

## C4. ANALISI IMMUNOENZIMATICHE

Mara Stefanelli (a)\*, Francesca Caviglia (b)

(a) Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti ed Insediamenti Antropici, Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro, Roma

(b) Dipartimento Provinciale del Verbano Cusio Ossola, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Piemonte, Verbania

\*m.stefanelli@inail.it

### C4.1. Caratteristiche generali del metodo

L'*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* o ELISA è un test immunoenzimatico che si basa sull'interazione antigene/anticorpo per identificare e quantificare una sostanza chimica. Anticorpi selettivi per le cianotossine sono stati creati e incorporati in saggi generalmente semi-quantitativi per determinare la presenza di tossine cianobatteriche (Dörr *et al.*, 2010; Metcalf *et al.*, 2000; Zeck *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2004).

Il metodo è rapido, relativamente poco costoso e di facile applicazione: permette in poco tempo (da pochi minuti a qualche ora) di determinare piccole concentrazioni di cianotossine (circa 0,1 µg/L nel caso delle microcistine (MC) e in alcuni casi nell'ordine dei ng/L) in campioni d'acqua, organismi e tessuti (Lawton & Edwards, 2008; Sivonen, 2008), sebbene in questi ultimi casi possa esserci una interferenza da parte della matrice. Le metodologie immunoenzimatiche, paragonate ai metodi di rilevazione chimica sono in grado di rilevare la presenza di tossine, indipendentemente dalla disponibilità di standard analitici, caratteristiche che li hanno resi particolarmente utili per lo screening di campioni ambientali.

Il saggio ELISA è usato in una ampia varietà di test di tipo diverso: ELISA competitivo e non competitivo, anche detto a sandwich (Gan & Patel, 2013). Per i test competitivi, maggiore è la concentrazione di antigene (cianotossina), minore sarà il numero di immunocomplessi (cianotossina più anticorpo primario) rilevabili, per cui esiste una proporzionalità inversa tra il segnale registrato (assorbanza) e la concentrazione. Per quelli non competitivi i risultati sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'antigene, legato all'anticorpo che a sua volta non si legherebbe se fosse presente l'antigene nel campione sconosciuto. I saggi di tipo competitivo possono essere a loro volta ulteriormente classificati in diretti e indiretti. Nell'ELISA competitivo di tipo diretto l'anticorpo specifico per la cianotossina è adsorbito sulla superficie dei pozzetti del supporto solido, spesso costituito da una micropiastra ad alta capacità legante. Il campione, nel quale si deve determinare la presenza della cianotossina (antigene libero), e quantità prefissate di un complesso cianotossina-perossidasi (antigene complessato) vengono depositati nei vari pozzetti. Durante la fase di incubazione (circa 1 ora), l'antigene legato compete con l'antigene libero presente nel campione, per i siti di legame degli anticorpi adesi nei pozzetti.

Alla fine del periodo di incubazione, il materiale non reagito viene rimosso grazie ad opportuni lavaggi e la quantità di antigene complessato, legata dagli anticorpi immobilizzati sulla piastra, è quantificata mediante l'aggiunta di un substrato della perossidasi che forma un prodotto colorato (giallo). La reazione viene arrestata mediante l'aggiunta di una soluzione acida (stop solution) e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm: il colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione delle cianotossine nel campione. La quantificazione avviene per confronto/estrapolazione con una curva standard, costruita con la

cianotossina, nella quale si riportano in scala semilogaritmica le concentrazioni di cianotossina vs. % della assorbanza dello standard rispetto alla assorbanza del controllo negativo (%B0).

Nell'ELISA competitivo di tipo indiretto la cianotossina (antigene), generalmente legato ad una proteina carrier come l'albumina di siero bovino, è adsorbita sulla superficie dei pozzetti. Il campione viene addizionato nei pozzetti e successivamente si aggiunge una quantità prefissata di anticorpo specifico per la cianotossina. Durante la fase di incubazione, gli anticorpi in soluzione si ripartiscono tra la cianotossina libera, presente nel campione in analisi, e quella immobilizzata sul supporto solido. Tutto ciò che non ha reagito durante l'incubazione viene successivamente rimosso mediante lavaggi e la quantità di anticorpo legato all'analita specifico nel pozzetto viene quantificata mediante aggiunta di un anticorpo secondario (coniugato con un enzima, frequentemente anche in questo caso una perossidasi) che si lega al primo. In seguito ad una seconda fase di incubazione e ai lavaggi, si aggiunge il substrato, si arresta la reazione e si procede alla lettura. Anche in questo caso, la quantità di colore sviluppatosi risulterà inversamente proporzionale alla quantità di cianotossina libera nel campione. In altri tipi di saggi competitivi di tipo indiretto, sulla superficie dei pozzetti sono adesi, invece dellacianotossina, anticorpi in grado di legare anticorpi anti-cianotossina (X). Durante l'esecuzione del test, si aggiunge la soluzione contenente gli anticorpi anti-antigene che si legano agli anticorpi adesi. Con l'aggiunta simultanea del coniugato e del campione (in cui può essere eventualmente presente l'analita libero (X)), si origina la reazione di competizione per i siti anticorpali già vista sopra. Si procede infine ai lavaggi e all'aggiunta del substrato. La reazione viene arrestata mediante una soluzione acida (stop solution), che muta il colore da blu a giallo e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm.

## C4.2. Tipologia di ELISA disponibili

Per quanto riguarda il classico saggio ELISA, le reazioni vengono di norma eseguite all'interno di pozzetti di polivinile o polistirene (micropiastra da 12 strip da 8 pozzetti ciascuna per un totale di 96 pozzetti) (Figura C4.1) su cui sono adesi, a seconda dei casi, gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse o l'antigene stesso.



Figura 1. Esempio di micropiastra da 96 pozzetti (foto M. Stefanelli)

All'interno dei pozzetti vengono incubati i campioni da analizzare e gli opportuni reagenti intervallati da lavaggi atti a rimuovere i reagenti in eccesso. Per ultimo si aggiunge il substrato che dà origine al prodotto colorato. La positività è valutata analizzando la comparsa o meno del colore, in seguito alla reazione catalizzata dall'enzima sul substrato.

I kit, commercialmente disponibili sono semplici da usare, a risposta rapida e possono essere utilizzati in laboratorio e in alcuni casi anche su campo (Tabella C4.1).

**Tabella C4.1. Kit ELISA per l'analisi delle cianotossine disponibili in commercio e caratteristiche**

Saggio ELISA	Anticorpo e antigene target	Applicazione	Range di rivelazione (ppb)	Cross-reattività (%)*	Quantità campione richiesta (µL)	Tempo di analisi (min)
<b>MICROCISTINE (MC)</b>						
<b>Micropiastre</b>						
Competizione diretta	Policonale-MC-LR	laboratorio	0,16-2,5	MC-LR: 100 MC-RR: 54 MC-LA: 62 MC-YR: 35	20	90
Competizione diretta	Monoclonale-Adda	laboratorio	0,15-5,0	MC-LR: 100 MC-RR: 53 MC-LA: 47 MC-YR: 64	100	110
Competizione indiretta	Policonale-Adda	laboratorio	0,15-5,0	MC-LR: 100 MC-RR: 90 MC-LA: 124 MC-YR: 78	50	150
Competizione diretta	Policonale-MC-LR	laboratorio	0,16-1,60	MC-LR: 100 MC-RR: 97 MC-LA: 23 MC-YR: 82	100	90
Competizione diretta	Policonale-MC-LR	laboratorio	0,1-2,0	MC-LR: 100 MC-RR: 73 MC-LA: 2 MC-YR: 58 MC-LF: 3 MC-LW: 4	50	60
Competizione indiretta	Policonale-Adda	laboratorio	0,15-5,0	Ottima con tutti i congeneri testati	50	190
<b>Test tube</b>						
Competizione diretta	Policonale-MC-LR	laboratorio e su campo	0,4-2,5	MC-LR: 100 MC-RR: 40 MC-LA: 54 MC-YR: 46	75	45
Competizione diretta	Policonale-MC-LR	laboratorio	0,15-5	MC-LR: 100 MC-RR: 87 MC-LA: 3 MC-YR: 48	500	40
Competizione diretta	Policonale - MC-LR	laboratorio	0,3 - 5	MC-LR: 100 MC-RR: 73 MC-LA: 2 MC-YR: 58 MC-LF: 3 MC-LW: 4	500	40

*segue*

continua

Tipo di saggio ELISA	Tipo di anticorpo e antigene target	Applicazione	Range di rivelazione (ppb)	Cross-reattività (%)*	Quantità campione richiesta (µL)	Tempo di analisi (min)
<b>CILINDROSPERMOPSINA (CYN)</b>						
<b>Micropiastre</b>						
Competizione diretta	Policlonale - CYN	laboratorio	0,05-2,0	CYN: 100 Deoxy-CYN: 120	50	75
Competizione diretta		laboratorio	0,1-2,0	CYN: 100	50	90
<b>SAXITOSSINE (STX)</b>						
<b>Micropiastre</b>						
Competizione diretta	Monoclonale - STX	laboratorio	0,02-0,4	STX: 100 Dec-STX: 29 GTX 2-3: 23 GTX-5B: 23 Sulfo GTX 1-2: 2,0 Dec-GTX 2-3: 1,4 NeoSTX: 1,3 Dec-NeoSTX: 0,6 GTX 1-4: < 0,2	50	60
<b>NEOSAXITOSSINE (NEO)</b>						
<b>Micropiastre</b>						
Competizione diretta	Monoclonale - NEO	laboratorio	0,03-1	NeoSTX: 100 STX Dihydrochloride: 11 Dec-STX: < 1 GTX 2-3: < 1 GTX 1-4: < 0,1 Dec-GTX 2-3: 0,4 Dec-NeoSTX: 0,7	100	60
<b>β-N- METILAMINO-L-ALANINA (BMAA)</b>						
<b>Micropiastre</b>						
Competizione diretta	Monoclonale - BMAA	laboratorio	5-500	BMAA: 100 L-Cysteine hydrochloride: 0,2 L-Glutamic acid: 0,2 L-Aspartic acid: 0,2 γ-Aminobutyric acid: 0,02 DL-2,4-Diaminobutyric acid dihydrochloride: 0,01	100	120

\* Le diverse varianti di MC vengono indicate con due lettere che identificano quali aminoacidi si ritrovano nelle posizioni variabili 2 e 4.

GTX: Goniautossine (vedi paragrafo A2.2.5)

Sotto forma di micropiastre esistono saggi diagnostici per la presenza non solo di microcistine, ma anche di cilindrospermopsina, saxitossine e neosaxitossine. Di recente produzione è anche un saggio per la determinazione della  $\beta$ -N-Methylamino-L-Alanine o BMAA, per il quale però, sembrerebbe dimostrata la non attendibilità per quanto riguarda l'analisi di campioni ambientali (Fassen *et al.*, 2013).

Per la determinazione delle microcistine sono inoltre disponibili dei kit sotto forma di *Test Tube* e *Strip Test*, che permettono di avere a basso costo risultati, puramente qualitativi, in tempo reale mediante l'uso di un lettore portatile da campo. Risultati semi-quantitativi possono essere ottenuti in laboratorio (mediante l'uso di standard di MC-LR, una delle varianti di MC, vedi paragrafo C3.2, e successiva comparazione dei campioni con questo), ma sebbene il principio dei due test sia lo stesso, rispetto allo *Strip Test*, che prevede la lisi cellulare del campione e quindi un'analisi di MC totali, il *Test Tube* non prevede la lisi cellulare, quindi in questo caso le MC trovate saranno riferite esclusivamente alla frazione libera. Inoltre i livelli di MC misurate per lo *Strip Test* (1-10  $\mu\text{g/L}$ ) sono riferibili ai limiti per le acque di balneazione, mentre per il *Test Tube* a quelli per le acque potabili (0,5-3  $\mu\text{g/L}$ ) (Brylinsky, 2012). Per quanto riguarda questi kit, sono ancora pochi gli studi che ne hanno valutato l'attendibilità con prove di laboratorio, tuttavia, al fine di avere una valutazione del tutto preliminare, questi test sembrano dare risultati abbastanza attendibili sia su campioni ambientali che su colture di laboratorio (Lawton *et al.*, 2010; Arada-Rodriguez & Jin, 2011; Humpage *et al.*, 2012). A prescindere dal tipo di kit che si decide di usare i risultati dovranno, comunque, essere confermati con analisi di laboratorio più specifiche (vedi capitolo C3).

I kit possono essere usati in particolare per effettuare analisi su campioni di acqua dolce ma anche per campioni di acque marine, salmastre, estratti algali e acque potabili, previa preparazione degli stessi mediante procedure che vengono riportate nelle specifiche istruzioni.

### **C4.3. Protocollo di analisi con kit ELISA su micropiastre ed eventuali interferenze**

Le cianotossine presenti in un corpo idrico sono principalmente contenute all'interno delle cellule produttrici (tossine intracellulari); tuttavia elevate concentrazioni di tossine possono essere rilasciate in acqua soprattutto a seguito di senescenza e lisi cellulare (tossine extracellulari o libere) compromettendo la qualità delle acque di balneazione. Dal punto di vista dell'analisi del rischio potenziale per la salute è quindi significativo il risultato corrispondente all'analisi del campione tal quale, al fine di rilevare la concentrazione di cianoatossine totali (frazione intracellulari + frazione extracellulari). Nella maggior parte dei protocolli allegati ai kit disponibili in commercio è infatti indicato di dispensare in micropiastre solo il campione tal quale.

#### **C4.3.1 Preparazione del campione**

Il campione, prelevato in contenitore in vetro scuro, deve essere conservato in frigorifero a  $4\pm 3^\circ\text{C}$  al buio, in quanto la luce potrebbe degradare le tossine eventualmente presenti nel campione, e analizzato, entro 5 giorni dal prelievo; in alternativa i campioni devono essere congelati.

Ciascun kit comprende i seguenti reagenti:

- strip in forma di micropiastre a 96 pozzetti, con anticorpo adeso sul fondo;
- controllo negativo;
- calibratori a diverse concentrazioni (parti per bilione, ppb);

- diluente;
- coniugato;
- substrato;
- soluzione Stop;
- soluzione di lavaggio.

Per effettuare la ricerca di cianotossine con metodo ELISA ciascun laboratorio deve essere dotato di:

- frigorifero a  $4\pm 3^{\circ}\text{C}$ ;
- apparato filtrazione per campioni con presenza di particelle (siringa, filtri  $0,2\ \mu\text{m}$ );
- pipette graduate tarate a volumi diversi ( $20\ \mu\text{L}$ ,  $100\ \mu\text{L}$ , ecc.) e pipette multicanale;
- agitatore per micropiastre;
- lettore per micropiastre a singola lunghezza d'onda con filtro a  $450\ \text{nm}$ .

L'analisi prevede la determinazione delle cianotossine totali: la frazione intracellulare (presenti all'interno delle cellule algali) più la frazione extracellulari (disciolta nei campioni di acqua). Per poter analizzare il contenuto totale è quindi necessario lisare tutte le cellule prima di iniziare il test ed è quindi indispensabile possedere un:

- bagno ad ultrasuoni;
- congelatore che raggiunga una temperatura di almeno  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Le tecniche utilizzate più frequentemente per provocare la totale lisi cellulare sono più cicli (almeno tre) di congelamento/scongelo e/o la sonicazione. In questi casi è buona norma verificare sempre la reale rottura delle cellule mediante l'uso di un microscopio.

Oggi è anche disponibile un kit specifico per la rapida lisi delle cellule algali (QuikLyse reagent – Abraxis).

#### **C4.3.2 Interferenze e cause di errore**

Di seguito viene riportata in tutte le sue fasi la procedura per poter effettuare un saggio ELISA con particolare attenzione alla risoluzione dei punti critici riscontrabili durante l'esecuzione:

- *Fase 1*  
Prima di iniziare il test il kit va mantenuto per almeno 30 minuti a temperatura ambiente ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ).  
*Criticità:* bisogna evitare di lavorare a temperature minori di  $10^{\circ}\text{C}$  e maggiori di  $30^{\circ}\text{C}$ .
- *Fase 2*  
Una sub-aliquota (circa 5ml) di campione tal quale, precedentemente agitato, viene prelevata e trattata per provocare la completa lisi cellulare.  
*Criticità:* verificare la reale rottura di tutte le cellule, se necessario aumentare i cicli di congelamento/scongelo prima di filtrare il campione; quest'ultimo passaggio è fondamentale per poter eliminare tutti i residui cellulari che potrebbero interferire con il test.
- *Fase 3*  
Nei saggi ELISA i campioni, gli standard e i controlli sono analizzati in doppio (o in triplo) a seconda del kit utilizzato (Tabella C4.2: esempio schematizzato per analisi in micropietra). Le quantità delle varie soluzioni dipendono dal kit utilizzato e sono ben riportate nelle istruzioni ad esso allegate.

**Tabella C4.2. Esempio di schema di analisi in micropiastra da 96 pozzetti**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Contr. Neg.	Camp1	Camp5									
B	Contr. Neg.	Camp1	Camp5									
C	Cal 0.16 ppb	Camp2	Camp6									
D	Cal 0.16 ppb	Camp2	Camp6									
E	Cal 0.6 ppb	Camp3	Camp7									
F	Cal 0.6 ppb	Camp3	Camp7									
G	Cal 2.5 ppb	Camp4	Camp8									
H	Cal 2.5 ppb	Camp4	Camp8									

Contr. Neg. = controllo negativo; Cal. = calibratore o standard; Camp. = campione

*Criticità:* Durante un'analisi in ELISA la manualità (precisione) dell'operatore è fondamentale per ottenere un risultato accurato. La fase di dispensazione dei campioni, degli standard, dei controlli e del diluente, deve essere effettuata in un periodo di tempo non superiore a 10 minuti per non alterare il legame antigene anticorpo. Infatti è raccomandato analizzare un numero di campioni non troppo elevato: 3 strip, è il numero idoneo da analizzare. Nel caso ci fosse la necessità di analizzare più campioni è fondamentale l'uso di pipette multicanale.

– *Fase 4*

Rispettare tutti i tempi di incubazione, specifici per i diversi KIT utilizzati, ed effettuare correttamente le fasi di lavaggio (se possibile utilizzare una pipetta multicanale e almeno 250 µL di soluzione per ogni pozzetto).

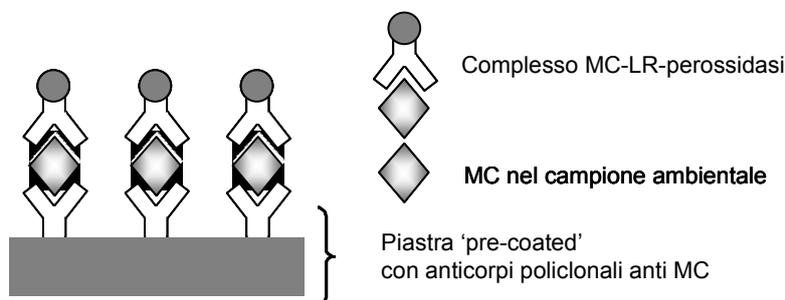
*Criticità:* se non si possiede un lavapiastre automatico, per evitare interferenze, si raccomanda di eliminare il più possibile i residui di soluzione di lavaggio, capovolgendo la piastra e picchiettando molto bene su carta assorbente. Nel caso si formino delle bolle d'aria cercare di eliminarle utilizzando ad esempio un piccolo ago di vetro, evitando di toccare il fondo del pozzetto.

– *Fase 5*

L'ultima fase prevede l'aggiunta di un substrato colorato, l'incubazione della piastra al buio, e infine una soluzione di stop.

*Criticità:* la lettura deve essere effettuata entro 30 minuti dallo stop della reazione.

Di seguito sono riportati in modo schematico due esempi di saggio ELISA (in questo caso per le MC): uno a competizione diretta (Figura C4.2) e uno a competizione indiretta (Figura C4.3) (Testai & Mattei, 2008).



**Figura C4.2. Schema di un test ELISA per competizione diretta**

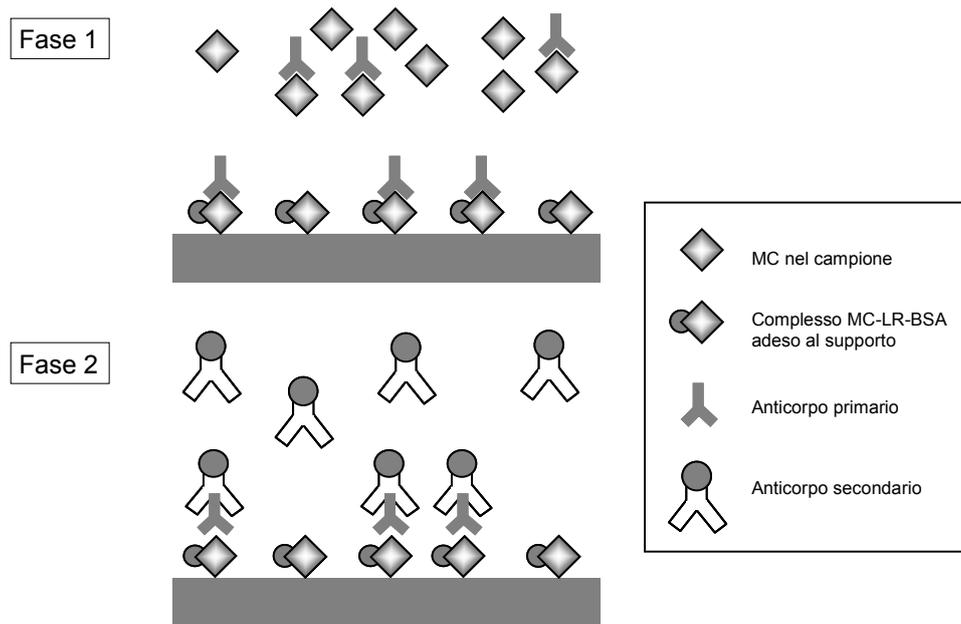


Figura C4.3. Schema di un test ELISA per competizione indiretta

### C4.3.3 Quantificazione

Per ogni kit in commercio, nel foglio delle istruzioni, viene spiegata la modalità di calcolo per la quantificazione delle concentrazioni di tossina nei campioni, istruzioni che vanno seguite in modo preciso, e viene sempre riportato un esempio illustrativo della curva standard. La quantificazione avviene per confronto/estrapolazione con quest'ultima.

Di seguito viene riportato un esempio di calcolo. Per la costruzione della curva (Figura C4.4) si riportano i valori %B0 vs le concentrazioni di MC-LR, su una scala semilogaritmica, per meglio evidenziare il tratto lineare della curva, entro cui si ha una relazione quantitativa precisa.

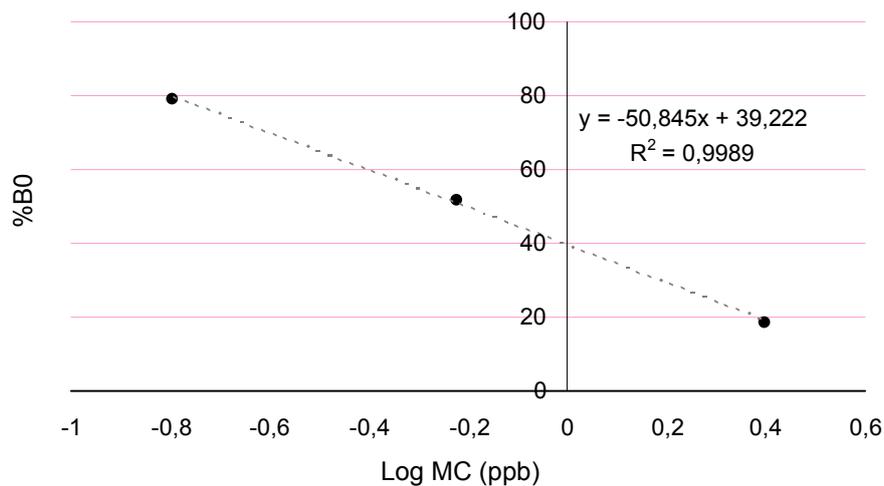


Figura C4.4. Esempio di relazione lineare tra il logaritmo della concentrazione di MC-LR e la %B0

%B0 è data dal rapporto fra la media della densità ottica (OD, *Optical Density*) o assorbanza degli standard (Tabella C4.3) o campioni (Tabella C4.4) e la media della densità ottica del controllo negativo. Il controllo negativo è dato da una soluzione non contenente MC-LR, il cui valore di % B0 corrisponde al valore massimo (100%) di densità ottica, essendo l'anticorpo adesivo al supporto completamente saturato dal complesso MC-LR perossidasi (Carmichael & An, 1999).

Affinché il test ELISA sia valido il %CV [coefficiente di variazione = (deviazione standard / media) × 100] delle misure di densità ottica degli standard non deve superare il 10%.

**Tabella C4.3. Calcolo di %B0 per gli standard**

Concentrazione standard (ppb)	OD (450 nm)		Media OD	%CV	%B0
0 (controllo negativo)	1,23	1,21	1,22	1,16	100,00
0,16	0,97	0,96	0,96	0,73	79,06
0,60	0,62	0,64	0,63	2,24	51,64
2,50	0,24	0,21	0,23	9,43	18,69

OD: densità ottica; CV: Coefficiente di variazione; %B0: media della densità ottica degli standard o dei campioni rispetto alla media della densità ottica del controllo negativo.

**Tabella C4.4. Calcolo di %B0 per i campioni**

Campione	OD (450 nm)		Media OD	%CV	%B0
#1	1,139	1,166	1,15	1,66	94,47
#2	0,473	0,400	0,44	11,83	35,78
#3	0,054	0,048	0,05	8,32	4,18
#4	0,048	0,051	0,05	4,29	4,06
#5	0,053	0,051	0,05	2,72	4,26
#6	0,048	0,054	0,05	8,32	4,18

OD: densità ottica; CV: Coefficiente di variazione; %B0: media della densità ottica degli standard o dei campioni rispetto alla media della densità ottica del controllo negativo.

Affinché il test ELISA sia valido il %CV delle misure di densità ottica dei campioni analizzati non deve superare il 15%.

La curva deve essere costruita utilizzando un numero adeguato di punti in modo tale da avere un tratto lineare ampio ben definito.

Partendo dall'equazione della curva di Figura C4.4:

$$y = -50,845x + 39,222$$

si calcola la x (Tabella C4.5), che corrisponde al logaritmo della concentrazione, in questo esempio, di MC nel campione:

$$x = (39,222 - y) / 50,845$$

La concentrazione in ppb (o µg/L) sarà quindi:  $10^x$ .

Per una corretta estrapolazione il dato di assorbanza del campione deve cadere nel tratto lineare della curva standard (in questo esempio tra 0,16 e 2,50 ppb) e non agli estremi, dove la risposta non è più proporzionale alla concentrazione.

Tabella C4.5 Calcoli per determinare la concentrazione di MC nei campioni

Campione	x	10 <sup>x</sup> (ppb)	Note
#1	-1,09	0,08	Valore <0,16 = campione negativo
#2	0,07	1,17	Valore accettabile
#3	0,69	4,89	
#4	0,69	4,92	Valori >2,50 = misure da ripetere dopo diluizione dei campioni
#5	0,69	4,87	
#6	0,69	4,89	

I valori di MC che sono al di sotto della concentrazione minima di standard (in questo caso 0,16ppb), devono essere considerati negativi; quelli che risultano superiori alla concentrazione massima di standard (2,5ppb), devono essere diluiti, ed il test deve essere ripetuto, tenendo conto del fattore di diluizione per il calcolo della concentrazione finale di tossina.

#### C4.3.4. Affidabilità, sensibilità e utilità del metodo: quando applicarli

Questo metodo determina solo la concentrazione totale di cianotossine in un campione e non identifica i diversi isomeri così come non stima la tossicità (Lawton *et al.*, 2010). An & Carmichael (1994) hanno dimostrato che alcuni congeneri di microcistine non sono rilevati o lo sono con scarsa efficienza. La valutazione della cross-reattività di un certo numero di microcistine usando un tipico test ELISA ha mostrato una bassa correlazione tra la reattività e la tossicità acuta, il che indica una possibile sottostima della concentrazione di alcune varianti di microcistine (Triantis *et al.*, 2010). L'affidabilità e la sensibilità di un test ELISA dipendono essenzialmente dalla natura dell'anticorpo e dalla sua cross-reattività con i vari congeneri e con suoi analoghi, inclusi i coniugati. Una scarsa cross-reattività dell'anticorpo utilizzato, come avviene quando si usano anticorpi monoclonali molto specifici, può dare informazioni accurate su uno specifico congenere, ma ovviamente questa caratteristica è poco utile se lo scopo del test è lo screening. Infatti, per sapere se campioni ambientali siano o meno contaminati da cianotossine, indipendentemente dal congenere, è auspicabile la massima cross-reattività possibile. È quindi fondamentale conoscere con esattezza le caratteristiche del kit a disposizione, per capire se risponde o meno alle esigenze dello sperimentatore e soprattutto per dare la giusta interpretazione ai risultati ottenuti. Dal punto di vista dello screening, potrebbe sembrare un vantaggio avere una elevata cross-reattività attraverso lo sviluppo di un pool di anticorpi contro una miscela di congeneri, in grado di riconoscere come apteni parti diverse della molecola: purtroppo la fluttuazione nella risposta immunitaria può causare variazioni notevoli nella proporzione relativa dei vari anticorpi, anche quando ottenuti in tempi diversi dallo stesso animale, per cui il livello di cross-reattività e la risposta non sono riproducibili tra batches diversi di antisiero e questa possibilità non è quindi praticabile (Mc Elhiney & Lawton, 2005).

La maggior parte dei kit disponibili commercialmente impiegano anticorpi sviluppati in animali (pecore, capre o topi) contro uno specifico congenere (es. per le MC in particolare la MC-LR): ne consegue automaticamente che la reattività massima sarà verso quella variante e che le altre saranno identificate con una sensibilità diversa, essendo la affinità di legame antigene-anticorpo più bassa. Quindi la quantificazione fatta rispetto ad una curva standard contenente un solo congenere (come ad esempio la MC-LR), non può essere accurata ed è per questo motivo che i metodi immunoenzimatici sono considerati semi-quantitativi.

I test ELISA disponibili non sono in grado di discriminare tra molecole parentali, prodotti di degradazione e coniugati che però hanno tossicità minore. Ad esempio il kit per le MC, avendo l'Adda (acido-3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(E),6(E)-dienoico), comune a tutte le varianti, come sito di riconoscimento per il legame è diagnostico anche per i vari prodotti di degradazione ambientale che contengano tale amminoacido, indicativi comunque della presenza di contaminazione, e per i coniugati con glutatione e cisteina prodotti dalla detossificazione delle MC ad opera delle glutatione S-trasferasi (Kondo *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 2002).

Questo aspetto è particolarmente rilevante per l'interpretazione di dati in termini di valutazione tossicologica, perché l'impossibilità di distinguere la tossina dai prodotti di detossificazione porta automaticamente ad una sovrastima della concentrazione e della potenziale tossicità del campione.

Sia il tipo di strumentazione disponibile nei singoli laboratori che la disponibilità degli operatori sono requisiti fondamentali per la scelta e l'uso dei metodi di screening da poter utilizzare. Il saggio ELISA è sicuramente idoneo per le analisi di screening delle cianotossine essendo sufficientemente sensibile e capace di determinare, anche se con capacità di responso differente, diverse varianti di cianotossine. Questo tipo di analisi, che permette di avere risposte veloci e cautelative dal punto di vista della protezione della salute dell'uomo, può quindi essere usato come azione di primo livello. È fondamentale, per avere delle valutazioni più accurate e precise, utilizzare tecniche analitiche o combinazioni di tecniche più complesse (Triantis *et al.*, 2010).

## C4.4. Altri kit per l'analisi di anatoxina-a

Oggi per l'analisi della anatoxina-a in campioni d'acqua dolce è disponibile il *Receptor-Binding Assay* o RBA (Abraxis). La procedura di analisi è molto simile al saggio ELISA, ma si basa sull'affinità dell'anatoxina-a per i recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs) piuttosto che sull'uso di anticorpi specifici. Il kit è in grado di determinare concentrazioni comprese tra 10-500 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) di anatoxina-a, con una LoD (*Limit of Detection*) di 10 ppb; si presenta sotto forma di micropiastra da 96 pozzetti, richiede 100 $\mu\text{L}$  di campione, incubazioni sia a 37°C che a temperatura ambiente e circa 3 ore e 30min per essere effettuato. Per evitare la degradazione dell'anatoxina-a, oltre che mantenere un pH basso, bisogna non esporre il campione alla luce diretta.

## Bibliografia

- An J, Carmichael WW. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 1994;32(12):1495-1507.
- Aranda-Rodriguez R, Jin Z. *Evaluation of field test kits to detect microcystins: 2010 study. Final Report*. Ottawa: Exposure and Biomonitoring Division Health Canada; 2011.
- Brylinsky M. *Evaluation of two test kits for measurement of microcystin concentrations*. Halifax: Nova Scotia Department of Environment; 2012.
- Carmichael WW, An J. Using an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Protein Phosphatase Inhibition Assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat Toxins* 1999;7:377-85.
- Dörr FA, Pinto E, Soares RM, Feliciano de Oliveirae Azevedo SM. Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* 2010;56:1247-56.

- Faassen EJ, Beekman W, Lürling M. Evaluation of a commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the determination of the neurotoxin BMAA in surface waters. *Plos One* 2013;8(6):1-7.
- Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ. Microcystin producing blooms - a serious global public health issue. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;59:151-63.
- Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol* 2013;133:1-3.
- Humpage AR, Froscio SM, Lau H-M, Murphy D, Blackbeard J. Evaluation of the Abraxis Strip Test for Microcystins™ for use with wastewater effluent and reservoir water. *Water Research* 2012;46:1556-65.
- Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1355-9.
- Lawton LA, Edwards C. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. *Advances in Exp Biol Med* 2008;619:513-37.
- Lawton LA, Chambers H, Edwards C, Nwaopara AA, Healy M. Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon* 2010;55:973-8.
- Mc Elhiney J, Lawton L. Detection of the cyanobacteria hepatotoxin microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:215-30.
- Metcalf JS, Bell SG, Codd GA. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. *Water Research* 2000;34(10):2761-9.
- Metcalf JS, Beattie KA, Ressler J, Gerbersdorf S, Pflugmacher S, Codd GA. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *J Water Supply Res and T* 2002;51(3):145-51.
- Sivonen K. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: state of the science and research needs. Chapter 24. *Adv Exp Med Bio* 2008;619:547-66.
- Testai E, Mattei D. Metodi biologici per la rilevazione delle cianotossine. In: Funari E, Scardala S, Testai E (Ed.). *I cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6). p.49-57.
- Triantis T, Tsimeli K, Kaloudis T, Thanassoulas N, Lytras E, Hiskia A. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon* 2010; 55:979-89.
- Yu FY, Liu BH, Chou HN, Chu FS. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *J Agric Food Chem* 2002;50(15):4176-82.
- Zeck A, Weller MG, Bursill D, Niessner R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst* 2001;126(11):2002-7.