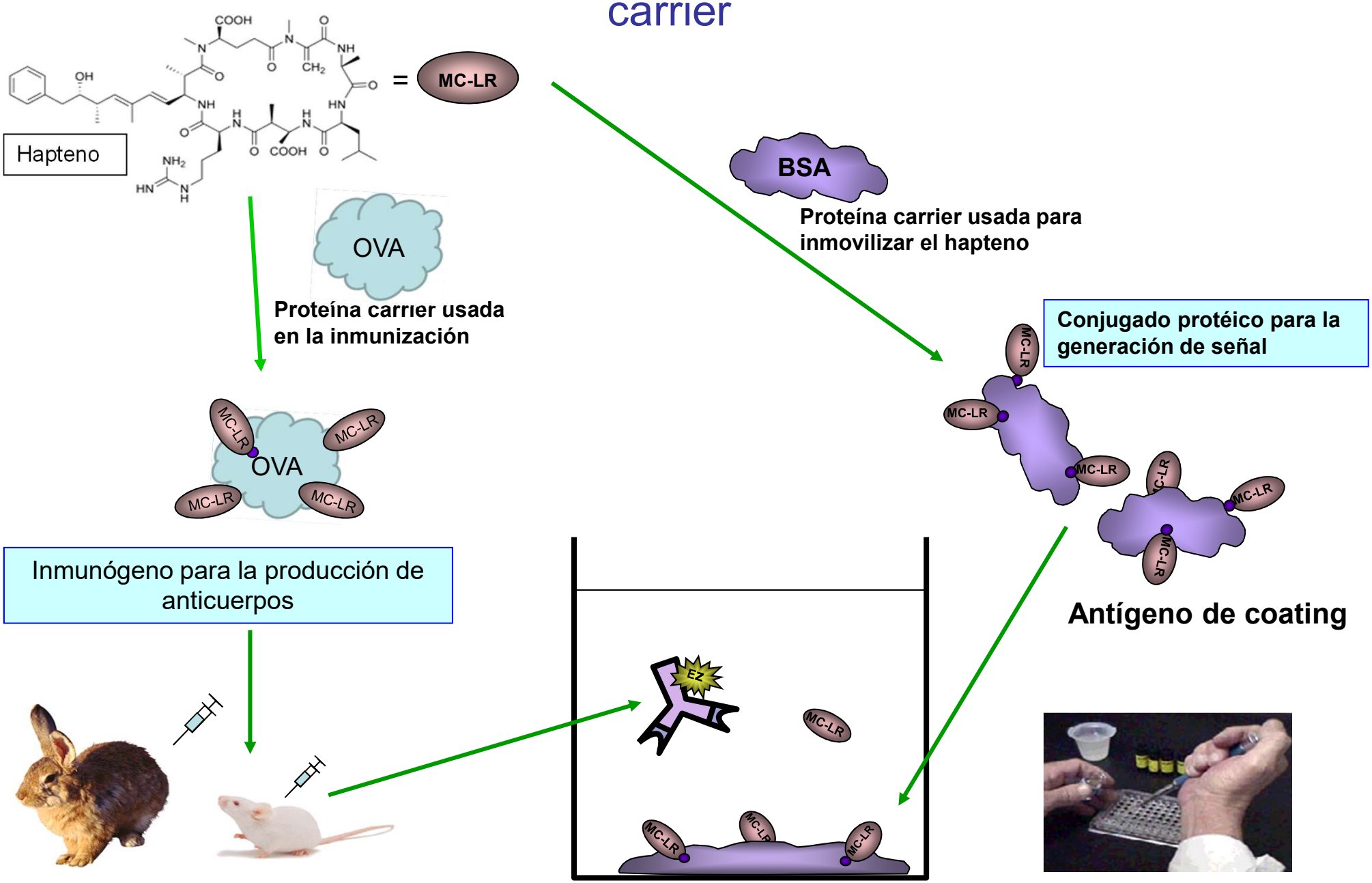






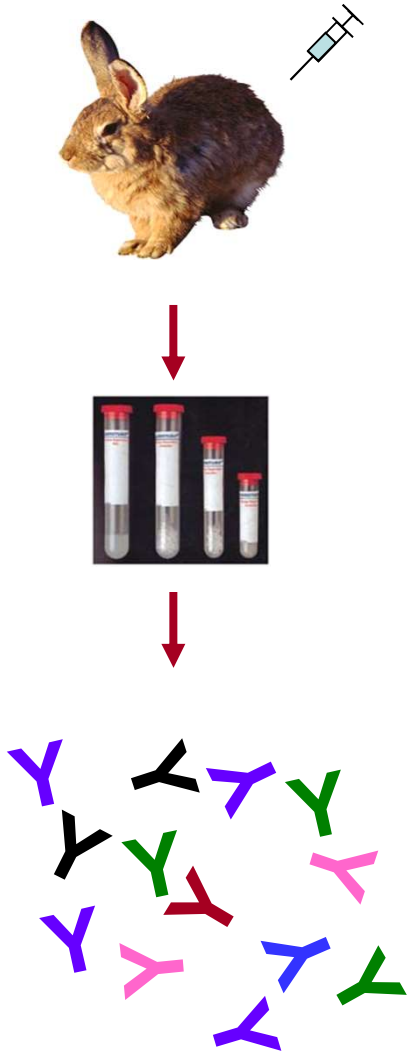


Etapas en el desarrollo de un inmunoensayo: conjugación a proteínas carrier



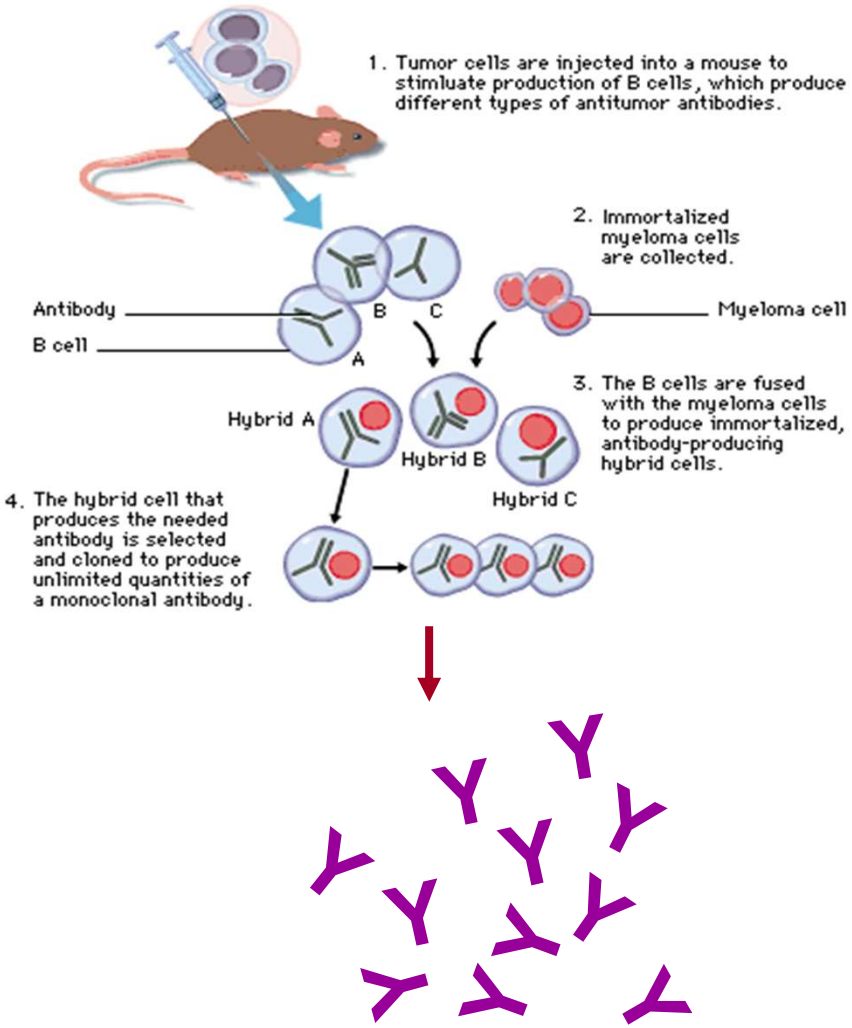
Etapas en el desarrollo de un inmunoensayo: generación de anticuerpos

Anticuerpos policlonales



Poblacion heterogénea de anticuerpos

Anticuerpos monoclonales



Poblacion homogenea de anticuerpos

Policlonal vs Monoclonal

VENTAJAS

Policlonales

- Baratos
- Desarrollo más rápido y más sencillo

Monoclonales

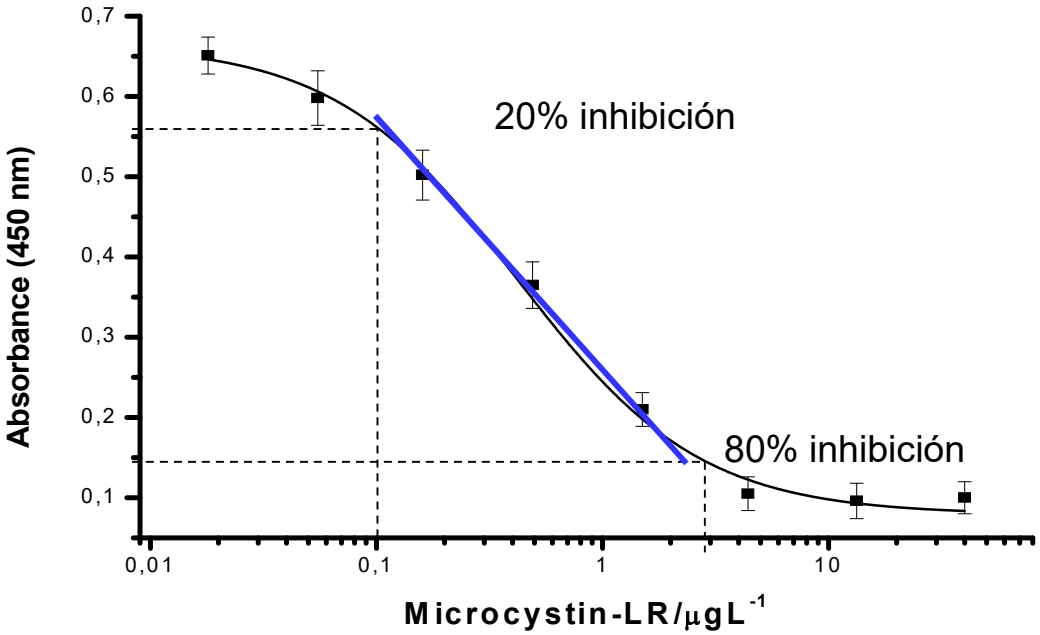
- Suministro Ilimitado
- Producción altamente reproducible
- Más especificos (menor reactividad cruzada con otros analitos)

DESVENTAJAS

- Suministro limitado
- Baja reproducibidad entre diferentes lotes
- Potencial reactividad cruzada con otros analitos

- Costosos
- Desarrollo lento y con mayores dificultades técnicas

La curva típica del ensayo de MC desarrollado en Uruguay



Para la adaptación en un formato de "kit" los puntos que definen la región dosis respuestas entre el 20-80% de inhibición se suministran como soluciones preparadas de estándar. La concentración de la muestra problema se obtiene por interpolación.

IC50 = 0.35 μg/L ± 0.07

Límite de cuantificación 0.1 μg/L

Reactividad cruzada para MCs y nodularina del ensayo policlonal desarrollado

Microcistina	% Reactividad cruzada
MC-LR	100
MC-DMLR	109
MC-RR	78
MC-DMRR	49
MC-YR	78
MC-LF	83
MC-LY	76
MC-LW	58
MC-WR	57
MC-HtyR	135
Nodularina	80

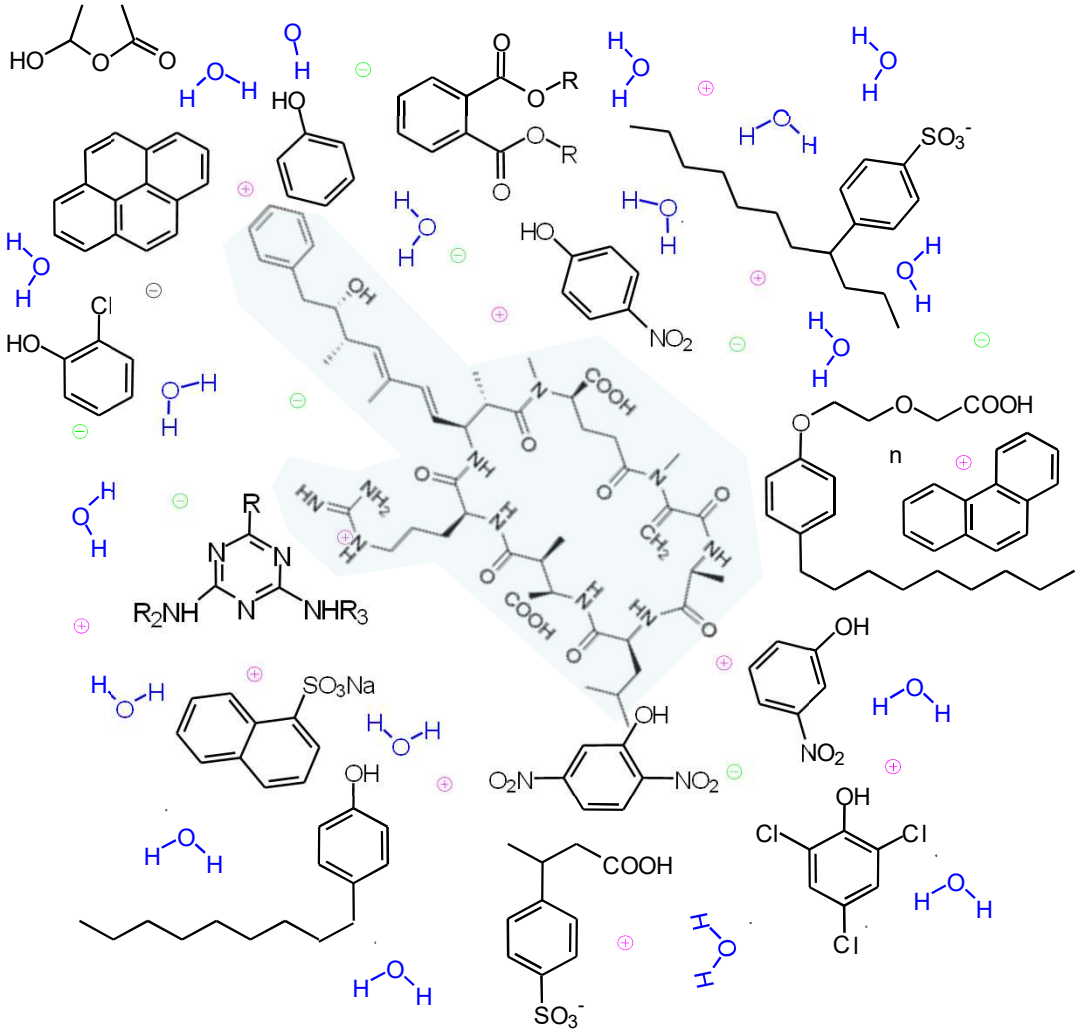
% Cross-reactivity: (IC50 MC-LR/IC50 MC X)*100

.Representa una medida global de las variantes presentes en la muestra en función de su elevada reactividad cruzada.

Microcystin	Molecular weight	Toxicity LD_{50}[2]	Organism[3]	Reference(s)
MCYST-LA	909	50	*M. aeruginosa*[s], *M. viridis*[s]	Botes *et al.*, 1984; Kaya and Watanabe, 1990
MCYST-LAba	923	NR	*M. aeruginosa*[s]	Gathercole and Thiel, 1987
MCYST-LL	951	+	*M. aeruginosa*[b]	Craig *et al.*, 1993
MCYST-AR	952	250	*Microcystis* spp.[b]	Namikoshi *et al.*, 1992a
MCYST-YA	959	NR	*M. aeruginosa*[s]	Botes *et al.*, 1985
MCYST-LR	994	50	*M. aeruginosa*[s], *A. flos-aquae*[s] *M. viridis*[s]	Botes *et al.*, 1985; Rinehart *et al.*, 1988; Krishnamyrthy *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1988
(D-Asp[3])MCYST-LR	980	160-300	*A. flos-aquae*[s], *M. aeruginosa*[s], *M. viridis*[b], *O. agardhii*[s]	Krishnamyrthy *et al.*, 1989; Cremer and Henning, 1991; Harada *et al.*, 1990b; 1991a; Luukkainen *et al.*, 1993
[Dha[7]]MCYST-LR	980	250	*M. aeruginosa*[s], *Anabaena sp.*[s], *O. agardhii*[s]	Harada *et al.*, 1991b; Sivonen *et al.*, 1992a; Luukkainen *et al.*, 1993
[DMAdda[5]]MCYST-LR	980	90-100	*Microcystis* spp.[b], *Nostoc* sp.[s]	Namikoshi *et al.*, 1992a; Sivonen *et al.*, 1992b
MCYST-RR	1,037	600	*M. aeruginosa*[s], *M. viridis*[s], *Anabaena* sp.[s]	Kusumi *et al.*, 1987; Painuly *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1988; Sivonen *et al.*, *1992a*
[(6Z)-Adda[5]]MCYST-RR	1,037	>1,200	*M. viridis*[b]	Harada *et al.*, 1990a,b
MCYST-YR	1,044	70	*M. aeruginosa*[s], *M. viridis*[s]	Botes *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1988

Chorus and Bartram, WHO 1999

¿Cómo sabemos que el valor del ELISA de una muestra se debe al contenido de MC y no a componentes de la matriz?



Puede darse por:

- Compuestos relacionados
- material particulado
- pH
- fuerza iónica
- material orgánico
- proteínas, lípidos etc.

En el caso de espumas o matas, la alta concentración permite diluir la muestra y disminuir el efecto matriz

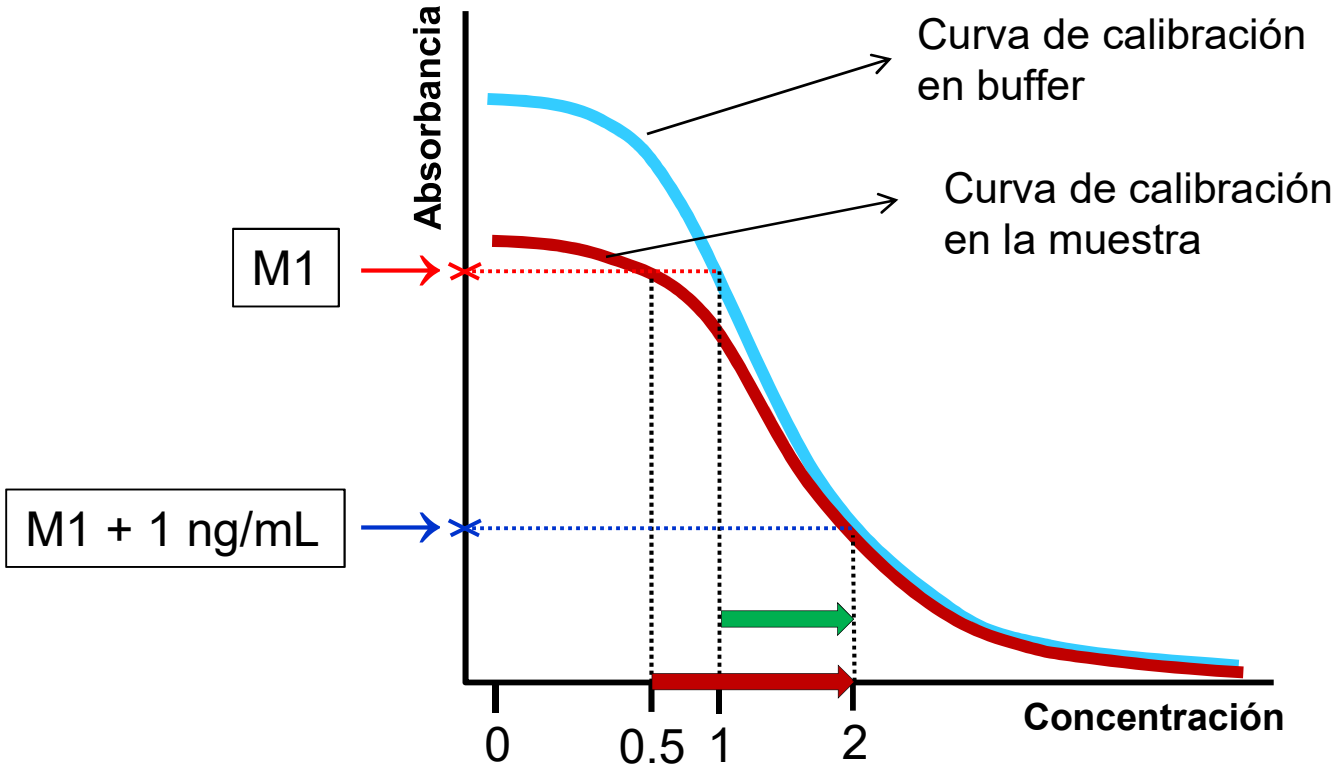
Evaluación:

- El paralelismo de la curva estandar con y sin matriz

- Si no se dispone de matriz blanco, entonces ensayos de fortificación de muestras.

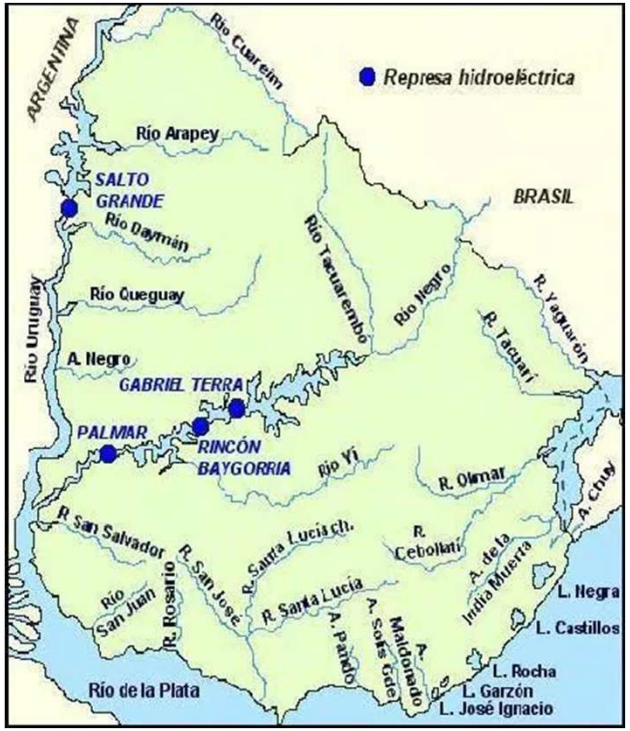
¿Cómo sabemos que el valor del ELISA de una muestra se debe al contenido de MC y no a componentes de la matriz?

Para una dada muestra la apreciación del efecto matriz, por ejemplo, requiere el entendimiento del principio de funcionamiento del kit y del disponer de estándares de MCs para evaluar este efecto.



Cuando el efecto de la matriz es importante, entonces debe considerarse la utilización de técnicas de limpieza de la muestra (clean-up)

Ensayo utilizado para el monitoreo de playas y de plantas de agua potable



Journal of Environmental Management 114 (2013) 63–71

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman

Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer

Macarena Pírez [a,b], Gualberto Gonzalez-Sapienza [b], Daniel Sienra [c], Graciela Ferrari [d,e], Michael Last [f], Jerold A. Last [f], Beatriz M. Brena [a,c,*]

[a] Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay
[b] Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay
[c] Servicio de Calidad y Control Ambiental, Departamento de Desarrollo Ambiental, Intendencia Municipal de Montevideo, Uruguay
[d] Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay
[e] Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA), Ministerio de Ganadería y Agricultura, Uruguay
[f] Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, School of Medicine, University of California Davis, Uni

El ELISA desarrollado hizo posible la implementación de un programa de monitoreo sostenible. Los datos revelaron niveles extremadamente altos de toxinas en las espumas cianobacterianas.

La reactividad cruzada y verificación de Kits por EPA

- With over 80+ microcystin and 10+ nodularins, most cross-reactivities are unknown!

Percent Cross-Reactivity

Microcystin Assays	MCLA	MCLF	MCLR	MCRR	MCLW	MCLY	MCYR	NODR
Monoclonal Assays								
Abraxis-DM	48	72	100	53	102	NA	64	76
Polyclonal Assays								
Abraxis-ADDA	125	108	100	91	114	NA	81	169
Beacon	5	NA	100	87	NA	NA	48	31
Envirologix	62	NA	100	54	NA	NA	35	69
Strategic Diagnostics	23	NA	100	97	NA	NA	82	66

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY

Environmental Technology Verification Program

Contact Us Search: ○ All EPA ◉ This Area Go

You are here: EPA Home » Research » ETV » Advanced Monitoring Systems Center » Verified Technologies

ETV Home
Basic Information
Where You Live
Verification Centers

Advanced Monitoring Systems Center Verified Technologies

The Advanced Monitoring Systems Center has verified technologies in the categories listed below. Each category includes a variety of documents, such as verification reports and statements, test/quality assurance plans and verification protocols.

US-EPA- Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay –

Agosto 2016

HPLC-UV
Método de referencia:
ISO 20179:2005

English

International Organization for Standardization

When the world agrees

Standards | All about ISO | Taking part | Store

Search

Standards catalogue | Publications and products

Store › Standards catalogue › Browse by ICS › 13 › 13.060 › 13.060.50 › ISO/CD 22104

ISO/CD 22104

Water quality -- Determination of microcystins -- Method using liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with pre-screening by immunoassay

General information

Current status : Under development

Edition : 1

Technical Committee : ISO/TC 147/SC 2 Physical, chemical and biochemical methods

ICS : 13.060.50 Examination of water for chemical substances

Got a question?

Check out our FAQs

Customer care

+41 22 749 08 88

customerservice@iso.org

Opening hours:
Monday to Friday - 09:00-12:00, 14:00-17:00 (UTC+1)

Life cycle

A standard is reviewed every 5 years

00 | 10 | 20 | **30.99** Committee | 40 | 50 | 60 | 90 | 95

Revisions / Corrigenda

Now under development
ISO/CD 22104

EPA METHOD 544.

DETERMINATION OF MICROCYSTINS AND NODULARIN IN DRINKING WATER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS)

METHOD 544

DETERMINATION OF MICROCYSTINS AND NODULARIN IN DRINKING WATER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS)

1. SCOPE AND APPLICATION

1.1 This is a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for determination of microcystins and nodularin (combined intracellular and extracellular) in drinking water. Accuracy and precision data have been generated in reagent water, and finished ground and surface waters for compounds listed in the table below.

Analyte	Chemical Abstract Services Registry Number (CASRN)
microcystin-LA (MC-LA)	96180-79-9
microcystin-LF (MC-LF)	154037-70-4
microcystin-LR (MC-LR)	101043-37-2
microcystin-LY (MC-LY)	123304-10-9
microcystin-RR (MC-RR)	111755-37-4
microcystin-YR (MC-YR)	101064-48-6
nodularin-R (NOD)	118399-22-7

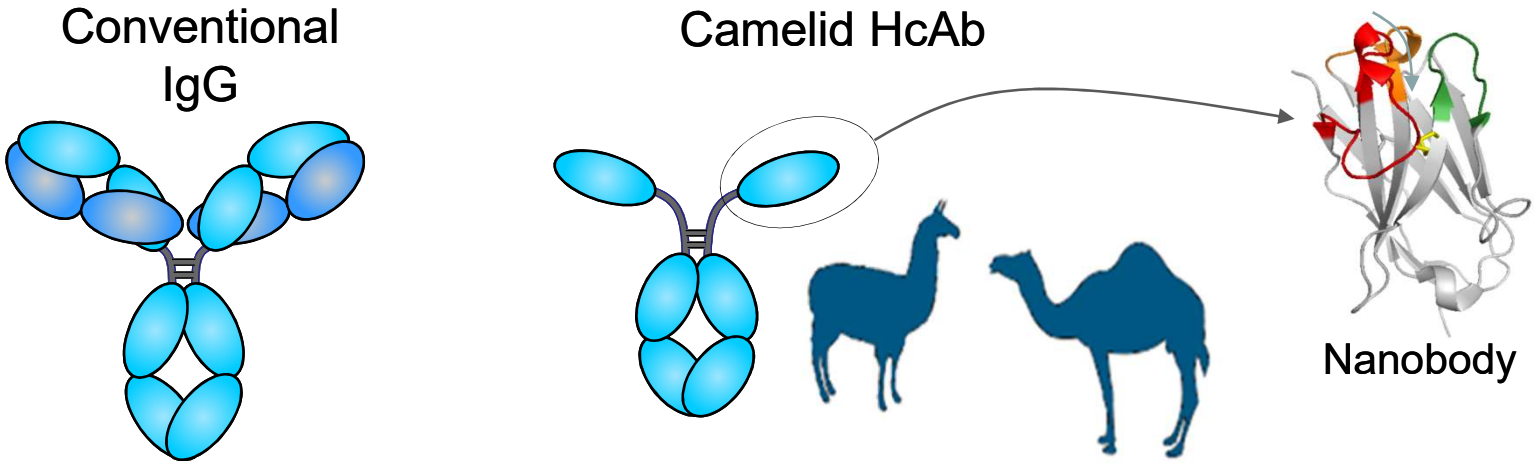
1.2. The Minimum Reporting Level (MRL) is the lowest analyte concentration that meets Data Quality Objectives (DQOs) that are developed based on the intended use of this method. The single laboratory lowest concentration MRL (LCMRL) is the lowest true concentration for which the future recovery is predicted to fall, with high confidence (99%), between 50 and 150% recovery. Single laboratory LCMRLs for analytes in this method range from 2.9-22 ng/L, and are listed in Table 5. The procedure used to determine the LCMRL is described elsewhere.[1]

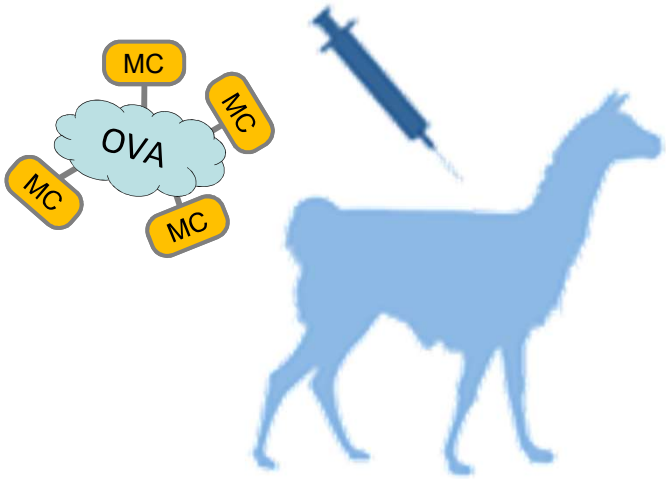
1.3. Laboratories using this method will not be required to determine the LCMRL for this method, but will need to demonstrate that their laboratory MRL meets the requirements described in Section 9.2.4.

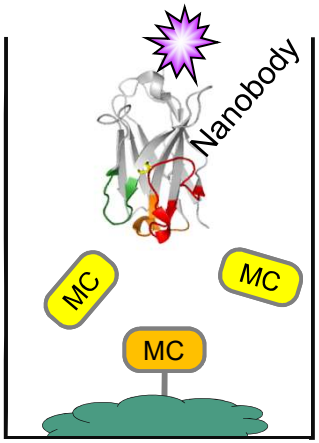
1.4. Determining the Detection Limit (DL) for analytes in this method is optional (Sect. 9.2.6). Detection limit is defined as the statistically calculated minimum concentration that can be measured with 99% confidence that the reported value is greater than zero.[2] The DL is compound dependent and is dependent on extraction efficiency, sample matrix, fortification concentration, and instrument performance. DLs for analytes in this method range from 1.2-4.6 ng/L, and are listed in Table 5.

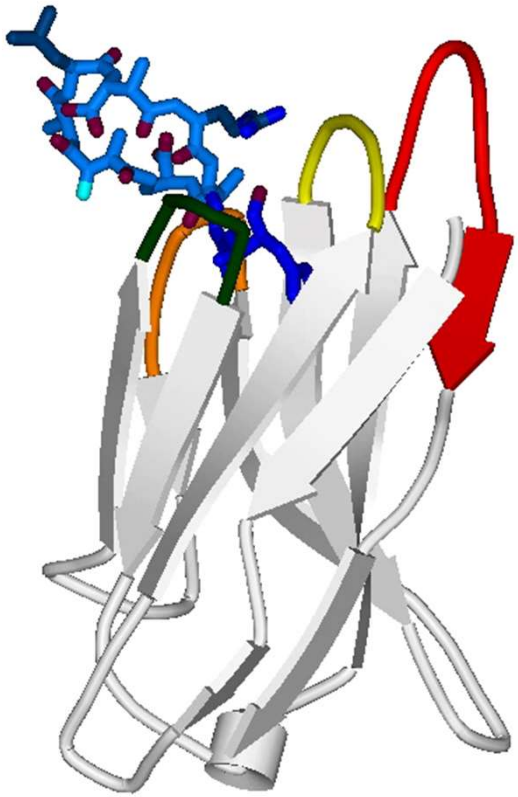
Version 1. February 2015

ELISA de nueva generación utilizando nanobodies



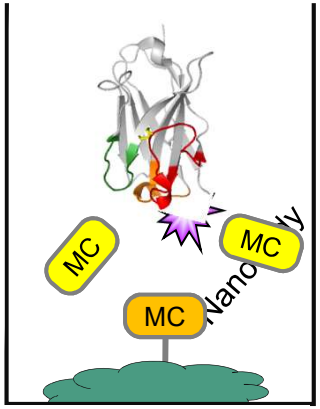






Nanobody MC-LR ELISA
Limit of Detection = 0.05 µg/L

ELISA de nueva generación utilizando nanobodies

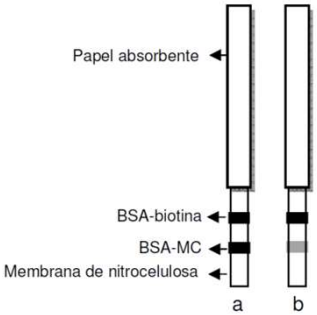


Nanobody MC-LR ELISA
LD = 0.05 µg/L

Pírez et al. Anal. Chem. 2017

Congener cross-reactivity (%)

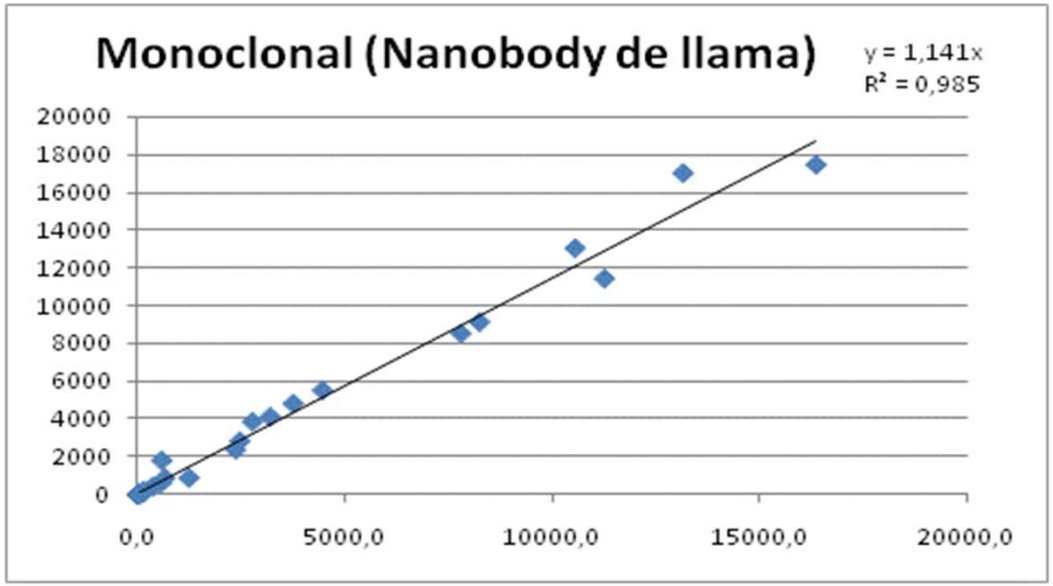
Microcystin	Clon A2	Clon H11	Polyclonal
MC-LR	100	100	100
MC-DMLR	79	88	109
MC-LA	30	36	
MC-LY	6	22	76
MC-HtyR	61	79	135
MC-YR	37	43	78
MC-LW	6	70	58
MC-WR	33	56	57
MC-DMRR	43	84	49
MC-RR	45	106	78
MC-LF	6	2	83

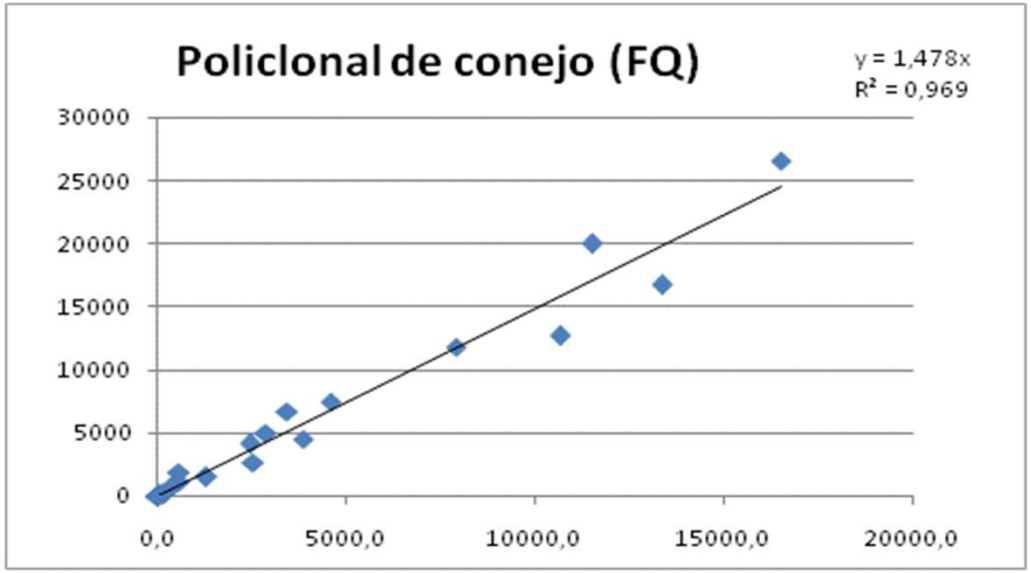


Inmunocromatografia de flujo lateral (Clon A2)
Tiras nitrocelulosa con BSA-MC, conjugado de revelado estreptavidina marcada con carbón.
a: En ausencia de MC libre,
b: en presencia de MC libre. LD 0.5 ng/mL

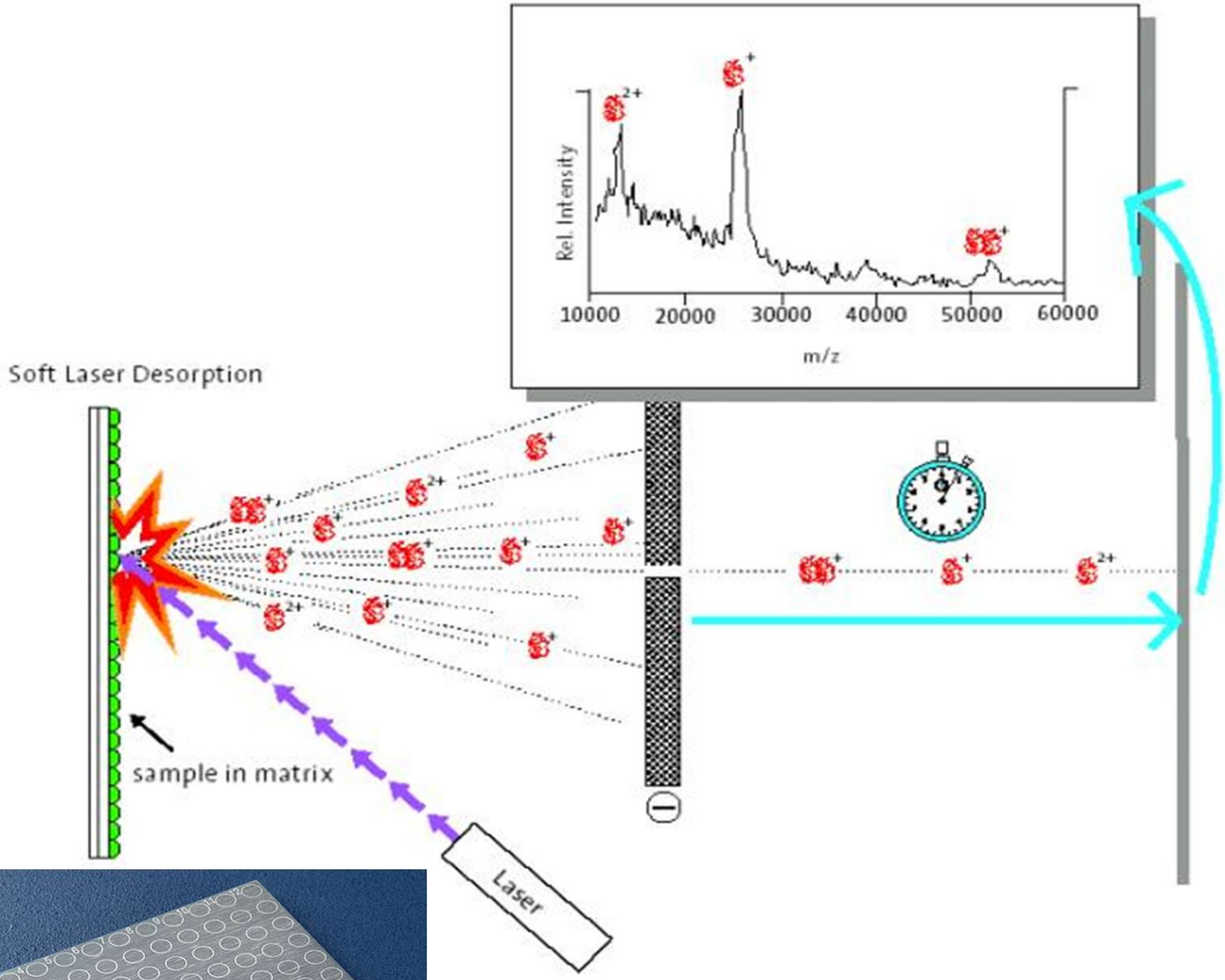
Nuevo anticuerpo monoclonal de llama más selectivo para MCs

- Comparación con Respuesta Teórica de MCs individuales por LC MSMS





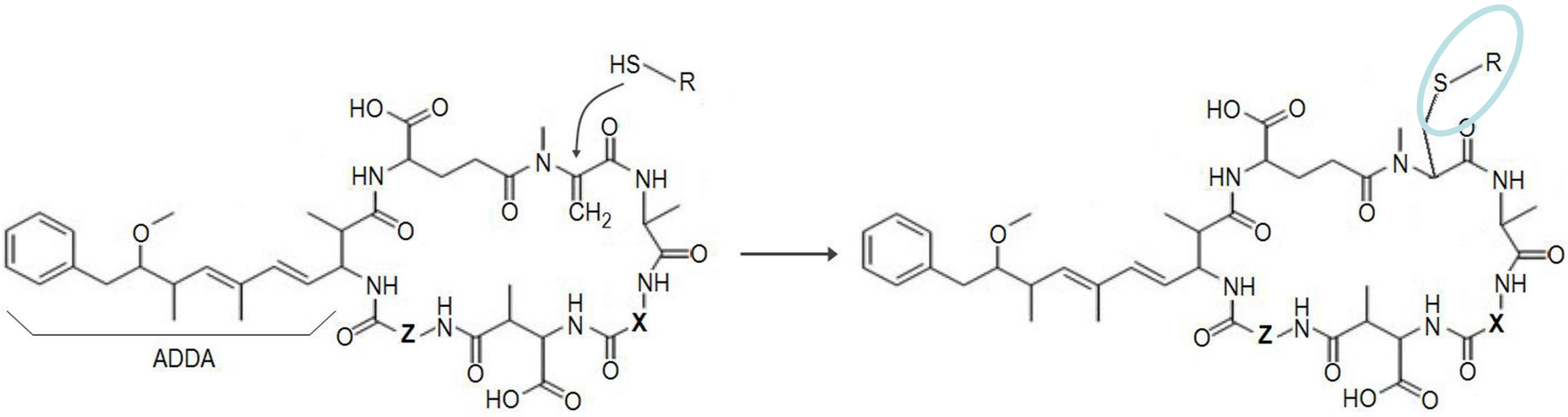
Análisis MALDI-TOF



Microflex : MALDI con reflector.

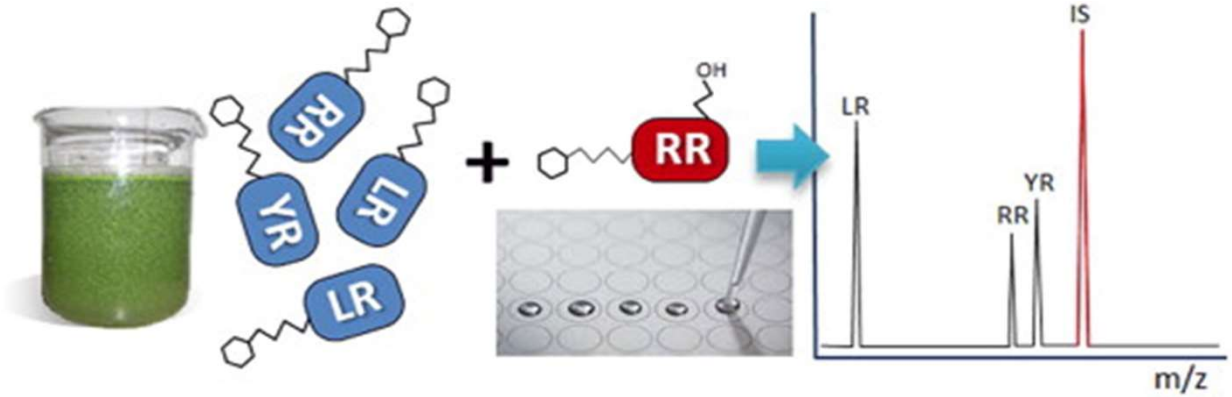
Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz)

Síntesis de Stds. Internos: reacción tiol-eno



- MC: RR o YR
- Tiol: Mercaptoetanol

MALDI cuantitativo: resultados de MCs individuales en pocos minutos

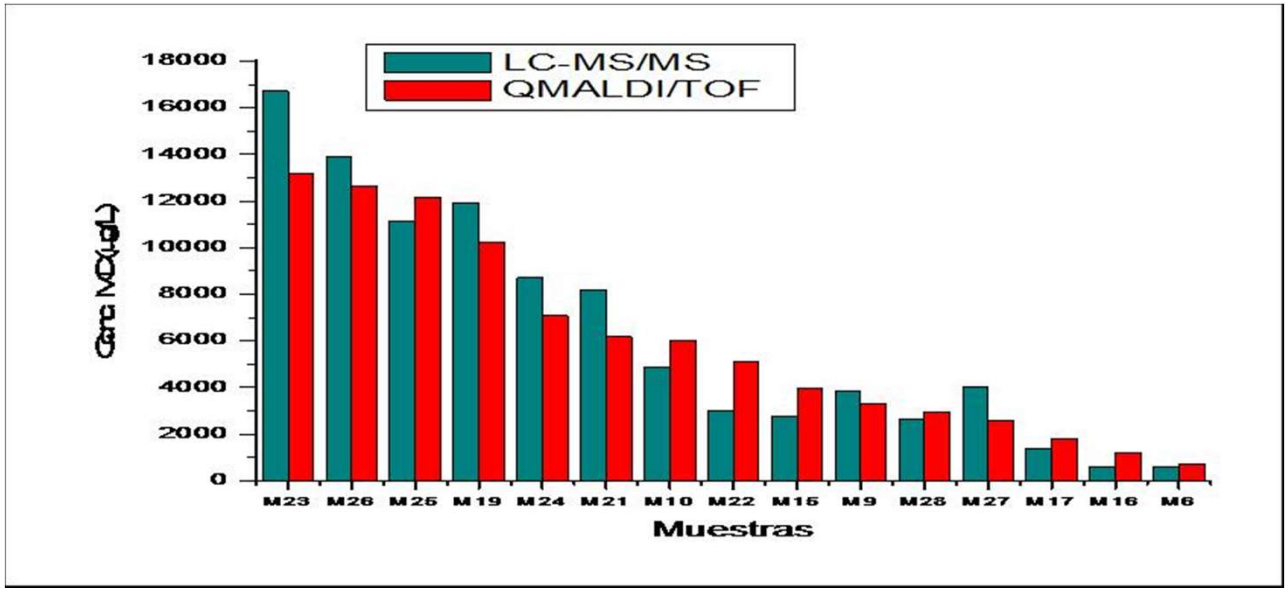


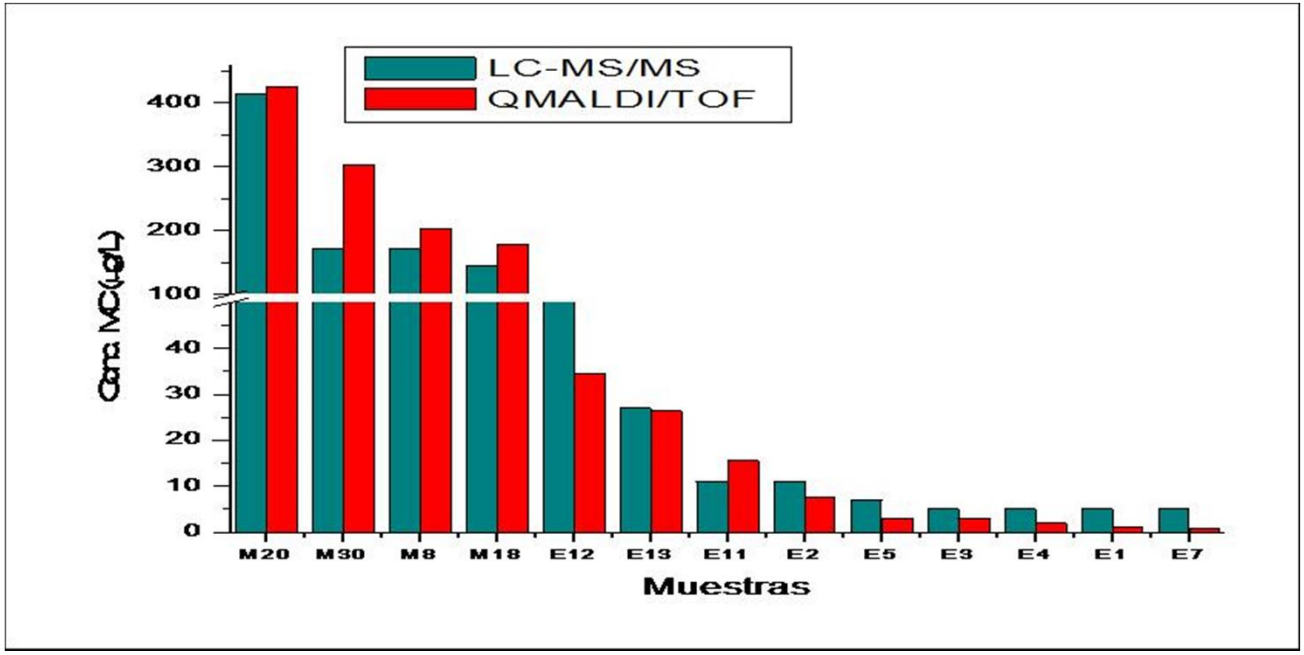
- Desarrollo de Estándares internos facilmente sintetizable para MALDI-TOF cuantitativo de MCs
- Microlitros de muestras de agua sin tratar analizadas en minutos
- Límites de detección (MDLs) para las diferentes variantes menores a 5 µg/L (30 veces más bajo que previos reportes).
- Recuperación de analito de muestras ambientales adicionadas: 80 -119%.

- **Método de alto rendimiento para rápido screening de muestras superficiales directas con bajo costo operativo**

Roegner, A., Pirez M., Puschner, B., .Brena,B., Gonzalez-Sapienza, G. Toxicon 2014 Feb;78:94-102

Comparación Q MALDI y LC MS/MS





Índice Similaridad Q MALDI – LC MS/MS
Muestras ambientales

Índice Similaridad (%)

Rango MC μg/L	LR	RR	YR
0 a 20	100,0	86,7	100,0
21 a 200	100,0	90,0	91,7
201 a 1000	100,0	83,3	84,6
1001 a 5000	100,0	83,3	-
Global	**100,0**	**86,2**	**91,4**
Coeficiente Correlación (Pearson)	**0,978**	**0,928**	**0,874**

Las metodologías a usar para la mejor evaluación de riesgo dependen de la toxina

Métodos indirectos:

Estimación de biomasa

- Pigmentos (espectrofotometría, fluorometría)
- Recuento celular (microscopía)

Moleculares

- Amplificación de genes especie-específicos (16S rRNA) o de clusters vinculados a la síntesis de cianotoxinas, ej. (PCR, multiplex PCR, qPCR, microarrays, NGS)

Determinación de toxinas (directos)

- Microcistinas: ELISA, Fosfatasa,- LC MS/MS
- Cilindrospermopsinas: ELISA, LC MS/MS
- Saxitoxinas: LC MS/MS

V. Gaget et al, Water Research, 2017, 227-238.

La experiencia con estos ensayos se ha difundido en cursos nacionales y regionales

- Capacitación de personal de Compañía Nacional de Agua Potable y Laboratorio de control de agua de playas Montevideo-Uruguay
- Monitoreo de Aguas de embalses y plantas de agua potable de la Compañía Nacional de Energía, embalses del Rio Negro (Baygorria and Bonete y Palmar)
- Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), Lima, Perú.
- Autoridad para el Manejo Sustentable de la Cuenca de Lago de Amatitlán (AMSA). Ciudad de Guatemala,Guatemala.

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

Curso-Taller Interdisciplinario de Posgrado PEDECIBA

PEDECIBA

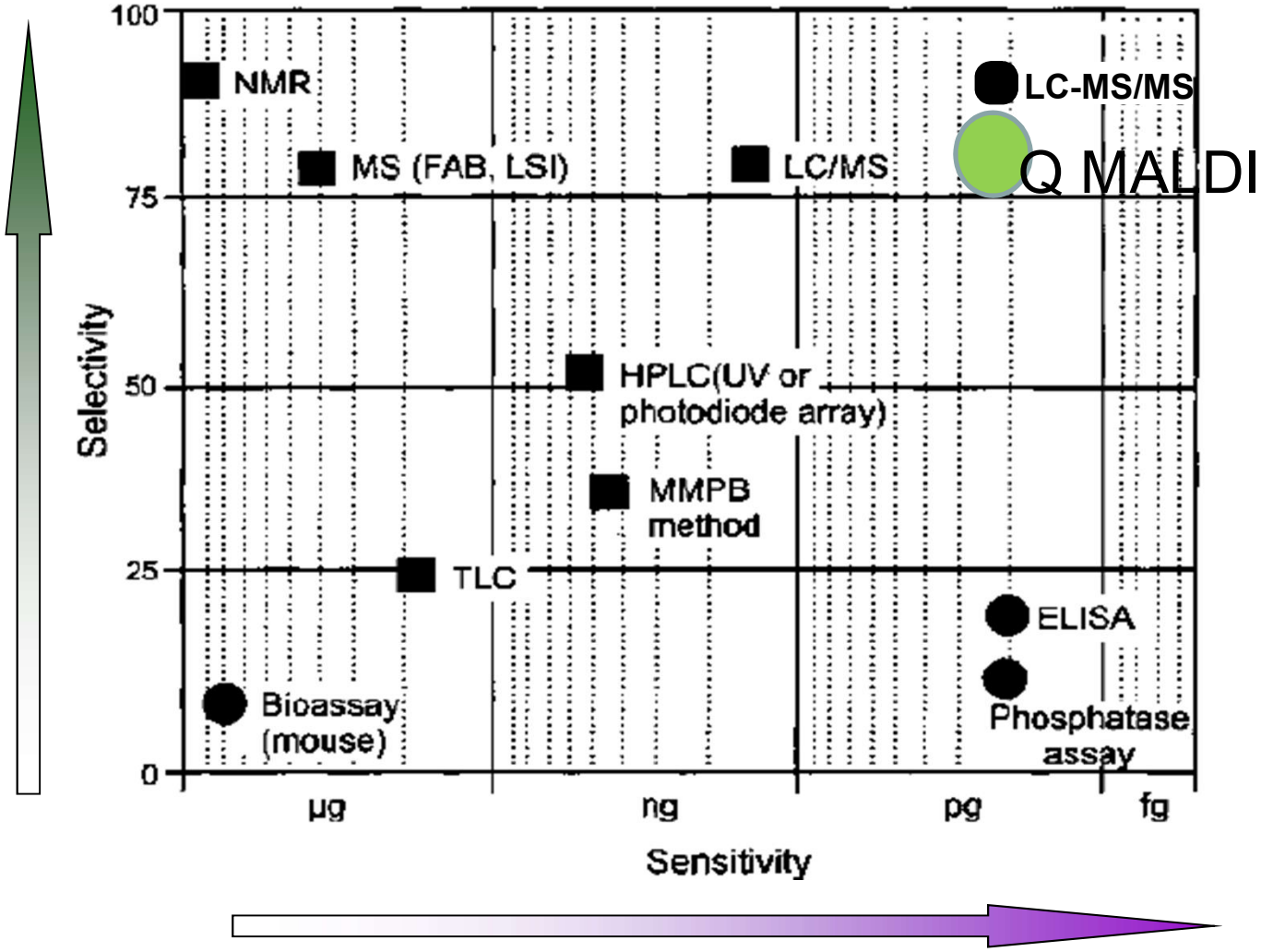
Cianotoxinas en sistemas acuáticos
Metodologías de monitoreo y análisis

Montevideo, 4-8 de diciembre de 2017

Bibliografia

- **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.** (http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxicyanbact/en/index.html).
- **Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines** (http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/_files/eh22.pdf)
- **Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection; 2017, EUR 28624; doi:10.2760/36186.** (http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC106478/kjna28624enn.pdf)
- **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.** Edited by Jussi Meriluoto, Lisa Spoof, Geoffrey A. Codd, © 2017 John Wiley & Sons, Ltd

Relación entre la sensibilidad y selectividad de distintos métodos analíticos para microcistinas



MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid) un producto de oxidación de microcistinas que se determina por GC