





Área Inmunología y Área Bioquímica Departamento de Biociencias Facultad de Química Universidad de la República

Desarrollo y Validación de métodos sencillos y rápidos para cianotoxinas en el monitoreo ambiental.

Trabajo de tesis para acceder al título de

Doctora en Química

Estudiante: B.C. Vania Macarena Pírez Schirmer Orientadora: Dra. Beatriz Brena Barragán Co-orientador: Dr. Gualberto González Sapienza

> Montevideo, Uruguay 29 de marzo de 2019

Índice

Resumen
Capítulo I
1. Introducción
1.1. Floraciones cianobacterianas5
1.2. Cianotoxinas
1.2.1.Microcistinas
1.3. Monitoreo de floraciones19
1.3.1.Monitoreo del riesgo asociado a cianotoxinas
1.3.2.0btención y preparación de muestras22
1.4. Detección y cuantificación de cianotoxinas23
1.4.1.Métodos instrumentales para cuantificación de MCs
1.4.2.Bioensayos y métodos bioquímicos31
1.4.3.Métodos inmunológicos
1.4.4.Validación de metodologías de análisis
Objetivo general
Objetivos específicos
Capítulo II
2. Desarrollo y validación de un ELISA policional para cuantificación de MCs41
2.1. Materiales y métodos 42
2.1.1.ELISA policlonal por competición para detección de MCs
2.1.2.Validación del ensayo desarrollado 44
2.2. Resultados y Discusión
2.2.1.Desarrollo del ELISA policlonal para cuantificación de MCs
2.2.2.Caracterización y validación del kit ELISA policlonal para MCs51
2.2.3.Comparación con métodos de referencia para cuantificación de MCs 56
2.2.4.Aplicación e impacto del método de ELISA policlonal
2.3. Conclusiones
Capítulo III
3. Selección de anticuerpos monoclonales (<i>Nanobodies</i>) anti-MCs y su

3.	Selection de anticuerpos monocionales (<i>Nanoboules</i>) anti-MCs y su	
imp	lementación en ensayos de segunda generación69	9

	3.1. Materiales y métodos	70
	3.1.1.Obtención de anticuerpos monodominio de llama (<i>Nanobodies</i>) y desarrollo de un ELISA para MCs	70
	3.1.2.Desarrollo de ensayos para determinaciones in situ con punto final	
	evaluado en forma visual (Inmunocromatografía de flujo lateral)	76
	3.2. Resultados y Discusión	79
	3.2.1.Construcción de la biblioteca de fagos y estrategias de selección (<i>panning</i>)	79
	3.2.2.Optimización y caracterización del ELISA de segunda generación con anti-MCs	<i>Nbs</i> 84
	3.2.3.Inter-comparación del ELISA monoclonal (VHH A2.3) desarrollado co LC-MS/MS	n 89
	3.2.4.Desarrollo de ensayo para detección <i>in situ</i> con punto final evaluado e forma visual (Inmunocromatografía de flujo lateral)	en 90
	3.3. Conclusiones	94
Са	pítulo IV	
4.	Detección y cuantificación de MCs mediante MALDI-TOF	97
2	4.1. Materiales y métodos	99
	4.1.1.Análisis cualitativo de MCs por MALDI-TOF	99
	4.1.2.Análisis cuantitativo de MCs por MALDI-TOF (qMALDI-TOF)	.101
	4.1.3.Cuantificación de MCs en aguas y sueros, mediante inmuno- concentración y detección por MALDI-TOF	.102
Z	4.2. Resultados y Discusión	. 104
	4.2.1.Estudio de variantes de microcistinas	.104
	4.2.2. Detección de variantes hidrofóbicas mediante MALDI-TOF	.105
	4.2.3.Análisis cuantitativo de MCs por MALDI-TOF (qMALDI-TOF)	.110
	4.2.4.Método de alta sensibilidad para la determinación de microcistinas en aguas y sueros, mediante MALDI-TOF	n .118
2	4.3. Conclusiones	. 126
Со	nclusiones generales y perspectivas	.128
Re	ferencias	.131
Ab	previaturas y acrónimos	.148
Ag	radecimientos	.150
Ar	tículos	.151

Resumen

La eutrofización de los ambientes acuáticos promueve la proliferación de cianobacterias, que producen una amplia variedad de compuestos altamente tóxicos para animales, las cianotoxinas. En Uruguay, los principales sistemas acuáticos (Río Negro, Río Uruguay y Río de la Plata) están seriamente afectados por floraciones de cianobacterias de géneros productores de microcistinas. Estas cianotoxinas son heptapéptidos cíclicos de elevada toxicidad, que interfieren en los principales usos del agua: producción de agua potable, recreación, producción agropecuaria, pesca, entre otros. Para evaluar y gestionar los riesgos asociados, se requieren métodos sencillos, rápidos y validados, que viabilicen su determinación a bajo costo. En esta tesis se desarrolló y validó un kit de ELISA sencillo y robusto, basado en anticuerpos policionales, que ha permitido monitorear microcistinas en aguas de embalses y playas. Los resultados evidenciaron en espumas cianobacterianas, concentraciones extremadamente elevadas de microcistinas (>1000 veces el límite para agua recreacional), que impulsaron el uso de la bandera sanitaria y sustentaron la detección visual de colonias cianobacterianas dispersas y espumas, como un criterio simple de alerta para la toma de decisiones rápidas en la gestión de playas. En una segunda etapa se avanzó en la estandarización de la inmunodetección, generando anticuerpos monoclonales de llama (Nanobodies), implementando estrategias novedosas de selección para aislar los clones de mayor desempeño analítico. Esto posibilitó el desarrollo de un ELISA de segunda generación sensible y con elevada selectividad. Ambos ensayos se han validado rigurosamente y comparado con métodos analíticos de referencia como LC-MS/MS. El nuevo anticuerpo viabilizó el desarrollo de un ensayo inmunocromatográfico en tiras, que se realiza en minutos en el sitio de interés y es adecuado para analizar aguas ambientales y potables. Para generar mayor información sobre la presencia de congéneres individuales de microcistinas, se desarrollaron métodos de MALDI-TOF cualitativos, y posteriormente cuantitativos incorporando estándares internos de síntesis sencilla. Finalmente, utilizando uno de los *nanobodies* biotinilado *in vivo* se generó un inmunoadsorbente equipado con estándar interno, que permite el análisis directo de estas toxinas por MALDI-TOF posibilitando su cuantificación ultrasensible en muestras de agua y matrices biológicas complejas.

Introducción

1. Introducción

1.1. Floraciones cianobacterianas

La eutrofización promueve la proliferación de cianobacterias productoras de toxinas con alto potencial para generar daño a la salud humana y animal. Estos eventos, conocidos como floraciones o *"blooms"*, son un fenómeno visible producido por el aumento notorio y relativamente rápido de la biomasa cianobacteriana, en los que existe dominancia de una o unas pocas especies de la comunidad fitoplanctónica [1, 2]. Se estima que entre el 50% y 80% de las floraciones son tóxicas. Además de la potencial producción de toxinas, las mismas causan severas alteraciones en la calidad de agua, tales como mal olor, disminución del oxígeno disuelto, alteración de la cadena trófica, entre otras consecuencias [3, 4]. Estos efectos han revelado la necesidad de implementar estrategias para preservar la calidad de aguas tanto continentales como costeras [5, 6].

Las cianobacterias son microorganismos ancestrales, presentes desde hace aproximadamente 3000 millones de años, que tienen distribución global. Son responsables de la creación de la atmósfera aeróbica terrestre debido a su actividad fotosintética productora de oxígeno y siguen siendo, al presente, agentes principales en los ciclos de carbono, nitrógeno y minerales [7, 8]. Por su capacidad para realizar fotosíntesis así como la habilidad de diversas cianobacterias de fijar nitrógeno, las cianobacterias son microorganismos colonizadores primarios [9, 10]. Algunas especies pueden almacenar nutrientes esenciales (fósforo, nitrógeno, carbono, hierro) lo que les permite crecer bajo condiciones limitantes de nutrientes y sobrevivir en diversos ambientes, incluyendo condiciones extremas [11-14]. Por otra parte, las cianobacterias representan la base de numerosas cadenas tróficas acuáticas y terrestres y actualmente se están encontrando cada vez más aplicaciones biotecnológicas como por ejemplo la producción de biofertilizantes o de potenciales compuestos con usos farmacológicos [9, 15].

Entre los géneros más comunes que producen floraciones se destacan *Microcystis, Raphidiopsis, Anabaena, Planktothrix, Aphanizomenon* y *Nodularia,* siendo *Microcystis,* uno de los géneros más cosmopolitas de cianobacterias formadoras de floraciones que ha sido detectado en al menos 108 países en todo el mundo. En Uruguay, numerosos sistemas acuáticos, particularmente las cuencas sedimentarias y grandes embalses se encuentran en un avanzado estado trófico, por lo que son frecuentes las floraciones de cianobacterias. Éstas se dan principalmente en los embalses del Río Negro, pero también en el Río de la Plata en toda su extensión y en lagos someros eutróficos de la región (**Figura 1**) [16-23]. En el Río de la Plata, el fenómeno se observa en toda la costa con una frecuencia que depende de factores hidrometeorológicos (caudal, vientos y precipitaciones en la cuenca). Las floraciones pueden ser estacionales, comenzando en primavera y extendiéndose hasta principios del otoño, o permanentes [8, 24-26].

Las floraciones se han vuelto más notorias e intensas en los últimos años no solo por el enriquecimiento de nutrientes debido a la actividad humana sino también al cambio climático global, ya que el aumento de temperatura favorece su desarrollo [27-30].



Figura 1. Floraciones cianobacterianas en Uruguay. **A.** *Bloom* de *Microcystis* sp. en Playa Ramirez, febrero 2003. **B.** *Bloom* registrado en playa Puerto de Buceo, marzo 2003 (Fotografías: Intendencia de Montevideo). **C.** Floración *Microcystis* spp. y *Sphaerocavum brasiliense*, lago Jover, Canelones (Fotografía: Informe Limnológico de Lagos, Facultad Ciencias y Facultad de Química, 2010). **D.** Imagen aérea de floración Central Hidroeléctrica Constitución, Embalse de Palmar, 2009 (Fotografía: UTE). **E.** *Bloom* registrado en febrero 2019 en playa de Embalse de Palmar (Fotografía: D. Pérez).

Las floraciones representan una amenaza grave para la salud humana e interfieren con el desarrollo de diversas actividades como la obtención de agua potable, agua para diálisis, turismo y en usos productivos [31-33]. Asimismo, pueden producir intoxicaciones de animales domésticos, ganado, peces y mamíferos acuáticos [34-39] y tienen alto potencial para afectar fuertemente la economía local [40, 41]. Por lo tanto, comprender la dinámica de las floraciones es primordial para controlar el problema y mitigar el deterioro que éstas provocan.

1.2. Cianotoxinas

Las cianobacterias producen una gran variedad de metabolitos secundarios altamente tóxicos para animales, conocidos con el nombre genérico de cianotoxinas, cuyas características y principales géneros productores se presentan en la **Tabla 1** [8, 25, 42, 43]. En términos generales las cianotoxinas no parecen ser necesarias para el metabolismo primario de la cianobacteria y aunque existen algunas hipótesis, su rol dentro o afuera de las células no ha sido establecido claramente hasta el momento [44, 45]. Las condiciones que inducen la producción de estas toxinas tampoco se conocen plenamente y algunas especies que tienen la habilidad de producir toxinas, solo lo hacen bajo determinadas condiciones [8, 46]. La producción de toxinas es especie y más aún, cepa específica ya que algunas especies presentan cepas tóxicas y no tóxicas, lo que hace imposible determinar su capacidad de producir toxinas solamente mediante observación o identificación [46, 47]. Actualmente, existen métodos moleculares para determinar si una cianobacteria es portadora de los genes involucrados en la biosíntesis de las diferentes toxinas. Sin embargo la presencia de estos genes no indica la producción de las mismas y sólo se detecta si una cepa de cianobacteria es potencialmente tóxica [48-52].

Existen numerosos reportes de toxicidad y mortandad de animales, así como intoxicaciones en seres humanos. Son múltiples los episodios vinculados al uso de agua contaminada en Australia, Inglaterra, China y Sudáfrica [53-55]. En este sentido, el caso más renombrado es el ocurrido en Caruaru, Brasil, en el año 1996, cuando se registraron varias decenas de personas fallecidas por contaminación del agua para hemodiálisis con microcistinas [32, 56-58].

Las intoxicaciones ambientales, así como bioensayos realizados directamente con biomasa de floraciones, pautaron la existencia de cianotoxinas mucho antes de su caracterización estructural y toxicológica. Las cianotoxinas son estructuralmente muy diversas y según su estructura, se pueden agrupar en diferentes familias tales como péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos (**Tabla 1**). La mayoría son de bajo peso molecular, en un rango entre 118 Da (β -N-metilamino-L-alanina, BMAA y ácido 2,4-diaminobutírico, DAB) y ~1000 Da (microcistinas, MCs). En el caso de los lipopolisacáridos (LPS) se encuentran en un rango de 10 a 20 kDa.

Aún después de numerosos años de intensa investigación, la lista de las principales cianotoxinas presentada en la **Tabla 1**, no puede considerarse exhaustiva ya que numerosos reportes de ensayos de toxicidad (*in vitro* o *in vivo*) realizados con biomasa de cianobacterias o con extractos crudos, indican la presencia de compuestos tóxicos aún no identificados [59, 60].

Los mecanismos de toxicidad son también diversos e incluyen efectos hepatotóxicos, neurotóxicos, dermatotóxicos, hasta la inhibición de la síntesis proteica. Las hepatotoxinas ocasionan el tipo más común de intoxicación, si bien pueden presentar menor toxicidad y son de acción más lenta que las neurotoxinas [8, 61, 62]. A su vez, las hepatoxinas pueden presentar efectos crónicos importantes debido al consumo o exposición a bajas dosis durante periodos prolongados de tiempo [63-66].

Como se menciona en la **Tabla 1**, las hepatotoxinas pueden ser heptapéptidos cíclicos (microcistinas, MCs), pentapéptidos cíclicos (nodularinas; NODs) y alcaloides (cilindrospermopsina, CYN). Las principales especies identificadas como productoras están incluidas en los géneros *Microcystis, Anabaena, Nodularia, Oscillatoria, Nostoc y Raphidiopsis* [1].

En aguas de climas sub-tropicales y crecientemente en aguas de climas templados, se han aislado cepas de *Raphidiopsis raciborskii* [67-69] y *C. umenzaquianatans* [70, 71], productoras de CYN, cuya estructura corresponde a un alcaloide cíclico de guanidina, con 5 análogos estructurales conocidos [72] (**Figura 2**). Además de afectar el hígado, el timo, el corazón y los riñones, actuando mediante múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la síntesis proteica y la unión covalente a los ácidos nucleicos (ADN y ARN), entre otros [73, 74]. Se ha establecido su acción

mutagénica *in vitro* y existe evidencia de su carcinogenicidad, así como de su actividad como promotor de tumores *in vivo* [75, 76].

Cianotoxina	Estructura química	Cianobacteria productora	Modo de acción
Microcistinas (>200 variantes) [77]	Heptapéptidos ciclícos	Microcystis, Anabaena*, Nostoc, Planktothrix, Phormidium, Oscillatoria, Radiocystis, Gloeotrichia, Anabaenopsis, Rivularia, Tolypothrix, Hapalosiphon, Plectonema	Hepatotóxica, promotor tumoral, inhibidor proteínas eucariotas fosfatasa PP1, PP2A y fosfoproteínas fosfatasas PPP4, PPP5.
Nodularinas	Pentapéptidos cíclicos	Nodularia spumigena, Nostoc (symbiotic)	Idem microcistinas, además de leve carcinogenicidad.
Cilindrospermopsina (5 variantes)	Alcaloides de guanidina tricíclicos	Cylindrospermopsis*, Umezakia, Anabaena*, Oscillatoria, Raphidiopsis, Aphanizomenon	Hepatotóxica. Toxicidad en multiples órganos, neurotóxica, genotóxica, disruptores endócrinos. inhibidor síntesis proteica.
Anatoxina-a	Alcaloides bicíclicos	Anabaena, Phormidium, Aphanizomenon	Neurotóxica, se une competitivamente a los receptores de acetilcolina.
Anatoxina-a (S)	N-hidroxiguanina cíclica fosforilada	Anabaena*	Neurotóxica, inhibidor de acetilcolinesterasa.
Saxitoxina	Alcaloides	Aphanizomenon, Anabaena*, Lyngbya, Cylindrospermopsis*, Planktothrix	Neurotóxica, bloquea canales de sodio dependientes de voltaje.
Lyngbyatoxinas, Aplysiatoxinas	Alcaloides de Indol	Lyngbya, Oscillatoria, Schizothrix	Promotor tumoral, unión a proteína quinasa C eucariota.
BMAA, DAB	Diaminoácidos	Diversos géneros	Neurotóxico, afecta desarrollo, inserción de errores en síntesis de proteínas.
LPS	Lipopolisacáridos	Todos los géneros	Inflamatorio, promueve secreción de citoquinas

Tabla 1. Cianotoxinas. Resumen de estructuras químicas, principales de géneros productores y modo de acción.

Extraído y adaptado de Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Section I: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Their Human Impact, and Risk Management. 2017. *Anabaena, actualmente Dolichospermum. *Cylindrospermopsis, actualmente Raphidiopsis. Investigaciones recientes han revelado una amplia distribución de cianobacterias productoras de neurotoxinas, tales como anatoxina [78-80] y saxitoxina (**Figura 2**). La anatoxina-a y la homoanatoxina-a (ATX y HTX) son compuestos de bajo peso molecular (166 y 193 Da), alcaloides con grupo amino secundario [81]. Son potentes agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina y actúan como bloqueadores neuromusculares a nivel post-sináptico [82]. Las saxitoxinas (STXs), son neurotoxinas, químicamente alcaloides carbamatos, que hasta el momento se describen 57 análogos [83], son producidos por dinoflagelados marinos (marea roja) y numerosas especies de cianobacterias filamentosas tales como *Dolichospermum circinalis, Aphanizomenon spp., Lyngbya wollei* y *Raphidiopsis raciborskii*. Cabe mencionar que se han aislado cepas de C. *raciborskii* (actualmente *Raphidiopsis raciborskii*) locales que son productoras de saxitoxinas [84, 85].



Figura 2. Estructura química de algunas de las cianotoxinas más conocidas. NOD: nodularina (9 variantes estructurales cíclicas y una variante lineal). CYN: cilindrospermopsina (5 análogos estructurales). ATX-a: anatoxina-a. HTX-a: homoanatoxina-a. STX: saxitoxina (57 análogos).

En la mayoría de los casos, las cianotoxinas existen naturalmente de forma intracelular (en el citoplasma). La ATX y las MCs se encuentran mayoritariamente dentro de la célula durante la fase de crecimiento cianobacteriano (95%). Cuando se produce ruptura mecánica de la membrana o durante la senescencia celular, las toxinas son liberadas al cuerpo de agua (toxina extracelular). Por otra parte, en el

caso de otras toxinas, por ejemplo, la CYN, una cantidad significativa de toxina es liberada naturalmente al medio cuando la célula aún está viva, se reporta que el 50% de la toxina es intracelular y el 50% es extracelular [46]. Las toxinas extracelulares una vez que se liberan se pueden bioacumular o biodegradar, pero también adsorberse a arcillas y a material orgánico disuelto que existe en el cuerpo de agua, y generalmente estas son más difíciles de eliminar o degradar [47].

1.2.1. Microcistinas

En función de su alta relevancia e impacto tanto a nivel local como global, este trabajo se centró en la generación de metodologías para la detección de MCs. El género productor de MCs por excelencia, *Microcystis* ha sido reportado en numerosos países alrededor del mundo como se puede observar en la **Figura 3** [86, 87]. Es importante destacar que en nuestros principales recursos hídricos (Río Uruguay, Río Negro y Río de la Plata) son frecuentes las floraciones con predominancia del género *Microcystis*, usualmente productoras de elevadas concentraciones de MCs [17, 18, 20, 22, 23, 88]. Además, debe destacarse también, que existen reportes de intoxicaciones agudas relacionadas al uso recreativo en el río Uruguay y en el Río de la Plata [89, 90].



Figura 3. Países donde se han reportado al menos una publicación ISI (International Scientific Index) de cianobacterias productoras de microcistinas. Extraído de Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Section I: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Their Human Impact, and Risk Management. 2017.

Las microcistinas fueron originalmente identificadas como FDF de la sigla en inglés *Fast-Death Factor* [91], pero unos pocos años después recibieron su nombre actual [92]. Las floraciones de *Microcystis*, productoras de MCs están fuertemente asociadas al aumento de nutrientes antropogénicos [10, 93], a temperaturas del agua por encima de los 15°C y a bajas salinidades [94-96]. Sin embargo, existen numerosas publicaciones y reportes sobre el incremento de floraciones cianobacterianas en estuarios y aguas salobres [97]. Algunos géneros tienen una tolerancia a concentraciones relativamente alta de sal, varios géneros comunes productores de MCs (*Anabaena, Anabaenopsis, Microcystis y Oscillatoria*), puede mostrar altas tasas de crecimiento en ambientes salinos [38, 98-100]. Por ejemplo, *M. aeruginosa* tiene una de las tolerancias más altas [101, 102] y puede continuar creciendo e inclusive produciendo MCs en ambientes salinos [100].

1.2.1.1. Rol biológico de las MCs

Los factores que regulan la producción de las MCs y su potencial rol ecofisiológico para su principal género productor (*Microcystis*), han sido temas de intensa investigación en las últimas décadas. Los primeros reportes se focalizaron en estudiar la influencia de factores comúnmente asociados con la formación y senescencia de las floraciones, como la temperatura, presencia de nutrientes y la luz. Sin embargo, en estos estudios se utilizaron principalmente cultivos en laboratorio y los cambios observados en la producción de toxina son relativamente menores (incrementos de 3 a 4 veces), por lo que estos factores no son suficientes para explicar las variaciones de toxicidad observadas en la naturaleza, que en ocasiones suelen ser mucho mayores [87].

Si bien una hipótesis popular fue que las MCs actúan como elemento disuasivo contra depredadores (tales como zooplacton y peces), los análisis filogenéticos sugieren que los genes responsables de su síntesis son anteriores a la aparición de los eucariotas [103]. Otras hipótesis apuntan a que las cepas productoras de MCs presentan mejor eficacia de fotosíntesis, tasas de crecimiento acelerado y resistencia frente a factores de estrés. En este sentido se han reportado implicancias en la quelación de metales [104, 105], en la comunicación intraespecie [106], formación de colonias [107] y modulación de la expresión proteica [108, 109].

1.2.1.2. Estructura química

Las MCs son péptidos monocíclicos pequeños muy estables, de siete aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos con estructura general, Ciclo(-D-Ala1-L-X2-D-MeAsp3-L-Z4-Adda5-D-Glu6-Mdha7) (**Figura 4**); donde *X* e *Y* representan posiciones ocupadas por L-aminoácidos variables; con un peso molecular de aproximadamente 1000 Da, el cual varía según su estructura [110-112]. Además, contienen dos D-aminoácidos convencionales en las posiciones uno y seis; ácido Deritro- β -metilaspártico en posición tres y en posición siete usualmente Nmetildehidroalanina. El β -aminoácido Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8trimetill-10-fenildeca-4,6-dienoico), único y característico de las MCs y NODs, está asociado a la toxicidad *in vivo* de la molécula [113-115].

Los diferentes congéneres o variantes reciben su nombre de acuerdo a los aminoácidos incorporados en posición dos y cuatro, por ejemplo, microcistina-LR (MC-LR) contiene leucina (L) en posición dos y arginina (R) en cuatro. El número de variantes o congéneres conocidos es muy dinámico y ha ido aumentando año tras año a medida que nuevas tecnologías permiten elucidar sus estructuras con mayor detalle. Actualmente se sabe que son una familia de al menos 248 heptapéptidos cíclicos [77, 116, 117], con diferente composición e isomerización de sus aminoácidos. Esta gran diversidad se debe principalmente a sustituciones de los L-aminoácidos variables en posición dos y cuatro, así como a modificaciones en todos los aminoácidos que componen la molécula, como por ejemplo oxidaciones y/o metilaciones [116, 118]. Las variantes químicas más comunes son, leucina-arginina (LR), tirosina-arginina (YR) y arginina-arginina (RR).



Figura 4. Estructura general de las MCs: Ciclo(-D-Ala1-L-X2-D-MeAsp3-L-Z4-Adda5-D-Glu6-Mdha7); en la que X y Z pueden ser varios L aminoácidos; D-MeAsp es D-eritro- β -ácido metilaspártico; Adda es un aminoácido atípico: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetill-10-fenildeca-4,6-dienoico, y Mdha es N-etil-dehidroalanina. Si X es Leucina y Z es Arginina MC-LR.

1.2.1.3. Toxicidad de las MCs

Las MCs no pueden difundir pasivamente a través de la membrana plasmática debido a su peso molecular relativamente alto (~1000 Da) y su moderada hidrofobicidad. Muchos reportes demuestran que su ingreso a las células está mediado por transportadores proteicos aniónicos de ácidos biliares, conocidos con el nombre genérico polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATp, de sus siglas en inglés). Este transporte activo ha sido estudiado en mamíferos, en líneas celulares y en tejidos de peces [119-125].

La toxicidad en vertebrados entonces, está mediada por este transporte activo principalmente hacia los hepatocitos, induciendo una retracción de los mismos y produciendo edema hepático (hepatomegalia) y hemorragia. Estos efectos pueden observarse fácilmente en necropsias, evidenciado por el incremento del tamaño del hígado y mediante análisis clínicos, a través del aumento de enzimas hepáticas en suero. Desde hace muchos años, se han reportado numerosos casos de intoxicaciones agudas, tanto en animales como en humanos, que se caracterizan por producir la muerte por hemorragia hepática masiva [32, 58, 126, 127].

Los datos sobre la toxicidad oral en humanos son limitados y en alguna medida confusos, debido a la posible co-exposición a otros contaminantes y a la falta de información cuantitativa. Estos demuestran la absorción de microcistinas en el tracto intestinal y su distribución a hígado, cerebro y otros tejidos. Una vez dentro de la célula, su toxicidad está mediada por la unión covalente entre la toxina y proteína fosfatasas citosólicas (tipo 1 y tipo 2A), luego de que la toxina ingresa en un surco hidrofóbico que poseen estas proteínas (**Figura 5**). Dicho enlace covalente se da entre la Cys269 localizada en el sitio activo de la proteína y el átomo de carbono terminal de la cadena lateral de Mdha [113, 128-131]. Esta unión produce la inhibición irreversible de estas fosfatasas generando múltiples efectos, que en el hígado conlleva a la pérdida de su arquitectura normal, produciendo estrés oxidativo y además, pérdida de la integridad funcional de la mitocondria ocasionando daño celular permanente [132-134].



Figura 5. Proteína fosfatasa 1 (PP1) humana unida a microcistina-LR. Fuente: *Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/).*

Se ha demostrado que las MCs causan daños hepáticos, insuficiencia renal (nefrotoxicidad), trastornos gastrointestinales, reacciones alérgicas e irritaciones, así como neurotoxicidad, entre otros efectos [135-137]. Pueden afectar, además, el sistema inmunológico de los animales, incluidos humanos. Se ha descubierto que MC-LR actúa como un inmunomodulador en la producción de citoquinas y regula a la baja las funciones de los linfocitos mediante la inducción de apoptosis y necrosis [138, 139]. Los datos sobre exposición intravenosa en humanos, en pacientes dializados con agua contaminada (caso de Caruaru, Brasil) en los que se registró la muerte de un gran número de pacientes también evidenciaron insuficiencia hepática aguda [32, 56].

Estudios en animales de laboratorio confirman además de los efectos hepáticos característicos, efectos renales y reproductivos luego de exposiciones orales en dosis sub-letales a corto plazo de MC-LR. La ingesta crónica, de dosis sub-letales posee el potencial de inducir carcinoma hepatocelular primario en roedores [140]. Se ha demostrado también que las MCs y NODs son potentes promotores de tumores [141-143]. Si bien los estudios epidemiológicos pueden no ser del todo concluyentes, existen reportes de que el consumo crónico de MCs, por ejemplo en agua potable puede ser un factor de riesgo para cáncer primario de hígado y colorrectal en humanos [144-149]. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha clasificado a Microcistina-LR como un posible carcinógeno humano (Grupo 2B) [150].

Aunque se dispone de datos limitados sobre el metabolismo y eliminación de las microcistinas, se presume que la eliminación de estas toxinas, también requiere del transporte activo antes mencionado (OATp). La mayoría de los estudios indican que las microcistinas se pueden conjugar con glutatión y cisteína, lo que resulta en productos menos tóxicos, aumentando su solubilidad y facilitando su excreción [151-153]. Este proceso de eliminación ha sido reportado en varias especies de peces [154-158]. En suma, en tejidos animales las microcistinas se pueden encontrar en diferentes formas: unidas a proteínas y en formas extraíbles (solubles en extractos con metanol/agua) como microcistina nativa o conjugada a glutatión y/o cisteína [57, 153, 159]. Un problema que merece especial atención es que las MCs tienen capacidad de acumularse en diversos organismos como por ejemplo moluscos bivalvos [160, 161]. Su transferencia en la cadena alimentaria a especies de niveles tróficos superiores, podría constituir una fuente adicional de exposición para animales y seres humanos [162]. Numerosos reportes señalan que esta acumulación puede ser particularmente relevante, alcanzando en hígado y músculo de peces (fitoplantívoros, omnívoros y carnívoros) concentraciones que pueden superar la dosis diaria tolerable provisional propuesta por la OMS [163]. Sin embargo, en algunos casos puede suceder que las concentraciones de toxina libre encontradas en músculo de peces sean muy bajas, a pesar de que presenten severas alteraciones en los tejidos a nivel estructural [164].

1.2.1.4. Valores guía y normativas para diferentes vías de exposición a MCs

La elevada toxicidad asociada a las microcistinas, promovió que la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableciera en el año 1998 el primer valor guía de microcistinas para agua potable: 1 μ g/L de MC-LR total (soluble más intracelular [165]. Este valor provisional está basado en una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,04 μ g/Kg/día [8, 166] y con un factor de alocación de 0,8 para agua potable y 0,2 para otras fuentes de exposición.

En la actualidad, dieciocho países además de tres estados en Estados Unidos, han establecido estándares o valores guías para MCs en agua potable (**Tabla 2**). En dieciséis de ellos y en Uruguay, se adoptaron las directrices provisionales de la OMS. Australia y Canadá han utilizado la misma IDT, pero han adaptado otros factores en el cálculo para reflejar sus circunstancias nacionales (por ejemplo, peso corporal o volumen de consumo de agua), alcanzando valores o estándares más altos [167]. Algunos países han propuesto valores de referencia específicamente para MC-LR, mientras que otros refieren a la toxicidad global de MCs expresada como equivalentes de toxicidad de MC-LR. Los valores son similares en todos los países, oscilando entre 1,0 y 1,5 µg/L [168].

En nuestro país, existe el Decreto N° 315/994 del 5 de julio de 1994 y Decreto 375/11 que adopta lo establecido en la Norma UNIT 833:2008 (reimpresión julio 2010), que establece el máximo valor permitido de MCs como 1 µg/L de MC-LR (cuantificado con método de referencia de la norma ISO 20179). Como parte del plan de trabajo de "revisión continua" de las Directrices para la Calidad del Agua Potable (GDWQ, de su sigla en inglés para *Guidelines for drinking-water quality*), la OMS revisará el valor de referencia provisional existente para MC-LR, y evaluará los datos disponibles para determinar si se pueden establecer nuevos valores de para MCs y para otras cianotoxinas (cilindrospermopsina, saxitoxina, anatoxina). Además, se evaluará si es apropiado establecer valores de referencia para exposiciones a corto plazo [165].

Country	Guideline Value	Source
Brazil, China, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Italy, Japan, Korea, Netherlands, Norway, New Zealand, Poland, South Africa, and Spain	1.0 μg/L microcystin-LR	Based on the World Health Organization (WHO) Provisional Guideline Value of lug/L for drinking water (WHO, 1999; 2003)
Australia	1.3 μg/L microcystin- LR (toxicity equivalents)	Australian Drinking Water Guidelines 6 (NHMRC, NRMMC, 2011)
Canada	1.5 μg/L microcystin-LR	Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation Cyanobacterial Toxins- Microcystin-LR (Health Canada, 2002)

Tabla 2. Valores guía internacionales establecidos para microcistinas.

Extraído de Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. U.S. Environmental Protection Agency. 2015.

En los Estados Unidos, la Ley sobre Agua Potable Segura (*Safe Drinking Water Act*) habilita a que la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU (EPA, de su sigla en inglés para *Environmental Protection Agency*), publique advertencias para la salud, de aquellos contaminantes que no están sujetos aún a ninguna regulación nacional. En este marco, la EPA tiene programas de Asesoramiento de Salud (Health

Advisories, HA); para aportar información a funcionarios de salud pública u otros grupos interesados, sobre contaminantes asociados con incidentes de contaminación a corto plazo o derrames, que pueden afectar la calidad del agua potable. Este programa de asesoramiento considera al agua potable como la principal fuente de exposición a MCs. Aunque la exposición a las cianobacterias y sus toxinas, también puede ocurrir por la ingestión de alimentos contaminados, incluido el consumo de pescado; por inhalación y el contacto dérmico durante el baño o la ducha, o durante las actividades recreativas en cuerpos de agua contaminados. Si bien estos otros tipos de exposición total que el consumo de agua potable [168]. Debido a la estacionalidad de las floraciones cianobacterianas, no se espera que las exposiciones sean crónicas; aunque como ya se mencionó estas floraciones son cada vez más frecuentes e inclusive en la actualidad debido al cambio climático y variabilidad climática, pueden existir floraciones permanentes [3, 28, 29, 31, 169, 170].

Las recomendaciones de la EPA, describen las máximas concentraciones de contaminantes en las cuales no se esperan efectos adversos a la salud durante períodos de exposición específicos (por ejemplo, un día, 10 días, varios años o toda la vida). En este sentido, la EPA recientemente ha emitido, para un periodo de exposición de 10 días, los siguientes valores límite (*Health Alert*): 0,3 µg/L de MCs, para niños en edad pre-escolar (menores de 6 años); y 1,6 µg/L, para niños escolares y adultos [168]. Entre otros aspectos, se considera que los niños pequeños son más susceptibles, además de que consumen más agua en relación a su peso corporal.

Por otro lado, con los datos disponibles, la EPA considera que la principal fuente de exposición aguda a MCs, con efectos sobre la salud humana, es la exposición recreativa a las floraciones de cianobacterias. Los síntomas reportados incluyen dolor de cabeza, dolor de garganta, vómitos y náuseas, dolor de estómago, tos seca, diarrea, ampollas alrededor de la boca y neumonía [171]. La Organización Mundial de la Salud en el año 2003, también estableció una serie de valores guía para exposición recreativa a cianobacterias (**Tabla 3**), en base a las concentraciones de

células y de clorofila-a, en diferentes categorías de riesgo asociados con la gravedad y los posibles efectos adversos sobre la salud [172].

Tabla 3. Directrices/niveles de acción para cianobacterias, clorofila-a y microcistina en aguas recreacionales.

Relative Probability of Acute Health Effects	Cyanobacteria (cells/mL)	Chlorophyll a (µg/L)	Estimated Microcystin Levels (µg/L)ª
Low	< 20,000	< 10	< 10
Moderate	20,000-100,000	10–50	10-20
High	>100,000-10,000,000	50-5,000	20-2,000
Very High	> 10,000,000	> 5,000	> 2,000

a: concentraciones de microcistina, derivados de los niveles de densidad celular de cianobacterias. Extraído de Human Health Recreational Ambient Water Quality Criteria or Swimming Advisories for Microcystins and Cylindrospermopsin. U.S. Environmental Protection Agency. Diciembre 2016.

A medida que la densidad de cianobacterias aumenta, aumenta la probabilidad de respuestas inflamatorias y la posibilidad de efectos adversos para la salud más graves. Los valores propuestos se basan en el supuesto que las cianobacterias productoras de MCs dominan la población de cianobacterias presentes y que el contenido promedio de MCs en *Microcystis* sp. es 0,2 pg/célula [172]. Esta guía de la OMS estableció como límite de bajo riesgo para exposición recreativa, una densidad de células cianobacterianas 20.000 células/mL (equivalente a un valor de clorofila-a de 10 μ g/L) que corresponde aproximadamente a 2-4 μ g/L de MCs [8, 172].

1.3. Monitoreo de floraciones

La protección de la salud pública es un objetivo primordial de los programas de monitoreo de aguas recreacionales. La eficacia de la gestión y manejo de los riesgos asociados a las floraciones tóxicas, así como la implementación de programas de monitoreo exitosos, depende de una evaluación precisa y adecuada del peligro. Esta evaluación depende tanto de la disponibilidad de datos analíticos exactos, precisos y confiables, representativos de la situación real, así como del correcto planteo de los supuestos que subyacen para la conversión del resultado de un análisis, en una estimación de riesgo potencial [173, 174]. Por otra parte, si bien existe acuerdo en que deben analizarse las cianotoxinas, la vigilancia de rutina del riesgo asociado a estas moléculas tanto en aguas ambientales utilizadas para uso recreativo, como para la producción de agua potable, se realiza a nivel mundial, por métodos simples e indirectos [174].

1.3.1. Monitoreo del riesgo asociado a cianotoxinas

Los métodos más utilizados para el monitoreo de floraciones son: 1- identificación y conteo de cianobacterias toxigénicas (o determinación de clorofila como indicador de biomasa de fitoplancton); 2- detección de genes que codifican la producción de toxinas; 3- detección y cuantificación de toxinas individuales y 4-bioensayos de toxicidad [174]. Cada uno de estos métodos posee sus ventajas y desventajas, por lo que la complementación de la información obtenida en cada uno, genera mayor seguridad a la hora de tomar decisiones. Así, por ejemplo, para traducir un valor guía de toxinas en un número absoluto de células o biovolumen, se debe asumir un contenido celular estándar de toxina (cuota celular). Sin embargo, esta estrategia tiene sus limitaciones, porque las cuotas celulares reportadas varían considerablemente según la composición de las cepas cianobacterianas presentes en una floración [174].

La metodología de monitoreo a utilizar depende de las condiciones del curso de agua, así como de los recursos disponibles [175]. La EPA propone un enfoque conceptual paso a paso que se esquematiza en la **Figura 6**. En el primer paso se recomienda evaluar la vulnerabilidad del cuerpo de agua a las floraciones y priorizar los sitios de control para el monitoreo. Para aquellos sitios vulnerables, en el segundo paso se propone observar la presencia de floraciones, en base a observación visual, datos satelitales, o recuento de fitoplancton a lo largo de toda la temporada estival. Si se detectan floraciones, en el siguiente paso se deben monitorear cianotoxinas y/o densidades celulares. Finalmente, si se detecten niveles de cianotoxinas y/o cianobacterias, por encima de los valores guía o normativos, se debe notificar de los riesgos a la población y continuar con el monitoreo en forma regular.



Figura 6. Diagrama de recomendaciones para el monitoreo de cianotoxinas y/o cianobacterias en aguas recreacionales. Adaptado de *"Recommendations for Public Water Systems to Manage Cyanotoxins in Drinking Water" June 2015, EPA 815-R-15-010".*

*Puede ser un aviso/advertencia o cierre del sitio afectado.

**En caso afirmativo, se puede considerar modificar la notificación para indicar el nivel de toxina o el recuento de células. Si hay toxinas presentes pero el valor es menor que el apropiado para la advertencia, continuar monitoreando toxinas.

***Si no se dispone de un programa de monitoreo establecido con valores para cianotoxinas o recuento de células en el que basar una notificación, los responsables de la gestión de las aguas recreativas pueden considerar el uso de los valores preliminares que recomienda la EPA.

1.3.2. Obtención y preparación de muestras

Un punto clave para el análisis exitoso de cianotoxinas es el proceso de obtención y preparación de muestras. Si bien el proceso de toma de muestra depende del tipo de análisis que se desee realizar, existen ciertas consideraciones a tener en cuanta. Si el objetivo es la protección de la salud pública la muestra debe extraerse de las zonas de mayor uso recreativo, así como de los sitios donde se observen las acumulaciones de cianobacterias, que representan el peor escenario para la exposición.

En muestras ambientales si es necesario, la biomasa cianobacteriana se concentra mediante filtración utilizando redes para concentración de plancton (con mallas de 10–64 mm) [176-178], por micro-filtración utilizando filtros GF/C [179] o por filtración por vacío usando filtros de papel GF/B [180].

Como ya se mencionó anteriormente, estas toxinas son mayoritariamente intracelulares, sobretodo en estadios tempranos del crecimiento cianobacteriano. Para realizar el análisis de la toxina extracelular se utiliza la fase acuosa que se puede obtener directamente por filtración y para el análisis de la toxina intracelular se obtiene la biomasa filtrada. En todos los casos la muestra debe ser almacenada a -20° hasta la realización del análisis [176, 179, 181]. En la mayoría de los casos se realiza el análisis del contenido total de toxina (intra y extracelular), en este caso, previo al análisis es indispensable la correcta homogenización y disrupción o lisis completa de las células, para asegurar una recuperación del contenido total de la toxina libre. Todos los métodos analíticos disponibles permiten medir las MCs solubles o libres, presentes en la muestra (a excepción del método MMPB que se discutirá más adelante).

Para la disrupción celular se han descripto una gran diversidad de métodos, entre ellos: incubación de la biomasa con agitación en presencia de solventes por varias horas [182], agitación mecánica utilizando vortex [183], repetidos ciclos de congelado y descongelado [180, 184] y sonicación [179, 185]. Sin embargo, no existen datos concluyentes sobre qué método es el más adecuado [186]. Por ejemplo, la sonicación ya sea en baño o utilizando sondas es un método ampliamente empleado [187], aunque su uso no es recomendado para poco volumen de muestra, ya que puede provocar aumento de temperatura resultando en evaporación o inclusive degradación de la muestra [179, 188]. La estrategia de lisis más utilizada e inclusive recomendada en el método EPA 546 para determinación de MCs totales por ELISA es tres ciclos de congelado y descongelado [189]. También se ha propuesto el uso de horno microondas y baño de agua en ebullición, para la ruptura y extracción de MCs, apuntando a métodos de extracción que eviten la utilización de solventes orgánicos, los cuales pueden interferir en procedimientos analíticos sensibles como en el caso de los inmunoensayos [190]. Luego de la lisis celular se deben remover los restos celulares por centrifugación o por filtración utilizando membranas de 0,2-0,45 μm [182, 191].

1.4. Detección y cuantificación de cianotoxinas

Los métodos para el análisis de cianotoxinas varían ampliamente en sensibilidad, rapidez, costo y nivel de experiencia requerida. La determinación analítica de cianotoxinas, puede basarse en sus propiedades fisicoquímicas utilizando métodos analíticos instrumentales, en propiedades bioquímicas y moleculares, así como también en bioensayos, que evalúan directamente sus efectos en organismos vivos. Si bien los métodos instrumentales son los más ampliamente utilizados como métodos de referencia, los inmunoensayos son cada vez más aceptados para la cuantificación de este tipo de moléculas y suelen ser utilizados como métodos de tamizaje (*screening*).

En general lo más adecuado es el uso combinado de más de un método: primeramente, un método de *screening* y luego uno confirmatorio que suele ser un método instrumental. Sin embargo, la realidad es muy compleja, ya que, aunque se utilicen métodos analíticos para cuantificar toxinas, como se mencionó anteriormente, algunas cianotoxinas presentan una gran variedad de congéneres o variantes estructurales, que presentan diferencias en su toxicidad [8, 192]. A su vez, como los valores guía establecidos están usualmente en el rango de partes por billón (µg/L), existe la necesidad de disponer de métodos muy sensibles. Estas condicionantes determinan que es esencial disponer de métodos de alta resolución y sensibilidad, que implican grandes desafíos desde el punto de vista analítico.

1.4.1. Métodos instrumentales para cuantificación de MCs

La cuantificación de MCs en diferentes matrices generalmente se realiza usando técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) y espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) [179, 181, 193-197]. Para la detección se puede utilizar espectrometría UV o de masas, esta última representa una herramienta poderosa para la identificación de MCs y NODs, que puede aportar datos cualitativos y cuantitativos. La primera norma de análisis de MCs fue la norma ISO 20179:2005 basada en HPLC/UV; las normas más nuevas están basadas en métodos de LC-MS/MS como el método EPA/600/R-14/474. Method 544 [198, 199].

Una de las mayores limitaciones para el análisis cuantitativo de MCs con métodos instrumentales como el HPLC/UV, es la disponibilidad de estándares [200, 201], ya que para la cuantificación de cada variante se requiere el estándar correspondiente. De las cerca de 250 variantes reportadas [192], solo existen disponibles comercialmente estándares para una fracción pequeña de congéneres (<20) [202-204].

1.4.1.1. El HPLC/UV: método tradicional para el análisis de MCs

El amplio rango de polaridad de las diferentes congéneres de MCs, permite la separación cromatográfica de numerosas variantes utilizando columnas de silica C18 [179, 180, 202] y la elución requiere el uso de gradientes de fases móviles (agua y acetonitrilo o metanol, generalmente) acidificadas con ácido trifluoroacético (TFA) o ácido fórmico. Tradicionalmente, se ha utilizado la detección UV, especialmente incorporando arreglo de diodos (PDA, *photo diode array*), ya que las MCs y NODs tienen un espectro característico con máximo de absorción a 238 nm, atribuido a su principal cromóforo, el dieno en el residuo aminoacídico Adda [181, 204] o a 222 nm para las MCs que contienen triptófano (**Figura 7**) [182].

La identificación y cuantificación de estas toxinas por HPLC/UV, se basa en el tiempo de retención, su espectro UV y el área del pico obtenido, utilizando curvas de calibración con estándares comerciales [201]. La capacidad de distinguir entre congéneres de esta técnica es limitada, ya que la mayoría de las variantes

presentan un perfil de absorción característico similar entre 200 y 300 nm. Además, junto con cada pico es posible la co-elución de otros compuestos que no corresponden al analito de interés que pueden interferir en la cuantificación [18, 180].



Figura 7. (a). Cromatograma de MCs presentes en *Microcystis aeruginosa* (cepa PCC7820), extracto 100% metanol: 5-MC-LR; 8-MC-LY; 9-MC-LW; 10-MC-LF. **(b)**. Espectro de absorción correspondiente determinado por HPLC con detector PDA. *Extraído Lawton et al. 1994.*

1.4.1.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS o MS/MS): identificación y elucidación estructural de MCs

La cromatografía líquida acoplada a detección por MS, ofrece las mejores características para el análisis de familias complejas de moléculas de alta diversidad estructural como es el caso de estas toxinas [25, 111, 205, 206]. En la espectrometría de masas, las moléculas presentes en la muestra se convierten en iones desolvatados, que se resuelven en analizadores de masas, dependiendo de su masa molecular y de su carga [207]. Dado que se conocen las masas de las diferentes variantes, el LC-MS tiene como ventaja la posibilidad de monitorear y cuantificar solo aquellas masas específicas de interés. En la **Figura 8** se puede observar una representación de la estructura de diferentes congéneres de MCs, donde se indican algunas de las modificaciones más comunes y las señales m/z de los iones [MH]⁺ correspondientes, donde M es la masa molecular de cada variante.

Se denomina espectrometría de masas en tándem (MS/MS) al acoplamiento de dos espectrómetros de masas unidos por una cámara, que en general fragmenta las moléculas. El primer espectrómetro genera el espectro de masas de la muestra y

selecciona de todos los iones, el ion correspondiente a una relación masa/carga (m/z) determinada (*Ion Precursor*). Este *Ion Precursor* se introduce en una cámara de colisión, en la que se bombea un gas. En esta cámara, los iones son acelerados por un potencial eléctrico hasta obtener una energía cinética alta y colisionan con las moléculas del gas (helio, nitrógeno o argón). En la colisión parte de la energía cinética se transforma en energía interna y el *Ion Precursor* se fragmenta en pequeños fragmentos neutros y cargados; estos fragmentos, denominados *Iones Producto*, entran en el segundo espectrómetro de masas donde son analizados para dar un nuevo espectro de masas. En la **Figura 8** se muestran los *Iones Productos* característicos de la fragmentación de grupo Adda (m/z 135 y [MH-134]+).



Figura 8. Estructuras de análogos de MCs y sus correspondientes señales m/z de iones [MH]⁺, donde M es la masa molecular. Se representan los siete residuos de aminoácidos (1-7), las posiciones 2 y 4 corresponden a aminoácidos variables. Se representa la fragmentación de grupo Adda y los *Iones Producto* generados (m/z 135 y [MH-134]⁺). Los aminoácidos se indican con sus abreviaturas de 3 letras. *Extraído y adaptado de Miles et al, 2013.*

El análisis por LC-MS/MS utilizando ionización por *electrospray* y diferentes analizadores de masas como triple cuadrupolo, trampa de iones o por tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*), se han convertido en los métodos de referencia (*gold standard*) para determinación de MCs y NODs [179, 203, 208-210].

Los analizadores de masas ofrecen una muy buena sensibilidad y mejoras de selectividad sobre la detección óptica (UV). Los fragmentos de masa característicos, producidos ya sea en la fuente de ionización o por fragmentación

MS/MS, pueden ser utilizados para la identificación confiable de estas toxinas (aún en ausencia de estándares), ya que el espectro de masas de los diferentes congéneres de MCs presentan diferentes patrones de fragmentación [202, 211-213].

A su vez, esta metodología que se utiliza para la secuenciación de péptidos, es una herramienta extremadamente valiosa para detectar variantes de MCs desconocidas, inclusive en matrices complejas [193, 214, 215]. Entre los métodos que existen con este fin, el más utilizado en proteómica es la disociación inducida por colisión (CID, *collision-induced dissociation*). Los fragmentos de iones CID, especialmente el ion de fragmentación de m/z 135 (derivado del grupo Adda), o m/z 265 para los congéneres que contienen ADMAdda (Adda desmetilado), han proporcionado desde hace algunos años, una herramienta útil para la identificación de MCs [162, 180, 204, 208, 213].

Con el fin de aumentar la confianza en la identificación y cuantificación, el uso de la espectrometría de masas en tándem es prácticamente obligatorio en analítica y en particular con matrices complejas como tejidos animales [211, 216]. Sin embargo, estos métodos requieren técnicos entrenados, sus costos de inversión y operativos son altos, lo que dificulta la implementación para el monitoreo ambiental, limitando así la disponibilidad de datos. Asimismo, en muchos casos, para alcanzar los límites de detección requeridos, son necesarios laboriosos procesos de preconcentración de muestras por extracción en fase sólida. En este sentido, recientemente se han reportado avances notorios en métodos de preconcentración que permitieron llegar a muy bajos límites de detección [217].

1.4.1.3. MALDI-TOF: método no cromatográfico para identificación y cuantificación de MCs

La espectrometría de masas por desorción/ionización laser, asistida por matriz, con analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF, *Matrix assisted laser desorption/ionization, Time of flight*) puede usarse para realizar un análisis rápido y sencillo con el fin de identificar o inclusive cuantificar MCs y NODs [218-222]. La principal ventaja del MALDI-TOF frente a otras técnicas analíticas es que utiliza pequeñas cantidades de muestra, generalmente sin necesidad de pretratamiento, además de obtener un resultado inmediato a un costo operativo bajo.

La espectrometría de masas por MALDI-TOF se basa en el análisis directo de muestras co-cristalizadas con una matriz de moléculas orgánicas pequeñas, con alta capacidad de absorber energía proveniente de un láser. La ionización del analito de interés junto con moléculas de la matriz, se logra entonces por un láser de nitrógeno (λ =337 nm) en pulsos de corta duración (**Figura 9**) [223]. Dependiendo del analito en cuestión se emplean distintas matrices, entre las más comunes se encuentran el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), el ácido sinapínico (SA) y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). El analizador de masas por tiempo de vuelo (TOF), permite determinar la relación m/z de los iones generados luego de la ionización según el tiempo que tarda el ion en atravesar el analizador TOF y alcanzar el detector. Utilizando el modo de extracción tardía (delayed extraction), en la que el voltaje de aceleración no se aplica inmediatamente, es posible compensar pequeñas diferencias en la energía adquirida en la ionización por iones de igual masa mejorando así la resolución. Además, un aumento notable en la resolución se logra utilizando un "espejo de iones" (modo reflectrón o reflector), el cual mediante un campo eléctrico invierte la dirección de los iones, proceso en el que se corrigen las diferencias en la energía cinética de iones de idéntica masa, que llegan así con idénticos TOF al detector.

A su vez, estos equipos permiten la realización de espectros utilizando la opción *Post Source Decay* (PSD), en donde es posible obtener un perfil de fragmentación de los iones moleculares y aportan información adicional sobre la estructura del *Ion Precursor* [207, 224, 225]. En los últimos años se han incorporado equipos de MALDI-TOF/TOF (espectrometría de masas en tándem), que permiten analizar los fragmentos obtenidos del *Ion Precursor* en un segundo analizador TOF, obteniendo así una mejor resolución y sensibilidad para los *Iones Producto* permitiendo obtener excelentes espectros de fragmentación que superan ampliamente los obtenidos por PSD.



Analizador de masas TOF

Figura 9. Esquema de ionización mediante MALDI-TOF. Sobre una placa de acero se deposita la muestra junto con matriz. Los puntos (*spots*) a analizar reciben disparos de un láser causando la vaporización e ionizando de las moléculas de la matriz y la muestra. La nube de moléculas ionizadas se acelera en el analizador de masas TOF, hacia un detector. Las moléculas más ligeras adquieren velocidades mayores, seguidas por analitos progresivamente más pesados. La separación es por relación m/z, pero debido a que los iones adquieren típicamente un único protón la separación es efectivamente por masa molecular. *Extraído y adaptado de Patel 2015 (Fundación Mayo para la Educación e Investigación Médica).*

Son numerosos los reportes del uso de MALDI-TOF para la identificación de MCs y de otros oligopéptidos, aun directamente desde colonias individuales aisladas de *Microcystis* [49, 226, 227]. El análisis directo de colonias de *Microcystis*, resulta una herramienta valiosa para la alerta temprana en la formación de floraciones toxicas, ya que permite la detección rápida de la presencia de cepas productoras de MCs en una fase temprana de crecimiento, así como obtener un perfil completo de metabolitos secundarios [218].

Las aplicaciones cuantitativas de MALDI-TOF para el análisis de MCs son escasas y relativamente recientes [220, 221]. A pesar de que la intensidad de un ion dado, es proporcional a su concentración en el sitio irradiado con el láser, la distribución heterogénea del analito junto con la matriz, que se produce durante la cristalización dificulta sus aplicaciones cuantitativas. Sin embargo, esto puede corregirse con el uso de estándares internos (IS), esto es adicionando moléculas

con propiedades fisicoquímicas similares al analito que co-cristalizan con el mismo y que permiten así obtener resultados cuantitativos sobre la base de la relación de la intensidad del analito respecto al IS [228-230].

1.4.1.4. Método para determinación de MCs totales (MMPB)

Desde ya hace varios años se ha propuesto el método conocido como método MMPB (ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico), para la cuantificar el contenido total de MCs y NODs en todo tipo de matrices, sobre todo en matrices biológicas [231]. Este método permite cuantificar un producto resultante de la oxidación del grupo Adda, mediante el proceso conocido como oxidación de Lemieux (**Figura 10**). La técnica analítica comúnmente usada para la cuantificación del MMPB luego de la oxidación es la LC-MS/MS, este permite cuantificar el total de las MCs/NODs presentes en la muestra, aunque quedan excluidos los congéneres que presentan el grupo Adda desmetilado (ADMAdda). Este proceso ha sido adaptado y optimizado para la determinación cuantitativa de MCs totales (libre y unida covalentemente a proteínas), tanto en matrices complejas, así como en aguas [232-234].



Figura 10. Oxidación de Lemieux para analisis de MCs totales, mediante oxidación del motivo Adda liberando MMPB (ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico). *Extraído y adaptado de Roy-Lachapelle et al, 2015.*

1.4.2. Bioensayos y métodos bioquímicos

Inicialmente los únicos métodos disponibles eran los bioensayos en ratones, en los que la muestra se inyecta, por ejemplo, intraperitonealmente y la respuesta obtenida permite identificar el tipo de toxina presente según los efectos observados [8, 25]. También se han reportado bioensayos con invertebrados como *Artemia salina* [235, 236], en plantas como *Sinapis alba* [237], además de bioensayos en líneas celulares. Estos ensayos tienen numerosas ventajas: son los únicos métodos generales para cianotoxinas, evalúan la toxicidad asociada a una muestra, son simples y algunos pueden ser rápidos [201]. Sin embargo, son poco sensibles, no son precisos y algunos métodos presentan restricciones éticas.

Los ensayos bioquímicos como el *test* de proteína fosfatasa (PPIA) son también ampliamente utilizados. Este ensayo fue desarrollado en base a la capacidad de las MCs y NODs de inhibir las proteína-fosfatasas [238-244]. Si bien no permiten identificar cada variante individual de la toxina, son muy adecuados para el *screening* de MCs y NODs en muestras de agua. Estos ensayos basados en inhibición de proteínas fosfatasas están disponibles comercialmente, sin embargo, son métodos que pueden presentan efecto matriz pronunciado y son susceptibles a diferentes interferencias. Tanto los bioensayos como los métodos bioquímicos son adecuados como métodos de *screening* de muestras de floraciones potencialmente tóxicas.

1.4.3. Métodos inmunológicos

Estos métodos se basan en la extraordinaria especificidad y alta afinidad con que los anticuerpos reaccionan con su antígeno, que los convierten en una de las herramientas más valiosas en investigación, diagnóstico y en inmunoterapia.

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Igs), son componentes proteicos del sistema inmune con diversas funciones. En su estructura presentan dos cadenas pesadas idénticas (H, por *heavy*) y dos cadenas livianas también idénticas (L, por *light*), unidas de forma covalente por puentes disulfuro [245, 246]. Cada cadena liviana consiste de un dominio variable (V_L) y uno constante (C_L), mientras que la cadena pesada consiste de un dominio variable (V_H) y hasta cuatro dominios constantes (C_{H1-3}) (**Figura 11**). En la cadena pesada hay una región bisagra que confiere flexibilidad a la molécula, a través de la que tiene lugar la interacción de cada heterodímero ($V_L/C_L:V_H/C_H$) para formar el anticuerpo con su estructura típica en forma de Y [247-250].

La asociación de los dominios variables de cada cadena forma el sitio de unión al antígeno (Fab, por *antigen binding fragment*), que representa lo que se denomina paratope del anticuerpo. El apareamiento de la región constante de las Igs forma la región Fc (fragmento cristalizable), el cual media la mayoría de las funciones efectoras de los anticuerpos *in vivo*.



Figura 11. Representación esquemática de la estructura de una IgG convencional. En amarillo los dominios constantes de la cadena pesada C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . En verde, el dominio constante de cadena ligera (C_L) y los dominios variables de cadena pesada (V_H) o cadena ligera (V_L) en rojo y naranja, respectivamente. Fabs: dominios de unión al antígeno en un anticuerpo convencional. *Extraído y adaptado de Joosten et al, 2003.*

Existen distintos métodos que permiten generar una señal medible a partir de la reacción del anticuerpo con su antígeno, y de esta forma cuantificar el antígeno presente en la muestra. Entre estos métodos inmunoquímicos se destacan los ensayos de tipo ELISA (de su sigla en inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), basados en anticuerpos policionales [251-254] o monocionales [255-258]. Los métodos inmunoquímicos son una alternativa altamente utilizada en la actualidad para la detección y cuantificación de MCs. Esto se debe a sus numerosas ventajas: son rápidos, de bajo costo y requieren poco o ningún pretratamiento según el tipo de muestra en estudio. Sus límites de detección son adecuados, muy por debajo de los valores guía requeridos para MCs [259].

Los ELISAs son muy usados para diversas toxinas como métodos de tamizaje o *screening*, porque aportan información cuantitativa en forma sencilla. Otra de las importantes ventajas de los inmunoensayos, es que pueden adaptarse a diversos formatos y pueden realizarse ensayos "en campo" o *in situ* (inmunocromatografia de flujo lateral, dipsticks) en forma muy rápida y extremadamente simple. En contraparte, los ELISAs pueden presentar efecto matriz por lo que es necesario estudiar este aspecto cuidadosamente y formular los reactivos para evitarlo. A su vez, por ejemplo, en el caso de las MCs, la respuesta del ELISA corresponde a todos los congéneres o variantes químicas presentes que el anticuerpo reconozca, y puede ser necesario complementar la información que aporta, con datos provenientes de métodos analíticos que permiten identificar individualmente cada variante presente en la muestra.

Además, de su aplicación en diferentes formatos de inmunoensayos, los anticuerpos específicos, son herramientas muy útiles para el procesamiento de muestras complejas previo a su análisis. Se han utilizado de forma efectiva en cromatografía de inmunoafinidad para eliminar contaminantes o interferencias en muestras biológicas [260, 261] y para remover compuestos que co-eluyen, cuando se concentran muestras, permitiendo así la identificación de MCs por HPLC [262, 263].

1.4.3.1. Anticuerpos policionales

Inicialmente, la única fuente para la obtención de anticuerpos con el fin de montar inmunoensayos, eran los sueros policlonales hiperinmunes. La forma más utilizada para generar sueros policlonales, es mediante la inmunización de animales de laboratorio como conejos o cabras, administrando el antígeno blanco de interés, conjuntamente con un adyuvante, con el fin de aumentar su inmunogenicidad. Debido a que la mayoría de los antígenos son estructuras complejas con múltiples epítopes (regiones del antígeno reconocidas por el sistema inmune), el antisuero extraído de un animal contendrá anticuerpos de múltiples clones de células B, resultando en una población heterogénea de anticuerpos con especificidad por el antígeno de interés, pero con diversidad de paratopes (sitios de unión al antígeno) que reconocen distintos regiones (epítopes) del antígeno blanco [245]. Además, el suero extraído del animal contendrá una enorme cantidad de anticuerpos inespecíficos (generados a lo largo de la vida del mismo) que pueden dar lugar a problemas de inespecificidad cuando el suero se utiliza en el desarrollo de un inmunoensayo.

Los sueros policionales son robustos, relativamente fáciles de obtener y son baratos, por lo que constituyen una herramienta muy útil. Sin embargo, presentan algunas limitaciones al momento de su eventual producción comercial ya que las características del mismo dependen del animal inmunizado y por tanto son difíciles de reproducir. Asimismo, como se ha comentado, su naturaleza policional implica riesgos de reactividad cruzada frente a moléculas que no son el analito.

1.4.3.2. Anticuerpos monoclonales

A diferencia de los anteriores que constituyen una población heterogénea de moléculas de anticuerpos, los anticuerpos monoclonales (mAbs) derivan de un único clon de células B, y así, en una preparación de mAbs todas las moléculas de anticuerpos son idénticas entre sí. La tecnología de hibridomas, una de las primeras estrategias utilizada para la obtención de mAbs, fue desarrollada por Georges Köhler y César Milstein en 1975 [264]. Luego de la inmunización del animal (generalmente ratón), se extraen las células B del bazo del animal inmunizado. Dado que estas células B tienen una vida media acotada, se fusionan con células B inmortales (células de mieloma), y así se logran líneas celulares estables capaces de producir anticuerpos (hibridomas). Estos hibridomas seleccionados para obtener el mAb de características deseadas, se cultivan; el medio de cultivo se recoge periódicamente y se purifican los mAb del sobrenadante del cultivo. De esta manera se puede producir una cantidad ilimitada de anticuerpo monoclonal con una única especificidad y afinidad bien definida. Sin embargo, este es un proceso muy costoso y lento, puede tomar semanas de cultivo y muchos litros de medios para obtener mAbs en cantidades suficientes para la aplicación que se desee. Como alternativa a los hibridomas, en los últimos años, ha surgido una nueva forma de obtención de mAbs que presenta interesantes ventajas, tales como los derivados de anticuerpos de cadena pesada.

1.4.3.3. Anticuerpos monoclonales derivados de anticuerpos carentes de cadena liviana

Los camélidos y algunas especies de tiburones, producen además de los anticuerpos convencionales, formados por cadenas pesadas y livianas, anticuerpos que carecen de cadena liviana. El sitio de unión al antígeno está formado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada (VHH), lo cual no impide que presenten afinidades similares a los anticuerpos convencionales (Figura 12) [265, 266]. Las formas recombinantes de los VHHs, que se conocen como nanobodies (Nbs), son muy atractivos como componentes de inmunoensayos, porque pueden producirse en *E. coli* con niveles de expresión mucho mayores que los fragmentos scFv o Fab de los anticuerpos convencionales. Poseen alta solubilidad, elevada estabilidad térmica y gran estabilidad en presencia de solventes orgánicos [267, 268]. Por su pequeño tamaño y fácil manipulación genética es posible generar conjugados recombinantes bi-funcionales como por ejemplo con proteínas fluorescentes o enzimas [269]. Además, debido a que un único gen codifica el dominio que confiere la especificidad de los Nbs, su generación y selección a partir de bibliotecas de expresión en fagos (*Phage display*) es una metodología robusta y accesible.



Figura 12. a. Representación esquemática de la estructura de una IgG convencional. b. Anticuerpo IgG de cadena pesada. c. Fragmento variable de cadena pesada (VHH). Los anticuerpos de cadena pesada que se encuentran en camélidos están compuestos de cadenas pesadas y carecen completamente de la cadena ligera. El dominio de unión a antígeno consiste solo en el dominio V_H, que se conoce como V_{HH} (fragmento variable de anticuerpo de cadena pesada), para distinguirlo de un V_H convencional. *Extraído y modificado de Joosten et al, 2003*.
Debido a todas estas características, los Nbs han recibido gran atención como reactivos analíticos y de diagnósticos para moléculas de gran tamaño [270], y más recientemente para el análisis de moléculas pequeñas de importancia en química ambiental [266, 271, 272]. Debido a que los VHHs carecen de la interfase cadena pesada/cadena liviana que conforma el sitio de reconocimiento para moléculas pequeñas (haptenos) en los anticuerpos convencionales, su valor para la inmunodetección de pequeñas moléculas ha sido cuestionada. Sin embargo, en los últimos años distintos trabajos demostraron que sí era posible utilizarlos para estos fines, y recientemente se ha reportado que, para compensar la ausencia de la interfase de la cadena pesada y liviana, los VHHs pueden adoptar un mecanismo de reconocimiento especial, mediante la formación de un bolsillo tipo "túnel" donde se introduce el hapteno [273, 274].

1.4.4. Validación de metodologías de análisis

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de cualquier análisis químico. El proceso de validación implica una serie de determinaciones o experimentos con el fin de determinar las características o parámetros de desempeño de un método o ensayo; definiendo los requisitos analíticos y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes para las aplicaciones requeridas. Es decir, debe realizarse para demostrar que el método desarrollado es apto para el propósito analítico para el cual será utilizado, y de esta forma asegurar que los resultados sean confiables [275, 276].

Existen diferentes guías para la validación de métodos analíticos establecidas por organismos internacionales tales como la Organización Internacional de Normalización (ISO, de sus siglas en inglés *International Organization for Standardization*), la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, de su sigla en inglés) y la *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC).

1.4.4.1. Parámetros de desempeño

Los parámetros evaluados para la validación de un método suelen variar según su aplicación, sin embargo, existen características comunes que siempre se deben tener en cuenta. Estos parámetros son principalmente: exactitud (veracidad y precisión); selectividad; límites de detección y cuantificación; además del intervalo de trabajo y linealidad. A continuación de describen las definiciones correspondientes basándose en la *Guía Eurachem* (1a edición en español, 2016).

<u>Exactitud</u>

La exactitud de una medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia [277, 278]. La evaluación de este parámetro surge de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Por lo tanto, normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: *veracidad y precisión*.

<u>Veracidad</u>

La *veracidad* de medición es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Sin embargo, se puede realizar una evaluación práctica de la veracidad. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de *sesgo*. Existen tres enfoques generales para su determinación: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y c) comparación con resultados obtenidos mediante otro método.

<u>Precisión</u>

La precisión de una medida se define como cuan cerca están los resultados entre sí [277, 279]. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos, típicamente la desviación estándar (o desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado, en condiciones específicas. *Repetibilidad de medición y reproducibilidad de medición*, representan las dos medidas de precisión que se pueden obtener.

La repetibilidad, supone la más pequeña variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo. En esta tesis, la *repetibilidad* en general se refiere como precisión *intra-ensayo. La reproducibilidad*, supone la mayor variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios utilizando el mismo método. Entre estos extremos, *"la precisión intermedia"* ofrece una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad (precisión *inter-ensayo*).

<u>Selectividad</u>

La selectividad analítica se relaciona con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.

Límites de detección y cuantificación

El *límite de detección (LOD)* o *valor mínimo detectable* es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado [280]. En tanto, el nivel más bajo en el cual el desempeño del método es aceptable para una aplicación típica, constituye el *límite de cuantificación (LOQ)*.

<u>Intervalo de trabajo</u>

El intervalo de trabajo, es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación (LOQ). En el límite superior, los factores limitantes dependen del sistema de respuesta o del equipo de medición. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, donde la respuesta de la señal tendrá una relación lineal con el analito. El *intervalo lineal de trabajo* de un método, es el intervalo de trabajo en el que la relación entre la concentración del mensurando y la respuesta presentan linealidad, con la precisión y exactitud ensayadas, bajo las condiciones especificadas para el ensayo, en este sentido la linealidad se puede evaluar mediante el coeficiente de determinación R² [281].

Objetivo general

Desarrollar y validar métodos simples de *screening* para la determinación de microcistinas en muestras de agua y matrices biológicas.

Objetivos específicos

- **1.** Desarrollar y optimizar inmunoensayos de tipo ELISA (policlonal) para microcistinas.
- **2.** Estabilizar los reactivos desarrollados para su uso en forma sencilla y validar el kit de reactivos desarrollados.
- **3.** Generar y seleccionar anticuerpos monoclonales de llamas (*Nanobodies*) contra microcistinas.
- Desarrollar y validar ensayos de segunda generación basados en mAbs (ELISA y inmunocromatografía en flujo lateral).
- Intercomparación de los inmunoensayos desarrollados con métodos cromatográficos (HPLC/UV; LC-MS/MS).
- 6. Caracterizar el perfil de congéneres de microcistinas presentes en floraciones del país mediante MALDI-TOF.

Ш

Capítulo II

Desarrollo de un ELISA policional para cuantificación de MCs

2. Desarrollo y validación de un ELISA policional para cuantificación de MCs

En nuestro país, especialmente en el periodo estival y hasta avanzado el otoño, es frecuente que floraciones de cianobacterias del género *Microcystis* dominen el fitoplancton de los principales recursos hídricos, particularmente en los embalses del río Uruguay, del río Negro y el Río de la Plata [16, 17, 19, 282]. Si bien existen reportes de estas floraciones desde 1981, recién en el año 2001 se publicó el primer trabajo sobre la presencia de microcistinas en el Río de la Plata, en la costa de Colonia [20]. Este hallazgo demostró la necesidad de realizar monitoreo de los niveles de riesgo asociados a estas floraciones. Sin embargo, debido a la falta de capacidad analítica instalada en el país, las muestras del Río de la Plata debían enviarse a Brasil para su análisis. Esto implicaba altos costos y demoras en los resultados, limitando la posibilidad de tomar medidas de protección para los usuarios de las playas. Más aún, en el caso del agua potable, esta carencia restringía la capacidad de controlar el funcionamiento de las plantas de tratamiento de agua potable. Por todas estas razones, se inició el desarrollo de metodologías para detección y cuantificación de MCs.

Como se mencionó anteriormente, los inmunoensayos de tipo ELISA son muy adecuados para el monitoreo de toxinas como métodos de *screening* o tamizaje. Hacia este objetivo, a fines del año 2003, utilizando un anticuerpo monoclonal convencional AD4G2 [258], cedido por el Dr. Michael G. Weller de la Universidad Tecnológica de Munich; nuestro grupo implementó un ELISA monoclonal que permitió iniciar el monitoreo en el Río de la Plata [18]. Sobre la base de esta experiencia, y con el fin de disponer de reactivos de producción local, se procedió al desarrollo de un ELISA para cuantificación de MCs basado en anticuerpos policlonales.

La mayor parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo y validación de este ensayo, así como su aplicación en un programa de monitoreo local sustentable están contenidos en la primera publicación de esta tesis (**Artículo I**). Este ensayo se logró implementar en formato tipo *kit* y se validó evaluando su desempeño según los requisitos analíticos para este tipo de método. El ensayo ha sido ampliamente utilizado para el monitoreo ambiental a través de convenios con

instituciones públicas (UTE, Intendencia de Montevideo), para capacitación de técnicos y estudiantes de posgrado, y en el desarrollo de proyectos de investigación en colaboración con investigadores del país y la región [17, 119, 161, 282-285].

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. ELISA policional por competición para detección de MCs

Los anticuerpos policlonales se generaron en conejo, utilizando como conjugado de inmunización ovalbúmina cationizada y tiolada, conjugada a MC-LR (OVA-MCLR) [257]. La generación del inmunógeno y la técnica de inmunización, así como la obtención del antígeno de *coating* o sensibilización (BSA-MCLR), se reportan en el **Artículo I** adjunto [24]. Brevemente, para la síntesis de OVA-MCLR, previo a la tiolación la proteína se cationizó con etilendiamina utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC; Thermo Fisher, MA, USA) [257, 286]. Para la tiolación de la OVA cationizada y BSA se utilizó succinimidil-3- (2-piridilditio)-propionato (SPDP; Thermo Fisher, MA, USA) en una relación proteína:SPDP de 1:40 y luego reducción con 50 mM de ditiotreitol (DTT; BioBasic, ON, Canadá). El número de grupos tiol incorporados a cada proteína, se tituló con el reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditio-bis- [2-nitrobenzoico] (DTNB; Sigma Aldrich, MO, USA) y se utilizó una relación molar 1:1, MC-LR:tiol presente en la proteína luego de la tiolación [287].

Las condiciones iniciales del ensayo fueron optimizadas mediante lo que se conoce como titulación en *checkerboard*, donde en placas de ELISA de 96 pocillos se pueden variar dos parámetros a la vez. Las placas de ELISA se sensibilizaron con 70 ng/mL de BSA-MCLR en buffer fosfato salino (PBS), 100 μ L/pozo, se bloquearon con 250 mL de BSA 1 % en PBS (m/v). Luego se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0,05 % y una vez con agua milliQ; se secaron en cámara a 23±2 °C y 40-50 % de humedad relativa durante una hora. Las placas se conservaron a 4 °C en bolsas de aluminio selladas conteniendo desecante (Sigma Aldrich, MO, USA). Los estándares de MC-LR (Alexis, Enzo Life Science, USA) en concentraciones 0,2; 0,6; 1,0; 1,5 y 2,5 μ g/L se prepararon en PBS conteniendo 0,5 g/L de Azida de sodio (Buffer diluyente). El suero policional anti-MC, se diluyó 1/15000 en buffer PBS con 0,1 % BSA y 0,5 g/L de Azida de sodio y el anticuerpo anti-conejo conjugado a enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*) (Pierce, Thermo Fisher, MA, USA), se diluyó 1/5000 en PBS 0,5 % de BSA, 0,01 % de timerosal y 0,1 mM de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB; Sigma Aldrich, MO, USA). Las soluciones de los anticuerpos y los estándares fueron filtradas por filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,2 μ m (Avantec MFS) y se conservaron a 4 °C. Antes de cada análisis, se mezclaron 6 mL de la dilución del suero policional anti-MC, con 1,34 mL buffer Tris 1M, pH 7,5 conteniendo 100 g/L de EDTA, 16 g/L de NaCl y 1 % de BSA (*Buffer Interferencias*).

2.1.1.1. Procedimiento operativo para el análisis de MCs por ELISA policional

Para lisar las células y extraer el contenido total de toxinas, las muestras se sometieron a 3 ciclos de congelado y descongelado, y se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos. Se filtraron por filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,2 μ m (Avantec MFS) y se analizaron en diluciones seriadas. Se incluyó al menos una solución control en PBS de MC-LR 1,0 μ g/L por placa (Control Interno). Todas las muestras y estándares se analizaron por triplicado.

En cada pocillo de la placa de ELISA se sembraron 50 µL de estándar (MC-LR), muestra o dilución de la muestra en buffer diluyente (para muestras por encima del rango de trabajo), se adicionaron con 60 µL de solución de anticuerpo anti-MC y se incubaron 50 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Luego de lavar 4 veces con PBS-Tween 0,05 %, se dispensaron 100 µL por pozo del anticuerpo anti-conejo-HRP y se incubaron 40 minutos a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron 7 veces con PBS-Tween 0,05 % y se revelaron con 100 µL por pozo de sustrato, 0,4 mL de TMB a 6 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) con 0,1 mL de H₂O₂ 1% en 25 mL de buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5. La reacción enzimática se detuvo luego de 15 minutos con la adición de 50 µL por pozo de H₂SO₄ 2N. Se determinó la absorbancia a 450 nm en lector de placas FLUOSTAR optima (BMG Labtech, Alemania) usando como longitud de onda de referencia 620 nm. Los valores de porcentaje de la absorbancia para cada estándar respecto a la absorbancia del cero (% A/A₀), se ajustaron a una curva lineal con escala *semi logarítmica* en *Excel*, siguiendo la ecuación:

% $A/A_0 = a Ln (Concentración MC) + b$

2.1.1.2. Monitoreo de playas (Montevideo, Río de la Plata)

Las muestras fueron extraídas por personal del Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, de la Intendencia de Montevideo. Se prepararon alícuotas para la identificación de cianobacterias, conteo celular, clorofila-a y cuantificación de MCs, como se reporta en **Artículo I**.

2.1.2. Validación del ensayo desarrollado

2.1.2.1. Linealidad e Intervalo de trabajo

Con el fin de facilitar los cálculos, en lugar del ajuste *sigmoidal* con 4 parámetros característico de los ensayos tipo ELISA competitivos, se utilizó un modelo de regresión *log-lineal*. Se verificó si ese ajuste es adecuado en el rango de trabajo propuesto 0,2-2,5 µg/L a través del coeficiente de correlación (R²) de la curva de calibración y de la desviación estándar relativa (RSD) de las réplicas para cada solución estándar expresadas en porcentaje [189].

2.1.2.2. Veracidad y Precisión (Exactitud)

Se utilizaron dos métodos para el estudio de *exactitud* del ensayo: a) realización de ensayos de recuperación; b) comparación de los estándares utilizados con los de otra fuente comercial [189, 275, 276]. Para esta evaluación, se utilizaron muestras de matriz blanco (sin floración), adicionadas con tres concentraciones de MC-LR dentro del rango lineal del ensayo (0,2; 1,0 y 2,0 µg/L), y se evaluó el porcentaje de recuperación del analito (*veracidad*) y la variabilidad de los resultados expresados en % RSD (*precisión*).

2.1.2.3. Límites de detección y cuantificación

Para la determinación del *Límite de detección* (LOD) y *Límite de cuantificación* (LOQ), se adicionaron las muestras de matriz blanco con 0,2 μ g/L de MC-LR y se realizaron 25 determinaciones en 4 días. El LOD se definió como 3 SD (desviación estándar) y LOQ como 6 SD de las determinaciones de las muestras adicionadas [275, 276, 281].

2.1.2.4. Reactividad cruzada

Se evaluó la reactividad cruzada del ensayo frente a las variantes de MCs disponibles y a NOD. Se realizaron curvas de inhibición completas en un amplio rango de concentraciones (0,024-50 μ g/L), se realizó ajuste *sigmoidal* y se calcularon los IC50 (concentración inhibitoria 50 %), es decir, la concentración en la cual se observa 50 % de inhibición respecto al máximo de señal del ensayo. Para el tratamiento de datos se utilizó el programa *Origin 6.0* (Microcal Software). La reactividad cruzada se expresó en % de IC50 respecto al IC50 de referencia obtenido para la variante MC-LR.

2.1.2.5. Comparación del ensayo con métodos de referencia para cuantificación de MCs

Los métodos de referencia actuales para la cuantificación de MCs, son métodos instrumentales como HPLC/UV (Norma ISO 20179:2005) y LC-MS/MS (EPA/600/R-14/474. Method 544) [198, 288].

Comparación con HPLC/UV: Se compararon los resultados de ELISA de 84 muestras de aguas potables y ambientales (Río Negro), y el método basado en la Norma ISO 20179:2005 y Lawton et al, 1994 [181], con un LOQ de 0,35 µg/L. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), que cuenta con acreditación del Servicio de Acreditación del Reino Unido (UKAS, *United Kingdom Accreditation Service*).

Comparación con LC-MS/MS: Más recientemente se tuvo acceso a un LC-MS/MS con características adecuadas para este análisis, trabajando en colaboración con la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química, y el Polo Agroalimentario de Paysandú, quienes pusieron a punto el método para determinar variantes de MCs (LR, RR, YR, LA). El análisis se realizó en un Cromatógrafo Agilent 1200, utilizando columna Restek C18 46 x 20 mm, 5 µm. Fase móvil, ACN:H2O. Volumen de inyección 10µL. Detector: QLIT/MS/MS cuadrupolo, trampa lineal de iones (ABSciex Instruments; Foster City, CA, USA).

En la **Tabla 4** se reportan las condiciones seleccionadas del método de LC-MS/MS implementado. Los LOQ alcanzados fueron de 1 μ g/L para RR y 10 μ g/L para las demás variantes. Se analizaron 26 muestras ambientales, provenientes de floraciones del Río Negro y del Río de la Plata.

Tabla 4. Condiciones operativas del LC-MS/MS. Tiempo de retención para cad	la
MCs analizada, iones y transiciones seleccionadas y voltajes de fragmentación.	

МС	Tiempo de retención (min)	Transiciones seleccionadas		Voltajes de fragmentación		
		SRM1	520/135,2	DP	CE1	46
RR	6,4	SRM2	520/213,3	110	CE2	51
		SRM3	520/282		CE3	24
YR	7,0	SRM1	1045,5/135,2	DP	CE1	69
		SRM2	1045,5/213,3	160	CE2	82
LR	7,1	SRM1	995,6/135,2	DP	CE1	70
		SRM2	995,6/213,3	150	CE2	80
LA	9,2	SRM1	911,3/135,2	DP	CE1	70
		SRM2	911,3/213,3	110	CE2	65

SMR: Control selectivo de reacción (*selected reaction monitoring*), relación m/z de los iones seleccionados. DP: *Declustering potencial*. CE: Energía de colisión (*Collision energy*).

2.2. Resultados y Discusión

2.2.1. Desarrollo del ELISA policional para cuantificación de MCs

Los ELISAs para MCs son ensayos por competencia o competitivos ya que, por su pequeño tamaño (aproximadamente 1000 Da) es poco probable lograr la unión simultánea de dos anticuerpos en formatos de tipo *sándwich* o de captura, como sucede en el caso de proteínas, donde se utiliza un anticuerpo de captura y otro de detección que reconoce el analito unido al primer anticuerpo.

En el formato del ELISA desarrollado, las MCs en solución provenientes de la muestra o del estándar y las MCs inmovilizadas en los pocillos (conjugado BSA-MCLR), compiten por la unión al anticuerpo específico (anti-MCs), agregado en solución. Luego de lavados exhaustivos, un segundo anticuerpo (anti anticuerpo de conejo) conjugado a una enzima (HRP), permite cuantificar anticuerpo específico unido al conjugado BSA-MCLR inmovilizado en la placa (**Figura 13**). Como existe una relación inversamente proporcional entre la concentración original del analito presente en los estándares y la señal obtenida, las curvas de calibración obtenidas se conocen como curvas de inhibición.



Figura 13. Representación esquemática los principales componentes del ensayo de ELISA. A: Antígeno de *coating* inmovilizado (BSA-MCLR); **B:** MCs soluble presente en estándares o muestra; **C:** Anticuerpo anti MCs de conejo; **D:** Anticuerpo anti conejo conjugado a HRP (enzima peroxidasa).

El componente clave que determina la sensibilidad y especificidad del ensayo es el anticuerpo anti-analito. Dado que las moléculas pequeñas (haptenos) como las MCs no son inmunogénicas por sí solas, para inducir la generación de anticuerpos es necesario administrarlo acoplado covalentemente a una proteína portadora (*carrier*) y conjuntamente con un adyuvante para generar inflamación, y así disparar la producción de anticuerpos. Cuando se acoplan al *carrier*, los haptenos se vuelven inmunogénicos, ya que la proteína puede transportar múltiples moléculas del hapteno que pueden entrecruzar los receptores de células B específicas activándolas, y además activar células T a través de la presentación de péptidos derivados de la proteína portadora [245, 289]. La producción de anticuerpos anti-hapteno de especificidad deseada depende en gran medida del diseño del inmunógeno administrado, es decir, es importante preservar la estructura química y la conformación espacial de la molécula de interés, seleccionar la proteína *carrier* apropiada y para esto, es esencial el método de conjugación [290].

Siguiendo estas consideraciones y con el objetivo de desarrollar un ensayo de amplia reactividad cruzada por las diferentes variantes de la familia de las MCs, se optó por sintetizar un inmunógeno en el cual se expone al solvente el aminoácido Adda, así como los aminoácidos variables en posiciones 2 y 4. Por esta razón se utilizó como química de conjugación, la reacción tiol-eno entre la proteína tiolada y el grupo metileno presente en la metildehidroalanina (Mdha, aminoácido en posición 7 de la MC-LR), como se muestra en la **Figura 14.** Esta química de conjugación tiene la ventaja adicional de ser de alta eficiencia, comparada por ejemplo con reacciones de conjugación por carboxilos mediante activación con carbodiimidas [291].



Figura 14. Esquema del conjugado de inmunización OVA-MCLR. a. Estructura MC-LR, con * se señala el grupo reactivo frente a tioles. **b.** Conjugado de OVA tiolada con MC-LR, donde se observa que utilizando esta estrategia de conjugación se expone el aminoácido característico ADDA y las posiciones variables 2 y 4 de la molécula.

Para la síntesis del conjugado de inmunización, se utilizó ovalbúmina cationizada (cOVA) y posteriormente tiolada, como se describe en sección *Materiales y Métodos*. La cationización permite disponer un mayor número de grupos amino para la reacción de tiolación con SPDP, que transforma los grupos amino en tioles protegidos, los que deben ser reducidos con DTT justo antes de la reacción con el hapteno, para evitar su oxidación. El número de grupos tiol incorporados fue de 15-20 SH/mol de proteína. El análisis de los conjugados hapteno-proteína mediante MALDI-TOF permitió estimar el número de moléculas de MC-LR incorporadas. El conjugado OVA-MCLR presentó un promedio de 1,7 (máximo de 3,9) moléculas de MC-LR por molécula de proteína y el BSA-MCLR presentó un promedio de 2,8 (máximo de 6) como se puede observar en la **Figura 15**.



Figura 15. Análisis de conjugados de inmunización y *coating* por MALDI-TOF. a. OVA cationizada y tiolada. b. OVA conjugada a MCLR (OVA-MCLR), conjugado de inmunización. c. BSA tiolada. d. BSA conjugada a MC-LR (BSA-MCLR), conjugado de *coating*.

El suero extraído después de la tercera inmunización presentó un título de anticuerpos muy elevado, con una dilución 1/15000 se montó un ELISA con una concentración inhibitoria 50 % (IC50) muy baja, de 0,34 µg/L en PBS, como se

puede apreciar en la **Figura 16**. El parámetro IC50 en este tipo de ELISA por inhibición, es indicativo del rango de trabajo a obtener y refleja la sensibilidad. Las curvas de inhibición obtenidas permiten, en general, utilizar un modelo *log-lineal*, en el rango de inhibición de 20 a 80 % (**Figura 16**). Considerando estos indicadores el ensayo obtenido presentó alto potencial para la determinación de MCs en aguas potables, considerando que el valor guía de la OMS es de 1 μ g/L de MC-LR [165] y en consecuencia es también aplicable a aguas recreativas, en las que no se requieren tan bajos niveles de cuantificación.



Figura 16. Curva de inhibición ELISA policional en PBS. % A/A₀: Absorbancia obtenida para cada estándar sobre la absorbancia del cero de la curva en porcentaje. Estimación del rango lineal entre 20-80% de inhibición. IC50: concentración inhibitoria 50% (0,34±0,02 µg/L).

Sin embargo, el desempeño de un inmunoensayo puede ser limitado por el efecto matriz, ya que la presencia de los diversos componentes de la muestra, tales como sales, iones metálicos, ácidos húmicos, entre otros, pueden alterar la unión antígeno-anticuerpo [190, 256]. Para evitar este problema, se incorporó el denominado *Buffer Interferencias* (ver *Materiales y Métodos*), que minimiza la unión de los ácidos húmicos a las proteínas presentes en el ensayo, contiene EDTA que actúa como quelante de iones metálicos, y Tris 1M pH 7,5 que provee una alta fuerza iónica y previene cambios de pH que influyen considerablemente en inmunoensayos [256, 257]. En la **Figura 17**, se muestra en curvas de inhibición para MC-LR, como el agregado de este buffer logra corregir el efecto matriz

observado por ejemplo en el caso de un pool de muestras provenientes de aguas estuarinas del Río de la Plata (costa de Montevideo), con una salinidad promedio de 2 (escala práctica de salinidad).



Figura 17. Curvas de inhibición en PBS y en pool de muestras de playas (estuario, Río de la Plata) en ausencia (**a**) y en presencia de Buffer Interferencias (**b**). IC50: Concentración inhibitoria 50%.

2.2.2. Caracterización y validación del kit ELISA policlonal para MCs

Un factor importante en este tipo de desarrollo, donde se busca su aplicación en programas de monitoreo por operadores con escaso entrenamiento, es que sea un ensayo sencillo (similar a un kit comercial) y que sus componentes o reactivos, prontos para usar sean estables. Para esto se apuntó a la estabilización de las placas sensibilizadas y bloqueadas, las soluciones de estándares, anticuerpo específico (anti-MC) y el conjugado anti-conejo-HRP.

En una primera instancia, se incluyeron conservadores para evitar el crecimiento bacteriano, azida de sodio 0,05 % para el anticuerpo anti-MC y para los estándares; y timerosal 0,01 % para el anticuerpo anti-conejo-HRP. A su vez, para estabilizar el conjugado anti-conejo-HRP, se utilizó 0,1 mM de TMB (uno de los sustratos de la enzima peroxidasa) y se incluyó BSA en todas las soluciones de anticuerpos. Con estas formulaciones se procedió a la evaluación del desempeño analítico de *kit*.

2.2.2.1. Linealidad e intervalo de trabajo

La curva de calibración con MC-LR, en el intervalo de trabajo propuesto presenta excelente ajuste a un modelo *log-lineal*, con coeficiente de correlación mayor a 0,99 (**Figura 18**). Este coeficiente de correlación (R²) así como la variabilidad

observada en los % A/A₀, correspondientes a cada estándar (RSD \leq 2,5 % en todo el rango), cumplen ampliamente con los requisitos establecidos de *repetibilidad* para el método de ELISA propuesto actualmente por la EPA [189]. El mismo establece que la RSD de los estándares debe ser \leq 10 % y el R² de la curva \geq 0,98. Además, el intervalo de trabajo obtenido (0,2-2,5 µg/L) es comparable al de la mayoría de los ensayos comerciales (Abraxis, EnviroLogix, etc) y es muy adecuado para el análisis tanto de muestras ambientales como potables.



Figura 18. Curva de calibración típica para MC-LR (promedio cinco curvas en un día). %A/A₀: absorbancia de cada estándar sobre absorbancia correspondiente al cero en porcentaje, en función de la concentración de estándar MC-LR en μg/L. Cada estándar analizado por triplicado (n=15).

En la **Tabla 5** se muestra la variabilidad los % A/A₀ obtenidos para cada estándar y de los parámetros de las curvas de calibración en un periodo de un año, utilizando diferentes lotes de reactivos y diferentes operadores (n=43 curvas). Los bajos coeficientes de variación obtenidos en un período muy largo de tiempo, indican de la robustez del método, ya que a pesar de las variaciones de las condiciones mantuvo sus características.

					y = a (l	n x) + b	
Concentración de MC (μg/L)	0,2	0,6	1	1,5	2,5	а	b
% A/A ₀	70,8	46,3	35,7	29,4	22,2	-19,5	37,9
SD	5,5	5,3	5,1	4,6	4,7	1,6	4,8
RSD	7,8	11,5	14,2	15,7	21,3	8,1	12,7

Tabla 5. Variabilidad (RSD) del % A/A₀ para cada estándar y parámetros de la curva.

SD: Desviación estándar. RSD: Desviación estándar relativa en %.

% A/A₀: absorbancia correspondiente a cada estándar sobre absorbancia de cero en porcentaje. Curvas en un periodo de un año (43 curvas independientes; diferentes lotes).

Con el fin la estudiar la estabilidad de todos los componentes del *kit*, un lote se conservó a 4°C y luego de un periodo de un año se evaluaron los parámetros de la curva obtenidos. Los resultados fueron, $\mathbf{a} = -19,4$ y $\mathbf{b} = 32,8$; dado que estos valores están dentro de una desviación estándar (SD) de los parámetros promedio informados en la **Tabla 5**, se verificó que los reactivos preparados en formato *kit*, fueron estables en ese período.

2.2.2.2. Veracidad y precisión (Exactitud)

La veracidad del método, fue evaluada mediante ensayos de recuperación en muestras de matriz en blanco (sin floración), adicionadas a tres niveles (0,5; 1,0 y 2,0 µg/L de MC-LR). Se estudiaron muestras blanco provenientes de los embalses del Río Negro (*pool* de Palmar, Baygorria y Bonete), del Río de la Plata (*pool* con salinidad promedio de 2) y agua potable. Se estudió la precisión, tanto *intra-ensayo* (*Repetibilidad*) e *inter-ensayo* en cuatro días (*Precisión Intermedia*).

Los resultados que se resumen en la **Tabla 6**, demuestran que el ensayo presenta características adecuadas para el monitoreo de aguas ambientales y potables; y cumple ampliamente con los requisitos establecidos para el ELISA en el método 546 de la EPA 2016 de recuperación en el rango 60-140 %. En cuanto a la precisión la EPA establece un coeficiente de variabilidad *intra-ensayo*, menor a 15 %, en términos de absorbancia, lo que corresponde a una RSD de hasta 25 % en términos de concentración de analito [189].

	Adición (μg/L)	Río de la Plata	Embalses Río Negro	Potable
	0,5	94	80	78
% Recuperación	1,0	101	85	86
	2,0	106	74	78
RSD	0,5	16	16	20
Repetibilidad	1,0	5	18	13
n=9	2,0	14	6	10
RSD	0,5	19	19	21
Precisión Intermedia	1,0	16	21	16
n=21 (4 días)	2,0	18	10	14
n=25 LOD		0,14	0,15	0,14
(4 días) LOQ		0,28	0,29	0,29

Tabla 6. Veracidad y precisión del ensayo de ELISA para MCs en aguas.

RSD: Desviación estándar relativa en %. LOD: Limite de detección (µg/L). LOQ: Límite de cuantificación (µg/L).

Adicionalmente, como control externo de calibración se analizó una solución de 1,0 μ g/L, preparada a partir de estándar de fuente comercial diferente a la usada para la preparación de los estándares empleados en el ensayo (Abraxis Inc, PA, USA), el cual arrojó un valor de 0,99 ± 0,11 μ g/L (n=24), en tres ensayos independientes realizados en días diferentes.

2.2.2.3. Límites de detección y cuantificación

En la **Tabla 6**, se muestran los valores de LOD ($\leq 0,15 \ \mu g/L$) y LOQ ($<0,3 \ \mu g/L$), obtenidos para las tres matrices en estudio. Se destaca que el ensayo presentó excelente sensibilidad, con límites muy por debajo de los niveles de referencia para MCs tanto en aguas recreacionales, como en agua potable ($1\mu g/L$ de MC-LR).

2.2.2.4. Estudio de efecto matriz en muestras con salinidad elevada

Se ha reportado un efecto matriz pronunciado en muestras con salinidad elevada, en el caso de inmunoensayos para MCs [190]. Esto representa un gran desafío en aguas estuarinas [292], ya que en el Río de la Plata en Montevideo, si bien las floraciones ocurren principalmente con salinidades menores a 5, éstas son cada vez más frecuentes y existe una alta variabilidad de salinidad con promedios mensuales en el rango 5-25 [293, 294].

Por esta razón se estudió el desempeño del método en 7 muestras de diferentes playas de Montevideo (sin floración) con salinidades distribuidas entre 1-27,

adicionadas en tres niveles 0,5; 1,0 y 2,0 µg/L de MC-LR. El RSD *inter-ensayo* evaluado en tres días, fue menor a 30 % (n=30) en todos los casos y el porcentaje de recuperación promedio fue de 85-95 %. En la **Tabla 7**, se muestran los resultados obtenidos en muestras representativas de salinidades elevadas. El ensayo presentó muy buenas recuperaciones, inclusive en la mayor salinidad estudiada (27), además de presentar buena precisión en los tres niveles de adición estudiados [189].

Salinidad	Adiciones (µg/L)	Concentración (µg/L)	RSD	% Recuperación
	0,5	0,53 ± 0,11	20	106
9	1,0	1,18 ± 0,23	19	118
	2,0	1,74 ± 0,38	22	87
	0,5	0,46 ± 0,06	14	93
14	1,0	1,02 ± 0,11	11	102
	2,0	1,88 ± 0,18	9	94
	0,5	0,42 ± 0,06	14	85
27	1,0	0,85 ± 0,17	20	85
	2,0	1,73 ± 0,22	13	86

Tabla 7. Recuperaciones (veracidad) y precisión en muestras de salinidad elevada.

RSD: Desviación estándar relativa en %. n=30, en 3 días.

2.2.2.5. Reactividad cruzada frente a diferentes congéneres

Se evaluó la especificidad del método frente a diferentes variantes disponibles comercialmente y, además, nodularina. Como se muestra en la **Tabla 8**, el ensayo detecta con alta *reactividad cruzada* la mayoría de las variantes estudiadas y nodularina. Esto implica que el resultado del ELISA refleja globalmente las concentraciones de las principales variantes de MCs presentes en la muestra.

Microcistina	IC50 (µg/L)	Reactividad Cruzada (%)	Microcistina	IC50 (µg/L)	Reactividad Cruzada (%)
MC-LR	0,35 ± 0,03	100	MC-LF	0,42 ± 0,03	83
MC-DMLR	$0,32 \pm 0,04$	109	MC-LY	0,46 ± 0,03	76
MC-RR	0,45 ±0,05	78	MC-LW	0,60 ± 0,02	58
MC-DMRR	$0,71 \pm 0,04$	49	MC-WR	0,61 ± 0,05	57
MC-YR	0,45 ± 0,03	78	MC-HtyR	0,26 ± 0,07	135
MC-ADDA 1	$0,27 \pm 0,02$	130	Nodularina	$0,44 \pm 0,07$	80
MC-ADDA 2	0,36 ± 0,02	97			

Tabla 8. Reactividad Cruzada a variantes de microcistinas y nodularina.

% Reactividad Cruzada: (IC50 MC-LR/IC50 MC-X) *100. IC50: Concentración inhibitoria 50%.

MC-LR: Leucina Arginina, MC-DMLR: Dimetilmicrocistina Leucina Arginina, MC-RR: Arginina Arginina, MC-DMRR: Dimetilmicrocistina Arginina Arginina, MC-YR: Tirosina Arginina, MC-LF: Leucina Fenilalanina, MC-LY: Leucina Tirosina, MC-ADDA1 y MC-ADDA2 Microcistinas aisladas de blooms locales (no identificadas), MC-WR: Triptofano Arginina, MC-LW: Leucina Triptófano, MC-HtyR: Homotirosina Arginina.

2.2.3. Comparación con métodos de referencia para cuantificación de MCs

2.2.3.1. Comparación con HPLC/UV

Se realizó la inter-comparación de los resultados obtenidos por el ELISA desarrollado y por el método de referencia ISO para MC-LR realizado en el LATU (HPLC/UV). Se analizaron 41 muestras de aguas potables y 43 ambientales del Río Negro. Esta comparación es importante ya que en la normativa de Uruguay sólo se establece un valor máximo permitido para MC LR, analizada por este método ISO.

En cuanto a las muestras de agua potable analizadas, todas resultaron no cuantificables por ambos métodos. En la **Figura 19**, se representan gráficamente los resultados de las muestras ambientales. La comparación presentó una correlación altamente significativa (coeficiente *Spearman*, ρ = 0,877; p<0,0001), a pesar de que ambos métodos tienen características analíticas diferentes y que HPLC se analizó sólo la variante más representativa de la familia (MC-LR).



Figura 19. Resultados de muestras ambientales provenientes de lagos, analizadas por el ELISA y HPLC/UV. En eje y, concentración de suma de MCs detectadas por ELISA (μ g/L) y concentración de MC-LR por HPLC/UV (μ g/L).

Del total de 42 muestras ambientales, 12 muestras fueron no cuantificables por ambos métodos y 8 muestras reportadas como no cuantificables por HPLC, fueron cuantificadas por ELISA (muestras con valores entre 0,3 y 1,1 μ g/L). Para las muestras ambientales cuantificables por ambos métodos, se observó la tendencia a presentar valores mayores por ELISA, lo que puede explicarse porque el ELISA detecta otros congéneres presentes que no fueron analizados por HPLC.

En resumen, en esta comparación no se encontraron falsos negativos para el ELISA y la respuesta entre ambos ensayos fue concordante considerando la posible presencia de otras variantes. Esto se pudo comprobar en el *Capítulo IV* de esta tesis, en el que se reportan los diferentes congéneres encontrados mediante MALDI-TOF. Estos resultados confirmaron la presencia de otras variantes en proporciones comparables o en algunos casos mayoritarias respecto a MC-LR (MC-YR, MC-RR, entre otras). Adicionalmente, las variantes principales se cuantificaron por LC-MS/MS. Si bien la normativa nacional se refiere solamente a MC-LR, las demás MCs son también tóxicas, por lo que se considera altamente favorable la detección de otras variantes mediante un método de *screening*, que induzcan posteriormente a un estudio más detallado de las muestras cuantificables por ELISA.

Para la evaluación del valor diagnóstico del ensayo, se estudiaron dos parámetros característicos tales como la *sensibilidad* y *especificidad* del método desarrollado, para la detección de muestras de más de 4 µg/L MC-LR, correspondiente al valor límite establecido de bajo riesgo por la EPA en muestras ambientales para uso recreativo (**Tabla 9**). La *sensibilidad* se define como la capacidad o habilidad del sistema de *screening* de detectar muestras positivas cuando realmente son positivas. De forma similar, la *especificidad* se define capacidad o habilidad del sistema de *screening* de detectar muestras negativas cuando realmente son negativas [295].

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad analítica del ELISA frente a HPLC/UV.

		HPLC		
		Positivas (+)	Negativas (-)	
	Positivas (+)	VP n=10	FP n=5	
ELISA	Negativas (-)	FN n=0	VN n=27	
		Sensibilidad	Especificidad	
		1,00	0,84	

Sensibilidad=VP/(VP+FN)

Especificidad=VN/(VN+FP)

Muestras positivas: > 4µg/L. Muestras negativas: < 4µg/L

VP: Verdadero Positivo; VN: Verdadero Negativo; FN: Falso Negativo; FP: Falso Positivo.

Los resultados obtenidos de *sensibilidad* (1,00) y *especificidad* (0,84) para este nuevo método, demuestran que posee una excelente capacidad de detectar muestras positivas además de discriminar de forma excelente muestras negativas. Esto lo hace muy adecuado como método rápido de *screening* para ser utilizado en programas de monitoreo.

2.2.3.2. Comparación con LC-MS/MS

La comparación con esta técnica analítica es muy relevante ya que en la actualidad apunta a ser la técnica de referencia por excelencia para este tipo de análisis y numerosas normativas incluyen otras variantes además de la MC-LR [167]. En este caso se realizó la cuantificación de MC-LR, MC-RR, MC-YR y MC-LA; variantes que son reportadas como las más frecuentes. Se analizó un panel de 28 muestras provenientes de floraciones de los embalses del Río Negro. Se seleccionaron muestras provenientes de floraciones donde el 75% (n=21), presentaron valores de concentración de MCs totales >20 μ g/L, lo que corresponde al nivel de riesgo alto en aguas recreacionales [171]. Este panel de muestras se seleccionó con el objetivo de aumentar la probabilidad de encontrar las variantes minoritarias por LC-MS/MS. En la **Figura 20**, se muestra el gráfico de la inter-comparación del ensayo desarrollado con el método LC-MS/MS, donde se puede observar que ambos métodos presentan muy buena correlación en los resultados, presentando un coeficiente de Pearson de 0,984 (p<0,0001).



Figura 20. Inter-comparación entre el método de ELISA desarrollado con la técnica de referencia LC-MS/MS. En eje y, concentración de suma de MCs detectadas por ELISA (µg/L); en eje x, concentración de MC-LR, MC-RR, MC-YR y MC-LA por LC-MS/MS en µg/L.

2.2.4. Aplicación e impacto del método de ELISA policional

El ELISA basado en anticuerpos policionales desarrollado y validado en este trabajo de tesis ha sido ampliamente utilizado para el monitoreo ambiental. Los resultados encontrados en los embalses del Río Negro, así como en las playas del Río de la Plata, indican la existencia niveles muy elevados de MCs. Estos niveles demostraron estar muy por encima de los niveles recomendados actualmente de riesgo por las Guías internacionales [171, 172], con alta probabilidad de efectos sobre la salud. En Montevideo, los resultados impulsaron a las autoridades departamentales a tomar medidas de prevención de exposición para uso recreativo de playas en presencia de floraciones [294, 296].

Para la gestión de las floraciones se utilizan en general diversos indicadores del nivel de riesgo por cianotoxinas, como por ejemplo el recuento de cianobacterias y clorofila-a [8]. En el **Artículo I** adjunto, se comparó la concentración de toxina obtenida por ELISA, con ambos parámetros, ya que, si bien pueden ser inespecíficos, son utilizados habitualmente en los laboratorios de monitoreo de calidad de agua. A partir de la evaluación de los datos acumulados y la experiencia adquirida en el monitoreo, se logró sustentar la definición e implementación de un criterio simple para la clasificación visual de las floraciones, que puede ser utilizados por guardavidas y técnicos entrenados para tomar decisiones rápidas en el sitio de interés, permitiendo acelerar la implementación de medidas preventivas.

El enfoque simple es ampliamente aplicable a la gestión de riesgos en países en desarrollo. Durante las temporadas estivales, en cada sitio de muestreo en las playas de Montevideo, se realizó una observación visual cuidadosa para establecer la presencia o ausencia de floraciones de cianobacterias. Cuando se detectaron colonias de cianobacterias, los técnicos fueron capacitados para clasificar la magnitud del fenómeno en dos categorías bien definidas: **1**. *Colonias dispersas* de cianobacterias, las colonias son uniformes, dispersas y se pueden ver solo a corta distancia, es decir desde el agua; y **2**. *Espuma cianobacteriana*, es cuando las colonias se acumulan y producen un color verde intenso típico en el agua que se puede observar desde varios metros de distancia.

2.2.4.1. Floraciones cianobacterianas en el Río de la Plata

Las floraciones de cianobacterias a lo largo de la costa de Montevideo son un fenómeno complejo influenciado por varios factores que aún es necesario comprender en su totalidad, y que en la actualidad han adquirido mayor relevancia debido a su frecuencia e intensidad [23, 294]. La especie dominante resultó ser *Microcystis aeruginosa*, seguida de otras especies del género *Microcystis* y en menor medida *Anabaena* (actualmente *Dolichospermum*).

Cuando la descarga (caudal) del río Uruguay es muy alta (cerca de 10000 m³/s), la salinidad del Río de la Plata disminuye y se encuentran *espumas* en las playas a lo largo de toda la costa del Río de la Plata. Podemos suponer que las acumulaciones de cianobacterias se forman principalmente en las condiciones favorables que existen en las numerosas represas de la cuenca y son transportadas por las precipitaciones, llegando hasta el Río de la Plata. A la inversa, cuando disminuyen las precipitaciones, se podría suponer una disminución en el transporte de *espumas* desde la cuenca del Río Uruguay y consecuentemente menos floraciones en el Río de la Plata. Esto se puede observar en la **Figura 21**, donde se correlacionan los datos históricos recopilados desde la temporada 2000-2001 de frecuencias de floraciones y el nivel del caudal del Río Uruguay. Se puede apreciar que en el verano 2008-2009 no se observaron floraciones, coincidiendo con una de las sequias más severas registradas.



Figura 21. Frecuencia de espumas cianobacterianas en Montevideo (Río de la Plata) vs. la descarga del Río Uruguay (se reportan los promedios durante la temporada estival).

2.2.4.2. Resultados del monitoreo de playas (Montevideo, Río de la Plata)

El ELISA desarrollado localmente permitió establecer un programa de monitoreo sustentable, el cual reveló picos estacionales de toxicidad extremadamente elevados, más de 1000 veces mayores que el límite recomendado por la OMS en aguas recreacionales. Adicionalmente a los beneficios de costo y simplicidad, el método de ELISA ofrece importantes ventajas tales como elevada sensibilidad y amplia reactividad cruzada con diferentes congéneres de MCs como se mostró en la **Tabla 8**.

En el **Artículo I**, se reportan los resultados del monitoreo sistemático de floraciones de 6 temporadas estivales en 22 playas de Montevideo (temporada 2003-2004 a 2008-2009), con datos de MCs, clorofila-a, y detección visual de floraciones (**Tabla 10**), además de algunos datos de recuento de células cianobacterianas y reportes históricos aislados desde el año 1981.

Resumen de resultados para MCs de las muestras evaluadas en el monitoreo

- La gran mayoría de las muestras de la categoría *Ausencia* de colonias de cianobacterias (80%), presentaron niveles menores a 0,3 μg/L; y 20 % de las muestras fueron iguales a 0,3 μg/L. Ninguna muestra clasificada de esta categoría, presentó niveles superiores a 0,3 μg/L de MCs.
- Las muestras clasificadas en la segunda categoría, *Colonias dispersas* de cianobacterias, presentaron niveles de MCs desde no detectables hasta ~60 μg/L; donde la mayoría fueron del rango no detectable a < 20 μg/L (94,4 %), por debajo del límite de riesgo elevado establecido por la OMS. La Figura 22 muestra el contenido de MCs y clorofila-a de las muestras individuales clasificadas en esta categoría. La relación entre concentración de MCs y clorofila-a fue altamente variable; inclusive en el periodo de diciembre de 2007-enero de 2008, a pesar de que se detectaron valores elevados de clorofila-a, no se detectaron MCs. Por tanto, las muestras en esta categoría, son las más críticas para la toma de decisiones.
- En la categoría de muestras clasificadas como *Espumas cianobacterianas*, que representan floraciones más intensas, se observaron valores de MCs en un rango muy amplio de concentraciones desde 17 a 30000 μg/L. Se destaca que un 96,4 % de las mismas se encontraron por encima de 20 μg/L y la mayoría de presentaron concentraciones desde 100 a 4000 μg/L (Tabla 11). La presencia de espumas estuvo asociada a niveles muy elevados de toxina.



Figura 22. Concentración MCs vs. clorofila-a, en muestras clasificadas en la categoría *"colonias dispersas"*. En líneas punteadas se señalan los límites de riesgo establecidos por la OMS para MC-LR (20 µg/L) y clorofila-a (50 µg/L).

2.2.4.3. Correlación entre las diferentes variables analizadas

Tomando todos los datos agrupados, representados en la **Tabla 10**, no se observaron aumentos significativos en el contenido de clorofila-a y MCs (p>0,05, ANOVA, corrección de Tukey) entre la categoría de *Ausencia* y presencia de *Colonias dispersas*. Estos resultados también indican que la clorofila-a no sería un buen indicador de la presencia de toxinas en esta categoría intermedia (*Colonias dispersas*).

	Ausencia	Colonias dispersas	Espumas
Clorofila-a µg/L (2003-2009)			
Ν	332	172	25
Promedio	8,8	18,5	3500
SD	20	28,8	1900
MCs μg/L (2003-2009)			
Ν	94	107	28
Promedio	nd	3,9	3300
SD	-	9,7	1900

Tabla 10. Concentraciones de MCs y clorofila-a en muestras del Río de la plata.

N: número de muestras. SD: desviación estándar. nd: no determinado

En el caso de la categoría *Espumas*, sí hubo un aumento muy grande y significativo (p<0,001), tanto en el contenido de clorofila-a como en concentraciones de MCs,

donde también se observó una desviación estándar muy amplia en estos valores. Los resultados obtenidos demuestran una buena correlación entre células/mL o clorofila-a, y la concentración de MCs en promedio; sin embargo, si observamos más de cerca las muestras individuales clasificadas como *Espumas*, podemos ver que las correlaciones no son consistentes. En la **Tabla 11**, se muestra esta variabilidad entre la toxicidad por unidad de biomasa, cuando se observa la relación entre concentración de MCs y clorofila-a; esta relación osciló entre 0,01 (muy baja toxicidad) en noviembre-diciembre de 2004, a de 11 en diciembre de 2006 y marzo de 2008. Además, se pudo observar también una elevada variabilidad entre el conteo celular y la concentración de toxina.

Muestra	Fecha mes/día/año	Clorofila-a (µg/L)	MCs (µg/L)	Células/mL	Relación MCs:Clo
Punta Carretas	12/24/03	2700	970	-	0,36
La Colorada	01/24/04	-	790	-	-
La Estacada	01/27/04	-	96	-	-
Ramirez	02/04/04	-	2440	-	-
Punta Espinillos	02/04/04	1700	780	-	0,46
Puerto Buceo	11/18/04	360	39	4,50E+05	0,11
Puerto Buceo	11/19/04	4300	40	5,30E+05	0,01
Pocitos	12/27/04	2400	22	7,40E+05	0,01
Pocitos	01/24/05	230	64	6,30E+05	0,28
Pocitos	02/15/05	890	104	2,46E+06	0,12
Ramirez Oeste	01/09/06	9600	1900	1,20E+08	0,20
Ramirez Este	01/09/06	4600	620	8,00E+06	0,13
Pocitos	12/22/06	2500	20000	1,20E+07	8,00
Punta Carretas	12/22/06	1500	17000	1,40E+07	11,33
Puerto Buceo	01/06/07	280	750	-	2,68
La Colorada	01/12/07	3400	350	-	0,10
Punta Espinillo	01/12/07	1600	1070	-	0,67
Pocitos	02/07/07	200	17	-	0,09
Gas	03/19/07	3900	180	-	0,05
Malvín	03/06/08	19000	3000	7,2E+06	0,16
Ramírez	03/06/08	730	250	1,2E+06	0,34
Pocitos	03/06/08	4600	1100	1,1E+06	0,24
Pocitos	03/06/08	7200	30000	4,4E+06	4,17
Ramírez	03/07/08	2200	1100	2,0E+06	0,50
Pocitos	03/07/08	9100	3800	4,3E+06	0,42
Pocitos	03/07/08	340	3800	3,3E+05	11,18
Cerro	03/07/08	5000	3300	4,0E+06	0,66
Punta Carretas	03/09/08	490	120	1.6E+06	0.24

Tabla 11. Resultados del monitoreo en muestras de espumas cianobacterianas en playas (Río de la Plata).

MCs: microcistinas. Clo: Clorofila-a. Espacios en blanco: no se obtuvieron datos.

2.2.4.4. Gestión de los riesgos asociados a floraciones utilizando los indicadores disponibles

Para un programa de monitoreo exitoso de floraciones cianobacterianas en aguas recreativas, es extremadamente critico clasificar rápidamente el riesgo potencial para la salud. Con este fin, las playas y cuerpos de agua relacionados, se monitorearon visualmente durante las temporadas de verano para detectar la presencia de colonias de cianobacterias. El uso recreativo de las playas en el verano es muy atractivo para el turismo, por lo que hay un gran interés en mantener las playas abiertas y accesibles, e inhabilitar su uso solo cuando sea necesario.

Cuando no se observaron colonias de cianobacterias, los niveles de MCs en todas las muestras analizadas fueron consistentes con bajo riesgo desde una perspectiva de salud pública (niveles de MCs < $0,3 \mu g/L$). Por otro lado, cuando se observaron *Espumas*, las concentraciones de MCs estaban en el rango de "alta probabilidad de efectos adversos para la salud" y en 27/28 de las muestras analizadas (96,4%) los datos fueron consistentes con la recomendación de no hacer uso recreativo en las playas afectadas. Además, estas mismas muestras también calificaron como "alta probabilidad de efectos adversos para la salud" por su contenido de clorofila-a y recuento de células.

Las muestras clasificadas como *Colonias dispersas*, son las más críticas para la toma de decisiones. Como se mencionó anteriormente, siguiendo la guía de la OMS para el riesgo moderado (<20 µg/L de equivalentes de MC-LR), 6 de las 107 muestras (5,6%) presentaron valores indicativos de que el agua no era adecuada para uso recreativo, por lo tanto, cuantificación de MCs permite guiar y priorizar las decisiones sobre cuando inhabilitar las playas con el fin de proteger la salud. Por otro lado, si se utiliza el valor límite de la guía de la OMS de clorofila-a para riesgo moderado (50 µg/L), solo una de estas 6 muestras se habría clasificado correctamente, mientras que el resto se habría considerado por debajo del límite de riesgo moderado. Además, 11 de las muestras en esta categoría (10%) presentaron resultados elevados en clorofila (>50 µg/L) y hubieran llevado erróneamente a un cierre de las playas.

Todo esto evidencia la importancia de monitorear las concentraciones de toxina, lo que a su vez está de acuerdo con las tendencias actuales de monitoreo de cianotoxinas y/o cianobacterias en aguas recreacionales, reflejadas en las recomendaciones de la EPA [175], como se presentó en la **Figura 6** en la *Introducción* de esta tesis.

2.3. Conclusiones

La validación del ELISA desarrollado permitió confirmar que el ensayo local basado en anticuerpo policlonal, es un método muy adecuado para la detección "global" de los congéneres presentes en la muestra siendo una excelente herramienta para la detección rápida, sencilla y de bajo costo. La disponibilidad de este ensayo facilitó la implementación de un programa de monitoreo sustentable, en aguas ambientales, así como en agua potable. La utilidad de este enfoque para propósitos de monitoreo de rutina en países en desarrollo, se basa en el bajo costo de análisis por muestra y en no requerir equipos analíticos sofisticados. Por estas razones el ELISA ha sido progresivamente más aceptado como metodología para el análisis de aguas potables y recreacionales.

El *kit* de ELISA desarrollado se ha transferido y se han realizado capacitaciones de técnicos de agencias reguladoras y proveedores de agua potable en Uruguay, Paraguay, Perú y Guatemala; y Argentina con apoyo del Proyecto Binacional FrePlata (Argentina y Uruguay) para la protección ambiental del Río de la Plata (http://www.dinama.gub.uy/freplata/).

El monitoreo de playas que continúa hasta la actualidad, reveló picos muy elevados de concentraciones de toxinas en presencia de espuma cianobacteriana y demostró el escaso valor predictivo de los parámetros usados comúnmente para la evaluación de riesgos. Además, los resultados demuestran que un criterio simple y práctico, simplemente basado en la detección visual de *Espumas y Colonias dispersas*, se puede utilizar como alerta a tiempo real para la toma de decisiones rápidas en la gestión de playas, complementado con métodos de laboratorio sencillos y rápidos. Cabe destacar, que la detección visual de *Espumas*, mostró mucho mayor valor predictivo positivo y mayor especificidad que clorofila-a, como se detalla en la **Tabla 6** del **Artículo I** adjunto.

Finalmente, se destaca que la técnica de ELISA ha ido creciendo en confianza analítica por parte de agencias internacionales como se deduce de la reciente aprobación en 2016, de un método de este tipo por parte de la EPA (Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Asimismo, la Organización Internacional de Normalización (ISO) en la actualidad presenta bajo revisión, un método que propone el uso combinado de inmunoensayos como *screening* y LC-MS/MS (ISO/CD22104) con fines confirmatorios.

Capítulo III

Selección de Nanobodies anti-MCs

Desarrollo de inmunoensayos de segunda generación

3. Selección de anticuerpos monoclonales (*Nanobodies*) anti-MCs y su implementación en ensayos de segunda generación

Como se presentó en el *Capítulo II*, los ensayos basados en anticuerpos policionales son robustos y sencillos y tienen características adecuadas para su implementación en programas de monitoreo. Sin embargo, los mismos presentan problemas de reproducibilidad para su eventual producción comercial, pueden presentar problemas de selectividad con algunas matrices y su adaptación a otros formatos de inmunoensayos, tales como ensayos como flujo lateral, biosensores, etc., es más dificultosa. Por otra parte, los mAbs o monoclonales recombinantes presentan características de estandarización superiores, su especificidad única limita la aparición no deseada de reactividad cruzada y las formas recombinantes pueden generarse con modificaciones que faciliten su purificación o detección. Entre estos últimos, como se mencionó en la Introducción (Capítulo I), los anticuerpos monodominio de llama (VHHs o *nanobodies*), son muy atractivos como componentes de inmunoensayos y tienen alto potencial para generar nuevas herramientas analíticas [267-269, 272].

No obstante como se ha mencionado anteriormente, la estructura monodominio de los *nanobodies* (Nbs) no parece ser adecuada para alojar moléculas pequeñas (haptenos) [274]. A pesar de esto, varios artículos reportaron Nbs antihaptenos aislados a partir de bibliotecas de expresión de VHHs en fagos, aunque la afinidad reportada contra el analito no conjugado es moderada [297-302]. Efectivamente, la selección de anticuerpos de alta afinidad ha sido un paso limitante en este trabajo e implicó la necesidad de estudiar diversas estrategias de selección. En este Capítulo se describe la construcción de una biblioteca de VHHs contra MC-LR mediante *Phage Display* [303] y el desarrollo de novedosas estrategias de selección para la selección de Nbs de alta afinidad contra esta toxina.

Los principales resultados de la selección y desarrollo de este inmunoreactivo, así como la validación del ELISA de segunda generación contra MCs, se reportan en el **Artículo II** de esta tesis. En la segunda parte de este Capítulo se reporta la adaptación de este ensayo a un formato de inmunocromatografía de flujo lateral para detección de la toxina *in situ*.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Obtención de anticuerpos monodominio de llama (*Nanobodies*) y desarrollo de un ELISA para MCs

MC-LR y los demás congéneres fueron adquiridos de Enzo Life Sciences (Exeter, U.K.). Las enzimas de restricción y los reactivos de biología molecular son de Fermentas, Thermo Fisher, CA, USA. Otros reactivos usados fueron Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Vector *pComb3X* cedido por Dr. Carlos Barbas, III, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA. Los conjugado MC-LR a seroalbumina bovina (BSA-MCLR) y a ovoalbúmina (OVA-MCLR), fueron preparados como ya se describió en el Capítulo II de esta tesis, con algunas modificaciones [24, 257, 287].

3.1.1.1. Inmunización

Un espécimen de llama (*Lama glama*) se inmunizó con el fin de generar anticuerpos anti-MC. Se realizó una inoculación subcutánea con 500 µg de conjugado OVA-MCLR en *Adjuvante Incompleto de Freund* (AIF). Se realizaron tres inmunizaciones adicionales cada dos semanas. Cada vez que se realizó una inmunización se extrajo un pequeño volumen de sangre con el fin de evaluar la evolución del título de anticuerpos anti-MC mediante ELISA con placas sensibilizadas con BSA-MCLR. Luego de diez días de la última inoculación, se extrajeron 150 mL de sangre con anticoagulante. Todas estas actividades se realizaron cuidadosamente bajo los estándares establecidos de bienestar animal y fueron aprobadas por el comité de ética animal del Parque Zoológico Municipal Lecocq de Montevideo.

3.1.1.2. Producción y selección de anticuerpos (Phage display)

Los anticuerpos con la especificidad deseada se consiguieron mediante la tecnología de Phage Display que permite expresar el repertorio de anticuerpos generados por la llama, fusionados a proteínas de superficie de fagos, generando así una biblioteca [303]. En esta bilblioteca, cada fago expresa en su superficie un único anticuerpo, destacándose que existe relación entre la información genética que transporta el fago en su interior con la secuencia del VHH que expresa en su superficie. Luego, a través de rondas de selección (panning) se enfrentó la población total de la biblioteca de fagos al conjugado BSA-MCLR inmovilizado y a

MC soluble. Luego de cada ronda de selección se realiza una etapa de amplificación o enriquecimiento de los fagos seleccionados. Se relizaron tres estrategias de panning, que se describirán más adelante. La tecnología de Phage Display se esquematiza en la **Figura 23**.



Figura 23. Esquema del proceso de *Phage Display*. Se muestras las principales etapas de este proceso. Luego de culminar las rondas de selección se realiza el *screening* de clones individuales aislados y se procede a la secuenciación. Extraído y a adaptado de AptaIT GmbH, Martinsried, Alemania (https://ngsdataanalysis.com/technology/phage-display/).

Construcción de biblioteca de VHHs expresados en fagos

A partir de 150 mL de sangre extraída de la Llama inmunizada, se aislaron los leucocitos mononucleares por gradiente de densidad utilizando *Histopaque 1077* (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se procedió a la extracción del ARN total con reactivo *TRIzol* (Thermo Fisher). La integridad del ARN se verificó mediante geles de agarosa 1% y se realizó la transcripción reversa con el fin de de obtener el ADN copia (cDNA) utilizando el sistema Superscript III First-Strand Synthesis, siguiendo instructivo del proveedor (Thermo Fisher).

El cDNA luego se usó para amplificar los genes VHH/VH usando los *forwards primers* (cebadores directos):
JH (ccacgattctggccggcctggcctgaggagacrgtgacctgggtcc), donde R = A o G.

Los fragmentos productos de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de ~400 pares de base correspondientes a los VHH/VH, fueron purificados por gel y después clonados en el vector fagémido pComb3X mediante los sitios de restricción SfiI introducidos por los cebadores. El vector ligado fue purificado por precipitación con isopropanol y fue usado para transformar células supercompetentes *E. coli* ER2738 (Lucigen, Middleton, WI).

Las células transformadas se cultivaron en medio liquido SB (Super Broth) y se superinfectaron con fago *helper* M13K07 (Invitrogen, Thermo Fisher, MA, USA), al comienzo de la fase exponencial con el fin de generar la biblioteca de fagos que expresan en su superficie los anticuerpos.

Selección desde la biblioteca de fagos

Se sensibilizaron tiras de microtitulación para ELISA (Maxisorp, Nunc) con 0,5 μ g/mL of BSA-MCLR (100 μ L/pocillo), durante 16 horas a 4 °C y luego se bloquearon con 3 % BSA en PBS (250 μ L/pocillo). La biblioteca de fagos (con un título de 10¹² unidades de transducción) en PBS conteniendo 0,05 % de Tween 20 y 1 % de BSA, se dispensó en tres pocillos (100 μ L/pocillo). Luego de dos horas, cada pocillo se lavó 10 veces con 250 μ L de PBS conteniendo 0,05 % Tween 20 (PBS-T). Se incubaron 30 minutos con PBS-T a 4°C, y se volvieron a lavar 10 veces con PBS-T. Luego de estos lavados exhaustivos, los fagos unidos en los pocillos se eluyeron y se seleccionaron mediante tres estrategias diferentes (**Figura 24**):

1. *Competición secuencial*: Los fagos se eluyeron por competencia, secuencialmente con 100, 20 y 1 μ g/L de MC-LR en tres rondas de selección, respectivamente. Este es el modo convencional de selección para haptenos.

2. *Competición simultánea*: Los fagos se eluyeron con pH ácido (100 mM glicina-HCl, pH 2,7; 100 μ L/pocillo) durante 10 minutos, se transfirieron a un tubo Eppendorf, inmediatamente se neutralizaron con Tris base 2 M y se incubaron con trazas de MC-LR (10 fg/mL) durante 30 minutos con el fin de favorecer la unión de los nanobodies más afines a la MC libre. Posteriormente, los fagos se dispensaron en 6 pocillos recubiertos con BSA-MCLR (50 μ L/pocillo) y luego de una hora de incubación se colectaron los fagos no unidos.

3. *Selección en función de la constante cinética de disociación (koff):* Dado que típicamente los anticuerpos de muy alta afinidad presentan una muy baja *koff,* se diseñó un proceso de *panning* para promover su selección en base a largas etapas de lavado y competición con el analito en solución. Para esto, luego de la incubación, los fagos unidos se incubaron durante la noche con MC-LR 100 µg/L en PBS, y luego de lavados exhaustivos se eluyeron con tripsina 10 mg/mL en buffer Tris durante 30 min, se realizaron 2 rondas más repitiendo esta estrategia.



Figura 24. **Estrategias de** *panning* **desarrolladas para la selección de anticuerpos anti-MC.** 1-Competición secuencial. 2- Competición simultánea. 3- Selección por pequeña constante cinética de disociación (*koff*).

3.1.1.1. Screening de nanobodies anti-MC

Luego de la tercera ronda, del conjunto de fagos seleccionados de cada una de las diferentes estrategias de *panning* se extrajo el ADN, y los genes codificantes para los VHHs se purificaron por gel desde el plásmido fagémido digerido con SfiI. Estos fragmentos digeridos fueron clonados en masa en el vector pINQ-BtH6 [304, 305], que permite la expresión monomérica soluble periplasmática del *nanobody*

biotinilado y con un *tag* de poli-histidina (que facilita su purificación). Para lograr la sobreexpresión de la enzima biotin ligasa (BirA) de *E. coli*, que permite la biotinilación *in vivo* de los *nanobodies* (*Nbs*), el vector ligado se purificó y se usó para transformar células electrocompetentes BL21 (DE3), cepa *E. coli* que contenían el plásmido pCY216 (codificante para BirA) [305, 306]. Este sistema permite producir *Nbs* con un péptido señal (15-mer) que contiene un residuo de lisina que es biotinilado *in vivo* por la biotina ligasa sobre-expresada en esta cepa de *E. coli*.

Para realizar un *screening* de alto rendimiento (*highthroughput screening*), se inocularon 500 µL de medio de biotinilación (LB conteniendo, 50µg/mL de kanamicina, 35µg/mL de cloranfenicol, 0,04% de L-arabinosa y 100µM de Dbiotina) con colonias aisladas, en bloques de cultivo de 96 pocillos (Greiner, Monroe, NC). La expresión de los *Nbs* fue inducida cuando estos cultivos de 500 µL alcanzaron una absorbancia a 600nm de 0,5 UA con 3 µM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido), durante 4 horas a 37 °C con agitación. Los sobrenadantes se separaron por centrifugación y se analizaron en placas de ELISA sensibilizadas con BSA-MCLR, en ausencia y en presencia de MC-LR 10 µg/L (en solución). Los *Nbs* que quedaron unidos, fueron detectados con conjugado estreptavidinaperoxidasa (HRP) (Pierce, Rockford, IL).

Para la evaluación inicial de las condiciones del ensayo de ELISA, se realizaron cultivos de 10 mL de los clones individuales más promisorios (en condiciones idénticas a las descriptas anteriormente) y los *Nbs* biotinilados se extrajeron por sonicación desde los *pellets* celulares. Luego, se titularon en placas sensibilizadas con BSA-MCLR 60 ng/mL (100µL/pocillo), bloqueadas con BSA 1 % (250 µL/pocillo), con el fin de seleccionar la dilución de trabajo más apropiada (Abs 450 nm ~ 1 UA) que luego será usada en las curvas de inhibición con diferentes concentraciones de MCs.

3.1.1.2. Expresión y producción a gran escala de nanobodies, y desarrollo del ELISA monoclonal competitivo

Una vez que se seleccionaron los mejores candidatos, la producción a gran escala de los *Nbs* individuales biotinilados se realizó en frascos de cultivo (500 mL) con agitación, en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. El *pellet*

se separó por centrifugación y luego de sonicar el extracto celular se incubó 1 hora a 37°C con 100 µM de biotina; con el fin de aumentar el porcentaje de biotinilación; ya que la expresión del *nanobody* es mayoritariamente periplasmática y la enzima BirA es citoplasmática [304, 305]. Posteriormente, para separar los restos celulares se centrifugó a 10000g, y los *Nbs* biotinilados se purificaron con columnas de agarosa Ni-NTA (GE Life Sciences, PA, USA), se dializaron contra PBS y se conservaron a –20 °C. Las condiciones óptimas, como la concentración de antígeno de *coating* (BSA-MCLR) usada para sensibilizar las placas de ELISA y la concentración del anticuerpo, así como la selección del agente bloqueante, fueron optimizadas mediante titulación en *checkerboard* (ver Capítulo II).

Procedimiento final del ELISA monoclonal para cuantificación de MCs

Brevemente, las placas de ELISA se sensibilizaron durante la noche con 60 ng/mL de BSA-MCLR en PBS (100 μ L/pozo), se bloquearon con 250 μ L de 1 % de gelatina (Sigma-Aldrich, MO, USA) en PBS (m/v) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0,05% y una vez con agua MilliQ, se secaron en cámara a 23±2°C y 40-50% de humedad relativa durante una hora y se almacenaron a 4°C en bolsas selladas de aluminio conteniendo desecante. Tomas de 40 μ L de muestra o estándar de MC-LR (Alexis Corporation, Enzo Life Science, MI, USA), se sembraron por triplicado en los pocillos de la placa, se adicionan con 10 μ L de *Buffer Interferencias* (Tris 1 M; NaCl 0,3 M; EDTA 0,2 M; BSA 1%, pH 7,4) y se mezclan con 50 μ L solución del *nanobody* biotinilado 2 ng/mL en PBS-BSA 0,2%. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavan cuatro veces con PBS-T. Luego, se incuban con 100 μ L/pocillo de estreptavidina-HRP y luego de lavados exhaustivos, la actividad peroxidasa se determina como se describió en sección *Materiales y Métodos* del Capítulo II.

Caracterización y validación del ensayo ELISA monoclonal

El límite de detección (LOD) se estimó como la concentración de MC-LR correspondiente a 3 veces la desviación estándar (SD) del cero de la curva, y el límite de cuantificación (LOQ) como 10 veces la SD, n=15 en cuatro días [276]. La reactividad cruzada del ensayo se evaluó frente a las variantes de MCs disponibles y NOD, como se describe en sección *Materiales y Métodos* del Capítulo II. La

exactitud del ensayo se estudió mediante ensayos de recuperación utilizando muestras de matriz blanco (sin floración), adicionadas con tres concentraciones conocidas de MC-LR dentro del rango lineal del ensayo (0,2; 1,0 y 2,0 µg/L), y se evaluó el porcentaje de recuperación del analito (*veracidad* del ensayo) y la dispersión de resultados de las réplicas (*precisión*).

Comparación del ensayo con métodos de referencia para cuantificación de MCs El método de ELISA desarrollado se comparó con la técnica LC-MS/MS, como se describe en la sección *Materiales y Métodos*, Capitulo II. Se analizaron 30 muestras ambientales, provenientes de floraciones del Río Negro y del Río de la Plata.

3.1.2. Desarrollo de ensayos para determinaciones *in situ* con punto final evaluado en forma visual (Inmunocromatografía de flujo lateral)

Materiales: Microcistina-LR (MC-LR, 98.0% pureza, Enzo Life Sciences (Exeter, U.K.) Seroalbumina bovina (BSA, fraction V, 98%) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Tiras de nitrocelulosa para inmunocromatografía Hi-Flow Plus 120 Membrane Cards, Merck, Millipore (Darmstadt, Germany). Avidina, Pierce, Thermo-Fisher, MA, USA. Anticuerpo monoclonal de llama, seleccionado y producido como se describió anteriormente.

3.1.2.1. Preparación de tiras de nitrocelulosa

Las membranas de nitrocelulosa comerciales se sensibilizaron utilizando la plataforma para aspirar v dispensar BIODOT (modelo AD1520 ASPIRATE/DISPENSE PLATFORM). A tales efectos como línea test se dispensó el conjugado BSA-MCLR (preparado como se describe en el Capítulo II), 180 µg/mL en PBS conteniendo 5% sacarosa, y como línea control de corrida BSA-biotina, 250 µg/mL en PBS-sacarosa 5 %. Cada solución se dispensó utilizando un volumen de 0,8 µL/cm de nitrocelulosa, con una distancia entre líneas de 4 mm. La membrana de nitrocelulosa se secó a 37°C durante 2 horas, se acopló a papel absorbente (Merck, Millipore; Darmstadt, Germany) y se cortó en tiras de aproximadamente 4 mm de ancho.

3.1.2.2. Preparación BSA-biotina (línea control de corrida)

Se utilizó N-hidroxisuccinimido-biotina EZ-Link NHS-Biotin (ThermoFisher Scientific, MA, USA), siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando una relación BSA:biotina de 1:20.

3.1.2.3. Preparación de conjugados a Carbón

Brevemente, una solución 5 % de carbón (P-101) en agua Milli-Q (Milli-Q plus 185, Millipore) se sonicó en baño ultrasonido (un total de 5 minutos, con descansos de 30 segundos cada un minuto de sonicación). Se diluyó a 0,2 % en buffer bórico 5 mM pH 8,8 y sonicó nuevamente. Se mezclaron 200 μ g de proteína en buffer bórico 5 mM, pH 8,8 (volumen máximo 200 μ L) con la suspensión de carbón al 0,2 % en un volumen final de 500 μ L, se sonicó y se incubó 3 horas a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C. Las partículas se separaron por centrifugación y resuspendieron en 500 μ L de buffer bórico pH 8,8 (borato de sodio 0,1M; conteniendo 1% de BSA y 0,05% de Tween 20). Se sonicó e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Este paso se repitió 2 veces con el fin de lavar la proteína libre de carbón. Finalmente, se resuspendió en buffer bórico conteniendo 0,05% azida de sodio y se conserva a 4°C.

Producción de estreptavidina recombinante

Se utilizó estreptavidina recombinante, producida en forma soluble siguiendo un protocolo reportado previamente con algunas modificaciones [307, 308]. Para expresar la proteína recombinante se transformaron células de E. *coli* cepa BL21 con el vector de expresión pET11b (T7-ST), cedido por el Laboratorio del Dr. Thomas Ward, Universidad de Basel, Suiza. Las células transformadas se cultivan en 500 mL de medio LB (Luria-Bertani) con ampicilina a 25°C hasta alcanzar una OD de 0,6; se realizó la inducción con 0,5 mM de IPTG e incubo 4 horas a 25°C. Las células se centrifugaron a 3500 g, 15 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4; 1 mM de floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich), luego se sonicó con sonda 15 minutos a potencia de 80 e intervalos de 30%. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 18000 g durante 15 minutos a 4°C. La fracción soluble (sobrenadante) se calentó durante 10 minutos a 75°C, se enfrió en hielo y luego se centrifugó a 10000g durante 30 minutos. La estreptavidina soluble se purificó usando columna de Iminobiotina

agarosa (Pierce Iminobiotin Agarose, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) según protocolo del fabricante. Se obtuvo estreptavidina soluble con buen rendimiento (~4 mg). Se evaluó la pureza de la estreptavidina recombinante obtenida por SDS-PAGE y MALDI-TOF. Luego se dializó contra buffer bórico 5 mM, pH 8,8 y se conjugó a carbón como se describió anteriormente.

3.1.2.4. Inmunocromatografía para detección de MCs

En un microtubo (Eppendorf, Hamburg, Germany) o pocillo de placa de ELISA (baja adsorción, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) se pipetearon 180 μ L de muestra o de agua Milli-Q (control), se agregaron 20 μ L de buffer concentrado (PBS 10X-BSA 10 %) y 10 μ L de solución de anticuerpo (Nb 0,4 μ g/mL en PBS-BSA 0,2 %). La mezcla se homogeneizó, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 5 μ L solución de estreptavidina marcada con carbón (Stp-Carbón). Se homogeneizó e inmediatamente se sumergió la tira de nitrocelulosa y se dejó migrar la mezcla por capilaridad. La lectura se realizó en forma visual luego de 10-15 minutos de corrida.

3.2. Resultados y Discusión

3.2.1. Construcción de la biblioteca de fagos y estrategias de selección (*panning*)

La biblioteca se preparó a partir de los genes que codifican para los VHH/VH de linfocitos mononucleares periféricos de la llama inmunizada. El recuento de linfocitos aislados por gradiente de densidad, fue del orden de 10⁸ y la biblioteca resultante presentó una diversidad total de 4,3x10⁷ clones. A partir de esta biblioteca de fagos, se plantearon tres estrategias de *panning* (**Figura 24**), con el fin de seleccionar los más adecuados para obtener anticuerpos monoclonales específicos contra MCs con elevada afinidad, que permitan montar inmunoensayos de segunda generación, en primera instancia del tipo ELISA con alta sensibilidad y selectividad, adaptables a otros formatos de inmunodetección.

3.2.1.1. Panning por competición secuencial

En la *estrategia* **1**, la biblioteca fue seleccionada sobre BSA-MCLR por elución competitiva de los fagos, con concentraciones decrecientes de toxina (*selección competitiva secuencial*), usando 100, 20 y 1 μ g/L de MC-LR.

Luego de realizar el *screening* primario como se describió en sección *Materiales y Métodos*; los clones que presentaron mayor inhibición, es decir, la mayor disminución de señal comparando la señal obtenida en la placa sin MC-LR soluble y con MC-LR soluble (10 μ g/L), fueron secuenciados y se identificaron cinco clones diferentes como se muestran en la **Figura 25** (verde).

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
F1.1	MAQVQLVQSGGGSVQIGGSLRLSCLVS	GRIFSNYA	MAWFRQPAGKEREFVAR	ISWNGGST	YYGDSVKGRFTISRDNVRNTAYLQMTSLKPEDSAVYYC	AVGGAKDILYYHTERYGY	WGQGTQVTVSS(5)
G9.1						DR	(2)
B10.1 C9.1	EELT.DA.		VGAS. .GA	.N.SD.R. .N.SD.R.	A	SR	
A2.3	MAQVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GGISRVNV	AGWYRQAPGQQREMVAV	IRSGGRI-	NYADFVKGRFTFSRDDAKQTIYLQMDNLKSEDTAVYYC D	YGSLLETGTFQYREY	WGQGTQVTVSS(9)
H11.3 F11.3	MAQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS EEA.DK.	GHIPGMVT	GAWFRQAPEKEREFVAS AT	VRWRGT	DYADSVKGRFTLSRDDAKQTIFLQMDNLKPEDTAVYYC	AARFTSYSDRYDYTSSDEYPY N.HH.	WGRGTQVTVSS
B2.2 C3.2	V	.R		s	YN.N.VYN. 		

Figura 25. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de los clones de VHHs seleccionados mediante las diferentes estrategias de *panning.* Verde: Secuencias de VHHs aisladas usando competición secuencial. Rojo: Secuencias de VHHs aislados por competición simultánea. Negro: Secuencias de VHHs aislados en selección por constante cinética de disociación (koff) (*Off-rate selection*). Las secuencias se agruparon de acuerdo a la similitud de sus CDRs. Las frecuencias de secuencias repetidas se muestran entre paréntesis. Los guiones y puntos representan, espacios y residuos idénticos, respectivamente.

Como se aprecia en el alineamiento de las secuencias, los clones aislados por esta estrategia presentaron un alto nivel de similitud en sus CDR3. Los CDRs, regiones determinantes de la complementariedad (*Complementarity-determining regions*), son dominios hipervariables de las inmunoglobulinas que determinan la unión específica del anticuerpo por el antígeno [309].

En la **Figura 26** se muestran las curvas de inhibición obtenidas para cada uno de los clones seleccionados utilizando esta estrategia. Se pueden observar en forma comparativa la concentración de MC-LR que produce el 50 % de inhibición (IC50) para cada caso. Estos clones presentaron valores de IC50 similares, pero desafortunadamente elevados para detectar la toxina por debajo de los valores de referencia recomendados, en especial para agua potable.



Figura 26. Curvas de inhibición obtenidas con los VHHs aislados por competición secuencial. % A/A₀: Las curvas se normalizaron, expresando los valores de absorbancia obtenidos para cada estándar como % respecto a la absorbancia correspondiente al cero de la curva. Los valores se graficaron usando ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando el software *Origin 6.0 Microcal.* Cada estándar se analizó por triplicado. IC50: Concentración inhibitoria 50%.

3.2.1.2. Panning por competición simultánea

La elución por competición (selección por *competición secuencial*) durante el *panning*, promueve la selección de VHHs que presentan reactividad con el analito pero no necesariamente selecciona clones con las afinidades más elevadas. Esto se

debe a que la competencia no sucede simultáneamente, es decir, primero los fagos se unen al hapteno inmovilizado (BSA-MCLR), y luego de lavados los fagos deben disociarse para permitir su interacción con el analito que compite en solución. Esto no favorece la selección de VHHs que se unen al hapteno inmovilizado con constante de disociación pequeña (*koff*) que conlleva a una disociación lenta, los cuales están típicamente asociados a los clones de alta afinidad. Para evitar esto, se propuso una estrategia de *panning* que se basa en la competencia simultánea entre hapteno inmovilizado y analito que compite en solución.

Para cumplir con este objetivo, en cada ronda de selección, los fagos se enriquecieron inicialmente mediante selección con el hapteno inmovilizado (BSA-MCLR), luego se eluyeron en condiciones ácidas y fueron neutralizados inmediatamente. La fracción enriquecida en fagos específicos, luego se incubaron con cantidades sub-estequiométricas de MC-LR; donde se permitió la unión en solución y posteriormente se transfirió a nuevos pocillos con el hapteno inmovilizado. En estas condiciones, será seleccionado el fago que exprese en su superficie *Nbs* con elevada afinidad, debido a que estarán formando inmunocomplejos en solución y no serán capaces de unirse al hapteno inmovilizado.

Los clones que presentaron mayor capacidad de inhibición en presencia de MC-LR soluble respecto a la señal en ausencia de toxina, se seleccionaron para su secuenciación. En la **Figura 25**, se muestran en rojo las secuencias seleccionadas, donde se identificaron tres clones diferentes, que no están relacionados a los clones aislados en la estrategia de *panning* anterior.

Con estos clones seleccionados se realizaron curvas de inhibición que se pueden observar en la **Figura 27**. Los valores de IC50 obtenidos fueron similares a los obtenidos con los clones seleccionados en el *panning* por competición secuencial, a excepción del clon D9.2 que presentó un IC50= $2,2 \pm 0,06 \mu g/L$ con un LOD de $0,4 \mu g/L$. Si bien se logró un incremento de aproximadamente dos veces en la sensibilidad con esta estrategia, este límite de detección aún es modesto y no alcanza la sensibilidad del ensayo de ELISA basado en anticuerpos policionales, descripta en el Capítulo II.



Figura 27. Curvas de inhibición obtenidas con los VHHs aislados por competición simultánea. % A/A₀: Las curvas se normalizaron, expresando los valores de absorbancia obtenidos para cada estándar como % respecto a la absorbancia correspondiente al cero de la curva. Los valores se graficaron usando ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando el software *Origin 6.0 Microcal*. Cada estándar se analizó por triplicado. IC50: Concentración inhibitoria 50 %.

3.2.1.3. Panning por constante cinética de disociación (koff) lenta

Con el fin de explorar nuevas alternativas para la selección de anticuerpos que permitieran obtener inmunoensayos con mayor sensibilidad, se planteó una nueva estrategia de selección basada en la cinética asociada a la unión entre el anticuerpo y el antígeno. Esta estrategia es comúnmente usada para la selección de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, con elevada afinidad contra macromoléculas. En este enfoque, la población de fagos se enfrenta con el hapteno inmovilizado y luego de etapas de lavados exhaustivos, los fagos que continúan unidos al pocillo se incuban con exceso molar antígeno soluble durante periodos largos de tiempo. Finalmente, los fagos que permanecieron unidos, se eluyen por digestión con tripsina.

Esta estrategia promueve la selección de fagos que expresan VHHs con constante de disociación (*koff*) pequeñas, y por tanto VHHs de alta afinidad por el analito inmovilizado. Sin embargo, todo esto no garantiza que los clones seleccionados tendrán reactividad cruzada con elevada afinidad por el hapteno en solución. De

hecho, esta estrategia podría seleccionar VHHs que no reconocen al analito en solución, especialmente cuando la estructura del analito derivatizado utilizado para generar el conjugado, es muy diferente a la estructura del analito "nativo" [310]. Afortunadamente, la MC-LR, es un hapteno "grande" (PM~995 Da), y su conjugación a proteínas (BSA, OVA) se realizó mediante reacción tiol-eno que introduce modificaciones mínimas en la estructura de la molécula.

Utilizando esta estrategia, se realizaron tres rondas de *panning*, y a continuación se procedió a la selección de clones individuales como se describió anteriormente, según su capacidad de inhibición en presencia de MC-LR soluble por ELISA. Los clones que demostraron mayor inhibición se secuenciaron y se identificaron tres secuencias diferentes. El clon A2.3 fue el más representado, y se aislaron además dos secuencias relacionadas entre sí, clones H11.3 y F11.3 como se observa en la **Figura 25**. Además, como se puede apreciar el clon A2.3 tiene secuencia similar al clon D9.2; los clones H11.3 y F11.3 presentan secuencias similares a B2.2 y C3.2 pero no son idénticas.

Los clones A2.3 y H11.3 fueron seleccionados para desarrollar ensayos del tipo ELISA competitivos para cuantificación de MC-LR. En la **Figura 28**, se muestran las curvas de inhibición y ambos demostraron un importante incremento en la sensibilidad en comparación a los clones aislados en las estrategias de *panning* reportadas anteriormente, con valores de IC50 de 0,28 ± 0,02 µg/L (LOD=0,05 µg/L) para A2.3 y de 0,63 ± 0,06 µg/L (LOD=0,08 µg/L) para H11.3. Estos clones por lo tanto presentaron un alto potencial para la generación de inmunoensayos de segunda generación de elevada sensibilidad.



Figura 28. Curvas de inhibición obtenidas con los VHHs aislados por selección por elevada constante cinética de disociación (*koff***). % A/A₀: Las curvas se normalizaron, expresando los valores de absorbancia obtenidos para cada estándar como % respecto a la absorbancia correspondiente al cero de la curva. Los valores se graficaron usando ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando el software** *Origin 6.0 Microcal***. Cada estándar se analizó por triplicado. IC50: Concentración inhibitoria 50 %.**

3.2.2. Optimización y caracterización del ELISA de segunda generación con *Nbs* anti-MCs

Debido a que el Clon H11.3 presentó problemas de estabilidad y solubilidad a la vez que el clon A2.3 presentó mejor sensibilidad, se seleccionó este último para continuar con la caracterización de este ensayo monoclonal.

3.2.2.1. Evaluación de la exactitud del ensayo en muestras ambientales y potables Una vez que se estableció el formato de este nuevo ensayo, se evaluó su *exactitud* mediante el estudio de recuperaciones en muestras reales adicionadas con MC-LR. En función de la experiencia favorable con el uso del *Buffer Interferencias (BI*: Tris 1M, 0,3 M NaCl, 0,2 M EDTA, 1 % BSA; pH 7,4) en el ELISA policional para evitar el efecto matriz, el mismo se incorporó también en este ensayo. Sin embargo, aun utilizando estas condiciones se obtuvieron porcentajes de recuperación mayoritariamente bajos, además de alta variabilidad en los resultados (52%-132%). Con el fin de mejorar estos resultados se procedió a la modificación de diferentes condiciones del ensayo, variando la composición de los buffers utilizados, así como el agente bloqueante de las placas (gelatina y caseína en lugar de BSA). Experimentos preliminares mostraron que bloqueando con gelatina era posible mejorar los porcentajes de recuperación en muestras adicionadas. En la **Figura 29** se muestra la curva de calibración promedio para MC-LR obtenida en cuatro días utilizando el clon A2.3, con gelatina como agente bloqueante. El límite de detección (calculado según 3 SD del cero) fue de 0,06 μ g/L y el de cuantificación (10 SD) fue de 0,18 μ g/L.



Figura 29. Curva promedio del ensayo monoclonal establecido con clon A2.3. Promedio de cuatro curvas por triplicado, realizadas en 4 días diferentes. % A/A₀: Las curvas se normalizaron, em estadocon dadores de la curva. IC50: Concentración inhibitoria 50%. el rango óptimo (80-120%) como se pueden observar en la **Tabla 12**. La *veracidad* y la evaluación del efecto matriz, se realizó utilizando agua proveniente de tres embalses (Río Negro) y agua potable producida a partir de estos mismos embalses.

Utilizando el nanobody A2.3, se analizaron 27 muestras con baja concentración o no detectables, y se adicionaron con MC-LR 0,2 μ g/L (18 muestras) y 0,5 μ g/L (27 muestras). Las recuperaciones fueron excelentes en ambas concentraciones, demostrándose la aplicabilidad de este ensayo para la determinación directa de MCs.

-	Muestra sin adicionar	Adición MC-LR 0,2 μg/L		Adició	on MC-LR 0,5 μg/L
Muestra	MCs (µg/L)	MCs (µg/L)	% Recuperación	MCs (µg/	L) % Recuperación
DB1	0,94 ± 0,07	ND	ND	1,53 ± 0,1	12 118
DB2	0,48 ± 0,09	ND	ND	0,89 ± 0,0	03 82
DP1	0,94 ± 0,07	ND	ND	1,47 ± 0,0	06 106
DY1	1,02 ± 0,01	ND	ND	1,55 ± 0,1	14 106
DY2	$0,42 \pm 0,04$	ND	ND	0,97 ± 0,0	05 110
DY3	0,84 ± 0,06	ND	ND	1,36 ± 0,0	07 104
DY4	0,37 ± 0,02	ND	ND	0,96 ± 0,0	05 118
TB1	<lod< td=""><td>ND</td><td>ND</td><td>0,60 ± 0,0</td><td>01 120</td></lod<>	ND	ND	0,60 ± 0,0	01 120
TY1	<lod< td=""><td>ND</td><td>ND</td><td>0,60 ± 0,0</td><td>02 120</td></lod<>	ND	ND	0,60 ± 0,0	02 120
DB3	0,19 ± 0,01	0,41 ± 0,09	109	0,65 ± 0,0	92
DB4	0,41 ± 0,03	0,59 ± 0,01	90	0,90 ± 0,0	07 98
DB5	0,22 ± 0,05	0,41 ± 0,03	97	0,63 ± 0,0	05 82
DB6	0,28 ± 0,01	0,44 ± 0,03	80	0,78 ± 0,0	05 100
DY5	$1,07 \pm 0,07$	1,27 ± 0,08	98	1,50 ± 0,0	04 86
DY6	0,22 ± 0,05	0,41 ± 0,03	95	0,63 ± 0,0	05 82
DY7	0,08 ± 0,01	0,29 ± 0,04	105	0,58 ± 0,0	03 100
DB7	<lod< td=""><td>$0,20 \pm 0,04$</td><td>99</td><td>0,53 ± 0,0</td><td>06 106</td></lod<>	$0,20 \pm 0,04$	99	0,53 ± 0,0	06 106
DB8	<lod< td=""><td>0,23 ± 0,03</td><td>115</td><td>0,44 ± 0,0</td><td>04 88</td></lod<>	0,23 ± 0,03	115	0,44 ± 0,0	04 88
DP2	<lod< td=""><td>0,23 ± 0,09</td><td>114</td><td>0,52 ± 0,0</td><td>07 104</td></lod<>	0,23 ± 0,09	114	0,52 ± 0,0	07 104
TB2	<lod< td=""><td>0,19 ± 0,02</td><td>94</td><td>0,57 ± 0,0</td><td>06 114</td></lod<>	0,19 ± 0,02	94	0,57 ± 0,0	06 114
TB3	<lod< td=""><td>$0,24 \pm 0,02$</td><td>120</td><td>0,55 ± 0,0</td><td>04 110</td></lod<>	$0,24 \pm 0,02$	120	0,55 ± 0,0	04 110
TB4	<lod< td=""><td>$0,22 \pm 0,01$</td><td>108</td><td>0,51 ± 0,0</td><td>05 102</td></lod<>	$0,22 \pm 0,01$	108	0,51 ± 0,0	05 102
TP1	<lod< td=""><td>0,18 ± 0,02</td><td>92</td><td>0,60 ± 0,0</td><td>06 119</td></lod<>	0,18 ± 0,02	92	0,60 ± 0,0	06 119
TP2	<lod< td=""><td>$0,24 \pm 0,02$</td><td>120</td><td>0,55 ± 0,0</td><td>08 110</td></lod<>	$0,24 \pm 0,02$	120	0,55 ± 0,0	08 110
TY2	<lod< td=""><td>$0,20 \pm 0,03$</td><td>98</td><td>0,53 ± 0,0</td><td>04 106</td></lod<>	$0,20 \pm 0,03$	98	0,53 ± 0,0	04 106
TY3	<lod< td=""><td>0,16 ± 0,01</td><td>81</td><td>0,50 ± 0,0</td><td>07 100</td></lod<>	0,16 ± 0,01	81	0,50 ± 0,0	07 100
TY4	<lod< td=""><td>$0,20 \pm 0,06$</td><td>102</td><td>0,52 ± 0,0</td><td>04 104</td></lod<>	$0,20 \pm 0,06$	102	0,52 ± 0,0	04 104

Tabla 12. Recuperaciones (%) en muestras de aguas adicionadas con MC-LR.

Muestras: D y T, embalse y potable respectivamente. B, P, e Y se refiere a tres embalses diferentes, del Río Negro, Uruguay. <LOD: no detectable. ND: no determinado. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.2.2.2. Evaluación de variabilidad de la curva de calibración del ensayo

Con el fin de estudiar la precisión del ensayo, se realizó una aproximación mediante la determinación de la variabilidad asociada a los $\%(A/A_0)$ correspondientes a estándares con concentraciones que se encuentran dentro del rango lineal del ensayo (0,05; 0,09; 0,19; 0,38; 0,75 y 1,50 µg/L). Para esta evaluación se calcularon los RSD, intra-ensayo (*repetibilidad*) e inter-ensayo en cuatro días (*precisión intermedia*) para cada estándar (**Tabla 13**).

La curva de calibración del ensayo presenta baja variabilidad tanto intra-ensayo (<8 %) como inter-ensayo (<25 %) en todo el rango estudiado (0.05-1.5 μ g/L), lo

que es destacable considerando que se trata de un método para la cuantificación de analitos que se encuentran en concentraciones del orden de las ppb (partes por billón, μg/L), según los criterios requeridos en la Guía AOAC 2016 [311].

	Repetibilidad				Precisión Intermedia			
MC-LR µg/L	%(A/A ₀)	SD	RSD	_	%(A/A ₀)	SD	RSD	
1,50	13,9	1,0	7,3	_	16,3	3,8	23,4	
0,75	26,8	1,3	4,9		30,7	5,3	17,2	
0,38	47,0	1,8	3,7		50,8	5,3	10,4	
0,19	67,8	2,1	3,2		71,1	4,3	6,1	
0,09	82,8	1,8	2,2		85,0	3,1	3,6	
0,05	92,5	1,7	1,8		93,3	2,8	3,0	

Tabla 13. Precisión del ensayo ELISA monoclonal. Variabilidad asociada a estándares con concentraciones dentro del rango lineal.

%(A/A₀): Absorbancia de cada estándar sobre absorbancia cero en porcentaje. SD: desviación estándar. RSD: desviación estándar relativa en %. Repetibilidad: variabilidad *intra-ensayo* (n=6). Precisión intermedia: variabilidad *inter-ensayo* en cuatro días (n=12).

3.2.2.3. Reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales seleccionados

Como ya se mencionó al largo de esta tesis, las microcistinas pertenecen a una familia de variantes estructurales que en la actualidad se estima que son más de 240, presentando variabilidad en la toxicidad asociada y diferente frecuencia de aparición [192]. Todo esto dificulta la implementación de programas de monitoreo, lo que llevó a que la mayoría de las guías establezcan valores de referencia para MC-LR, la variante más frecuente y la más estudiada. Por esta razón, es muy importante conocer la reactividad cruzada frente a las variantes de microcistinas disponibles. En la **Tabla 14**, se muestra la reactividad cruzada de los dos clones obtenidos de menor LOD (A2.3 y H11.3), expresadas en porcentaje respecto a la reactividad contra MC-LR.

Tabla 14. Reactividad cruzada del ELISA monoclonal frente a diferentes congéneres de MCs.

	I	A2.3	H11.3			
Microcistina	IC50 µg/L	% Reactividad cruzada	IC50 µg/L	% Reactividad cruzada		
LR	0,37 ± 0,02	100	1,19 ± 0,04	100		
DMLR	0,47 ± 0,01	79	1,35 ± 0,04	88		
LA	$1,2 \pm 0,1$	30	3,3 ± 0,3	36		
LY	6,7 ± 2,7	6	$5,4 \pm 0,4$	22		
HtyR	0,61 ± 0,03	61	$1,5 \pm 0,1$	79		
YR	1,01 ± 0,03	37	$2,8 \pm 0,3$	43		
LW	6,7 ± 0,5	6	$1,7 \pm 0,1$	70		
WR	1,12 ± 0,05	33	$2,1 \pm 0,2$	56		
DMRR	0,86 ± 0,04	43	1,42 ± 0,03	84		
RR	0,83 ± 0,05	45	$1,1 \pm 0,1$	106		
LF	6,0 ± 0,5	6	≥ 50	≤ 2		

Como se puede observar en la **Tabla 14**, ambos VHHs presentan elevada reactividad con las variantes polares que contienen residuos de arginina, incluyendo los congéneres más frecuentes LR, YR, RR y sus modificaciones DM-LR, DM-RR y HtyR, que comúnmente coexisten en floraciones naturales de cianobacterianas [8]. El clon H11.3 presenta elevada reactividad frente a una de las variantes menos tóxicas MC-RR, por otro lado, el ELISA utilizando el VHH A2.3 es particularmente reactivo para MC-LR, una de las variantes más tóxicas y más dominante en las floraciones cianobacterianas. El H11.3 presenta una reactividad cruzada más uniforme frente a las variantes analizadas, lo que podría hacerlo más interesante para obtener una evaluación más general del contenido global de congéneres presentes en la muestra. Sin embargo, no presenta reactividad frente a MC-LF.

3.2.3. Inter-comparación del ELISA monoclonal (VHH A2.3) desarrollado con LC-MS/MS

Como se mencionó en sección *Materiales y Métodos* de este Capítulo, en colaboración con la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la

Facultad de Química, se analizaron un total de 30 muestras y se realizó la comparación con este ensayo monoclonal utilizando el clon A2.3.

Cabe destacar que para el análisis por métodos instrumentales es necesario disponer de estándares de cada variante que se desea analizar además de pretratamiento de la muestra en algunos casos, en esta comparación se realizó la determinación de las variantes MC-LA, MC-LR, MC-RR y MC-YR. El nuevo ensayo monoclonal presenta una excelente correlación (coeficiente de Pearson=0,993) con este método instrumental como se puede observar en la **Figura 30**. Esto demuestra la excepcional selectividad de este ensayo monoclonal con el VHH A2.3.



Figura 30. Inter-comparación ELISA monoclonal (A2.3) con LC-MS/MS. Concentración de la suma de variantes analizadas por LC-MS/MS (MC-LA, MC-LR, MC-RR y MC-YR) en µg/L en función de MCs en µg/L por ELISA.

3.2.4. Desarrollo de ensayo para detección *in situ* con punto final evaluado en forma visual (Inmunocromatografía de flujo lateral)

Debido a la necesidad de disponer de nuevos formatos de análisis que permitan su utilización *in situ* para facilitar el monitoreo de cianotoxinas de relevancia local, y dada la ventaja de disponer del VHH biotinilado, se plantearon en una primera instancia dos formatos de inmunocromatografía de flujo lateral. Cabe destacar dada la naturaleza del analito (hapteno), en ambos formatos la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración, es decir son ensayos por competencia, en los que la presencia del analito en la muestra genera una disminución o desaparición completa de la señal. A estos efectos se prepararon dos proteínas marcadas con carbón con el fin de evaluar el desempeño de cada formato; Avidina-Carbón y BSA-MCLR-Carbón.

3.2.4.1. Formato 1: Tiras sensibilizadas con Avidina y conjugado BSA-MCLR-Carbón Se basó en tiras de nitrocelulosa sensibilizadas con una línea *test* de avidina (comercial), la cual se sumerge en un pocillo o microtubo que contiene la muestra, buffer de corrida, VHH biotinilado y conjugado BSA-MCLR marcado con carbón. En ausencia de MC libre en la solución, luego de que por capilaridad dicha mezcla migra por la tira, todo el anticuerpo biotinilado se une al conjugado BSA-MCLR marcado con carbón y este inmunocomplejo se une a la avidina (a través del VHH biotinilado) resultando en el 100% de señal en la línea. Si hay microcistina libre proveniente de la muestra, se observa una disminución de la señal, debido a que la microcistina libre compite con el conjugado BSA-MCLR-Carbón por unirse al VHH.

Este formato no arrojó buenos resultados ya que no fue posible obtener conjugados BSA-MCLR fuertemente marcados con carbón. Por esta razón, se obtuvieron señales muy débiles. A su vez, en los controles realizados, se evidenció interacción inespecífica entre la avidina y el conjugado BSA-MCLR-Carbón. Estos resultados llevaron a descartar este formato y se continuó trabajando con el *Formato 2* que se describe a continuación.

3.2.4.2. Formato 2: Tiras sensibilizadas con BSA-MCLR y conjugado Avidina-Carbón En este formato se utilizan tiras de nitrocelulosa sensibilizadas con una línea *test* de conjugado BSA-MCLR (180 μg/mL) y como control de corrida una línea de BSA- biotina (250 µg/mL), La tira se sumerge en un pocillo o microtubo, y se deja pasar por capilaridad una mezcla de Avidina-Carbón y el VHH biotinilado, junto con la muestra y buffer de corrida (**Figura 31**). En este caso también se observó interacción inespecífica entre la avidina comercial y el conjugado BSA-MCLR, al igual que sucedió en el formato mencionado anteriormente. Por este motivo se sustituyó la avidina por estreptavidina recombinante, producida como se reportó en sección *Materiales y Métodos*.



Figura 31. Inmunocromatografía de flujo lateral (*Formato 2***).** Tiras nitrocelulosa con BSA-MCLR (línea test); BSA-biotina (línea control); conjugado de revelado estreptavidina-carbón. **a**: En ausencia de MC libre. **b**: en presencia de MC libre.

Con el fin de optimizar el ensayo y minimizar el límite de detección, se estudiaron variaciones en diversas condiciones como, concentración del conjugado BSA-MCLR utilizado para sensibilizar las tiras; pH y fuerza iónica del buffer de corrida; concentración de anticuerpo; volumen de muestra y volumen total en el pocillo o microtubo, donde se sumergen las tiras.

En lo que se refiere a la sensibilización de las tiras de nitrocelulosa, se obtuvieron líneas más definidas cuando la solución de BSA-MCLR y BSA-biotina, se realizó en PBS conteniendo sacarosa al 5%. Por otra parte, no se observó ningún efecto en lo que se refiere a la sensibilidad del ensayo, al variar la concentración de BSA-MCLR, en tanto que se use cantidad suficiente para obtener una línea definida y visible. Respecto a la variación de la fuerza iónica y el pH durante la corrida, tampoco se observaron efectos notorios. Esto es interesante porque el ensayo no depende de estas condiciones y demuestra ser robusto, ya que estos parámetros pueden variar en un amplio rango en muestras ambientales. La variable más crítica como es de esperarse, es la concentración de anticuerpo utilizada durante la corrida, es necesario que este sea suficiente para dar buena señal en cero y que no esté en exceso para lograr la mayor inhibición posible de la señal. Una vez evaluadas todas las condiciones antes mencionadas se logró obtener un ensayo rápido, robusto y con sensibilidad adecuada para el análisis tanto de aguas potables y ambientales.

Desempeño del ensayo en matrices reales

Con el fin de evaluar el desempeño del ensayo se utilizaron dos tipos de matrices blanco (agua ambiental y agua potable), en las cuales se realizaron adiciones estándar. Tanto en agua ambiental proveniente de un embalse como en agua potable, el ensayo se comportó igual que en buffer. Basado en los valores de referencia recomendados por la OMS de 1 µg/L en aguas potables y 2-4 µg/L en aguas recreacionales (valor límite de riesgo bajo) [8, 166, 172], el ensayo desarrollado presenta buena sensibilidad en ambas matrices. En agua potable se detecta inhibición a 0,5 µg/L y es muy notoria a 1 µg/L; en agua ambiental la inhibición es casi completa a partir de 2 µg/L, lo que demuestra que es adecuado como método de *screening* rápido en monitoreo ambiental (**Figura 32**).



Figura 32. Adiciones en matrices blanco. Tiras nitrocelulosa con BSA-biotina (control) y BSA-MCLR, conjugado de revelado estreptavidina-carbón. **a**.: Agua potable adicionada a 0,5, 1 y 2 μg/L. **b**.: Agua de embalse adicionada a 1, 2, 5 y 10 μg/L.

Validación del ensayo en relación a la interpretación por diferentes operadores

Como el objetivo principal de este desarrollo es su implementación en muestras ambientales *in situ*, para realizar su validación, se utilizó una muestra de embalse no detectable por ELISA monoclonal, adicionada a 3 niveles con MC-LR, 0,5 μ g/L; 1,0 μ g/L y 4,0 μ g/L. Además, se analizó dos muestras ambientales de 1,3 μ g/L y 4,5 μ g/L cuantificadas previamente por ELISA. El nivel más bajo de adición (0,5 μ g/L) corresponde a la concentración cercana al límite de detección estimado para este ensayo.

Cada análisis se realizó por duplicado y con el fin de estudiar su *reproducibilidad* para diferentes operadores, se evaluó el desempeño del ensayo mediante su lectura en forma visual por 6 operadores en un ensayo a "ciegas".

Criterios de interpretación visual

A cada operador se le solicitó que realizara la lectura en forma visual siguiendo dos criterios:

Criterio a: en cada tira inmunocromatográfica individual observación de la disminución de la intensidad de la línea *test*, respecto a la línea correspondiente al control (BSA-biotina) de la misma tira.

Criterio b: disminución de la línea *test* de cada análisis (muestra), comparando con la línea *test* correspondiente a la tira inmunocromatográfica del control negativo o cero, en este caso agua milliQ.

Para realizar esta evaluación se definieron cuatro resultados posibles para la clasificación de las muestras analizadas: negativo (-), positivo dudoso (±), positivo (+) y positivo fuerte (++, línea *test* prácticamente no visible).

Ambos criterios de evaluación planteados arrojaron resultados muy similares como se puede observar en la **Figura 33**. En la concentración cercana al límite de detección como se podría suponer, la mayoría de los operadores calificaron esta muestra como positivo dudoso (±) (**Figura 33.b**). Sin embargo, utilizando el primer criterio de evaluación (comparación respecto a línea control de cada tira), dos operadores calificaron esta muestra como positiva (+) (**Figura 33.a**). Además, cabe destacar, que todos los operadores manifestaron preferencia por este criterio de interpretación y ninguno observó diferencias en los duplicados de cada análisis.



Figura 33. Representación de criterios de lectura de *test* **inmunocromatográfico. a.** Criterio a: disminución de intensidad línea test respecto a línea control de la misma tira. **b.** Criterio b: disminución de intensidad de la línea test respecto a la línea test de la tira correspondiente al control negativo o cero. * Muestra de lago blanco adicionada. **Muestras ambientales reales.

3.3. Conclusiones

Una importante contribución de esta parte de la tesis fue el aporte a la metodología para la selección de *nanobodies* contra pequeños analitos. Distintos grupos han reportado fracasos en la selección de estos nanobodies [271], y la disponibilidad de nuevas estrategias para su aislamiento puede ayudar a revertir esta situación. Este desarrollo se hizo posible debido a que se logró generar una biblioteca de gran diversidad de VHHs contra MCs, y que se contó además con un sistema de expresión y producción de tipo *"high throughput"* de 96 clones individuales que se produjeron biotinilados *in vivo.* Esta biotinilación, que es sitio-específica y única, permite la inmovilización orientada y facilita la detección del anticuerpo. Basándose en la inhibición relativa de la señal en presencia de MC soluble, fue posible seleccionar los clones más promisorios derivados de cada estrategia.

En lo que se refiere a las estrategias de *panning* planteadas con el fin de seleccionar monoclonales monodominio de llama, las tres estrategias permitieron seleccionar diferentes *subsets* de VHHs. Esto fue evidente en el caso de la selección por competición secuencial, donde los clones aislados representan un grupo de secuencias muy similares que comparten la misma longitud de sus CDRs. En el caso de la segunda y tercera estrategia de *panning*, si bien hubo dos grupos de secuencias muy similares representadas cada una por clones A2.3 y H11.3, cada estrategia de selección aisló un conjunto único de secuencias. Es interesante observar que los VHHs que presentaron mayor sensibilidad evidenciada por sus valores de IC50, surgieron del método de selección por pequeña *koff* y en segundo lugar de la estrategia por competición simultánea, que hasta el momento no se han utilizado para la selección de *nanobodies* anti-hapteno. Si bien lo más probable es que esto sea caso específico y pueda ser diferente para otras moléculas, estos resultados demuestran la importancia de utilizar diferentes estrategias de *panning*, además de la selección por competición estándar, para optimizar la selección de *nanobodies* anti-haptenos de alta afinidad y así permitir el desarrollo de inmunoensayos sensibles para analitos de este tipo.

Con la estrategia por disociación lenta, fue posible seleccionar anticuerpos adecuados para la optimización de inmunoensayos para cuantificación de MCs. El nanobody A2.3 seleccionado, permitió montar un ensayo de tipo ELISA con elevada sensibilidad (IC50 = $0,37 \pm 0,04 \mu g/L$) con un límite de detección muy por debajo de los valores exigidos para MCs en agua potable. Además, el ensayo presentó excelente selectividad, lo que se ve reflejado en los resultados de recuperaciones en muestras ambientales y potables. La reactividad cruzada fue comparable con otros anticuerpos anti-MCs reportados anteriormente [24, 256, 257]. El coeficiente de correlación elevado, con uno de los métodos de referencia, LC MS/MS, también evidenció el excelente valor analítico del nuevo ensayo y su potencial para su aplicación en programas de monitoreo ambiental.

Por otro lado, se logró desarrollar un ensayo inmunocromatográfico para MCs que es rápido, sencillo y robusto, con un límite de detección adecuado tanto para el análisis de muestras ambientales como potables. El *test* fue validado en lo que se refiere a su lectura por diferentes operadores, demostrando que no existen diferencias de interpretación de los resultados, lo que es muy importante en este tipo de ensayos para aplicación en campo o *in situ*.

Capítulo IV

Detección y cuantificación de MCs mediante MALDI-TOF

4. Detección y cuantificación de MCs mediante MALDI-TOF

Los inmunoensayos descriptos en los *Capítulos II y III* aportan una respuesta cuantitativa "global" de las diferentes variantes de microcistinas presentes en la muestra, por lo que son muy útiles como herramienta primaria para la gestión del riesgo. Sin embargo, como la toxicidad de las diferentes variantes puede variar más de un orden de magnitud, esa información debe complementarse con métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación de las variantes individuales presentes [8, 312, 313].

Para cumplir con este objetivo, en primer lugar, se puso en marcha una metodología para identificar variantes estructurales de microcistinas por espectrometría de masas mediante *Matrix-assisted Laser desorption/ionization, Time of Flight* (MALDI-TOF). EL MALDI TOF es un método no cromatográfico, muy adecuado para identificar y caracterizar biopolímeros [314]. Aunque se requiere una elevada inversión inicial, el análisis por MALDI-TOF es sencillo y de bajo costo operativo, lo que hace posible una rápida identificación de las variantes de MCs presentes [219], permite confirmar la presencia de las mismas y complementa los resultados del ELISA, para una mejor valoración del riesgo asociado a una floración. Una ventaja adicional es que su uso con fines cualitativos, no requiere disponer de estándares individuales de los distintos congéneres.

Sin embargo, el MALDI-TOF como se basa en un método de ionización suave, tiene serias limitaciones para la identificación de congéneres de MCs hidrofóbicas o apolares y puede generar falsos negativos [315]. Este es el caso de MCs como la MC-LF, MC-LA, MC-LW y MC-LY. Si bien estas variantes no son muy frecuentes, existen reportes de su presencia en concentraciones relativamente elevadas [51, 179, 316]. Diversos estudios demuestran que las variantes de MCs más hidrofóbicas como la MC-LF y MC-LW, son claramente más tóxicas que la MC-LR *in vitro* y, por lo tanto, potencialmente también *in vivo* [117, 122, 317]. Con el fin de posibilitar la detección de las variantes apolares por MALDI-TOF, en este Capítulo se reporta el desarrollo de una estrategia de derivatización, sencilla y efectiva para favorecer su ionización.

Otra de las limitaciones del MALDI-TOF, es que la intensidad de la señal obtenida para cada ion, posee baja repetibilidad, debido principalmente a la variabilidad en la formación de los cristales intra e inter spot, por lo que no es habitualmente utilizado con fines cuantitativos [228, 230]. Este problema puede solucionarse mediante la incorporación de un estándar interno (IS), obteniéndose mejores resultados cuando este compuesto mimetiza las propiedades fisicoquímicas del analito de interés [230]. En este sentido, la forma más obvia de seleccionar un IS es la utilización de un isótopo marcado del analito, pero esto resulta costoso y puede ser muy difícil de preparar y purificar. En los primeros reportes de aplicaciones de MALDI-TOF cuantitativo para determinación de MCs, se propusieron tres potenciales estándares internos: nodularina (pentapéptido cíclico con estructura similar a las MCs); un isótopo marcado de MC-YR([15N]10-isotopomer) y la hormona angiotensina I, que es un péptido lineal pequeño [220]. El menor límite de detección para MC-LR se obtuvo con nodularina. Más recientemente, con el objetivo de facilitar y reducir el costo del análisis, Puddick et al., utilizó también angiotensina I como IS, pero intentando optimizar el método combinando diferentes técnicas de preparación de muestra. Sin embargo no logró alcanzar los límites de detección obtenidos anteriormente con nodularina [221], lo que resalta la importancia del uso de estándares internos con propiedades fisicoquímicas semejantes al analito de interés. Sin embargo, la utilización de nodularina como IS para cuantificar MCs, también presenta desventajas, ya que es posible la presencia de NODs y MCs en una misma muestra.

Para disponer de estándares internos de fácil obtención y de estructura similar a las MCs, se realizó la síntesis de una familia de compuestos mediante conjugación de microcistinas con diferentes tioles de bajo peso molecular. Esta química de derivatización, simple y de alta eficiencia, es la misma que se utilizó en la preparación de los conjugados (proteína-hapteno) de inmunización y de *coating* de esta tesis (Capítulos II y III). En este Capítulo se reporta la generación de esta familia estándares internos y su aplicación en un método cuantitativo para la determinación de congéneres polares individuales en aguas por MALDI-TOF (**Artículo III**, trabajo realizado en co-autoría).

Finalmente, se presenta el desarrollo de un método de alta sensibilidad para la cuantificación de MCs en aguas y matrices biológicas que combina inmunoconcentración con el VHH A2.3, inmovilizado en partículas magnéticas y la detección mediante MALDI-TOF. Estos resultados están incluidos en el manuscrito en preparación, **Artículo IV** (manuscrito sometido a Analytical Chemistry).

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Análisis cualitativo de MCs por MALDI-TOF

Se utilizó un equipo MALDI-TOF Microflex LRF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) con un láser de nitrógeno de 337 nm, operado en modo positivo con reflector con extracción tardía, optimizado en el rango m/z desde 500 Da a 2000 Da. Se mezclaron 5 μ L de muestra o extracto concentrado en metanol, obtenido luego de extracción en fase sólida (SPE, Strata C18-E, 55 μ m, 70A, 500mg/3mL; Phenomenex, CA, USA); con 5 μ L de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 20 mg/mL (CHCA, Bruker Daltonics, MS, USA) en acetonitrilo:agua (50:50 v/v) conteniendo 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich, MO, USA). La mezcla se depositó por triplicado (2 μ L/spot) sobre la placa de acero (MicroScout Target, Bruker) y se dejó secar a temperatura ambiente [318]. Se utilizó calibrador comercial para péptidos (Bruker Daltonics, MS, USA). Luego de la calibración del equipo, se procedió al análisis de las muestras. Con el fin de optimizar la resolución de los espectros de masas, dependiendo de las características de la muestra, se puede ajustar la intensidad del láser (30-50% Intensidad de láser). La calibración se repitió cada vez que fue necesario.

El equipo utilizado con reflector, permite la identificación de péptidos según su relación m/z, con excelente resolución. Dado que los péptidos se ionizan y se cargan con un único protón (modo positivo), la señal obtenida corresponde al ion [MH]⁺ en donde M corresponde a la masa molecular. La identificación de las MCs se realizó utilizando tablas de las señales m/z reportadas para las mismas [192]. Cabe destacar que algunos congéneres de MCs comparten la misma masa y en estos casos la identificación resulta ambigua.

Para fines confirmatorios, el equipo permite realizar el método PSD (*Post Source Decay*), que posibilita obtener un perfil de fragmentación de un pico de masa parental de interés (ion precursor). Donde se obtiene un espectro de fragmentos característicos derivados del ion precursor [213, 219]. Cuando la abundancia de la variante lo permitió, la misma se analizó por PSD a los efectos de confirmar si se trataba de una MC, en cuyo caso uno de los fragmentos principales observados es el correspondiente al grupo ADDA, m/z 135.

4.1.1.1. Detección de MCs hidrofóbicas

Para la modificación o derivatización de estas MCs, se utilizó la reacción tiol-eno, con diferentes compuestos. En primera instancia, se utilizó Arginina tiolada sintetizada en el laboratorio. Esto se realizó mediante modificación de su grupo amino primario, utilizando N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP, Thermo Fisher, MA, USA) en una relación molar Arginina:SATP de 1:5 siguiendo las recomendaciones del fabricante. La derivatización con mercaptoetilguanidina (MEG, Thermo Fisher, MA, USA), se realizó incubando 5 μ L de muestra/extracto, o solución estándar de MC con 20 μ L de buffer Carbonato 10 mM, pH 9 s y 5 μ L de solución 5mg/mL de MEG, durante 10 minutos a 95°C en termociclador (iCycler, BIO-RAD, CA, USA).

4.1.1.2. Cultivo de Microcystis sp. (Cepa LTPNA 08, productora de MCs apolares)

La cepa LTPNA 08, aislada del embalse de Salto Grande (San Pablo, Brasil, año 2007); fue proporcionada por el laboratorio del Profesor Dr. Ernani Pinto, de la Universidade de São Paulo, Brasil. Dicha cepa, identificada como *Microcystis sp.*, se cultivó en medio ASM-1, según *Domingos et al*. El volumen de reactor fue de 8 litros, con un fotoperíodo de 12:12 h (luz:oscuridad) a 23±0,5°C e intensidad de luz de 1000±100 lux. Después de 25 días, cuando se alcanzó la fase de crecimiento exponencial, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C [319]. El *pellet* de células se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se liofilizó (L101; Liotop, Brasil).

Para el análisis de variantes por MALDI-TOF, se disolvieron 15 mg de biomasa liofilizada en 3 mL de agua MilliQ; se homogenizó en Vortex durante 5 minutos y luego se sonicó en baño de ultrasonido durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 18000g, 15 minutos a 4°C. Finalmente, al sobrenadante se realizó una extracción en fase sólida utilizando cartuchos de C18 (SPE, Strata C18-E, Phenomenex, CA, USA), luego de lavado con 5 mL de metanol 10%, la muestra se eluyó en 2 mL de metanol 100%. Previo al análisis el extracto se diluyó 1:1 (v/v) en agua MilliQ.

4.1.2. Análisis cuantitativo de MCs por MALDI-TOF (qMALDI-TOF)

Estándares de MC-LR y MC-RR (GreenWater Laboratories Palatka, FL); estándar MC-YR (Alexis, Enzo Life Sciences, Exeter, U.K.); β -mercaptoetanol y ácido trifluoroacético (TFA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y solución estándar de calibración de péptidos (Bruker Daltonics, MS, USA). Acetonitrilo y metanol, grado HPLC (Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

4.1.2.1. Síntesis de estándares internos

En primera instancia se prepararon dos estándares internos IS-1 e IS-2, derivados de MC-LR y MC-RR, respectivamente, por reacción tiol-eno entre el metileno presente en la N-metildehidroalanina (Mdha). A una solución 0,1 mM de MC disuelta en metanol/buffer borato 100 mM (50:50, v/v), pH 10,5; se agregaron 10 µl de β -mercaptoetilamina o β -mercaptoetanol y se dejó reaccionar a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno durante seis horas. El avance de reacción se siguió mediante MALDI-TOF y una vez completada, la mezcla resultante se diluyó hasta una concentración final de metanol de 10%, se acidificó a pH 3 con ácido acético glacial al 5% y se purificó mediante extracción en fase sólida (SPE C18, Phenomenex, Torrance, CA, USA). El eluido obtenido en 100% metanol se evaporó y se reconstituyó en metanol; luego se cuantificó utilizando HPLC/UV; se alicuotó para su conservación a -20°C.

4.1.2.2. Cuantificación de MCs polares en muestras ambientales

Cada muestra se preparó y se cuantificó previamente por ELISA policional, como se describió en *Sección Materiales y Métodos*, Capítulo II. El análisis por MALDI-TOF se realizó como se detalla en el **Artículo III**. Brevemente, 10 µL de cada muestra o

estándar, se mezclaron con estándar interno a concentraciones finales de 30, 40, 80, 300 o 400 μ g/L (según se indica en cada caso), luego se adicionaron 10 μ L de matriz CHCA. Se sembraron 2 μ L de la mezcla en 8 *spots* de la placa de MALDI y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se adquirieron los espectros disparando el láser en 10 zonas diferentes del *spot*, realizando 100 disparos individuales acumulando 1000 disparos en total, con 30% de intensidad de láser. Para la cuantificación se determinaron para cada *spot*, las relaciones de intensidad o área del pico correspondiente a cada MC, sobre la intensidad o área del pico de IS. Se realizaron curvas de calibración en paralelo a cada tanda de análisis; graficando la relación de intensidad o área del pico correspondiente a cada MC y del IS, en función a concentración del estándar en μ g/L.

4.1.2.3. Comparación método qMALDI-TOF con LC-MS/MS

El método LC-MS/MS, se realizó como se describe en la *Sección Materiales y Métodos* del Capítulo II. Se seleccionó un panel de 29 muestras de aguas ambientales provenientes de represas del Río Negro y del Río de la Plata, conteniendo diferentes niveles de microcistinas. Las muestras fueron seleccionadas mediante un *screening* previo utilizando la técnica de ELISA y fueron analizadas por el método qMALDI desarrollado y utilizando LC-MS/MS como método de referencia, se determinó MC-LR, MC-YR y MC-RR. Las muestras con concentraciones determinadas por ELISA \leq 60 µg/L fueron concentradas utilizando columnas C18 (SPE, Strata C18-E, Phenomenex, CA, USA).

4.1.3. Cuantificación de MCs en aguas y sueros, mediante inmunoconcentración y detección por MALDI-TOF

4.1.3.1. Preparación del inmunoadsorbente utilizando el VHH A2.3 e IS

Se tomaron 200 μ L de partículas magnéticas comerciales (MagnaBindTM Streptavidin Beads, 10mg/mL, Thermo Fisher, MA, USA) en un microtubo, se lavaron dos veces con 1,0 mL de PBS-BSA 0,2% y se resuspendieron en 1,0 mL solución 40 μ g/mL del nanobody o VHH A2.3 en PBS-BSA 0,2%. Se incubaron 30 minutos a una temperatura controlada de 18-20°C, con agitador rotacional. En

todas las etapas, es importante utilizar buffers de lavados y soluciones frías (refrigeradas en hielo), para evitar la agregación de las partículas.

Luego de la inmovilización del VHH en la superficie de las partículas, se realizaron 2 lavados con 1,0 mL de PBS-Tween 0,05% y dos lavados con PBS-BSA 0,2%, entre cada lavado se centrifugaron a 6000 g durante dos minutos y se concentraron en campo magnético. Las partículas cargadas con el anticuerpo, se resuspendieron en 1,0 mL de solución conteniendo 10 ng de estándar interno en PBS-BSA 0,2%. En este caso se utilizó IS-3, estándar interno derivado de MC-YR con β -mercaptoetanol. Se incubaron 30 minutos a temperatura controlada de 18-20°C, con agitador rotacional. Posteriormente, se realizaron lavados como se describió anteriormente y finalmente se resuspendieron en 200 µL de PBS-BSA 0,2% y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

4.1.3.2. Captura de las toxinas en muestras y análisis cuantitativo

Cada lote de muestras se analizó con una curva de calibración obtenida en paralelo, con estándares preparados en agua MilliQ. A una toma de 1,0 mL de estándares o muestras de agua se agregó, previo a la inmuno-concentración, 100 µL de buffer PBS 10X-BSA 10%. En el caso de las muestras de suero se utilizó 1,0 mL de muestra sin agregar buffer.

A cada tubo de muestra o estándar se adicionaron 5 μ L de partículas magnéticas pre-cargadas con VHH e IS-3 y se incubaron 10 minutos a temperatura controlada 18-20°C, en agitador rotacional. Luego de la captura, se centrifugó por 1 min a 6000 g y se realizó la separación magnética en soporte. De esta forma, se realizaron tres lavados con 1,0 mL de PBS-Tween 0,1% y dos lavados con agua-Tween 20 al 0,002%, de modo de remover las sales del PBS que interfieren en el análisis por MALDI-TOF, y adicionar un agente tenso activo para minimizar la posible agregación de las partículas.

Las partículas se concentraron en campo magnético, se resuspendieron en 20 μ L de matriz CHCA 10 mg/mL en acetonitrilo:agua (50:50 v/v) conteniendo 0,05% de TFA. Las suspensiones de partículas en matriz se homogenizaron e inmediatamente se sembraron por triplicado, 2 μ L/*spot* en placa para MALDI. Se

dejó secar a temperatura ambiente y se procedió con el análisis. Para obtener los espectros, el láser se disparó en ocho zonas diferentes del *spot* realizando 250 disparos individuales acumulando 2000 disparos por muestra con 50% de intensidad del láser. La curva de calibración se realizó graficando la relación de intensidad del pico correspondiente a cada MC y del IS-3 (Intensidad MC-LR/Intensidad IS) en función de la concentración del estándar en μ g/L.

4.2. Resultados y Discusión

4.2.1. Estudio de variantes de microcistinas

En el marco de este trabajo de tesis, se puso en marcha el método para identificar variantes estructurales de MCs por MALDI-TOF y se estudiaron las variantes presentes en muestras provenientes del Río de la Plata y de los embalses del río Negro.

Las muestras del Río de la Plata (Montevideo) correspondieron a la temporada 2009-2010 (n=32). El análisis cualitativo por MALDI-TOF permitió comprobar que la MC-LR ([MH⁺]=995,6), fue la variante predominante; acompañada ocasionalmente con una baja proporción de MC-RR ([MH+]=1038,6) o MC-YR ([MH⁺]=1045,6). De los embalses del Río Negro, se analizaron muestras de las temporadas 2010-2011 (n=46) y 2012-2013 (n=58), provenientes de Bonete, Baygorria y Palmar. En este caso se encontró mayor diversidad que en las muestras del Río de la Plata; nuevamente la MC-LR fue la más abundante, aunque ocasionalmente la variante MC-YR fue mayoritaria. También se confirmó la presencia adicional de MC-RR en una pequeña proporción de las muestras. Ocasionalmente, se presentaron otras variantes muy poco comunes, como la MC-WR de m/z 1068,6; otra variante de m/z 1029,6 que puede corresponder a (MC-M(O)R, MC-FR, MC-RF, [Asp³]MC-HphR o (Dha⁷)MC-HphR, y la variante MC-AnaR o [D-Leu¹]MC-LR de m/z 1037,6. En la **Figura 34** se muestran espectros representativos de la diversidad encontrada en muestras de playas de Montevideo (Río de la Plata) y embalses (Río Negro).



Figura 34. Espectros de masas mediante MALDI-TOF de muestras ambientales; provenientes de playas del Río de la Plata (a, b y c) y embalses del Río Negro (d y e). Se muestran los picos más relevantes, con señales m/z correspondientes a diferentes variantes de MCs ya reportadas. [MH+]=995,6 (MC-LR); [MH+]=1037,6 (MC-AnaR o [D-Leu¹]MC-LR); [MH+]=1058,6 (péptido 1057); [MH+]=1072,6 (MC-KynR); [MH+]= 1029,6 (MC-FR o MC-RF o MC-(O)R o [Asp³]MC-HphR o [Dha⁷]MC-HphR); [MH+]= 1045,6 (MC-YR o MC-RY o [D-Asp³]MC-HtyR); [MH+]= 1068,6 (MC-WR). Kyn: kinurenina. M(O): metionina-S-óxido, Hty: homotirosina, Hph: homofenilalanina.

4.2.2. Detección de variantes hidrofóbicas o apolares, mediante MALDI-TOF

Considerando las múltiples ventajas del MALDI-TOF como método sencillo y rápido para la identificación de variantes, es muy interesante estudiar condiciones que promuevan la ionización de congéneres apolares y lograr así su detección. Para ello, considerando la eficacia de la reacción de las MCs con los grupos tiol, se evaluó el efecto de la modificación química mediante conjugación con tioles cargados. Se estudió la reactividad de las MCs con los siguientes compuestos tiolados: glutatión reducido, cisteína y cisteamina (mercaptoetilamina, MEA) y su efecto en la detección por MALDI-TOF.

Para optimizar las condiciones de reacción, se estudió el efecto de las variables pH, temperatura y tiempo, utilizando como sistema modelo la reacción de MC-LR con MEA (PM=77,1). La cinética de la conjugación se evaluó realizando el seguimiento de la reacción mediante MALDI-TOF. Para alcanzar en pocos minutos conversión prácticamente completa (>99%) de MC-LR en concentración micromolar (como se encuentran en la naturaleza), fue necesario utilizar exceso del tiol (MC-LR:MEA de 1:20000), así como realizar la modificación a pH 9 con buffer Carbonato 10 mM y a 95°C (**Figura 35**).



Figura 35. Cinética de la modificación de MC-LR con mercaptoetilamina (MEA) a 95°C, pH 9. Condiciones óptimas de reacción, a los 5 minutos se observa reacción completa (>99%) con un exceso molar MC-LR:MEA de 1:20000. Volumen reacción 30 μL; MC-LR 5 μM y MEA 0,1 M.

A pesar de que la reactividad de la MC-LR con los diversos tioles estudiados (glutatión reducido, cisteína y MEA) fue muy buena, no fue posible detectar las

MCs hidrofóficas mediante MALDI-TOF utilizando estas modificaciones (glutatión reducido, cisteína y cisteamina), probablemente porque no se logró mejorar significativamente su capacidad de ionización. Dado que el MALDI-TOF es muy adecuado para la detección de MCs con residuos de Arginina, como prueba de concepto, se desarrolló un procedimiento para la síntesis de Arginina tiolada (**Figura 36.a**), para luego proceder a conjugarla a MCs mediante la misma química de reacción tiol-eno (**Figura 36.b**).



Figura 36. Tiolación de Arginina y modificación química de MCs con Arginina tiolada. a. Síntesis Arginina tiolada con SATP y reducción de grupo sulfhidrilo protegido con hidroxiamina. (*) se señala amina primaria. **b.** Modificación de MCs utilizando Arginina tiolada. SATP: N-succinimidil-S-acetilthiopropionato. NHS: N-hidroxisuccinimida. Arg: Arginina. (*) se señala el metileno reactivo frente a la Arg-SH.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción con estándares de MCs hidrofóbicas y Arginina tiolada (10 minutos a 95°C, a pH 9); se logró la detección de estas variantes por MALDI-TOF. En la **Figura 37**, se muestran los espectros de estándares de MC-LY y MC-LW luego de su modificación; la cual implica un incremento de 262 Da en la masa original de la molécula. Si bien se obtuvieron muy buenos resultados derivatizando con Arginina tiolada; este reactivo no es comercial por lo que, para simplificar el procedimiento se buscó un reactivo
alternativo, disponible comercialmente que contiene un grupo guanidino, como la mercaptoetilguanidina (MEG).



Figura 37. Modificación de MCs hidrofóbicas (MC-LY y MC-LW) con Arginina tiolada. **a.** Estándar 100 μg/L MC-LY modificado con Arg-SH [MH⁺]=1264,6. **b.** Estándar 100 μg/L MC-LW modificado con Arg-SH [MH⁺]=1287,6.

Utilizando MEG como reactivo para la modificación, también se llegó a una condición de derivatización óptima a 95°C, 10 minutos, en buffer Carbonato 10 mM, pH 9, con una relación molar MC:MEG de 1:30000. La derivatización con tiolguanidina fue exitosa, y esta metodología rápida y sencilla, permitió la detección de las variantes hidrofóbicas.

En la **Figura 38** se muestra que, solamente luego de la derivatización, fue posible visualizar claramente las señales m/z correspondientes a las variantes apolares modificadas con MEG, con intensidades equivalentes a sus pares polares en una mezcla compleja de congéneres (1000 µg/L cada variante). Como se observa en **Figura 38.a**, en la mezcla de estándares sin derivatizar, aparecen señales m/z de los iones correspondientes a LA (m/z 910,5), LY (m/z 1002,5) y LW (m/z 1025,5), pero con intensidades muy inferiores a las obtenidas con las variantes polares. Esta modificación implica el agregado de una molécula de MEG a las moléculas de MCs y conlleva a la adición de una masa de 119 Da, por lo que la señal obtenida debe ser [MH⁺]+119 Da, donde M corresponde a la masa molecular de la variante de interés sin modificar.

En la **Figura 38**, se puede apreciar que la reacción es prácticamente completa para la MC-LR (m/z 995,5) y sólo queda una muy baja proporción de MC-RR (m/z 1038,5) sin derivatizar. A su vez se verifica que las intensidades de las variantes hidrofóbicas modificadas son muy similares entre sí, por lo que las condiciones de reacción son adecuadas para la derivatización y detección de las mismas con fines cualitativos.



Figura 38. Espectros de masas de estándares de MCs. a. Mezcla de variantes sin derivatizar. b. Mezcla de las mismas variantes derivatizadas con MEG.

MCs LR (m/z 995,5), RR (m/z 1038,5) e YR (m/z 1045,5); LA (m/z 910,5); LF (m/z 986,5), LY (m/z 1002,5) y LW (m/z 1025,5). Variantes modificadas con MEG, LR-MEG (m/z 1114,5), RR-MEG (m/z 1157,5), YR-MEG (m/z 1164,5), LA-MEG (m/z 1029,5), LF-MEG (m/z 1105,5), LY-MEG (m/z 1121,5) y LW-MEG (m/z 1144,5). En todos los casos se utilizó solución estándar 1000 μ g/L de cada variante.

Utilizando esta metodología, se realizó la modificación de 35 muestras de floraciones directas (sin tratar) y extractos obtenidos mediante extracción en fase sólida (columnas C18), donde se obtuvieron buenos resultados en lo que se refiere a la derivatización de todas la MCs polares presentes. Sin embargo, en ninguna de las muestras estudiadas, se detectó presencia de MCs apolares. Por esta razón, mediante colaboración con la Universidad de São Paulo se obtuvo un liofilizado de cultivo de *Microcysti*s sp. cepa LTPNA 08, productora de microcistina polares y apolares, este material permitió la puesta a punto con una muestra positiva. Este cultivo fue analizado por LC-MS/MS en la Universidad de São Paulo, confirmando

la presencia de las variantes polares MC-RR, MC-LR, MC-YR y [D-Asp3]-MC-LR, además de las microcistinas apolares MC-LF y MC-LW. El extracto de la cepa LTPNA 08 se derivatizó utilizando el método desarrollado y fue posible la detección de variantes polares y apolares por MALDI-TOF (**Figura 39**). En la figura se muestra el espectro de masas del extracto antes (**Figura 39.a**) y después de derivatizar (**Figura 39.b**). Como se puede observar, solo es posible detectar la presencia de los congéneres apolares luego de realizar la modificación química con MEG, MCLF-MEG m/z 1105,6 y MCLW-MEG m/z 1144,6, así como también se observan los picos correspondientes a la derivatización de las MCs polares de la muestra.



Figura 39. Extracto-de liofilizado de *Microcystis* **sp. cepa LTPNA 08**, antes de modificación con MEG (a.) donde se observan variantes polares y luego de 10 minutos de reacción (b.) donde se pueden ver los derivados de microcistinas polares y apolares conjugadas a MEG.

4.2.3. Análisis cuantitativo de MCs por MALDI-TOF (qMALDI-TOF)

El MALDI-TOF no es usado habitualmente como método cuantitativo, pero se ha reportado que el agregado de un estándar interno permite disminuir la variabilidad *intra* e *inter spot* posibilitando así la cuantificación mediante esta técnica [315]. Dado que la naturaleza de este compuesto es muy importante y

determina el potencial del MALDI como método cuantitativo; se planteó el desarrollo de estándares internos (IS) derivados de estándares comerciales de MCs, sintetizados mediante un procedimiento sencillo que incorpora modificaciones mínimas y no alteran sustancialmente sus propiedades fisicoquímicas.

4.2.3.1. Síntesis de estándares internos

Utilizando la reacción tiol-eno, se optimizaron las condiciones para la síntesis de un panel de tres estándares internos; IS-1 m/z 1073,7; IS-2 m/z 1116,6 derivados de MC-LR y MC-RR modificadas con β -mercaptoetanol, reportados en el **Artículo III**, e IS-3 m/z 1123,5; correspondiente a la modificación de MC-YR con β mercaptoetanol (**Figura 40**).



Figura 40. Síntesis de estándar interno IS-3 y espectros de MALDI-TOF. a. Espectro correspondiente a estándar de MC-YR. b. Espectro IS-3 sin purificar derivado de MC-YR modificado con β-mercaptoetanol, donde se observa reacción completa del estándar MC-YR.

En la **Tabla 15** se muestra como la incorporación del estándar interno permitió mejorar notoriamente la precisión de las determinaciones; tanto utilizando la

relación de intensidad o el área del pico de MCs e IS, en el rango 25 a 5000 μ g/L, posibilitando la utilización del MALDI-TOF como método cuantitativo.

MC-LR (µg/L)	RSD Intensidad LR	RSD Área LR	RSD Int LR/Int IS	RSD Área LR/Área IS
5000	23	37	16	10
2500	28	32	8	6
1000	59	58	5	5
500	26	27	7	7
250	48	45	23	15
100	21	20	7	5
50	39	33	12	11
25	33	25	15	8

Tabla 15. Variabilidad de intensidades y áreas de los picos entre spots.

RSD: desviación estándar relativa entre *spots* en porcentaje (%). Int: intensidad de los picos obtenidos. IS: IS-2 (derivado de MC-RR). Cada estándar se analizó por triplicado.

Posteriormente a la publicación del **Artículo III**, *Roegner et al, 2014* se realizaron algunas optimizaciones operativas en lo que se refiere a la preparación de muestras y en su co-cristalización con la matriz, que facilitaron su uso de rutina. En este sentido, se agregó el IS directamente en la matriz, manteniendo la relación matriz:IS 10:1 (v/v), preparando volumen suficiente para todas las muestras en conjunto, previo al análisis de cada lote, en vez del agregado a cada muestra. Esto permitió mejorar la repetibilidad *inter-spot*, alcanzándose una mejor precisión en las determinaciones (RSD \leq 15 %) que lo reportado en el artículo (RSD \leq 23%), cuando se utiliza intensidad de pico para la cuantificación. La presencia en las muestras ambientales, de un pico con señal m/z similar al IS-1 derivó en la elección del IS-2 para continuar con el análisis de muestras ambientales.

En la **Figura 41**, se muestran las curvas de calibración obtenidas para las tres variantes más comunes (MC-LR, MC-RR y MC-YR) luego de las optimizaciones incorporadas, en el rango 0-1000 μ g/L, utilizando 80 μ g/L de IS-2 y 30% intensidad de láser.



Figura 41. Curvas de calibración utilizando estándar interno IS-2 (80µg/L). Rango de concentraciones utilizado 0-1000 µg/L en todos los casos. **a.** Curva de calibración para MC-LR. **b.** Curva de calibración para MC-RR. **c.** Curva de calibración. para MC-YR.

Como se observa en la **Figura 41**, el método presenta excelente linealidad en el rango estudiado como se ve reflejado en los coeficientes de correlación (R^2) > 0,99, con ordenada en el origen igual a cero. Una vez optimizado el protocolo experimental la reproducibilidad de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas fue excelente, presentando una desviación estándar relativa, variando el operador y en tres días < 17%.

Se destaca a su vez, que se alcanzaron límites de detección y cuantificación (LOQ \leq 6,5 µg/L para LR, YR y RR (**Tabla 16**); que permiten la cuantificación directa (sin etapas de pre-concentración) de muestras ambientales para uso recreativo por encima del valor guía de la OMS para el nivel de riesgo moderado (20 µg/L).

Estándar Interno	Variante	Parámetro	RSD	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
IS-1	MC-LR	Intensidad	6,7	2,8	4,5
		Área	8,6	2,6	4,3
	MC-RR	Intensidad	10,3	1,6	2,6
		Área	8,5	0,87	3,6
	MC-YR	Intensidad	4,3	4,5	6,2
		Área	6,2	3,9	4,2
IS-2	MC-LR	Intensidad	18,5	2,8	6,5
		Área	25,3	1,8	4,4
	MC-RR	Intensidad	6,2	1,4	4,6
		Área	3,1	2,3	4,3
	MC-YR	Intensidad	7,7	4,5	6,4
		Área	9,8	3,6	4,5

Tabla 16. Límites de detección y de cuantificación para MC-LR, RR e YR usando relaciones de intensidades y áreas de picos con IS-1 e IS-2.

RSD: desviación estándar relativa en porcentaje para solución de 100 μ g/L MC-LR. LOD: Limite de detección; LOQ: Limite de cuantificación; calculados utilizando solución estándar de 5 μ g/L para MC-LR y MC-RR y 10 μ g/L para MC-YR.

Se evaluó la veracidad del método, mediante estudios de recuperación en muestras adicionadas, conteniendo concentraciones en un amplio rango, con variada composición de congéneres. Los valores de recuperación en todos los casos, cuando se utilizó relación de intensidades entre MCs e IS-2, se encontraron entre 80 y 120% para una adición de 100 μ g/L de cada una de las variantes estudiadas (**Tabla 17**).

	МС	-LR	МС	-RR	MC-YR		
Muestra	Concentración Inicial μg/L	Recuperación %	Concentración Inicial μg/L	Recuperación %	Concentración Inicial μg/L	Recuperación %	
wbA 1	307	116	234	119	439	107	
wbA 2	157	93,9	41,6	87,7	55,7	80,2	
wbB 1	235	94,5	198	80,0	347	97	
wbB 3	76,3	84,5	<loq< th=""><th>82,1</th><th>45,0</th><th>109</th></loq<>	82,1	45,0	109	
wbB 4	12000	84,4	1470	99,8	1240	79,0	
wbB 5	35,3	84,2	ND	86,2	ND	108	
wbC 1	49,5	81,1	<loq< th=""><th>90,3</th><th><loq< th=""><th>108</th></loq<></th></loq<>	90,3	<loq< th=""><th>108</th></loq<>	108	
wbC 2	417	80,4	53,5	93,5	95,8	94	
wbC I	27,4	86,2	ND	89,9	ND	110	

Tabla 17. Recuperaciones en muestras ambientales proveniente de embalses, utilizando IS-2.

Todas las muestras se adicionaron con 100 μg/L de cada variante a excepción de la muestra wbB 4 que se adicionó con 1000 μg/L. Valores de recuperación calculados utilizando relación de intensidades (Intensidad MC/Intensidad IS-2). ND: no detectable.

4.2.3.2. Comparación del método qMALDI-TOF desarrollado con LC-MS/MS

Se analizaron por ambos métodos, 29 muestras ambientales de floraciones, provenientes de embalses del Río Negro y del Río de la Plata. En la **Tabla 18**, se reportan los resultados individuales para cada variante analizada por ambos métodos, y los coeficientes de correlación de Pearson para cada caso. Estos coeficientes indican muy buena correlación para MC-LR y MC-RR (r Pearson = 0,978 y 0,928 respectivamente) y para MC-YR se observó un coeficiente de correlación menor (r Pearson=0,874).

Muestra	qMALDI-TOF (μg/L)				LC-MS/MS (µg/L)			
N⁰	LR	RR	YR	-	LR	RR	YR	
1*	1,19	<loq< th=""><th><loq< th=""><th>-</th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<></th></loq<>	<loq< th=""><th>-</th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>	-	5	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
2*	7,54	<loq< th=""><th><loq< th=""><th></th><th>11</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<></th></loq<>	<loq< th=""><th></th><th>11</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>		11	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
3*	1,32	1,62	<loq< th=""><th></th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>		5	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
4*	1,9	<loq< th=""><th><loq< th=""><th></th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<></th></loq<>	<loq< th=""><th></th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>		5	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
5*	3	<loq< th=""><th><loq< th=""><th></th><th>7</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<></th></loq<>	<loq< th=""><th></th><th>7</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>		7	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
6	708	<loq< th=""><th><loq< th=""><th></th><th>577</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<></th></loq<>	<loq< th=""><th></th><th>577</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>		577	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
7*	0,75	<loq< th=""><th><loq< th=""><th></th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<></th></loq<>	<loq< th=""><th></th><th>5</th><th><loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<></th></loq<>		5	<loq< th=""><th><loq< th=""></loq<></th></loq<>	<loq< th=""></loq<>	
8	134	56	13		121	19	32	
9	1660	1230	412		1988	1242	625	
10	4733	1056	215		3717	772	372	
11*	2	3,3	10,2		10	1	<loq< th=""></loq<>	
12*	30,1	3,1	1,4		45	3	4	
13*	18,6	5,5	2,3		18	4	5	
14	2507	1104	325		1790	467	409	
15	946	166	96		477	71	57	
16	1536	92	168		1042	<loq< th=""><th>340</th></loq<>	340	
17	139,7	13	26		107	<loq< th=""><th>39</th></loq<>	39	
18	9108	846	301		10132	1013	767	
19	297	86	42		285	74	55	
20	5733	198	247		7351	199	511	
21	4300	366	430		2419	134	451	
22	12363	324	468		15835	250	640	
23	6797	138	132		7865	<loq< th=""><th>598</th></loq<>	598	
24	11447	476	257		9974	251	634	
25	10573	1468	599		12055	1027	653	
26	2136	334	133		3275	377	384	
27	2692	139	123		2277	<loq< th=""><th>333</th></loq<>	333	
28	281	366	35,4		293	466	57	
29	146	126	32	_	85	51	36	
r								

Tabla 18. Comparación entre qMALDI-TOF y el método de referencia LC-MS/MS, en muestras ambientales.

Pearson 0,978 0,928 0,874

r Pearson: coeficiente de correlación de Pearson. LOQ: Límite de cuantificación. *Muestras pre-concentradas.

Los resultados de ambos métodos muestran la amplia predominancia de la variante MC-LR, la más frecuente a nivel mundial y conocida por ser uno de los congéneres de mayor toxicidad; además de ser la única para la cual la OMS ha propuesto valores guía para aguas potables. Se destaca a su vez que en algunas muestras la presencia de las otras variantes estudiadas (RR e YR) es relevante y contribuye significativamente a la toxicidad asociada a la muestra (**Figura 36**).



Figura 42. Distribución porcentual de las diferentes variantes en las muestras estudiadas por qMALDI-TOF. Las muestras fueron ordenadas según el contenido de MC-LR en orden decreciente.

Para completar la comparación se calculó el índice de Similaridad [320], entre ambos métodos para cada variante y en diferentes rangos: 0 a 20 µg/L (límite del valor guía de la OMS para uso recreativo con un nivel de riesgo moderado); 21 a 200 µg/L (hasta 10 veces el valor guía); 201 a 1000 µg/L (hasta 50 veces el valor guía) y 1001 a 5000 µg/L (mayor a 50 veces el valor guía para uso recreativo). Como se reporta en la **Tabla 19**, el índice de *Similaridad* para LR es de 100% en todos los rangos; para las demás variantes (RR e YR), los valores del índice están entre 86,7 y 100% para los primeros dos rangos (0-200 µg/L) y superior al 83% por encima de 200 µg/L. Estos resultados se consideran muy satisfactorios en general y en particular para los rangos de mayor relevancia desde el punto de vista ambiental y de salud pública (muestras de hasta 200 µg/L, diez veces el valor guía para aguas recreacionales).

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

Tabla 19. Í	ndices de l	Similaridad	(IS)) entre d	MALD	I-TOF	v LC MS	/MS.
			/					-

Índice de similaridad = (nab /2) × (1/na + 1/nb). nab: N° de muestras clasificadas igualmente por ambos métodos, dentro del rango indicado. na: N° de muestras clasificadas por qMALDI-TOF. nb: N° de muestras clasificadas por LC-MS/MS.

Se aplicaron también otros métodos estadísticos, para la evaluación de la concordancia entre ambos métodos (Bland-Altman; Coeficiente de concordancia, CC). En los gráficos de Bland-Altman se representan las diferencias entre las mediciones frente a la media de los valores. Dicho gráfico permite visualizar si la discordancia depende del rango de los datos (**Figura 43**).



Figura 43. Gráficos de Bland-Altman para LR, RR e YR respectivamente (qMALDI-TOF vs LC-MS/MS). Coeficiente de Concordancia (CC) para LR = 0,97 (IC95%= 0,943 – 0,984); CC para RR = 0,90 (IC95%= 0,808 – 0,947) y CC para YR=0,72 (IC95%= 0,558 – 0,825). IC: intervalo de confianza.

En cuanto a los coeficientes de concordancia, en el caso de MC-LR los métodos muestran excelente concordancia en todos los rangos (CC= 0,97). Para las otras variantes estudiadas, MC-RR (CC= 0,90) y MC-YR (CC= 0,72), estos coeficientes se pueden considerar buenos (CC > 0,70). Debe puntualizarse que, para estas últimas variantes, se encontraron diferencias por fuera de los límites de confianza del 95% en las muestras más concentradas (> 500 μ g/L para RR y > 300 μ g/L para YR); valores que están muy por encima de los valores guía para uso recreativo. Dado que las mayores diferencias se dieron a altas concentraciones, estas podrían deberse al efecto matriz ya que, la cuantificación por MALDI-TOF es una medida directa de la muestra sin un método separativo previo como es el caso del LC-MS/MS.

4.2.4. Método de alta sensibilidad para la determinación de microcistinas en aguas y sueros, mediante MALDI-TOF

Los niveles de detección alcanzados en el método cuantitativo de MALDI-TOF, no son suficientemente bajos para cuantificar MCs en muestras de agua potable (valor máximo permitido 1 µg/L para MC-LR) o en matrices biológicas complejas donde es necesario detectar concentraciones notoriamente menores. La estrategia utilizada para mejorar la sensibilidad del método consistió en inmunoconcentrar las MCs utilizando el nanobody A2.3 biotinilado (reportado en el Capítulo III) inmovilizado en en partículas magnéticas (MB) recubiertas con estreptavidina y su posterior análisis por MALDI-TOF. Incluyendo un estándar interno en las MB es posible además cuantificar las MCs capturadas. Esta pre-concentración de unas 50 veces permite la cuantificación directa de la toxina por MALDI-TOF, lo que, además le confiere una alta especificidad al método por el doble reconocimiento que implica la inmunopurificación de la toxina mediada por el anticuerpo, y la posterior detección de la señal m/z característica de cada variante (**Figura 44**).

De acuerdo con la capacidad de unión a la biotina informada por el fabricante, las MB podrían unir hasta 3,5 nmoles de VHH biotinilado por miligramo, lo que corresponde a una capacidad de unión de MC-LR de 3,5 μ g/mg, que es muy elevada considerando que la aplicación se propone para analizar muestras de muy baja concentración.



Figura 44. Representación esquemática del análisis de MCs por inmunocentración utilizando partículas magnéticas con VHH inmovilizado, y cuantificación mediante MALDI-TOF (Nb-QMS). Las partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina pre-cargadas con VHH biotinilado (A2.3) y estándar interno, son usadas para capturar MCs presentes en la muestra. Luego de la concentración en campo magnético y etapas de lavado, las partículas se mezclan con matriz y se analizan directamente por MALDI-TOF.

Para el análisis, luego de la captura y lavados, las MBs se resuspenden en la matriz y se siembran directamente sobre la placa de MALDI-TOF. Interesantemente, la presencia de las MBs promueve una cristalización más uniforme y consecuentemente una distribución más homogénea de toxina. Esto se observó al estudiar la influencia de las MB en la señal obtenida con una solución estándar de MC-LR (Figura 45). Si bien hubo una pequeña disminución en la intensidad de la señal en presencia de las MB, se constató una cristalización más uniforme de la matriz y la MC-LR en la superficie de la placa, que se reflejó en una disminución de la variabilidad de los valores de intensidad obtenidos. Esto es de gran relevancia para el análisis cuantitativo de la toxina, porque independiza la señal obtenida de las regiones del spot interrogadas con el láser.



Figura 45. Efecto de la presencia de MB en la cristalización y la intensidad del pico correspondiente a MC-LR (m/z 995,5). En la parte superior A: ausencia de MB y B: presencia de MB. Se depositaron 2 µl de mezcla de volúmenes iguales de estándar de MC-LR (0,5 µg/L en TA) y matriz α -CHCA (20 mg/mL) en ausencia y presencia de MB comerciales (25 µg/L); y se adquirieron los espectros en 8 zonas diferentes de cada *spot* (250 disparos/zona) acumulando 2000 *disparos*. Se representan los datos con diagrama de cajas de 5 *spots* para cada condición.

Para explorar el potencial de concentración del método, se incubó 1 mL de PBS-BSA 1%, conteniendo diferentes concentraciones de MC-LR, con 5 µL de MB (50 µg), precargados con VHH A2.3 (sin el agregado de IS). Las partículas lavadas se resuspendieron en 20 µl de matriz (α -CHCA, 10 mg/mL) y se analizaron directamente por MALDI-TOF. Estas condiciones, que representan una preconcentración de 50 veces, posibilitaron la detección de hasta 12,5 ng de MC-LR por litro (S/N del ión [MH+] 995,6 = 3,0 ± 0,2) (**Figura 46**). De esta forma se logra alcanzar niveles de detección muy superiores a los necesarios para la determinación de MCs en agua potable y con gran potencial para su cuantificación en suero y otras matrices, donde la toxina se encuentra en muy bajas concentraciones (usualmente menores a 0,1 µg/L).



Figura 40. Espectros obtenidos utilizando estándares de MC-LR inmuno-concentrados en MB con VHH inmovilizado y analizados directamente sobre la placa de MALDI. Las soluciones estándar se inmuno-concentraron 50 veces y previo al análisis se resuspendieron en matriz α -CHCA. Cada concentración se analizó por triplicado.

Como se mencionó anteriormente, la adición de un estándar interno (IS), que tiene características fisicoquímicas y de masa similares al analito de interés, permite corregir algunas de las irregularidades intrínsecas a la preparación de muestras para el análisis y la generación de iones. De los tres estándares internos disponibles, en este desarrollo se optó por utilizar el IS-3 ([MH⁺]= 1123,6 Da), debido a que la MC-YR es uno de los congéneres disponibles con mayor masa y, por lo tanto, este IS se alejará del rango m/z de la mayoría de las MCs.

Como se esperaba, debido a que el VHH A2.3 se aisló de una llama inmunizada con MC-LR conjugada a la ovoalbúmina tiolada utilizando la misma química de conjugación, el anticuerpo mostró fuerte reactividad con el IS y fue incorporado en las MBs. La cantidad de IS que se adicionó a las MBs con VHH inmovilizado, se optimizó para proporcionar una intensidad de iones similar a la de una solución de 0,25 µg/L de MC-LR (**Figura 47**). En estas condiciones, solo se consume una fracción muy pequeña (0,14%) de la capacidad de captura total de las MB con VHH. La captura del IS-3 en las partículas con VHH inmovilizado, permitió así la generación de un reactivo listo para usar.



Figura 47. Espectro obtenido de solución estándar MC-LR 0,25 μg/L (m/z 995,5) e IS-3 (m/z 1123,5) pre-cargado a las MB (0,25 ng de IS por cada 5 μL de MB). La cantidad de IS-3 utilizada se optimizó para obtener una intensidad equivalente.

Con este método se utiliza una pequeña cantidad de MBs (5 μ L) para unir las MCs presentes en un volumen significativamente mayor de muestra. Si bien esto permite alcanzar un factor de concentración de 50 veces (1 mL de muestra inicial a 20 μ L finales de MB en matriz), podría ser desfavorable para una captura rápida y cuantitativa de las toxinas. Para estudiar este aspecto, se evaluó la cinética de captura del analito. En la **Figura 48**, se observa que la intensidad relativa de los iones correspondientes a la MC-LR y el IS-3 capturados a diferentes tiempos, observándose que se alcanzó su máximo después de 4,5 minutos de captura; incluso después de 1,5 minutos la mayoría de la MC-LR ya estaba unida a las MB. Sobre esta base, se adoptó un tiempo de 10 minutos para la incubación de estándares y muestras con las MB.



Figura 48. Cinética de captura de MC-LR con MB precargadas con VHH e IS-3. Se incubaron las MB precargadas durante diferentes tiempos con estándar MC-LR 0,1 μ g/L y se determinó la relación de intensidades del ion [MH+]=995,5 (MC-LR) y el ion correspondiente al IS-3 [MH+]=1123,5; cada condición se analizó por triplicado.

Luego de la optimización del método, que se denominó Nb-QMS se procedió a la realización de curvas de calibración. En la **Figura 49**, se muestran las curvas obtenidas en el rango 0-0,1 μ g/L y 0-5 μ g/L de MC-LR. En el rango bajo de concentraciones, se utilizó un ajuste polinómico de segundo orden, mientras que una regresión lineal fue satisfactoria a concentraciones más altas. El límite de detección (LOD), definido como el promedio de intensidades obtenidas en el cero, correspondientes al ruido (n = 16) más 3 desviaciones estándar, fue de 0,0125 μ g/L.



Figura 49. Curvas de calibración obtenidas para MC-LR. a. Curva en el rango 0-0,1 µg/L con ajuste polinómico de segundo grado. **b.** Curva en el rango 0-5 µg/L con ajuste lineal. Cada estándar fue analizado por triplicado.

4.2.4.1. Veracidad y precisión del método

La veracidad del método en aguas potables y muestras ambientales provenientes de los embalses del Río Negro, se evaluó mediante estudios de recuperación. Se utilizaron muestras previamente analizadas por ELISA, no detectables o con concentraciones inferiores a 0,2 μ g/L; adicionadas con MC-LR a tres niveles (0,025; 0,05 y 0,1 μ g/L). En la **Tabla 20**, se muestran los resultados obtenidos, donde se observan excelentes recuperaciones, inclusive en la concentración más baja estudiada. Esto indica que el límite de cuantificación del método (LOQ), en este tipo de matriz es de 0,025 μ g/L, en función del criterio de guías de validación como por ejemplo la guía europea SANTE/11813/2017 que establece que el LOQ corresponde a la mínima concentración de analito adicionada que presenta recuperaciones entre 70-120% con RSD de *repetibilidad* menor o igual a 20% [321]. Asimismo, las recuperaciones observadas, cumplen muy satisfactoriamente con los requisitos de veracidad (70-130%) y precisión (< 30%) establecidos por la Norma EPA 544 para la determinación de MCs en aguas mediante LC-MS/MS [288].

	Conc. Inicial	Adición 0,02	5 µg/L	Adición 0,050 μg/L		Adición 0,10 μg/L	
	MC-LR µg/L	MC-LR (µg/L)	% Recup.	MC-LR (µg/L)	% Recup.	MC-LR (µg/L)	% Recup.
T1	<lod< td=""><td>nd</td><td>nd</td><td>0,056 ± 0,003</td><td>112</td><td>0,118 ± 0,010</td><td>118</td></lod<>	nd	nd	0,056 ± 0,003	112	0,118 ± 0,010	118
T2	<lod< td=""><td>0,025 ± 0,003</td><td>99</td><td>0,038 ± 0,003</td><td>76</td><td>0,067 ± 0,001</td><td>67</td></lod<>	0,025 ± 0,003	99	0,038 ± 0,003	76	0,067 ± 0,001	67
Т3	<lod< td=""><td>0,029 ± 0,002</td><td>117</td><td>0,047 ± 0,007</td><td>94</td><td>0,103 ± 0,006</td><td>103</td></lod<>	0,029 ± 0,002	117	0,047 ± 0,007	94	0,103 ± 0,006	103
T4	<lod< td=""><td>0,028 ± 0,003</td><td>112</td><td>0,059 ± 0,004</td><td>118</td><td>0,090 ± 0,005</td><td>90</td></lod<>	0,028 ± 0,003	112	0,059 ± 0,004	118	0,090 ± 0,005	90
T5	<lod< td=""><td>0,024 ± 0,002</td><td>94</td><td>0,048 ± 0,003</td><td>96</td><td>0,083 ± 0,004</td><td>83</td></lod<>	0,024 ± 0,002	94	0,048 ± 0,003	96	0,083 ± 0,004	83
F1	<lod< td=""><td>0,029 ± 0,003</td><td>116</td><td>0,044 ± 0,003</td><td>89</td><td>0,073 ± 0,011</td><td>73</td></lod<>	0,029 ± 0,003	116	0,044 ± 0,003	89	0,073 ± 0,011	73
F2	<lod< td=""><td>0,028 ± 0,003</td><td>113</td><td>0,056 ± 0,004</td><td>112</td><td>0,122 ± 0,011</td><td>122</td></lod<>	0,028 ± 0,003	113	0,056 ± 0,004	112	0,122 ± 0,011	122
F3	<lod< td=""><td>0,025 ± 0,002</td><td>100</td><td>0,038 ± 0,001</td><td>76</td><td>0,069 ± 0,001</td><td>69</td></lod<>	0,025 ± 0,002	100	0,038 ± 0,001	76	0,069 ± 0,001	69
F4	<lod< td=""><td>0,026 ± 0,005</td><td>102</td><td>0,036 ± 0,003</td><td>72</td><td>0,076 ± 0,005</td><td>76</td></lod<>	0,026 ± 0,005	102	0,036 ± 0,003	72	0,076 ± 0,005	76
F5	<lod< td=""><td>0,026 ± 0,005</td><td>103</td><td>$0,048 \pm 0,004$</td><td>97</td><td>0,097 ± 0,001</td><td>97</td></lod<>	0,026 ± 0,005	103	$0,048 \pm 0,004$	97	0,097 ± 0,001	97
F6	<lod< td=""><td>0,028 ± 0,002</td><td>111</td><td>0,051 ± 0,003</td><td>102</td><td>0,079 ± 0,004</td><td>79</td></lod<>	0,028 ± 0,002	111	0,051 ± 0,003	102	0,079 ± 0,004	79
F7	0,043 ± 0,007	0,073 ± 0,004	123	0,094 ± 0,003	103	0,124 ± 0,005	82
F8	0,050 ± 0,009	0,080 ± 0,006	120	0,100 ± 0,006	100	0,131 ± 0,007	82
F9	0,055 ± 0,001	0,086 ± 0,003	91	0,113 ± 0,006	116	0,149 ± 0,004	98
F10	0,093 ± 0,006	$0,113 \pm 0,004$	81	0,139 ± 0,002	92	nd	nd
F11	0,102 ± 0,007	0,124 ± 0,002	91	0,156 ± 0,004	108	$0,184 \pm 0,004$	82
F12	0,184 ± 0,004	nd	nd	0,237 ± 0,004	107	0,294 ± 0,011	110

Tabla 20. Recuperaciones en muestras de agua potable y ambientales adicionadas a tres niveles.

LOD: Limite de detección. Todas las muestras se analizaron por triplicado. nd: no determinado.

% Recup.: Porcentaje de recuperación. T: muestras potables. F: muestras ambientales.

La precisión del método se evaluó utilizando una muestra blanco de agua adicionada con 0,025 y 0,050 µg/L de MC-LR. La muestra se analizó por quintuplicado (5 réplicas independientes) en el mismo día (precisión *intra-ensayo*) para evaluar *repetibilidad*; y cinco réplicas en cinco días diferentes (precisión *inter-ensayo*). La desviación estándar relativa (RSD) en ambos casos fue inferior al 10%, demostrando ser un método altamente preciso según los criterios los mencionados anteriormente SANTE/11813/2017 [321] (**Tabla 21**).

Adiciones (µg/L)	0,025	0,050
Intra-ensayo		
Replicas	5	5
Promedio (µg/L)	0,025	0,049
RSD	1,6	3,6
Inter-ensayo		
Días	5	5
Promedio (µg/L)	0,025	0,049
RSD	7,7	8,0

Tabla 21. Precisión intra e inter-ensayo del método Nb-QMS.

RSD: Desviación estándar relativa en porcentaje. Cada replica se analizó en 5 spots diferentes.

El uso de partículas magnéticas no solo permite concentrar la toxina, sino que también funciona como un paso de purificación. Esta es una característica muy valiosa porque elimina las posibles interferencias provenientes de matrices complejas, durante el análisis. Para estudiar la selectividad de este método, se evaluó la recuperación en muestras de sueros adicionadas con diferentes concentraciones de MC-LR donde se obtuvieron excelentes recuperaciones en sueros de diferentes especies (**Tabla 22**).

	Conc. Inicial	Adición 0,0	25 µg/L	Adición 0,050	Adición 0,10 µg/L		
Muestra	MC µg/L	MC µg/L	% Recup.	MC µg/L	% Recup.	MC µg/L	% Recup.
Humano 1	<lod< td=""><td>0,027±0,002</td><td>109</td><td>0,047±0,003</td><td>93</td><td>0,092±0,004</td><td>92</td></lod<>	0,027±0,002	109	0,047±0,003	93	0,092±0,004	92
Humano 2	<lod< td=""><td>0,027±0,001</td><td>108</td><td>0,057±0,004</td><td>114</td><td>0,105±0,005</td><td>105</td></lod<>	0,027±0,001	108	0,057±0,004	114	0,105±0,005	105
Bovino 1	<lod< td=""><td>0,030±0,007</td><td>120</td><td>0,043±0,002</td><td>86</td><td>0,103±0,004</td><td>103</td></lod<>	0,030±0,007	120	0,043±0,002	86	0,103±0,004	103
Bovino 2	<lod< td=""><td>0,027±0,002</td><td>107</td><td>0,051±0,003</td><td>103</td><td>0,097±0,003</td><td>97</td></lod<>	0,027±0,002	107	0,051±0,003	103	0,097±0,003	97
Bovino 3	<lod< td=""><td>0,029±0,002</td><td>115</td><td>0,044±0,003</td><td>88</td><td>0,086±0,014</td><td>86</td></lod<>	0,029±0,002	115	0,044±0,003	88	0,086±0,014	86
Ovino	<lod< td=""><td>0,024±0,002</td><td>94</td><td>0,051±0,002</td><td>102</td><td>0,080±0,003</td><td>80</td></lod<>	0,024±0,002	94	0,051±0,002	102	0,080±0,003	80
Llama 1	<lod< td=""><td>0,021±0,002</td><td>82</td><td>0,045±0,002</td><td>90</td><td>0,083±0,003</td><td>83</td></lod<>	0,021±0,002	82	0,045±0,002	90	0,083±0,003	83
Llama 2	<lod< td=""><td>0,028±0,002</td><td>112</td><td>0,053±0,004</td><td>106</td><td>0,079±0,003</td><td>79</td></lod<>	0,028±0,002	112	0,053±0,004	106	0,079±0,003	79
Llama 3	<lod< td=""><td>0,028±0,002</td><td>113</td><td>0,059±0,002</td><td>117</td><td>0,111±0,003</td><td>111</td></lod<>	0,028±0,002	113	0,059±0,002	117	0,111±0,003	111

Tabla 22. Recuperaciones en diferentes muestras de sueros adicionadas con *MC-LR*.

LOD: Limite de detección. Todas las muestras se analizaron por triplicado. % Recup.: Porcentaje de recuperación.

4.3. Conclusiones

En este Capítulo se desarrollaron varias estrategias para expandir y mejorar la metodología de MALDI-TOF para detección de MCs. El MALDI-TOF es ampliamente aceptado para análisis cualitativo de MCs en muestras directas de floraciones y extractos. Por ello, en primer lugar, se implementó en el laboratorio para identificar las variantes presentes y complementar la información aportada por el ELISA. Debe recordarse que, si bien la gran mayoría de las 248 variantes identificadas son tóxicas, sus niveles de toxicidad varían mucho, por lo que esta información es de alta relevancia. Asimismo, se logró resolver la limitación del MALDI-TOF respecto a la identificación de variantes hidrofóbicas, utilizando una metodología de derivatización muy sencilla, que permite en sólo 10 minutos incrementar la capacidad de ionización de MCs hidrofóbicas y así evitar falsos negativos en el análisis por MALDI-TOF.

Adicionalmente se optimizaron métodos sencillos para la síntesis de estándares internos, que posibilitan la cuantificación de MCs mediante MALDI-TOF sin la necesidad de pre-tratamiento de la muestra. El método permite obtener en pocos minutos datos cuantitativos de las variantes polares más comúnmente encontradas, en concentraciones que posibilitan evaluar el cumplimento de las recomendaciones de la OMS para aguas recreacionales. Esta metodología confirma y complementa la información aportada por el ELISA y es muy valiosa para la rápida toma de decisiones sobre el nivel de riesgo de una floración, por ejemplo, en

una playa o a la entrada de una planta potabilizadora. Estos desarrollos, que utilizan nuevas aplicaciones de la reacción de las MCs con tioles, han permitido amplificar el valor del MALDI-TOF como método general, rápido, sencillo y de bajo costo operativo para el análisis cualitativo y cuantitativo de MCs.

Finalmente, utilizando la ventaja de disponer de un anticuerpo biotinilado se logró desarrollar un método ultrasensible y muy selectivo para determinar MCs en matrices complejas como sueros, utilizando partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con el anticuerpo inmovilizado. La incorporación del IS, permitió la cuantificación directa sin necesidad de pre-tratamiento de las MCs concentradas en las MBs por MALDI-TOF, logrando niveles de cuantificación y selectividad notables, tanto en aguas potables y matrices biológicas.

Conclusiones generales y perspectivas

En los últimos años ha surgido una preocupación creciente sobre la problemática de los *blooms* de cianobacterias tóxicas, tanto en ámbitos científicos como en la sociedad en general. Si bien el monitoreo de las cianobacterias en Uruguay comenzó hace muchos años, en el país no se disponía de metodologías para el análisis de cianotoxinas. Por esa razón, en este trabajo de tesis, se propuso aportar herramientas para facilitar la adquisición de datos confiables sobre la presencia de microcistinas, cianotoxinas de amplia prevalencia en los principales recursos hídricos del país, de manera sencilla y sustentable.

El primer ELISA desarrollado, basado en anticuerpos policionales demostró ser muy adecuado para la detección "global" de los diversos congéneres o variantes de MCs. El ensayo, adaptado a un formato tipo kit, facilitó la implementación de programas de monitoreo sustentables en aguas ambientales (plavas de Montevideo y embalses del río Negro), así como en agua potable (plantas de tratamiento de UTE en el Río Negro). El monitoreo de playas en la costa de Montevideo realizado por la Intendencia de Montevideo, reveló picos extremadamente elevados de concentraciones de toxinas en espumas cianobacterianas y evidenció el escaso valor predictivo de los parámetros usados comúnmente para la evaluación de riesgos. Los resultados sustentaron la implementación un criterio simple y práctico, basado nada más que en la detección visual de Espumas y Colonias dispersas, que puede utilizarse como alerta para la toma de decisiones rápidas en la gestión de playas. Además de su transferencia a varias instituciones, el kit desarrollado se utilizó en cursos de posgrado y capacitaciones de técnicos de agencias reguladoras y proveedores de agua potable en Uruguay, Paraguay, Perú, Guatemala y Argentina.

En una segunda etapa de este trabajo, se avanzó hacia una mayor estandarización en la inmunodetección. Utilizando la tecnología de *Phage display* se implementaron estrategias novedosas de selección y *panning* que posibilitaron montar un ELISA de segunda generación, basado en un anticuerpo monoclonal monodominio de llama (nanobody A2.3). El ensayo tiene muy buena performance en aguas ambientales y potables, y presenta mayor selectividad y capacidad de estandarización que el ensayo policlonal. Estas propiedades a su vez, permiten vislumbrar otras posibles aplicaciones de este anticuerpo tales como la determinación de MCs en muestras biológicas, o el estudio de bioacumulación en tejidos de animales expuestos. Por otro lado, utilizando este nanobody, se desarrolló un ensayo inmunocromatográfico para detección *in situ* de MCs en aguas ambientales y potables, que es rápido, sencillo y robusto. Para su posible transferencia o comercialización se requiere su implementación en cartuchos similares a los *test* de embarazo comerciales. Actualmente se ha comenzado a explorar la adaptación a formatos de flujo lateral no competitivos, de lectura directa, donde la presencia del analito implica la aparición de la señal. Esta estrategia permite, en general, lecturas más sencillas y menores límites de detección. Para ello, se dispone de bibliotecas de péptidos expresados en fagos, a partir de las cuales se buscará seleccionar péptidos que reconozcan específicamente el inmunocomplejo.

Finalmente, se desarrollaron varias estrategias para expandir y mejorar la metodología de MALDI-TOF para detección de variantes MCs, como método general, rápido, sencillo y de bajo costo operativo para el análisis cualitativo y cuantitativo de MCs. En primera instancia se implementó la identificación de las variantes presentes en muestras ambientales, con el fin de complementar la información aportada por ELISA. A su vez, se desarrolló una estrategia de derivatización muy sencilla para la detección de congéneres hidrofóbicos y así evitar falsos negativos en el análisis por MALDI-TOF. Por otra parte, se sintetizó una familia de estándares internos para la cuantificación de MCs mediante MALDI-TOF, sin necesidad de pre-tratamiento. Este método permite en pocos minutos, obtener datos cuantitativos de las variantes polares presentes en aguas Asimismo, combinando el anticuerpo biotinilado (VHH) y la recreacionales. metodología por MALDI-TOF, se logró desarrollar un método ultrasensible y muy selectivo para cuantificar MCs en agua y matrices complejas como sueros, utilizando partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina con el anticuerpo inmovilizado y estándar interno capturado. Actualmente este método se está evaluando para la cuantificación de MCs en extractos de peces expuestos a floraciones cianobacterianas. El desempeño en este tipo de matrices ha sido muy satisfactorio si bien es necesario la comparación de estos resultados con métodos aceptados actualmente para este tipo de análisis.

Referencias

- 1. Carmichael, W.W., *Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins.* J Appl Bacteriol, 1992. **72**(6): p. 445-59.
- Smayda, T.J., *What is a bloom? A commentary* Limnology and Oceanography, 1997.
 42(5, part 2): p. 1132-1136.
- 3. Paerl, H.W. and V.J. Paul, *Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria.* Water Res, 2012. **46**(5): p. 1349-63.
- 4. Wiegand, C. and S. Pflugmacher, *Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review.* Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **203**(3): p. 201-18.
- 5. Karjalainen, M., et al., *Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea.* Ambio, 2007. **36**(2-3): p. 195-202.
- 6. Smith, V.H. and D.W. Schindler, *Eutrophication science: where do we go from here?* Trends Ecol Evol, 2009. **24**(4): p. 201-7.
- 7. Whitton, B.A., *Ecology of Cyanobacteria. II Their Diversity in Space and Time*. 2012: Springer Dordrecht.
- 8. Chorus, I. and J. Bartram, *Toxic cyanobacteria in water: A guide to public health significance, monitoring and managment.* E & FN Spon/Chapman and Hall ed. 1999, London: Published by E & FN Spon, London, on behalf of the World Health Organization, Geneva. 416.
- 9. Codd, G.A., J. Meriluoto, and J.S. Metcalf, *Introduction: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Their Human Impact, and Risk Management,* in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis,* J. Meriluoto, L. Spoof, and G.A. Codd., Editors. 2017, John Wiley & Sons.
- 10. Dolman, A.M., et al., *Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38757.
- 11. Aubriot, L. and S. Bonilla, *Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms.* Aquat Microb Ecol, 2012. **67**: p. 251-263.
- 12. Aubriot, L., S. Bonilla, and G. Falkner, *Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations.* FEMS Microbiol Ecol, 2011. **77**(1): p. 1-16.
- 13. Schmidt, S.K. and L. Vimercati, *Growth of cyanobacterial soil crusts during diurnal freeze-thaw cycles.* J Microbiol, 2019.
- 14. Cires, S., M.C. Casero, and A. Quesada, *Toxicity at the Edge of Life: A Review on Cyanobacterial Toxins from Extreme Environments.* Mar Drugs, 2017. **15**(7).
- 15. Whitton, B.A., *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time.* 2012.
- 16. Bonilla, S., y colectivo de autores. Cianobacterias Planctonicas del Uruguay. Manual para la identificacion y medidas de gestion. Capítulo 11. Embalse de Salto Grande - G. Chalar. Programa Hidrológico Internacional para América Latina y el Caribe (PHI-LAC) Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe UNESCO 2010: Montevideo.
- 17. Bonilla, S., et al., *Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay.* Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay. INNOTEC., 2015. **10**: p. 9-22.
- 18. Brena, B.M., et al., *ITREOH building of regional capacity to monitor recreational water: development of a non-commercial microcystin ELISA and its impact on public health policy.* Int J Occup Environ Health, 2006. **12**(4): p. 377-85.
- 19. Chalar, G., et al., Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse Salto Grande, in El agua en Iberomérica: de la Limnología a la Gestión en Sudamérica-CYTED Aprovechamiento y Gestión de los Recursos Hídricos: 123-142, A. Fernández-Cirelli and G. Chalar, Editors. 2002: Buenos Aires.

- 20. De Leon, L. and J.S. Yunes, *First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium microcystis aeruginosa in the La Plata River, South America.* Environ Toxicol, 2001. **16**(1): p. 110-2.
- Feola, G., B. Brena, J. Risso & D. Sienra Programa de Monitoreo de Agua de Playas y Costa de Montevideo. Informes Técnicos: Playas. Informe temporada estival: 2007-2008/2009-2010 Montevideo, Laboratorio de Calidad Ambiental. Depto de Desarrollo Ambiental. Intendencia Municipal de Montevideo (IMM). <u>http://www.montevideo.gub.uy/institucional/publicaciones/documentos</u>. 2009-2010.
- 22. Ferrari, G. and L. Vidal, Fitoplancton de la zona costera uruguaya: Río de la Plata y océano atlántico. In: R. Menafra, L. Rodríguez-Galllego, F. Scarabino y D. Conde (eds.). Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya. Vida Silvestre Uruguay.p.45-56. 2006.
- 23. Sienra, D. and G. Ferrari, Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo. En: R. Menafra, L. Rodríguez-Galllego, F. Scarabino y D. Conde (eds.). Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay, p. 413-419. 2006.
- 24. Pirez, M., et al., *Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: simple and affordable methods may be the answer.* J Environ Manage, 2013. **114**: p. 63-71.
- 25. van Apeldoorn, M.E., et al., *Toxins of cyanobacteria*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(1): p. 7-60.
- 26. Anderson, D.M., A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff, *Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management.* Ann Rev Mar Sci, 2012. **4**: p. 143-76.
- 27. O'Neil, J.M., et al., *The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change.* Harmful Algae, 2012. **14**: p. 313–334.
- 28. Paerl, H.W., et al., *Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients.* Harmful Algae, 2016. **54**: p. 213-222.
- 29. Paerl, H.W. and J. Huisman, *Climate. Blooms like it hot.* Science, 2008. **320**(5872): p. 57-8.
- 30. Smith, V.H., *Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem.* Environmental Science and Pollution Research, 2003. **10**(2): p. 126–139.
- 31. Bullerjahn, G.S., et al., *Global solutions to regional problems: Collecting global expertise to address the problem of harmful cyanobacterial blooms. A Lake Erie case study.* Harmful Algae, 2016. **54**: p. 223-238.
- 32. Pouria, S., et al., *Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil.* Lancet, 1998. **352**(9121): p. 21-6.
- 33. Qin, B., et al., *A drinking water crisis in Lake Taihu, China: linkage to climatic variability and lake management.* Environ Manage, 2010. **45**(1): p. 105-12.
- 34. Backer, L.C., et al., *Canine cyanotoxin poisonings in the United States (1920s-2012): review of suspected and confirmed cases from three data sources.* Toxins (Basel), 2013. **5**(9): p. 1597-628.
- 35. Davis, T.W., et al., *Mesozooplankton and microzooplankton grazing during cyanobacterial blooms in the western basin of Lake Erie.*. Harmful Algae 2012. **15**: p. 26–35.
- 36. Huisman, J., H.C.P. Matthijs, and P.M. Visser, *Harmful Cyanobacteria, Softcover Reprint of Hardcover. 1st ed. Springer 2005 edition.* 1st ed. 2010.
- 37. Malbrouck, C. and P. Kestemont, *Effects of microcystins on fish.* Environ Toxicol Chem, 2006. **25**(1): p. 72-86.

- 38. Miller, M.A., et al., *Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters.* PLoS One, 2010. **5**(9).
- 39. Tillmanns, A.R., et al., *Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific responses.* Fundam. Appl. Limnol. Arch. Für Hydrobiol., 2008. **171**: p. 285–295.
- 40. Bingham, M., S. Sinha, and F. Lupi, *Economic Benefits of Reducing Harmful Algal Blooms in Lake Erie. (Report).* 2015, Environmental Consulting & Technology, Inc.
- 41. Dodds, W.K., et al., *Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages.* Environ Sci Technol, 2009. **43**(1): p. 12-9.
- 42. Leflaive, J. and L. Ten-Hage, Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. Freshwater Biology, 2007. **52**: p. 199-214.
- 43. Meriluoto, J., et al., *Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in European waters recent progress achieved through the CYANOCOST Action and challenges for further research.* Advances in Oceanography and Limnology 2017. **8**(1).
- 44. Holland, A. and S. Kinnear, *Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide?* Mar Drugs, 2013. **11**(7): p. 2239-58.
- 45. Kaplan, A., et al., *The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins).* Front Microbiol, 2012. **3**: p. 138.
- 46. Codd, G.A., J. Meriluoto, and J.S. Metcalf, *Introduction: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Their Human Impact, and Risk Management.*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.*, J. Meriluoto, L. Spoof, and G.A. Codd, Editors. 2017.
- 47. EPA, *Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems.* U.S. Environmental Protection Agency Office of Water., 2014.
- 48. Dyble, J., et al., *Microcystin concentrations and genetic diversity of Microcystis in the lower Great Lakes.* Environ Toxicol, 2008. **23**(4): p. 507-16.
- 49. Janse, I., et al., *Toxic and nontoxic microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity.* Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(7): p. 3979-87.
- 50. Kurmayer, R. and T. Kutzenberger, *Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium Microcystis sp.* Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6723-30.
- 51. Bittencourt-Oliveira, M.C., M.C. Oliveira, and E. Pinto, *Diversity of microcystinproducing genotypes in Brazilian strains of Microcystis (Cyanobacteria).* Braz J Biol, 2011. **71**(1): p. 209-16.
- 52. Bittencourt-Oliveira, M.D., *Detection of potential microcystinproducing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker.* Harmful Algae 2, 2003. **1**: p. 51-60.
- 53. Alonso-Andicoberry, C., et al., *Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria.* Vet Rec, 2002. **151**(23): p. 706-7.
- 54. Stewart, I., A.A. Seawright, and G.R. Shaw, *Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds--an overview.* Adv Exp Med Biol, 2008. **619**: p. 613-37.
- 55. Thomas, A.D., et al., *Cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii as a probable cause of death in cattle in northern Queensland.* Aust Vet J, 1998. **76**(9): p. 592-4.
- 56. Azevedo, S.M., et al., *Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil.* Toxicology, 2002. **181-182**: p. 441-6.
- 57. Yuan, M., W.W. Carmichael, and E.D. Hilborn, *Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996.* Toxicon, 2006. **48**(6): p. 627-40.

- 58. Jochimsen, E.M., et al., *Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil.* N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 873-8.
- 59. Bernard, C., et al., *Novel toxic effects associated with a tropical Limnothrix/Geitlerinema-like cyanobacterium.* Environ Toxicol, 2011. **26**(3): p. 260-70.
- 60. Novakova, K., et al., *Novel metabolites in cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii with potencies to inhibit gap junctional intercellular communication.* J Hazard Mater, 2013. **262**: p. 571-9.
- 61. Brena, B. and S. Bonilla, *Capítulo 4. Producción de toxinas y otros metabolitos.* Bonilla, S., 2009 y colectivo de autores., in Cianobacterias Planctonicas del Uruguay. Manual para la identificacion y medidas de gestion. Programa Hidrológico Internacional para América Latina y el Caribe (PHI-LAC). Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe UNESCO., S. Bonilla, Editor. 2009: Montevideo, Uruguay.
- 62. Dorr, F.A., et al., *Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays.* Toxicon, 2010. **56**(7): p. 1247-56.
- 63. da Silva, R.R., O.R. Pires, and C.K. Grisolia, *Genotoxicity in Oreochromis niloticus* (*Cichlidae*) induced by Microcystis spp bloom extract containing microcystins. Toxicon, 2011. **58**(3): p. 259-64.
- 64. Dias, E., et al., *Genotoxicity of microcystin-LR in in vitro and in vivo experimental models.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 949521.
- 65. He, L., et al., *Chronic Microcystin-LR Exposure Induces Hepatocarcinogenesis via Increased Gankyrin in Vitro and in Vivo.* Cell Physiol Biochem, 2018. **49**(4): p. 1420-1430.
- 66. Xu, L., et al., *Alterations in microRNA expression linked to microcystin-LR-induced tumorigenicity in human WRL-68 Cells.* Mutat Res, 2012. **743**(1-2): p. 75-82.
- 67. Ohtani, I., R.E. Moore, and M.T.C. Runnergar, *Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxic from the blue-green algae Cylindrospermopsis raciborskii.* J. Am. Chem. Soc., 1992: p. 114:7941.
- 68. Antunes, J.T., P.N. Leao, and V.M. Vasconcelos, *Cylindrospermopsis raciborskii: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species.* Front Microbiol, 2015. **6**: p. 473.
- 69. Wendy Guiry in Guiry, M.D. and G.M. Guiry, *AlgaeBase. World-wide electronic publication*, <u>http://www.algaebase.org</u>. National University of Ireland, Galway. 2019.
- 70. Harada, K.I., et al., *Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium Umezakia natans and its screening method.* Toxicon, 1994. **32**(1): p. 73-84.
- 71. Wood, S.A.a.D.J.S.N.Z., *First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in New Zealand.* Journal of Marine and Freshwater Research., 2003. **37**: p. 821-828.
- 72. Meriluoto, J., L. Spoof, and G.A. Codd., *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.* 1st ed. 2017.
- 73. Moraes, A.C.N. and V.F. Magalhaes, *Renal tubular damage caused by cylindrospermopsin (cyanotoxin) in mice.* Toxicol Lett, 2018. **286**: p. 89-95.
- 74. Liebel, S., et al., Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). Toxicol In Vitro, 2015. **29**(3): p. 479-88.
- 75. Falconer, I.R. and A.R. Humpage, *Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin.* Environ Toxicol, 2001. **16**(2): p. 192-5.

- 76. Humpage, A.R., et al., *Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin.* Mutat Res, 2000. **472**(1-2): p. 155-61.
- 77. Spoof, L. and A. Catherine, *Appendix 3. Tables of Microcystins and Nodularins.*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.* 2017.
- 78. Cadel-Six, S., et al., *Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France.* Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(23): p. 7605-14.
- Heath, M.W., S.A. Wood, and K.G. Ryan, *Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand*. FEMS Microbiol Ecol, 2010.
 73(1): p. 95-109.
- 80. Wood, S.A., et al., *First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand.* Toxicon, 2007. **50**(2): p. 292-301.
- 81. Devlin, J.P., et al., *Anatoxin-a, a toxic alkaloid from Anabaena flos-aquae NRC-44h.* Can. J. Chem., 1977. **55**: p. 1367-1371.
- 82. Carmichael, W.W., D.F. Biggs, and M.A. Peterson, *Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte Anabaena flos-aquae NRC-44-1.* Toxicon, 1979. **17**(3): p. 229-36.
- 83. Wiese, M., et al., *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs.* Mar Drugs, 2010. **8**(7): p. 2185-211.
- 84. Fabre, A., et al., South American PSP toxin-producing Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria) decreases clearance rates of cladocerans more than copepods. Hydrobiologia, 2017. **785**(1): p. 61–69.
- 85. Vico, P., et al., *Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in Cylindrospermopsis raciborskii.* Harmful Algae, 2016. **56**: p. 37-43.
- 86. Chaffin, J.D., et al., Interactions between nitrogen form, loading rate, and light intensity on Microcystis and Planktothrix growth and microcystin production. Harmful Algae, 2018. **73**: p. 84-97.
- 87. Harke, M.J., et al., *A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, Microcystis spp.* Harmful Algae, 2016. **54**: p. 4-20.
- 88. Feola, G., et al. *Programa de Monitoreo de Agua de Playas y Costa de Montevideo. Informe Técnico: Playas. Informe temporada estival: 2007-2008 Montevideo, Laboratorio de Calidad Ambiental. Depto de Desarrollo Ambiental. Intendencia Municipal de Montevideo (IMM).* 2008; Available from: <u>http://www.montevideo.gub.uv/institucional/publicaciones/documentos</u>.
- 89. Giannuzzi, L., et al., An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. Mar Drugs, 2011. **9**(11): p. 2164-75.
- 90. Vidal, F., et al., *Recreational Exposure during Algal Bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A Liver Failure Case Report.* Toxins (Basel), 2017. **9**(9).
- 91. Bishop, C.T., E.F. Anet, and P.R. Gorham, *Isolation and identification of the fast-death factor in Microcystis aeruginosa NRC-1.* Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(3): p. 453-71.
- 92. Konst, H., et al., *Symptoms and pathology produced by toxic Microcystis aeruginosa NRC-1 in laboratory and domestic animals.* Can J Comp Med Vet Sci, 1965. **29**(9): p. 221-8.
- 93. Perovich, G., et al., *Causes, Prevention, and Mitigation Workgroup report.* Adv Exp Med Biol, 2008. **619**: p. 185-215.
- 94. Okino, T., Studies on the blooming of Microcystis aeruginosa. II: rapid accumulation of phosphate by Microcystis aeruginosa. J. Fac. Sci. Shinsu Univ., 1974. 8: p. 135–145.

- 95. Reynolds, C.S., et al., On the annual cycle of the blue-green alga Microcystis aeruginosa Kutz. Emend. Elenkin. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci., 1981. **293**(1068): p. 419–477.
- 96. Jacoby, J.M., et al., *Environmental factors associated with a toxic bloom of Microcystis aeruginosa.* . Can. J. Fish. Aquat. Sci., 2000. **57**(1): p. 231–240.
- 97. Preece, E.P., et al., A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. Harmful Algae, 2017. **61**: p. 31–45.
- 98. Robson, B.J. and D.P. Hamilton, *Summer flow event induces a cyanobacterial bloom in a seasonal western Australia estuary.* Mar. Freshw. Res., 2003. **54**: p. 139–151.
- 99. Ross, C., L. Santiago-Vazquez, and V. Paul, *Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa.* Aquat Toxicol, 2006. **78**(1): p. 66-73.
- 100. Tonk, L., et al., *Salt tolerance of the harmful cyanobacterium Microcystis aeruginosa.* Aquat. Microb. Ecol. , 2007. **46**: p. 117–123.
- 101. Orr, P.T., G.J. Jones, and G.B. Douglas, *Response of cultured Microcystis aeruginosa* from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries. Mar. Freshw. Res., 2004. **55**(3): p. 277-283.
- 102. Verspagen, J.M., et al., *Water management strategies against toxic Microcystis blooms in the Dutch delta.* Ecol Appl, 2006. **16**(1): p. 313-27.
- 103. Rantala, A., et al., *Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 568-73.
- 104. Humble, A.V., G.M. Gadd, and G.A. Codd, *Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography.* Water Res, 1997. **31**(7): p. 1679–1686.
- 105. Sevilla, E., et al., Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2476-83.
- 106. Schatz, D., et al., *Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins.* Environ Microbiol, 2007. **9**(4): p. 965-70.
- 107. Gan, N., et al., *The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming Microcystis spp.* Environ Microbiol, 2012. **14**(3): p. 730-42.
- 108. Makower, A.K., et al., *Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in Microcystis aeruginosa PCC 7806.* Appl Environ Microbiol, 2015. **81**(2): p. 544-54.
- 109. Zilliges, Y., et al., *The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of microcystis under oxidative stress conditions.* PLoS One, 2011. 6(3): p. e17615.
- 110. Codd, G.A., L.F. Morrison, and J.S. Metcalf, *Cyanobacterial toxins: risk management for health protection.* Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **203**(3): p. 264-72.
- 111. Miles, C.O., et al., *Identification of microcystins in a Lake Victoria cyanobacterial bloom using LC-MS with thiol derivatization.* Toxicon, 2013. **70**: p. 21-31.
- 112. Welker, M. and H. von Dohren, *Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis.* FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(4): p. 530-63.
- 113. Dawson, R.M., *The toxicology of microcystins*. Toxicon, 1998. **36**(7): p. 953-62.
- 114. Rinehart, K.L., et al., *Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda.* J. Am. Chem. Soc., 1988. **110**(25): p. 8557–8558.
- 115. Tillett, D., et al., *Structural organization of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system.* Chem Biol, 2000. **7**(10): p. 753-64.

- 116. Puddick, J., et al., *High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners.* Mar Drugs, 2014. **12**(11): p. 5372-95.
- 117. Vesterkvist, P.S., et al., *Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 cells.* Toxins (Basel), 2012. **4**(11): p. 1008-23.
- 118. Rinehart, K., et al., *Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria).* J. Appl. Phycol., 1994. **6**(2): p. 159–176.
- 119. Bieczynski, F., et al., *Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout* (Oncorhynchus mykiss) across the intestinal wall: possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. Aquat Toxicol, 2014. **154**: p. 97-106.
- 120. Boaru, D.A., N. Dragos, and K. Schirmer, *Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study.* Toxicology, 2006. **218**(2-3): p. 134-48.
- 121. Eriksson, J.E., et al., *Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin.* Biochim Biophys Acta, 1990. **1025**(1): p. 60-6.
- 122. Fischer, A., et al., *The role of organic anion transporting polypeptides* (*OATPs/SLCOs*) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **245**(1): p. 9-20.
- 123. Lu, H., et al., *Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR.* Toxicol Sci, 2008. **103**(1): p. 35-45.
- 124. Meier-Abt, F., et al., *The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver.* Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **218**(3): p. 274-9.
- 125. Runnegar, M., et al., *In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(1): p. 162-9.
- 126. Beasley, V.R., et al., *Algae intoxication in livestock and waterfowl.* Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1989. **5**(2): p. 345-61.
- 127. Beasley, V.R., et al., *Diagnostic and clinically important aspects of cyanobacterial (blue-green algae) toxicoses.* J Vet Diagn Invest, 1989. **1**(4): p. 359-65.
- 128. Hastie, C.J., et al., *Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(2): p. 187-93.
- 129. MacKintosh, C., et al., *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants.* FEBS Lett, 1990. **264**(2): p. 187-92.
- 130. MacKintosh, R.W., et al., *The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1.* FEBS Lett, 1995. **371**(3): p. 236-40.
- 131. Xing, Y., et al., *Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins.* Cell, 2006. **127**(2): p. 341-53.
- 132. Feurstein, D., et al., *Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells.* Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **234**(2): p. 247-55.
- 133. Goldberg, J., et al., *Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1.* Nature, 1995. **376**(6543): p. 745-53.
- 134. Maynes, J.T., et al., *Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins.* J Mol Biol, 2006. **356**(1): p. 111-20.
- 135. Milutinovic, A., et al., *Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins - LR and -YR.* Toxicon, 2003. **42**(3): p. 281-8.
- 136. Bell, S.G. and G.A. Codd, *Cyanobacterial toxins and human health.* Rev Med Microbiol, 1994. **5**: p. 217–277.

- 137. Torokne, A., A. Palovics, and M. Bankine, *Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria--experimental evidence.* Environ Toxicol, 2001. **16**(6): p. 512-6.
- 138. Lankoff, A., et al., *DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR.* Mutat Res, 2004. **559**(1-2): p. 131-42.
- 139. Rymuszka, A. and L. Adaszek, *Cytotoxic effects and changes in cytokine gene expression induced by microcystin-containing extract in fish immune cells--an in vitro and in vivo study.* Fish Shellfish Immunol, 2013. **34**(6): p. 1524-32.
- 140. Nishiwaki-Matsushima, R., et al., *Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR*. J Cancer Res Clin Oncol, 1992. **118**(6): p. 420-4.
- 141. Falconer, I.R., *Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria.* Environmental Toxicology and Water Quality, 1991. **6**: p. 177-184.
- 142. Fujiki, H., Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? Mol Carcinog, 1992. **5**(2): p. 91-4.
- 143. Nishiwaki-Matsushima, R., et al., *Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase.* Jpn J Cancer Res, 1991. **82**(9): p. 993-6.
- 144. Svircev, Z., et al., *Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms.* J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2013. **31**(3): p. 181-200.
- 145. Svircev, Z., et al., *Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia.* J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2009. **27**(1): p. 36-55.
- 146. Ueno, Y., et al., *Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay.* Carcinogenesis, 1996. **17**(6): p. 1317-21.
- 147. Yu, S.Z., *Primary prevention of hepatocellular carcinoma.* J Gastroenterol Hepatol, 1995. **10**(6): p. 674-82.
- 148. Hernández, J.M., V. López-Rodas, and E. Costas, *Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: a risk intensified by global change.* Med Hypotheses, 2009. **72**: p. 539–540.
- 149. Lun, Z., Y. Hai, and C. Kun, *Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer.* Biomed Environ Sci, 2002. **15**: p. 166–171.
- 150. WHO, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins.* Vol. 94. 2010, LYON, FRANCE.: WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.
- 151. Ito, E., et al., *Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds.* Toxicon, 2002. **40**(7): p. 1017-25.
- 152. Kondo, F., et al., *Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins.* Chem Res Toxicol, 1992. **5**(5): p. 591-6.
- 153. Pflugmacher, S., et al., *Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1425**(3): p. 527-33.
- 154. Cazenave, J., et al., *Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of Corydoras paleatus experimentally exposed to microcystin-RR*. Aquat Toxicol, 2006. **76**(1): p. 1-12.
- 155. Sahin, A., et al., *Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish.* Toxicology, 1996. **106**(1-3): p. 123-30.

- 156. Soares, R.M., V.F. Magalhaes, and S.M. Azevedo, *Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in Tilapia rendalli (Cichlidae) under laboratory conditions.* Aquat Toxicol, 2004. **70**(1): p. 1-10.
- 157. Williams, D.E., et al., *Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae.* Chem Res Toxicol, 1997. **10**(4): p. 463-9.
- 158. Xie, L., et al., *Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment.* Environ Pollut, 2004. **127**(3): p. 431-9.
- 159. Williams, D.E., et al., *Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, Mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues.* Toxicon, 1997. **35**(11): p. 1617-25.
- 160. Amorim, A. and V. Vasconcelos, *Dynamics of microcystins in the mussel Mytilus galloprovincialis.* Toxicon, 1999. **37**(7): p. 1041-52.
- 161. Sabatini, S.E., et al., Oxidative effects and toxin bioaccumulation after dietary microcystin intoxication in the hepatopancreas of the crab Neohelice (Chasmagnathus) granulata. Ecotoxicol Environ Saf, 2015. **120**: p. 136-41.
- 162. Zhang, D., et al., *Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health.* Sci Total Environ, 2009. **407**(7): p. 2191-9.
- 163. Ibelings, B.W. and I. Chorus, Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: a review. Environ Pollut, 2007.
 150(1): p. 177-92.
- 164. Greer, B., et al., *Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms.* Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(16): p. 4057-4069.
- 165. WHO. *Chemical hazards in drinking-water: Microcystin-LR*. 2018 27/02/2019]; Available from: https://<u>www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/microcystin/en/</u>.
- 166. WHO, Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/57). 2003.
- 167. Chorus, I., *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.* 63/2012., ed. I. Chorus. 2012: Federal Environment Agency (Umweltbundesamt). Germany.
- 168. EPA, *Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins.* U.S. Environmental Protection Agency Office of Water., 2015.
- 169. Michalak, A.M., et al., *Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(16): p. 6448-52.
- 170. Paerl, H.W. and T.G. Otten, *Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls.* Microb Ecol, 2013. **65**(4): p. 995-1010.
- 171. EPA, Human Health Recreational Ambient Water Quality Criteria or Swimming Advisories for Microcystins and Cylindrospermopsin. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water., 2016. **EPA Document Number: 822-P-16-002**
- 172. WHO, Guidelines for Safe Recreational Water Environments: Volume 1: Coastal and Fresh Waters. World Health Organization, 2003.
- 173. Vasconcelos, V., *Global changes and the new challenges in the research on cyanotoxin risk evaluation.* Limnetica, 2015. **34**(1): p. 149-158.
- 174. Gaget, V., et al., *Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment?* Water Res, 2017. **118**: p. 227-238.
- 175. EPA, *Recommendations for Cyanobacteria and Cyanotoxin Monitoring in Recreational Waters*. June 2017, United States Environmental Protection Agency. Office of Water EPA 820-R-17-001.

- 176. Fastner, J., et al., Optimized extraction of microcystins from field samples a comparison of different solvents and procedures. Water Res, 1998. **32**(10): p. 3177–3181.
- 177. Karlsson, K.M., et al., *First observation of Microcystin-LR in pelagic cyanobacterial blooms in northern Baltic Sea.* Harmful Algae, 2005. **4**(1): p. 163–166.
- 178. Kotak, B.G., et al., *Microcystins-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status.* Can. J. Fish Aquat. Sci. , 1996. **53**: p. 1974–1985.
- 179. Spoof, L., et al., Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. J Chromatogr A, 2003. **1020**(1): p. 105-19.
- 180. Ortea, P.M., et al., *Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry.* Chemosphere, 2004. **55**(10): p. 1395-402.
- 181. Lawton, L.A., C. Edwards, and G.A. Codd, *Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters*. Analyst, 1994. **119**(7): p. 1525-30.
- 182. Moollan, R.W., et al., Some comments on the determination of microcystin toxins in waters by high performance liquid chromatography. Analyst, 1996. **121**: p. 233–238.
- 183. Ruangyuttikarn, W., et al., *Reversed-phase liquid chromatographic-mass spectrometric determination of microcystin-LR in cyanobacteria blooms under alkaline conditions.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **800**(1-2): p. 315-9.
- 184. Akcaalan, R., et al., *Microcystin analysis in single filaments of Planktothrix spp. in laboratory cultures and environmental blooms.* Water Res, 2006. **40**(8): p. 1583-90.
- 185. Rapala, J., et al., *Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay, comparison of methods.* Anal. Chim. Acta 2002. **466**(2): p. 213–231.
- 186. Lawton, L.A. and C. Edwards, *Purification of microcystins*. J Chromatogr A, 2001. **912**(2): p. 191-209.
- 187. Hummert, C., et al., *LC–MS identification of microcystins in Microcystis aeruginosa strain from lake Thanh Cong, Hanoi, Vietnam.* Chromatographia, 2001. **45**(9/10): p. 569–577.
- 188. Ramanan, S., J. Tang, and A. Velayudhan, *Isolation and preparative purification of microcystin variants*. J Chromatogr A, 2000. **883**(1-2): p. 103-12.
- 189. EPA, Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. 2016, U.S. Environmental Protection Agency.
- 190. Metcalf, J.S., et al., *Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits.* J Appl Microbiol, 2000. **89**(3): p. 532-8.
- 191. Dell'Aversano, C., G.K. Eaglesham, and M.A. Quilliam, *Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry.* J Chromatogr A, 2004. **1028**(1): p. 155-64.
- 192. Spoof, L. and A. Catherine, *Appendix 3. Tables of Microcystins and Nodularins.*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, First Edition.*, J. Meriluoto, L. Spoof, and G.A. Codd, Editors. 2017, John Wiley & Sons, Ltd.

- 193. Lawton, L.A., et al., Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of Microcystis aeruginosa and from an associated animal toxicosis. Nat Toxins, 1995. **3**(1): p. 50-7.
- 194. Neffling, M.R., E. Lance, and J. Meriluoto, *Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Environ Pollut, 2010. **158**(3): p. 948-52.
- 195. Spoof, L., M.R. Neffling, and J. Meriluoto, *Separation of microcystins and nodularins by ultra performance liquid chromatography.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(30): p. 3822-30.
- 196. Meriluoto, J., L. Lawton, and K. Harada, *Isolation and detection of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins.* Methods Mol Biol, 2000. **145**: p. 65-87.
- 197. Msagati, T.A., B.A. Siame, and D.D. Shushu, Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. Aquat Toxicol, 2006. 78(4): p. 382-97.
- 198. ISO, ISO 20179:2005. Determination of microcystins Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. 2005, International Standards Organization. Geneva.
- 199. Shoemaker, J., D. Tettenhorst., and A. Delacruz, *METHOD 544. DETERMINATION OF MICROCYSTINS AND NODULARIN IN DRINKING WATER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS). U.S. Environmental Protection Agency.* 2015: Washington, DC.
- 200. Lawton, L.A., et al., *Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity*, in *Special Publication Detect, Methods Cyanobacterial Toxins*, G.A. Codd, et al., Editors. 1994, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 111–116.
- 201. Rapala, J. and K. Lahti, *Methods for detection of cyanobacterial toxins. Chapter 7*, in *Detection Methods for Algae, Protozoa and Helminthes in Fresh and Drinking Water. Water Quality Measurement Series*, F. Palumbo, G. Ziglio, and A. Van der Beken, Editors. 2002: Wiley, New York. p. 107–128
- 202. Barco, M., et al., Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of Planktothrix (Oscillatoria) rubescens in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. Toxicon, 2004. **44**(8): p. 881-6.
- 203. Barco, M., J. Rivera, and J. Caixach, *Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water* samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. J Chromatogr A, 2002. **959**(1-2): p. 103-11.
- 204. McElhiney, J. and L.A. Lawton, *Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **203**(3): p. 219-30.
- 205. Geis-Asteggiante, L., et al., *Development and validation of a rapid method for microcystins in fish and comparing LC-MS/MS results with ELISA*. Anal Bioanal Chem, 2011. **401**(8): p. 2617-30.
- 206. Mayumi, T., et al., *Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions.* J Antibiot (Tokyo), 2006. **59**(11): p. 710-9.
- 207. Graves, P.R. and T.A. Haystead, *Molecular biologist's guide to proteomics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(1): p. 39-63; table of contents.
- 208. Zweigenbaum, J.A., et al., Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal, 2000. **23**(4): p. 723-33.
- 209. Cong, L., et al., *Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry.* Anal. Chim. Acta, 2006. **569**(1-2): p. 157–168.

- 210. Ott, J.L. and W.W. Carmichael, *LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues.* Toxicon, 2006. **47**(7): p. 734-41.
- 211. Pérez, S. and D.S. Aga, *Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water.* TrAC Trends Anal. Chem., 2005. **24**(7): p. 658–670.
- 212. Sivonen, K. and G. Jones, *Cyanobacterial toxins*, in *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, I. Chorus and J. Bartram, Editors. 1999, E&FN Spon, London. p. 41–111.
- 213. Kleinteich, J., et al., *Toxic Cyanobacteria in Svalbard: Chemical Diversity of Microcystins Detected Using a Liquid Chromatography Mass Spectrometry Precursor Ion Screening Method.* Toxins (Basel), 2018. **10**(4).
- 214. Diehnelt, C.W., S.M. Peterman, and W.L. Budde, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins.* TrAC Trends Anal. Chem. , 2005. **24**(7): p. 622–634.
- 215. Frias, H.V., et al., *Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(3): p. 741-6.
- 216. Li, W., et al., *Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014. **963**: p. 113-8.
- 217. Palagama, S.W.D., R.E. West III, and D. Isailovic, *Improved solid-phase extraction* protocol and sensitive quantification of six microcystins in water using an HPLC-orbitrap mass spectrometry system. Anal. Methods, 2017. **9**(13): p. 2021-2030
- 218. Erhard, M., H. Von Dohren, and P. Jungblut, *Rapid typing and elucidation of new* secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 906-9.
- 219. Welker, M., et al., *Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research*. Environ Toxicol, 2002. **17**(4): p. 367-74.
- 220. Howard, K.L. and G.L. Boyer, *Quantitative analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.* Anal Chem, 2007. **79**(15): p. 5980-6.
- 221. Puddick, J., et al., Enhanced Sample Preparation for Quantitation of Microcystins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry. Phytochem Anal, 2011.
- 222. Ferranti, P., et al., A peptidomic approach for monitoring and characterising peptide cyanotoxins produced in Italian lakes by matrix-assisted laser desorption/ionisation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011. **25**(9): p. 1173-83.
- 223. Patel, R., *MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases.* Clin Chem, 2015. **61**(1): p. 100-11.
- 224. Mikalsen, B., et al., *Natural variation in the microcystin synthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in Microcystis strains.* J Bacteriol, 2003. **185**(9): p. 2774-85.
- 225. Neumann, U., et al., *Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of Microcystis sp. from a Chilean lake.* Syst Appl Microbiol, 2000. **23**(2): p. 191-7.
- 226. Fastner, J., M. Erhard, and H. von Dohren, *Determination of oligopeptide diversity* within a natural population of Microcystis spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(11): p. 5069-76.

- 227. Welker, M., et al., *Diversity and distribution of Microcystis (Cyanobacteria)* oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. Microbiology, 2004. **150**(Pt 6): p. 1785-96.
- Duncan, M.W., H. Roder, and S.W. Hunsucker, *Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.* Brief Funct Genomic Proteomic, 2008. 7(5): p. 355-70.
- 229. Sleno, L. and D.A. Volmer, *Assessing the properties of internal standards for quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(10): p. 1517-24.
- 230. Szajli, E., T. Feher, and K.F. Medzihradszky, *Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS.* Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(12): p. 2410-8.
- 231. Sano, T., et al., *A Method for Micro-Determination of Total Microcystin Content in Waterblooms of Cyanobacteria (Blue-Green Algae).* International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1992. **49**(3): p. 163-170.
- 232. Hilborn, E.D., et al., *Serologic evaluation of human microcystin exposure*. Environ Toxicol, 2007. **22**(5): p. 459-63.
- 233. Lance, E., et al., Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environ Pollut, 2010. **158**(3): p. 674-80.
- 234. Soares, R.M., et al., *Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil.* Environ Toxicol, 2006. **21**(2): p. 95-103.
- 235. Schantz, E.J., et al., *Purified shellfish poison for bioassay standardization*. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 1958. **41**: p. 160–168.
- 236. Kiviranta, J., et al., *Detection of toxicity of cyanobacteria by Artemia salina bioassay.* Environmental Toxicology and Water Quality, 1991. **6**(4): p. 423–436.
- 237. Kos, P., et al., Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (Sinapis alba L.). Anal Biochem, 1995. **225**(1): p. 49-53.
- 238. Almeida, V.P.S., et al., *Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast-Brazil.* Braz. J. Microbiol., 2006. **37**(2): p. 192–198.
- 239. Heresztyn, T. and B.C. Nicholson, *A colorimetric protein phosphatase inhibition* assay for the determination of cyanobacterial peptide hepatotoxins based on the dephosphorylation of phosvitin by recombinant protein phosphatase 1. Environ Toxicol, 2001. **16**(3): p. 242-52.
- Heresztyn, T., B.C. Nicholson, and . Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assays. Water Res., 2001.
 35(13): p. 3049–3056.
- 241. Lambert, T.W., et al., *Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay.* Environ Sci Technol, 1994. **28**(4): p. 753-5.
- 242. MacKintosh, C. and R.W. MacKintosh, *The inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and an extremely sensitive and rapid bioassay for toxin detection*, in *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins. The Royal Society of Chemistry*, G.A. Codd, T.M. Jeffries, and C.W. Keevil, Editors. 1994: Cambridge, UK. p. 90–99.
- 243. Mountfort, D.O., P. Holland, and J. Sprosen, *Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS.* Toxicon, 2005. **45**(2): p. 199-206.
- 244. Wong, B.S.F., et al., *A colorimetric assay for screening microcystin class compounds in aquatic systems.* Chemosphere, 1999. **38**(5): p. 1113–1122.
- 245. Murphy, K., et al., *Janeway's Immunobiology. 8th edition*. 8th ed. 2012, New York: Garland Science.
- 246. Porter, R.R., *Chemical Structure of Gamma-Globulin and Antibodies.* Br Med Bull, 1963. **19**: p. 197-201.
- 247. Cohen, S. and C. Milstein, *Structure and biological properties of immunoglobulins.* Adv Immunol, 1967. **7**: p. 1-89.
- 248. Hilschmann, N. and L.C. Craig, *Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**(6): p. 1403-9.
- 249. Johnson, G. and T.T. Wu, *Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 214-8.
- 250. Riesen, W., [Structure and biological properties of immunoglobulins and gammaglobulin preparations. I. Structure and function of immunoglobulins]. Schweiz Med Wochenschr, 1980. **110**(3): p. 74-9.
- 251. Chu, F.S., et al., *Production and characterization of antibodies against microcystins.* Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(8): p. 1928-33.
- 252. Metcalf, J.S., S.G. Bell, and G.A. Codd, *Production of novel polyclonal antibodies* against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. Water Res, 2000. **34**: p. 2761–2769.
- 253. Sheng, J.W., et al., *A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies.* Anal Chim Acta, 2006. **572**(2): p. 309-15.
- 254. Young, F.M., et al., *Production of antibodies against microcystin-RR for the assessment of purified microcystins and cyanobacterial environmental samples.* Toxicon, 2006. **48**(3): p. 295-306.
- 255. Nagata, S., et al., A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody. Nat Toxins, 1999. **7**(2): p. 49-55.
- 256. Weller, M.G., et al., *Development of a direct competitive microcystin immunoassay of broad specificity.* Anal Sci, 2001. **17**(12): p. 1445-8.
- 257. Zeck, A., et al., *Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins.* Analytica Chimica Acta, 2001. **441**: p. 1-13.
- 258. Zeck, A., et al., *Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda*. Analyst, 2001. **126**(11): p. 2002-7.
- 259. Hawkins, P.R., et al., *A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment.* J. Water Supply: Res. Technol. AQUA 2006. **54**(8): p. 509–518.
- 260. Kondo, F., et al., *Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers.* Chem Res Toxicol, 1996. **9**(8): p. 1355-9.
- 261. Mhadhbi, H., et al., *Generation and characterization of polyclonal antibodies against microcystins-Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection.* Talanta, 2006. **70**(2): p. 225-35.
- 262. Kondo, F., et al., *Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water.* Toxicon, 2000. **38**(6): p. 813-23.
- 263. Lawrence, J.F. and C. Menard, *Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography.* J Chromatogr A, 2001. **922**(1-2): p. 111-7.
- 264. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
- 265. Joosten, V., et al., *The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi.* Microb Cell Fact, 2003. **2**(1): p. 1.

- 266. Tabares-da Rosa, S., et al., *Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response.* Anal Chem, 2011. **83**(18): p. 7213-20.
- 267. Kim, H.J., et al., *Isolation of alpaca anti-hapten heavy chain single domain antibodies for development of sensitive immunoassay.* Anal Chem, 2012. **84**(2): p. 1165-71.
- 268. Wesolowski, J., et al., *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.* Med Microbiol Immunol, 2009. **198**(3): p. 157-74.
- 269. Rothbauer, U., et al., *Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies.* Nat Methods, 2006. **3**(11): p. 887-9.
- 270. Cui, Y., et al., *Heavy chain single-domain antibodies to detect native human soluble epoxide hydrolase.* Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(24): p. 7275-83.
- 271. Bever, C.S., et al., *VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals.* Anal Bioanal Chem, 2016. **408**(22): p. 5985-6002.
- 272. Gonzalez-Sapienza, G., M.A. Rossotti, and S. Tabares-da Rosa, *Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications.* Front Immunol., 2017. **8**: p. 977.
- 273. Al Qaraghuli, M.M. and V.A. Ferro, *Analysis of the binding loops configuration and surface adaptation of different crystallized single-domain antibodies in response to various antigens.* J Mol Recognit, 2017. **30**(4).
- 274. Fanning, S.W. and J.R. Horn, *An anti-hapten camelid antibody reveals a cryptic binding site with significant energetic contributions from a nonhypervariable loop.* Protein Sci, 2011. **20**(7): p. 1196-207.
- 275. EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. English Edition 1.0 1998. EURACHEM Guide. 1998, United Kingdom.
- 276. EURACHEM, Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). 2016.
- 277. ISO, 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Parts 1-6. International Organization for Standardization. Geneva.
- 278. ISO, 3534 Statistics Vocabulary and symbols Parts 1-3. International Organization for Standardization. Geneva.
- 279. ISO, International vocabulary of metrology Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, <u>www.bipm.org</u>. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007. ISO Geneva. 2012.
- 280. UE, Commission Decision 2002/657/EC (12 August 2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. European Commission. 2002.
- 281. OUA, Validación de métodos de ensayo. Código: OUADOC033. Organismo Uruguayo de Acreditación. 2012.
- 282. Gonzalez-Piana, M., et al., *Effects of Wind Mixing in a Stratified Water Column on Toxic Cyanobacteria and Microcystin-LR Distribution in a Subtropical Reservoir.* Bull Environ Contam Toxicol, 2018. **101**(5): p. 611-616.
- 283. Aguilera, A., et al., *Synergistic effects of nutrients and light favor Nostocales over non-heterocystous cyanobacteria.* Hydrobiologia, 2017. **794**(1): p. 241–255.
- 284. Beamud, G., et al., *Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii.* Hydrobiologia, 2015. **763**(1): p. 61-172.
- 285. Sabatini, S.E., et al., *Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam Diplodon chilensis patagonicus upon subchronic exposure to toxic Microcystis aeruginosa.* Ecotoxicol Environ Saf, 2011. **74**(5): p. 1188-94.

- 286. Hermanson, G.T., *Chapter 3 Zero-Length Crosslinkers*, in *Bioconjugate Techniques* (*Second Edition*), G.T. Hermanson, Editor. 2008, Academic Press. p. 213-233.
- 287. Hermanson, G.T., Chapter 19 Preparation of Hapten–Carrier Immunogen Conjugates, in Bioconjugate Techniques (Second Edition), G.T. Hermanson, Editor. 2008, Academic Press. p. 743-782.
- 288. EPA, Method 544. Determination of microcystins and nodularin in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). EPA Document #: EPA/600/R-14/474. National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development. 2015, U. S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, Ohio 45268.
- 289. Gefen, T., et al., *The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity*. Immunology, 2015. **144**(1): p. 116-26.
- 290. Singh, M.K., et al., *HaptenDB: a comprehensive database of haptens, carrier proteins and anti-hapten antibodies.* Bioinformatics, 2006. **22**(2): p. 253-5.
- 291. Hoyle, C.E. and C.N. Bowman, *Thiol-ene click chemistry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(9): p. 1540-73.
- 292. Preece, E.P., et al., A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. Harmful Algae, 2017. **61**: p. 31-45.
- 293. Fossati, M. and I. Piedra-Cueva, *Numerical modelling of residual flow and salinity in the Río de la Plata.* Applied Mathematical Modelling, 2008. **32**(6): p. 1066-1086.
- 294. Risso, J., et al. *Programa de Monitoreo de agua de playas y costa del departamento de Montevideo.* 2018; Available from: <u>http://www.montevideo.gub.uy/playas/evaluacion-de-la-calidad-del-agua-en-las-playas/informes-anuales-de-evaluacion-de-calidad-del-agua-de-playas-y-costas</u>.
- Altman, D.G. and J.M. Bland, *Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity.* BMJ, 1994.
 308(6943): p. 1552.
- 296. IM. Floraciones algales. Bandera indicativa de riesgo sanitario <u>http://www.montevideo.gub.uy/ciudadania/desarrollo-ambiental/playas/floraciones-algales</u>. 2012.
- 297. Alvarez-Rueda, N., et al., *Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten.* Mol Immunol, 2007. **44**(7): p. 1680-90.
- 298. Frenken, L.G., et al., *Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae.* J Biotechnol, 2000. **78**(1): p. 11-21.
- 299. Ladenson, R.C., et al., Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. Anal Chem, 2006. **78**(13): p. 4501-8.
- 300. Spinelli, S., et al., *Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens.* Biochemistry, 2000. **39**(6): p. 1217-22.
- 301. van der Linden, R.H., et al., Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. Biochim Biophys Acta, 1999.
 1431(1): p. 37-46.
- 302. Yau, K.Y., et al., Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a nonimmunized llama ribosome display library. J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 161-75.
- 303. Barbas III, C.F., et al., *Phage Display. A Laboratory Manual*. 2001, New York. USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rossotti, M., et al., Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. Biochim Biophys Acta, 2015. 1850(7): p. 1397-404.

- Rossotti, M.A., et al., Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays. Anal Chem, 2015. 87(23): p. 11907-14.
- 306. Chapman-Smith, A., et al., *Expression, biotinylation and purification of a biotindomain peptide from the biotin carboxy carrier protein of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase.* Biochem J, 1994. **302 (Pt 3)**: p. 881-7.
- 307. Gallizia, A., et al., *Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in Escherichia coli.* Protein Expr Purif, 1998. **14**(2): p. 192-6.
- 308. Humbert, N., et al., *High-Yield Production and Purification of Recombinant T7-Tag Mature Streptavidin in Glucose-Stressed E. coli*, in *Avidin-Biotin Interactions*, *Methods and Applications*, R.J. McMahon, Editor. 2008, Humana Press: Totowa, NJ.
- 309. Polonelli, L., et al., *Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities.* PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2371.
- 310. Pardon, E., et al., *A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology.* Nat Protoc, 2014. **9**(3): p. 674-93.
- 311. AOAC, Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis. Appendix F. AOAC INTERNATIONAL, 2016.
- 312. Shimizu, K., et al., *Effects of the amino acid constituents of microcystin variants on cytotoxicity to primary cultured rat hepatocytes.* Toxins (Basel), 2013. **6**(1): p. 168-79.
- 313. Wolf, H.U. and C. Frank, *Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures*. Environ Toxicol, 2002. **17**(4): p. 395-9.
- 314. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
- 315. Boyer, A.E., et al., *Quantitative mass spectrometry for bacterial protein toxins--a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis.* Molecules, 2011. **16**(3): p. 2391-413.
- 316. Gurbuz, F., et al., *Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey.* Sci Total Environ, 2009. **407**(13): p. 4038-46.
- 317. Monks, N.R., et al., *Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 587-98.
- 318. Bruker, ed. *flexControl 3.3 User Manual*. 2009: Bremen, Germany.
- 319. Domingos P, et al., *First Report of Microcystin Production by Picoplanktonic Cyanobacteria Isolated from a Northeast Brazilian Drinking Water Supply.* Environmental Toxicology, 1999. **14**: p. 31-35.
- 320. Satchwell, M. and G. Boyer. *Comparison of Four Assays for the Detection of Microcystins.* in *Proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae.* October 2002.
- 321. SANTE, SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. . 2017: EUROPEAN COMMISSION. DIRECTORATE GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY.

Abreviaturas y acrónimos

MCs: Microcistinas

MC: Microcistina

MC-LR: Microcistina-leucina, arginina

NODs: Nodularinas

MS: Espectrometria de massa (Mass Spectrometry)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficácia (*High Performance Liquid Chromatography*)

UV: detector UV/visible

PDA: arreglo de diodos (photo diode array)

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

MALDI-TOF: Espectrometría de masas por desorción/ionización laser asistida por matriz, tiempo de vuelo (*Matrix assisted laser desorption/ionization, Time of flight*)

TOF: Tiempo de vuelo (Time of flight)

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

SD: Desviación estándar

RSD: Desviación estándar relativa (%)

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

m/z: relación masa/carga

Da: Dalton

SPE: Extracción en fase sólida (Solid phase extraction)

IS: Estándar interno (Internal standard)

PBS: solución tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)

BSA: Albúmina sérica bovina

HRP: Peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase)

OVA: Ovoalbúmina, albúmina de clara de huevo

CHCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

TFA: ácido trifluoroacético

MBs: Partículas magnéticas (Magnetic Beads)

mAbs: Anticuerpos monoclonales

VHHs: Dominios variables de anticuerpos de cadena pesada

Nbs: Dominios variables de anticuerpos monoclonales de cadena pesada recombinantes

OMS: Organización Mundial de la Salud

EPA: Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (*U.S. Environmental Protection Agency*)

ISO: Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*)

Agradecimientos

Al tribunal evaluador, Dra. Valéria Freitas de Magalhães, Dr. Luis Aubriot y Dr. Horacio Heinzen.

A las agencias financiadoras: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y Comisión Académica de Posgrado (CAP).

A Bea, pilar fundamental de este trabajo. Por el apoyo constante durante todos estos años, por siempre tener una palabra de aliento y por compartir todos sus conocimientos.

A Gualberto, por dejarme ser y crecer en el laboratorio.

A todos y cada uno de la *Casita de fondo*, compañeros y amigos, presentes siempre en todos los momentos, Triana, Sofía, Natalia, Gabriel, Andrés, Diego, Noelia, Romina, Noelia S., Cecilia. Y a todos los que pasaron por el grupo y ya no están.

A Gustavo, Claudio, Cecilia S. y Paula, que perteneciendo a la *Casita de adelante*, siempre están dispuestos a colaborar, escuchar y festejar.

A todos los de la Cátedra de Inmunología, por hacer de este laboratorio un lugar cómodo y alegre para trabajar.

A los colegas y amigos de los demás Departamentos del Instituto de Higiene. Especialmente a Geral, por su amistad y por las largas charlas discutiendo resultados.

A mi familia, por bancar la distancia, pero siempre estando presente en todo este camino, por su aliento y apoyo continuo.

A mi mamá, por hacer realidad lo que al principio fue una locura. Por su esfuerzo y tenacidad. Esta tesis se la dedico a ella.

A la estrella que me guía en el cielo, mi papá, que me enseñó que a pesar de no tener fuerzas hay que seguir luchando.

A Lucía, por estar conmigo en los momentos más duros y seguir ahí. Por ser mi cable a tierra y mi alegría cuando todo parecía gris.





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 Quimíca, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay

^b Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Quimíca, 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

^fDepartment of Pulmonary and Critical Care Medicine, School of Medicine, University of California Davis, United States

ARTICLE INFO

Article history: Received 25 January 2011 Received in revised form 21 August 2012 Accepted 8 October 2012 Available online 4 December 2012

Keywords: ELISA Microcystins Cyanobacteria Harmful algal blooms Uruguay South America

ABSTRACT

In recent years, the international demand for commodities has prompted enormous growth in agriculture in most South American countries. Due to intensive use of fertilizers, cyanobacterial blooms have become a recurrent phenomenon throughout the continent, but their potential health risk remains largely unknown due to the lack of analytical capacity. In this paper we report the main results and conclusions of more than five years of systematic monitoring of cyanobacterial blooms in 20 beaches of Montevideo, Uruguay, on the Rio de la Plata, the fifth largest basin in the world. A locally developed microcystin ELISA was used to establish a sustainable monitoring program that revealed seasonal peaks of extremely high toxicity, more than one-thousand-fold greater than the WHO limit for recreational water. Comparison with cyanobacterial cell counts and chlorophyll-a determination, two commonly used parameters for indirect estimation of toxicity, showed that such indicators can be highly misleading. On the other hand, the accumulated experience led to the definition of a simple criterion for visual classification of blooms, that can be used by trained lifeguards and technicians to take rapid on-site decisions on beach management. The simple and low cost approach is broadly applicable to risk assessment and risk management in developing countries.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The number and importance of harmful algal blooms, especially of cyanobacteria, are increasing worldwide and represent a significant threat to public health. Many developed countries have implemented strategies to monitor and control algal blooms. However, in many developing countries academic reports show that the problem is also present but there are difficulties in establishing monitoring programs and preventive measures. The case of Lake Atitlan in Guatemala is in many ways typical. For several decades it has received untreated sewage, as well as nitrogen and phosphorus runoff from uncontrolled erosion. A significant bloom of cyanobacteria (*Lyngbya hieronymusii*) appeared for the first time in December 2008. A few months later the bloom returned with more intensity and affected society at all levels (http://www. guatemala-times.com/science-environment/environment/1237guatemalas-lake-atitlan-disaster-the-explanation.html). Despite the prevailing opinion of the scientific community, there have been attempts to control the algal blooms by introducing grass carp or adding algicides into the lake to kill the cyanobacteria without regard for the potential ecological consequences.

Several species of cyanobacteria produce potent toxins such as the microcystins synthesized by various strains of *Microcystis* and *Anabaena*. In Caruaru, Brazil, water contaminated with microcystins caused the death of 52 patients of a hemodialysis clinic (Jochimsen et al., 1998) bringing the problem to the attention of the general public, which drastically changed the country's attitude toward cyanobacterial blooms (Azevedo et al., 2002; Dorr et al., 2010). As a consequence, in the year 2000 the Brazilian

^{*} Corresponding author. Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Quimíca, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay. Tel./ fax: +598 2 9241806.

E-mail address: bbrena@fq.edu.uy (B.M. Brena).

^{0301-4797/\$ –} see front matter \odot 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.052

regulations for drinking water quality were changed to incorporate cyanobacteria and cyanotoxins as parameters that must be monitored for water quality control.

Reports of systematic studies of cyanobacterial blooms in South America are scarce, but publications document the existence of the phenomenon (Ame et al., 2003; Conti et al., 2005; von Sperling and Souza, 2007; Benintende et al., 2008; Johnson et al., 2008; Tundisi et al., 2008: Sant Anna et al., 2011: Unrein et al., 2010). In Uruguay. cyanobacterial blooms have been increasingly evident with Microcystis aeruginosa dominating the bloom community in dams, rivers and the estuarine water of the Rio de la Plata (De Leon and Yunes, 2001; Piccini et al., 2006). The La Plata River estuarine system, fifth largest in the world with a population of approximately 67 million people, transports water from the central part of South America through the Paraná and Uruguay basins to the Atlantic Ocean. One of the main factors affecting water conditions the basin is the construction of more than thirty dams for hydropower (Salto Grande, Itaipú, Yacyretá), followed by increasing urbanization, expansion of agriculture and climate variations. These factors have modified the flow, as well as the quality of the water favoring the proliferation of algal blooms posing possible risks for the multiple uses of these water (fishing, drinking water source, recreation). This concern is more than theoretical, as practically all of the *Microcystis* blooms studied in Montevideo (the capital city) produced hepatotoxic microcystins (De Leon and Yunes, 2001; Brena et al., 2006).

Traditional detection of Microcystis by microscopic cell counts are time consuming and are not necessarily an accurate indicator of toxicity. Several *Microcystis* species produce toxins (microcystins) at later stages of the cell cycle, and the toxins, which are cyclic peptides of an unusual structure, may persist for very long times in the environment in either an intracellular form or extracellularly after lysis of the cyanobacterial cells. Traditional analytical methods for the determination of microcystins such as mouse bioassay have low sensitivity and may be considered ethically objectionable. Instrumental analysis by HPLC and/or by mass spectrometry, the reference method, is costly and therefore not suitable for high sample throughput and routine monitoring in developing countries. In addition, the microcystins are a family of more than 80 chemical congeners (van Apeldoorn et al., 2007) and the predominant variants in local blooms have not yet been identified, which adds further complexity to HPLC or mass spectrometry analysis.

Immunoassays are very useful for rapid screening of large numbers of samples directly, without the need for complex sample preparation procedures. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) is a well established and relatively low cost method for the rapid analysis of large numbers of samples. Therefore, the number of U.S. EPA-certified ELISA methods and the level of acceptance by other regulatory agencies of the use of immunoassays in environmental applications are increasing. Moreover, due to the large number of microcystin variants, the use of HPLC methods is limited by the availability of standards so immunoassays of broad specificity may be more suitable for providing global information about possible toxicity. Indeed, existing ELISA antibodies have a broad specificity for the different microcystin variants, which makes this an excellent method for screening for many of the known microcystins (and for unknown variants that have common structural features) simultaneously in a single assay. The comparative advantages of the ELISA prompted the local development of the assay (Brena et al., 2006).

In this paper we report the main results and conclusions of a long term cyanobacterial monitoring program, including cyanobacterial species identification, cell count and chlorophylla determination. We also describe our approach to the standardization and long-term use of our locally developed ELISA, the results from this systematic monitoring program for microcystins over a 6year period, and its impact upon public health protection in Montevideo.

2. Materials

Microcystin-LR (MC-LR, purity \geq 98.0%) and all other microcystin variants used in this study were purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). Goat anti-rabbit IgG-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate was from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA); bovine serum albumin (BSA, fraction V, purity 98%) and ovalbumin (OVA) were obtained from Sigma–Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Purified water was prepared with a Milli-Q plus 185 (Millipore).

Mercury ((o-carboxyphenyl)thio)ethyl sodium salt (Thimerosal) was obtained from BDH Chemicals Ltd., Poole, England. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB, ethylenediamine, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), and Minipax absorbent packets (0.5 g) were from Sigma–Aldrich. MC standards were from Alexis Biochemicals.

3. Methods

3.1. Study area and monitoring strategy

The study zone is situated on the Uruguayan coast at Montevideo (the northern coast of the Río de la Plata) between the Santa Lucia River in the west of the city and the Carrasco River to the East (Fig. 1). Hydrological records show an increase in the discharge of the Uruguay River since 1953, with a very sharp growth after 1971, and there have been frequent El Niño events that correlate with severe floods, and La Niña that are associated with droughts (Nagy et al., 1998).

During the summer season (mid-November to the end of March) the beach monitoring program for water quality of the City of Montevideo samples 22 sandy beaches every second day for the analysis of fecal coliform contamination. At each sampling site careful visual observation is performed in order to establish the presence or absence of cyanobacterial blooms. When cyanobacterial colonies are not observed, sentinel samples at six sites are taken once a week for routine vigilance. These samples are analyzed for salinity, temperature and chlorophyll-a. When cyanobacterial colonies are detected, technicians are trained to classify the magnitude of the phenomenon into two well-defined categories: 1. Dispersed cyanobacterial colonies (the colonies are evenly dispersed and can be seen only from a short distance or are observed in the water when the sample is taken) and 2. "Scum" ("bloom") is when colonies are accumulated and produce a typical deep green color in the water that can be observed from several meters distance. Experiments with the use of more categories proved to be difficult in practice so the distinction into only these two categories proved feasible. If a cyanobacterial bloom is detected, samples are taken for cyanobacterial species identification, cell count, chlorophyll-a determination and microcystin analysis.

Samples were collected in 1-L dark bottles 20 cm below the water surface and were carefully subdivided into three aliquots for determination of chlorophyll-a, cell counts, and ELISA. Aliquots for chlorophyll-a and cell counting were stored refrigerated at 4 °C until used (maximum preservation time 24 h). Aliquots for MC analysis were frozen at -20 °C and stored until analyzed. Cell counting was performed using Box's methodology (Box et al., 1981), with disintegration of colonies by alkaline hydrolysis (80–90 °C for 10 min, followed by intensive mixing). The isolated cells were counted using a counting chamber (Sedgewick–Rafter or a hemocytometer) with a $400 \times$ microscope. In cases of low cell density, Utermhöl methodology (Sournia, 1978) was used. The taxonomic



Fig. 1. A map of the Rio de la Plata basin; the sampling area of this study and of the city of Montevideo is shown. The beaches mentioned in the text and tables are shown in their relative locations to each other. The direction of flow of water from the Uruguay River is northwest to southeast in the Rio de la Plata.

observations were performed with a Leitz optic microscope. Phytoplankton analysis in water samples was done collaboratively with the National Direction of Aquatic Resources (DINARA, Montevideo, Uruguay).

Chlorophyll-a was determined spectrophotometrically using cells filtered through glass fiber filters, then extracted in acetone:water 75:25, following APHA Method 10200h (Association, 1998).

In this study we report on blooms occurred over 9 years during the summers from 2000 to 2001 to 2008–2009, with detailed ELISA results for microcystins from six summer seasons (2003–04 to 2008–2009) and isolated historical data starting from 1981.

3.2. Indirect competitive ELISA assay (kit format)

3.2.1. Preparation of plates and reagents

The ELISA assay was based on a rabbit polyclonal antibody raised by using cationized and thiolated ovalbumin (OVA-MC-LR conjugate) as hapten conjugate (McElhiney et al., 2002). Briefly ovalbumin was cationized with ethylenediamine using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, subsequently thiolated with SPDP and then coupled to MC (ratio MC-LR: carrier 15:1).

For immunization, one hundred micrograms of OVA–MC-LR conjugate were dissolved in 250 μ L of Phosphate-Buffered Saline (PBS) and vigorously mixed with 250 μ L of Freund's Complete Adjuvant (Pierce, Rockford, IL, USA) to form a thick emulsion. This emulsion was then injected subcutaneously into several points on the back of New Zealand white rabbits. After 4 and 8 weeks the animals were immunized intramuscularly with additional doses of hapten conjugates emulsified in Freund's Incomplete Adjuvant. Ten days after the final booster the animals were bled, and after clotting and centrifugation aliquots of the sera were prepared and kept at -20 °C until used.

The coating antigen (BSA-MC-LR) was prepared by coupling MC-LR to thiol groups introduced in cationized and thiolated bovine serum as described for ovalbumin (McElhiney et al., 2002). ELISA plates were coated with the BSA-MC-LR conjugate (100 μ L per well containing 70 ng/mL of conjugate in phosphate buffered saline, PBS); then blocked with 200 μ L 1% BSA (m/v) in PBS, for 1 h, thoroughly washed four times with PBS-Tween 0.05%, once with water and dried in a chamber at 23 °C \pm 2 at 40–50% humidity for 1 h. The plates were preserved in the refrigerator at 4 °C in sealed aluminum foil bags containing desiccant.

Due to the lack of certified standard materials for individual MCs we used MC-LR standard of declared purity, and checked the concentration of the standard by using an extinction coefficient at 238 nm of 39,800 (Blom et al., 2001). Microcystin standards (0.2; 0.6; 1.0; 1.5 and 2.5 μ g/L) were prepared in PBS containing 0.1% BSA and 0.5 g/L sodium azide (calibrator buffer). The anti-MC polyclonal serum was diluted 1/15,000 in calibrator buffer and the anti-rabbit-HRP conjugate solution was prepared by diluting the antiserum 1/ 5000 in PBS containing 0.5% BSA, 0.01% Thimerosal and 0.1 mM TMB. Antibody solutions and MC standards were filtered with 0.2 m cellulose acetate membrane filters (Avantec MFS). Solutions were preserved in the refrigerator at 4 °C in dark glass bottles. Before use, 6 mL of diluted anti-MC polyclonal serum were mixed with 1.34 mL of 1 M Tris buffer, pH 7.5 containing 100 g/L disodium EDTA, 16 g/L NaCl and 1% BSA.

3.2.2. ELISA assay procedure

The mixture containing microcystin standards or adequately diluted samples in calibrator buffer (50 μ L per well) and antimicrocystin antibody (60 μ L per well) was incubated for 50 min at room temperature with constant agitation (alternatively with manual mixing for 20 s every 10–15-min). After thorough washing, 100 μ L of the second antibody (anti-rabbit-HRP conjugate solution) was added to each well and the plate was incubated for 40 min at room temperature. The plates were washed and then 100 μ L of the peroxidase substrate (0.4 mL of 6 mg/mL dimethylsulfoxide (DMSO) solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, plus 0.1 mL of 1% H₂O₂ in water, prepared in a total volume of 25 mL of 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5) was dispensed into each well. The enzyme reaction was stopped after 15 min by the addition of 50 μ L of 2 N H₂SO₄. The absorbance was read at 450 nm in a FLUOSTAR optima BMG plate reader using a reference wavelength of 620 nm. Inhibition values were fitted to a linear semi-log plot using Excel, by the equation:

% Inhibition =
$$m \ln (MC \text{ concentration}) + b$$
 (1)

Samples were thawed, filtered, and measured using serial dilutions. Quality controls included the use of at least one control standard (1 μ g/L) and one spiked sample per plate. Samples and standards were determined in triplicate.

3.2.3. Statistical analysis of data

Data are expressed as mean values + SEM. Significant differences between groups was defined as a p value less than 0.05, and was determined by linear regression analysis or by ANOVA followed by t-tests between groups with Tukey's correction for multiple comparisons, as appropriate.

4. Results

4.1. Cyanobacterial blooms in the Rio de la Plata

Cyanobacterial blooms in the Rio de la Plata usually appear during late spring and summer (late November to March–April),

Table 1			
Reports of cyanobacterial scums	s in the	Río de	la Plata

producing clearly visible green discoloration of the water. Cyanobacterial scums are most frequently observed in the calm water next to rocky points, and appear occasionally in the middle of the beaches. The most relevant historical records of cyanobacterial scums in the Rio de la Plata since 1981 including some of the results of the systematic monitoring program of the beaches of Montevideo between 2003 and 2008 are summarized in Table 1. The dominant species found was *M. aeruginosa*, followed by other species of Microcystis, and less frequently by Anabaena. The first data set including cyanobacterial count, species identification and concentration of microcystins, was obtained in January 2001. In 2001 the determination of microcystins was performed in Brazil [Laboratory of Dr. Sandra Azevedo, Universidade Federal do Rio de Janeiro] since there was no analytical capacity available at that time in Uruguay. The high cyanobacterial cell densities and microcystin concentrations among the highest reported values worldwide (Chorus and Bartram, 1999; Rinta-Kanto et al., 2005; Lehman, 2007; Xu et al., 2008) led to a joint Government-University planning process for Uruguay to become self-sufficient in performing microcystin assays to enable characterization and understanding of the problem.

Cyanobacterial blooms along the Montevideo coast are a complex phenomenon influenced by several factors which are not fully understood (Feola et al., 2009; Sienra and Ferrari, 2006). When the discharge of the Uruguay River is very high (close to 10,000 m³/ s), the salinity of the Rio de la Plata is decreased and scums are found on the beaches along the entire coast of the Rio de La Plata. We can hypothesize that cyanobacterial accumulations are formed mostly in the favorable conditions existing in the numerous dams of the basin and are transported by heavy rainfall, thereby reaching the water of the Rio de la Plata. Conversely, during conditions of decreased rainfall we would anticipate decreased transport of scums from the Uruguay River basin and fewer blooms in the Rio de

Date	Site	μg MC/L	LD50 mg kg ⁻¹ (mouse bioassay)	µg MC g ⁻¹ dry mass	Species	Cyano-bacteria (cell ml ⁻¹)	Reference
1981	Río de la Plata	_	_	_	Ma	_	Carp-Shin-Sohma (1990) ^a
03/16/92	Montevideo	_	-	_	Ma	-	(Ferrari and Méndez, 2000)
01/27/94	Montevideo – P. del Este	_	_	_	Ma	_	(Ferrari and Méndez, 2000)
01/30/97	Colonia	125	233.3	_	Ma	-	(Ferrari and Méndez, 2000)
03/29/97	P. del Este	-	203.1	_	-	-	(Ferrari and Méndez, 2000)
							(Méndez and Ferrari, 2002)
02/02/99	Colonia	-	-	100-1000	Ma	-	(De Leon and Yunes, 2001)
01/05/01	Ramírez	_	-	_	Ma, As, Ac	161	Ferrari (2001) ^b
	Pocitos	_	-	-	Ma, Ac	6040	
	Carrasco	-	-	-	Ma, As, Ac	15,300	
01/11//01	Ramírez	_	-	_	Ma, Mw, Mfa	6.5×10^{5}	Ferrari (2001) ^b
01/12//01	Trouville	250	-	132	Mfa, Ma	2×10^9	(De Leon and Yunes, 2001) ^c
	Ramírez	97	-	194	Mfa, Ma	4.5×10^{6}	
	P. Carretas	1150	-	48	Mfa, Ma	1.6×10^{10}	
01/19//01	Ramírez	_	-	-	Mfa	2.5×10^{7}	Ferrari (2001) ^b
01/30//01	Ramírez	-	-	-	Mfa, Ma, Mn,	-	Ferrari (2001) ^b
					Mw, Ac, As		
01/03//02	Buceo (port)	290	-	619	Mfa, Mp	1×10^9	De León and Vidal (2002) ^c
02/19/03	Ramírez	26	-	-	Msp	-	De León (2003) ^c
	Pocitos	12	-	-	-	-	Ferrari (2003) ^b
01/27/04	Pocitos	-	-	-	Ma, Mfa, As	1.3×10^{8}	Sienra and Piaggio (2004) ^d
02/04//04	Ramírez	2440	-	-	Msp	-	Sienra and Ferrari (2004) ^d
11/19/04	Buceo	40	-	_	Ma	4×10^{5}	(Ferrari and Méndez, 2004)
01/09/06	Ramírez	1900	-	_	Ma	1.2×10^{8}	(Feola et al., 2009; Ferrari and Vidal 2006)
12/22//06	Pocitos	20,000	-	_	Ma	1.2×10^{7}	(Feola et al., 2009; Ferrari and Vidal, 2006)
03/06/08	Pocitos	30,000	-	_	Ma	4.4×10^{6}	(Feola et al., 2009, Ferrari) ^b

Abbreviations: Msp – Microcystis sp., Ma – M. aeruginosa, Mfa – M. flos-aquae, Mn – M. novacekii, Mp – M. panniformis, Mw – M. wessenbergii, As – Anabaena spiroides, Ac – Anabaena circinalis, Av –Anabaena vigueri.

^a Unpublished report, Comission of the Rio de la Plata (Carp-Shin-Sohma).

^b Unpublished report, National Direction of Aquatic Resources (DINARA), Ministerio de Ganadería y Agricultura, Uruguay.

^c Unpublished report, Limnology Section, Faculty of Science Universidad de la República, Uruguay.

^d Unpublished report, Laboratory of Environmental Hygiene, Municipality of Montevideo, Uruguay.

la Plata. Thus, in the summer season of 2008–2009, the most severe drought in the last 20 years, no blooms were observed in Montevideo (Fig. 2).

4.2. Development of local capacity for microcystin analysis in Uruguay

4.2.1. Selection of assay methodology

In addition to benefits of cost and simplicity, ELISA offers major advantages such as high sensitivity and broad cross-reactivity with different microcystin congeners. Indeed, with over 80 known chemical congeners of the microcystins, but detailed toxicological studies only available for the LR variant (which is the most toxic form known), an analytical technique that lumps (rather than splits) the total microcystin content is convenient for a conservative risk assessment. As shown in Table 2, the antibody used in our assay exhibits a broad spectrum of cross reactivity with microcystin congeners.

4.2.2. Assay standardization

To facilitate calculations, instead of the classical ELISA 4parameter sigmoidal curve, a semi-log linear equation was tested. In the range of 0.2–2.5 μ g/L of microcystin, the semi-log linear regression showed a very good fit ($R^2 \ge 0.99$). The assay range is comparable to that obtained with several commercial assays and it is adequate for analyzing drinking water (WHO guideline value 1 μ g/L microcystin LR (Chorus and Bartram, 1999) as well as recreational water (Table 3)).

The successful use of ELISA for monitoring water quality requires the standardization of reagents and conditions to ensure reproducible results. The stability of kit reagents (antibodies and standards) and of assay plates were evaluated. To characterize our ELISA methodology we performed a statistical analysis of 43 independently run calibration curves performed over the period of one year with fresh kit reagents. Average data for each standard and for the equation parameters are presented in Table 4. During our detailed analysis of these results we observed an apparent higher slope for the data collected during the summer months of the year tested than for the other times tested. This observation suggested the possibility of a determinant error in these specific assays, possibly related to batch-to-batch variation in the assay reagents used. This effect, though statistically significant, was small (Fstatistic: 3.586 on 2 and 40 DF, p-value: 0.03696). These data were included in our analyzes of the stability of the slope and the intercept (Table 4), and increase the reported standard deviation in



Fig. 2. Frequency of cyanobacterial scums in Montevideo (Rio de la Plata) *vs.* Uruguay River flow (average of each summer season).

Table 2

Cross reactivity of the ELISA assay for available microcystin variants.

Microcystin variant	IC 50 ^a µg/L	% Cross reactivity
LR	0.32 ± 0.03	100
RR	0.45 ± 0.05	68
YR	0.45 ± 0.03	68
LW	0.60 ± 0.02	52
LF	0.42 ± 0.03	77

^a IC50: Concentration at the midpoint of the inhibition ELISA curve for each variant (experimental details in Methods Section).

the assay. Additional analyzes designed to look for periodicities and autocorrelations in the data did not find any such potential sources of error. We also determined that the assay kit reagents were stable when stored in the refrigerator for one year. The observed curve parameters after 1 year of reagent storage at 4 °C were: m = -19.41, b = 32.82 are within one standard deviation of the average parameters reported in Table 4, so the use of the ELISA plates and reagents give results that are reproducible over time and the reagents are stable for at least 1 year of refrigerator storage.

During routine use control charts were used to track assay performance and evaluate trends that might be occurring over time. Acceptability limits for the curve parameters m and b were defined as the mean plus/minus two standard deviations. In each plate at least one control standard of 1 µg/l was determined in triplicate and the acceptability criterion for the average result of this control was in the range of 0.8–1.2 µg/L.

4.2.3. ELISA performance in water of the Rio de la Plata

In order to check method performance, seven representative beach water samples taken from different locations in the absence of blooms, with salinities in the range 1–27 (Practical Salinity Scale) were evaluated. Samples were treated as described in the Methods section and spiked with MC-LR at three levels: 0.5, 1, and 2 μ g/L (low, medium and high range of the calibration curve). Thirty replicate samples were then measured in ELISAs performed over three consecutive days. The inter-plate reproducibility was better than 30%, and accuracy (calculated from the recovery) was between 83 and 95% over the range of concentrations studied. The limit of detection, calculated as three standard deviations of the lowest standard tested (0.5 μ g/L), was determined to be 0.3 μ g/L.

4.3. Monitoring results from the Rio de la Plata in Montevideo, 2003–2009

We classified the occurrence of cyanobacteria in three categories, "Absent", "dispersed" and "scums", as described before. The great majority of the samples of the first category have undetectable levels of microcystin (<0.3 μ g/L, the limit of detection for the assay) with occasional (less than 20% of the total) samples at the detection limit of the assay. No samples in the category of "cyanobacteria absent" were observed with significantly higher levels of microcystin than the detection limit of the ELISA (0.3 μ g/L).

In the second category, identified as "dispersed", the observed values of microcystin ranged from non detected to 65 μ g/L in Pocitos (3/6/08) and 58 μ g/L in Zabala (3/20/04), but the vast

able 3	
VHO guideline values for recreational water. ^a	

Probability of adverse health effects	MC (µg/L)	Chlorophyll a (µg/L)	Cell count (cells/mL)
Relatively low Moderate	2-4 5-20	<10 10–50	2.0 E + 04 <1.0 E + 05
High	>20	>50	>1.0 E + 05

^a Adapted from: Chorus and Bartram, 1999.

Table 4

Average parameters from 43 ELISA calibration curves performed within one year.

						$y = m (\ln x)$	(x) + b
Concentration of MC (µg/L)	0.2	0.6	1.0	1.5	2.5	m	b
% Ao	70.8	46.3	35.7	29.4	22.2	-19.54	37.92
SD	5.5	5.3	5.1	4.6	4.73	1.59	4.80
% (RSD)	7.8	11.5	14.2	15.7	21.3	8.1	12.7

Abbreviations used: SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation; MC, microcystin. % Ao, percentage of absorbance of the zero concentration (Ao).

majority of microcystin values (94.4%) were in the range of non detected to $< 20 \ \mu g/L$ leaving only a minor fraction above the moderate risk limit recommended by WHO (Table 3). The microcystins: chlorophyll-a ratio was highly variable, with a maximum value of 7.6 observed on a single sample on February 2007. The minimum toxicity rates were found in the period December–January 2008, when no microcystins were detected despite the relatively high values of chlorophyll-a.

Finally, in the category of cyanobacterial blooms called "scums" (Table 1, Supplementary material) we observed microcystin values that ranged from 17 to 20,000-30,000 µg/L. The majority of microcystin values found were in the range of 100 to 4000 µg/L. Thus, the presence of cyanobacterial scums was strongly associated with very high concentrations of microcystins in the water. While we will report below that there was a reasonably good correlation between cells per mL or chlorophyll-a measurements and microcystin content on average in these experiments, if we look more closely at individual samples in the "scum" category we can see that the correlations are not consistent at the individual sample level. The variability of toxicity per biomass unit is easily observed when the microcystin:chlorophyll-a ratio is evaluated (Table 1, Supplementary material); this ratio ranged from 0.01 (very low toxicity rate) in November-December 2004 to a value of 11 in December 2006 and March 2008. There was also high variability between cyanobacterial cell numbers and microcystin content at the individual sample level in these scums.

4.4. Aggregated correlations between various measurements

With grouped chlorophyll-a and microcystins data over a 6-year period (Table 5) there are no significantly different increases in chlorophyll-a content and microcystin content as we go from water in which cyanobacteria were not detected visually to water in which disperse colonies were observed (p > 0.05, ANOVA, Tukey's correction). These results also indicate that chlorophyll-a would not be a good indicator of the presence of cyanobacteria in the intermediate category (disperse colonies). When scums were observed, there were very large (and significant, p < 0.001) increases in both chlorophyll-a and microcystin content, but there was also a very large standard error observed in these values.

When we evaluate the individual samples using all the data, which is dominated by the results when there were dispersed

Table 5

Chlorophyll-a and microcystin levels in water samples from the Rio de la Plata.

	Not detected	Dispersed	Scum
Chlorophyll a (200	3–2009)		
Ν	332	172	25
Average	8.8	18.5	3500
Standard error	20.0	28.8	1900
Microcystins (2003	6–2009)		
Ν	94	107	28
Average	nd	3.9	3300
Standard error	-	9.7	1900

N: number of samples.

cvanobacterial colonies present, a third of the variance (R^2 value) of the log of the chlorophyll content is explained by the log of the microcystin concentration, and 60% of the variance of the log of the chlorophyll content is explained by the log of the microcystin concentration. If we focus on evaluating only the individual samples during scums, we do not find a linear relationship between either the cvanobacterial cell content or the chlorophyll-a content and the microcystin concentration. On a log-log scale, a linear model shows that only 18% of the variance (R^2 value) in the microcystin concentration can be explained by variations in the chlorophyll content, and only 30% of the variance in the microcystin concentration can be explained by variations in the cyanobacterial cell content. Thus, the correlations become progressively weaker as we preferentially examine the samples with higher concentrations of microcystin present. This observation is biologically reasonable in that the highest concentrations of microcystin tend to be observed in water samples during and subsequent to lysis of large numbers of cells and because microcystins are very stable chemically and are broken down very slowly in the environment (Chorus and Bartram, 1999).

4.5. Risk management approach

In a monitoring program for algal blooms in recreational water, it is critical to rapidly classify the potential risk of the blooms. To this end, beaches and the surrounding water were visually monitored throughout the summer seasons for detecting the presence of either dispersed cvanobacterial colonies ("dispersed") or accumulated colonies ("scums"). Recreational use of the beaches in the summer is a major attractant for tourism so there is a great interest to maintain the beaches open and accessible. When no cyanobacterial colonies were observed the beaches were kept open, and as reported above, microcystin levels in all of the samples tested were consistent with this being a sound decision from a public health perspective (microcystin levels $<0.3 \mu g/L$). On the other hand, when scums were observed, microcystin concentrations were in the range of "high probability of adverse health effects" in 27/28 (96.4%) of the samples tested and in these cases people are warned not to swim. These same samples would also have been scored as "high probability of adverse health effects" by their chlorophyll-a content or cell counts.

The samples classified as "dispersed" are the most critical for decision making. Fig. 3 shows the microcystin and chlorophyll-



Fig. 3. Microcystins vs. chlorophyll-a in the samples of the "dispersed" category. The WHO guideline risk limits for microcystin-LR ($20 \mu g/L$) and chlorophyll-a ($50 \mu g/L$) are shown as dashed lines.

a content of the individual samples in this category. As mentioned before, following the WHO guideline for moderate risk (<20 μ g/L of microcystin-LR equivalents), only 6 out of the 107 samples (5.6%) will indicate that the water is not suitable for recreational use, and so availability of the microcystins results in a timely fashion helped guide decisions as to when to close beaches for swimming and bathing in order to protect human health. On the other hand, using the chlorophyll-a WHO guideline value for high risk (50 μ g/L) only one of these 6 samples would have been correctly classified, while the rest would have been wrongly considered harmless. In addition, 11 of the "dispersed" category samples (10%) presented high chlorophyll-a results (>50 μ g/L) that would have wrongly led to closure of the beaches.

4.5.1. Chlorophyll a and cyanobacterial count as risk indicators

We classified samples in which at least two of the three cells, chlorophyll-a, parameters—total and microcystin concentration-were measured, as containing low, medium or high levels of each component evaluated according to the WHO guideline values. When we examined the 21 samples where both total cyanobacterial cells and microcystin concentration were measured, we observed agreement between 19/21 of the samples. The two samples that did not agree were both cases of medium cells, low microcystins, suggesting that assessment of risk by quantification of total cell number alone would cause the beaches to be closed more often than is necessary. For the 23 samples where we had data for both total cell number and chlorophyll content, the values were in agreement 20 out of 23 times. For the three samples where these measurements did not agree, there were 2 times where chlorophyll values were high and total cells were medium, and once chlorophyll was medium and cells were low suggesting that chlorophyll a could overestimate the cyanobacterial cell count present. However, these conclusions are preliminary due to the low number of cell counts available in the intermediate category.

When we examined 220 samples where both total chlorophyll and microcystin concentration were measured, we observed agreement between 155/220 of the samples. In the intermediate category of risk (15 samples with microcystin in the range $4-20 \mu g/$ L) the chlorophyll values underestimated the true microcystin content in 30% of the cases. To summarize the main conclusions, in Table 6 we compare the predictive values, specificity and sensitivity of chlorophyll determination with visual detection of scums, as indicators of samples with high probability of adverse health effects (microcystin concentration higher than 20 $\mu g/L$). Both tests show similar sensitivity (about 80%) and negative predictive values (97%). Interestingly, the visual detection test shows much higher positive predictive values (96.0 *vs.* 67.6% for chlorophyll) and higher specificity (99.5 *vs.* 93.7% for chlorophyll).

5. Discussion

The occurrence of cyanobacterial scums in the Rio de la Plata was first observed more than 30 years ago (1981). *Microcystis*, the dominant genera in the Rio de la Plata produce microcystins, potent liver toxins identified as a threat to human and animal health for more than 100 years (Francis, 1878).

Our first question was whether we could design and implement an ELISA-based monitoring program to quantify microcystin concentrations in the Rio de la Plata during harmful cyanobacterial blooms. The answer to this question is a very strong yes, and this is a strong argument for the utility of this approach for routine monitoring purposes in developing countries based upon the low assay cost per sample and the lack of necessity for sophisticated analytical equipment. We have supplied assay kits and training for technicians in regulatory agencies and/or drinking water purveyors in Uruguay, Paraguay, Perú and Guatemala, and for the binational (Argentina–Uruguay) FrePlata Project (Environmental Protection of the Río de la Plata [http://www.freplata.org]).

Our second question was what concentrations of microcystins were present in the Rio de la Plata beaches of Montevideo during the blooms in the summer months? As shown in Table 5 they are very high during scums, and can occasionally exceed WHO guidelines for recreational water use during the presence of dispersed colonies of cyanobacteria (Fig. 3). Thus, a program for rapidly measuring microcystin levels in these beach water should be an integral part of any strategy for appropriate protection of public health.

Our third question was whether measurements of cyanobacterial cells or of chlorophyll-a can be used as surrogate measurements to estimate the actual amount of the cyanobacterial toxins present. The correlation between cells per mL or chlorophyll-a, and microcystins tends to be best at the lower levels of chlorophyll-a and microcystins, and to break down in the samples with very high concentrations of these components. The lack of correlation between chlorophyll-a and microcystin concentrations has been reported before (Ha et al., 2011). The use of either cyanobacterial count or chlorophyll as risk indicators would cause the beaches to be closed more often than necessary and in the case of chlorophyll

Table 6

```
Predictive values, specificity and sensitivity of chlorophyll-a determination vs. visual detection as indicators of recreational water health risk.
```

		High probability of adverse he	ealth effects (WHO) MC $>$ 20 $\mu g/L$ (high MC)	
		Positive	Negative	
Chlorophyll test	Positive Chlo >50 μg/L	True Positive High Clo/High MC 25	False Positive High Chlo/MC < 20 12	→ Positive predictive value 67.6%
	Negative Chlo ≤50 μg/L	False Negative Low Chlo/High MC 5 ↓ Sensitivity = 83.3%	True Negative Low Chlo/MC < 20 178 ↓ Specificity = 93.7%	→ Negative predictive value 97.3%
Visual detection test (scum detection)	Positive (scum)	True positive Scum/MC > 20 24	False positive Scum/MC < 20 1	→ Positive predictive value 96.0%
	Negative (no scum)	False Negative No scum/MC > 20 6 ↓ Sensitivity = 80.0%	True Negative No scum/MC < 20 189 ↓ Specificity = 99.5%	→ Negative predictive value 96.9%

Positive predictive value = TP/(TP + FP); negative predictive value = TN/(FN + TN). Sensitivity = TP/(TP + FN); specificity = TN/(FP + TN). there is also a high percentage of false negatives so it would not be protective for public health.

It is noteworthy that the visual detection of scums showed much higher positive predictive value and better specificity than chlorophyll—a (Table 6). Therefore, the criterion locally adopted for beach management, that is, a) warn not to swim in scums and, b) keep the beaches open in the presence of dispersed colonies unless microcystin analysis indicates high risk, seems appropriate for achieving a balance between protecting public health and keeping the beaches open for tourism.

Our fourth, and final, question was whether we could identify seasonal or other factors that are responsible for fluctuations in the extent of harmful cyanobacterial blooms and production of microcystins in the Rio de la Plata. Hydrological records show evidence of an increase both in rainfall and runoff in the La Plata Basin after 1970. El Niño events have also had an impact on stream flows in the basin. In the middle section of the Paraná River, the four largest discharges on record followed the four El Niño events of 1905, 1982-1983, 1992, and 1998. In a study to be reported elsewhere (manuscript in preparation), we will present monitoring data from the Rio de la Plata for 2009 and 2010 (La Niña and El Niño years, respectively) that suggest that flow rates of the Uruguay River into the Rio de la Plata, with concurrent impacts on river salinity, nutrient content, and turbulence, are a critical determinant of the occurrence of harmful cyanobacterial blooms on and around the beaches of Montevideo. The actual mechanisms connecting water flow rate and microcystin production in the Rio de la Plata are not well understood. It is known that salinity can affect cyanobacterial growth. In addition, some strains produce as much as 2- to 4fold more toxins at high phosphorus levels, and non-nitrogen fixing species such as Microcystis and Oscillatoria produce more toxins under nitrogen-rich conditions. Microcystis produced higher concentrations of microcystins when aggregated in a stationary state under conditions of low growth rate (Ha et al., 2011). Further studies will be required to determine which of these factors are critical in the causation of harmful cyanobacterial blooms in the Rio de la Plata.

6. Conclusions

Limited analytical capacity in developing countries may hide serious environmental problems, hampering risk assessment and management as well as the establishment of preventive and remediation measures. Local development of a microcystin ELISA made possible the establishment of a sustainable monitoring program that revealed peaks of extremely high concentrations of toxins, and demonstrated the poor value of commonly used predictive parameters for risk evaluation. Moreover, our results show that a simple and practical criterion, the visual detection of scums, can be used as a front line element for rapid beach management decisions, complemented with easy and fast laboratory methods.

Acknowledgments

This work was supported in part by a NIH Fogarty International Center training grant (TW-05718; "International Training Program in Environmental Immunoassay") under its International Training and Research in Environmental and Occupational Health Program. We also acknowledge support from PEDECIBA (Program for the Development of Basic Science), Uruguay, National Agency of Research and Innovation (ANII, Uruguay) and CSIC, Universidad de la República, Uruguay.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.052.

References

- Ame, M.V., del Pilar Diaz, M., Wunderlin, D.A., 2003. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina): a field and chemometric study. Environ. Toxicol. 18, 192–201.
- Association, A.P.H. (Ed.), 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC.
- Azevedo, S.M., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology 181–182, 441–446.
- Benintende, S.M., Benintende, M.C., Sanchez, C.I., De Battista, J.J., Sterren, M.A., Saluzzio, M.F., 2008. Cyanobacteria in rice fields from Entre Rios Province. Rev. Argent. Microbiol. 40, 229.
- Blom, J.F., Robinson, J.A., Juttner, F., 2001. High grazer toxicity of [D-Asp(3),(E)-Dhb(7)]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. Toxicon 39, 1923–1932.
- Box, P.G., Beresford, A.V., Roberts, B., 1981. Immune responses of chickens to IB vaccines. Vet. Rec. 108, 219.
- Brena, B.M., Diaz, L., Sienra, D., Ferrari, G., Ferraz, N., Hellman, U., Gonzalez-Sapienza, G., Last, J.A., 2006. ITREOH building of regional capacity to monitor recreational water: development of a non-commercial microcystin ELISA and its impact on public health policy. Int. J. Occup. Environ. Health. 12, 377–385.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. E & FN Spon/Chapman and Hall Edn, London.
- Conti, A.L., Guerrero, J.M., Regueira, J.M., 2005. Levels of microcystins in two Argentinean reservoirs used for water supply and recreation: differences in the implementation of safe levels. Environ. Toxicol. 20, 263–269.
- De Leon, L., Yunes, J.S., 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River. S. Am. Environ. Toxicol. 16, 110–112.
- Dorr, F.A., Pinto, E., Soares, R.M., Feliciano de Oliveira e Azevedo, S.M., 2010. Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. Toxicon 56, 1247–1256.
- Feola, G., Brena, B.M., Risso, J., Sienra, D., Echezarreta, M., 2009. Programa de Monitoreo de playas y costa de Montevideo. www.montevideo.gub.uy/ ciudadania/desarrollo-ambiental/documentos. In: Annual Reports.
- Ferrari, G., Méndez, S., 2000. Reports of Phytoplankton Species Producers of Coastal Water Discolorations in Uruguay. Iheringia, Sér. Bot., Porto Alegre.
- Ferrari, G., Méndez, S., 2004. Harmful algal monitoring in Uruguay. In: Hall, S., Etheridge, S., Anderson, D., Kleindienst, J., Zhu, M., Zou, Y. (Eds.), Harmful Algae Management and Mitigation. Asia Pacific Economic Corporation, Singapore, APEC Publication # 204-MR-04.2. pp. 144–148.
- Ferrari, G., Vidal, L., 2006. Fitoplancton de la zona costera uruguaya: Río de la Plata y océano atlántico. In: Menafra, R., Rodríguez-Galllego, L., Scarabino y, F., Conde, D. (Eds.), Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya. Vida Silvestre, Uruguay, pp. 45–56.
- Francis, G., 1878. Poisonous Australian lake. Nature 18, 11-12.
- Ha, J.H., Hidaka, T., Tsuno, H., 2011. Analysis of factors affecting the ratio of microcystin to chlorophyll-a in cyanobacterial blooms using real-time polymerase chain reaction. Environ. Toxicol. 26, 21–28.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E., Antunes, M.B., de Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S., Azevedo, S.M., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. N. Engl. J. Med. 338, 873–878.
- Johnson, H.E., King, S.R., Banack, S.A., Webster, C., Callanaupa, W.J., Cox, P.A., 2008. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. J. Ethnopharmacol. 118, 159–165.
- Lehman, E.M., 2007. Seasonal occurrence and toxicity of Microcystis in impoundments of the Huron River, Michigan. USA W. Res. 41, 795–802.
- McElhiney, J., Drever, M., Lawton, L.A., Porter, A.J., 2002. Rapid isolation of a singlechain antibody against the cyanobacterial toxin microcystin-LR by phage display and its use in the immunoaffinity concentration of microcystins from water. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5288–5295.
- Méndez, S., Ferrari, G., 2002. Floraciones Algales Nocivas en Uruguay: Antecedentes, proyectos en curso y revisión de resultados. In: Sar, E., Ferrario y, M., Reguera, B. (Eds.), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, pp. 271–288.
- Nagy, G.J., Carlos Martínez, M., Caffera, R.M., Pedrosa, G., Forbes, E.A., Perdomo, A.C., Loopez Laborde, J., 1998. In: Wells, P.G., Daborn, G.R. (Eds.), "The Rio de la Plata: an Environmental Overview": an EcoPlata Project Background Report. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada, pp. 17–70 (Chapter 2).
- Piccini, C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., Pernthaler, J., 2006. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6560–6568.
- Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J., Boyer, G.L., Twiss, M.R., Bridgeman, T.B., Wilhelm, S.W., 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003

and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. Environ. Sci. Technol. 39, 4198–4205.

- Sant Anna, C.L., de Carvalho, L.R., Fiore, M.F., Silva-Stenico, M.E., Lorenzi, A.S., Rios, F.R., Konno, K., Garcia, C., Lagos, N., 2011. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain, isolated from Sao Paulo–Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. Neurotox. Res. 19, 389–402.
- Sienra, D., Ferrari, G., 2006. Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo. In: Menafra, R., Rodríguez-Galllego, L., Scarabino y, F., Conde, D. (Eds.), Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre, Uruguay, pp. 413–419.
- Sournia, A., 1978. Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology 6. UNESCO, Paris.
- Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T., Abe, D.S., 2008. The ecological dynamics of Barra Bonita (Tiete River, SP, Brazil) reservoir: implications for its biodiversity. Braz. J. Biol. 68, 1079–1098.
- Unrein, F. O'Farrell, I., Izaguirre, I., Sinistro, R., dos Santos Afonso, M., Tell, G., 2010. Phytoplankton response to pH rise in a N-limited floodplain lake: relevance of N2-fixing heterocystous cyanobacteria. Aquat. Sci. 72, 179–190.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J., Bakker, G.J., 2007. Toxins of cyanobacteria. Mol. Nutr. Food Res. 51, 7–60.
- von Sperling, E., Souza, A.D., 2007. Long-term monitoring and proposed diffuse pollution control of a tropical reservoir. W. Sci. Technol. 55, 161–166.
- Xu, Q., Chen, W., Gao, G., 2008. Seasonal variations in microcystin concentrations in Lake Taihu, China. Environ. Monit. Assess. 145, 75–79.



Comparison of Three Antihapten VHH Selection Strategies for the Development of Highly Sensitive Immunoassays for Microcystins

Macarena Pírez-Schirmer,^{†,‡} Martín Rossotti,[†] Natalia Badagian,[‡] Carmen Leizagoyen,[§] Beatriz M. Brena,^{*,‡} and Gualberto González-Sapienza^{*,†}

[†]Cátedra de Inmunología and [‡]Cátedra de Bioquímica, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay, 11200

[§]Parque Lecocq, Intendencia de Montevideo, Montevideo, Uruguay, 12600

Supporting Information

ABSTRACT: Owing to their reproducibility, stability, and cost-effective production, the recombinant variable domains of heavy-chain-only antibodies (VHHs) are becoming a salient option as immunoassay reagents. Recently, there have been several reports describing their application to the detection of small molecules (haptens). However, lacking the heavy-light chain interface of conventional antibodies, VHHs are not particularly apt to bind small analytes and failures are not uncommon. Here we describe the construction of a VHH phage display library against the cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR and its selection using competitive panning



and two novel panning strategies. The outcome of each strategy was evaluated by a large-scale screening using *in vivo* biotinylated nanobodies. The three methods selected for different nonoverlapping subsets of VHHs, allowing one to optimize the immunodetection of the toxin. The best results were obtained by promoting the isolation of VHHs with the slowest k_{off} (off-rate selection). Among these, the biotinylated nanobody A2.3 performed in ELISA with excellent recovery and high sensitivity, IC50 = 0.28 $\mu g/L$, with a limit of detection that is well below the most rigorous guidelines for the toxin. While it may be case-specific, these results highlight the importance of exploring different panning strategies to optimize the selection of antihapten nanobodies.

he variable domain (VHH) of the heavy-chain-only lacksquare antibodies found in camelids and sharks are gaining widespread attention as advantageous recombinant reagents for immunoanalysis. There are several reasons for that including (a) a remarkable physicochemical stability that allows them to work at extreme temperatures^{1,2} and tolerate high concentrations of nonaqueous solvents,³ (b) a fine-tuned specificity resulting from a strict conformation-dependent recognition of their epitope,⁴ and (c) high-yield production in *E. coli* or yeast as multipurpose peptide tagged antibody fragments (nanobodies).⁵ In addition, since their antigen binding site sits exclusively in a single domain, their selection from phage display libraries of modest size is straightforward, which is not the case of conventional antibody libraries where the original combination of heavy and light chain variable domains that gave place to the immune specificity is shuffled during the construction of the library.

Most reports on diagnostic and analytical applications of VHHs are targeting large molecules. This is probably a direct consequence of the fact that VHHs lack the heavy/light chain interface that typically forms the binding pocket that accommodates small molecules (haptens) in conventional antibodies.⁶ In spite of that, a number of pioneer papers demonstrated that antihapten VHHs could be isolated from

immune libraries, although the reported affinity for the unconjugated hapten was moderate. $^{1,2,5,7-9}$ Most of these VHHs were isolated from phage display libraries by unspecific elution with triethylamine, pH 11. Using triclocarban (TCC) as a model hapten, we showed in 2011 that by competitive selection of the phage library with decreasing concentrations of the analyte it was possible to obtain high affinity VHHs to TCC and set up a sensitive VHH based immunoassay for this bactericide.¹⁰ With a similar selection strategy, we also developed a highly sensitive and robust VHH assay for the pyrethroid metabolite 3-phenoxybenzoic acid.³ More recently, using similar panning strategies, a number of VHHs against additional haptens were isolated, allowing the detection of ochratoxin,¹¹ aflatoxin,¹² and tetrabromobisphenol A¹³ with very low detection limits and excellent recovery from complex matrixes. These developments highlighted the thermal and chemical robustness of VHHs and their versatility as recombinant building blocks that in the case of the antiochratoxin VHH allowed the development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion tracer.¹

 Received:
 April 2, 2017

 Accepted:
 May 11, 2017

 Published:
 May 11, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

While the use of competitive selection of the phage library with decreasing concentrations of the analyte proved to be a valuable tool for the development of sensitive small-analyte VHH immunoassays, this strategy may not always be the most useful approach. Here we report on the development of a VHH assay for microcystin-LR (MC-LR) and show evidence of this. MC-LR (995 Da) is an interesting model hapten because of its environmental relevance. This compound (Table 1) is the most widespread congener among the family of more than 80 hepatotoxins produced by different species of cyanobacteria commonly associated with blue algal blooms.¹⁴⁻¹⁶ The intensification of agriculture, increased pollution, and global warming have increased the incidence and magnitude of toxicogenic blooms, and strict guideline limits for the occurrence of these toxins in drinking and recreational waters have been issued. As proof of this, in addition to the World Health Organizations provisional guideline value of 1 μ g/L of MC-LR for drinking water,¹⁴ the U.S. Environmental Protection Agency has recently issued a 10-day health advisory concentration below 0.3 μ g/L in drinking water for preschool children.¹⁷

In order to develop a nanobody-based assay with a detection limit below these guideline values, we built a VHH phage library from an immune llama and selected VHHs using different selection strategies. Different panels of VHH sequences were selected with each panning strategy providing a larger source of candidate nanobodies to improve the assay performance.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Microcystin LR and other congeners were purchased from Enzo Life Sciences (Exeter, U.K.). All restriction enzymes and molecular biology reagents were from (Fermentas Thermo Fisher, CA). Other reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) unless otherwise stated. The pComb3X vector (a kind gift of Dr. Carlos Barbas, III, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). The conjugates MC-LR-bovine serum albumin (MC-BSA) and MC-LR-ovalbumin (MC-OVA) were prepared by a modification of the alkenehydrothiolation method described before.^{18,19} Briefly, the amine groups of the protein were reacted with SPDP (succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate) (Thermo Fisher) in phosphate buffered saline (PBS) for 2 h, and then the pyridyldithio groups were reduced with an excess of dithiothreitol (DTT) to generate thiol groups. The excess of DTT was then removed by gel filtration on PD-10 columns (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA), and the pH of the thiolated protein was adjusted to 12 with 5 M NaOH and immediately mixed with MC-LR dissolved in acetonitrile. After reacting for 2 h, the conjugate was extensively dialyzed against PBS and kept at -20 °C until used. The protein-hapten conjugates were characterized by MALDI-TOF (Figure S1), and the average number of MC-LR moieties per molecule of carrier was 3.8 and 4.7 for OVA and BSA, respectively.

Immunization. A llama (*Lama glama*) was immunized subcutaneously with 500 μ g of the OVA MC-LR conjugate in Freund incomplete adjuvant. Three additional immunizations were performed every 2 weeks. In each opportunity, a small blood sample was drawn to evaluate the anti-MC response using an MC-BSA ELISA. At 10 days after the final booster, 150 mL of blood was collected with anticoagulant. All activities were carefully performed to establish high standards of animal

welfare and were approved by the animal ethics committee of the Lecocq Municipal Zoo of Montevideo.

Library Construction. Peripheral blood mononuclear leukocytes were isolated on Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) density gradient following the manufacturer's instructions, and total RNA was then extracted using TRIzol reagent (Thermo Fisher). The integrity of the RNA was assayed on 1% Agarose gels and was reverse transcribed to cDNA using the superscript III first-strand synthesis system (Thermo Fisher) following the instructions of the supplier. The cDNA was then used to amplify the VHH/VH genes using the forward primers, VH1 (catgccatgactcgcggcccaggcggccatggcccaggtgcagctggtgcagtctgg), VH3 (catgccatgactcgcggcccaggcggccatggccgaggtgcagctggtggagtctgg), VH4 (catgccatgactcgcggccatggcggccatggccaggtgcagctgcaggagtcggg), and the reverse primer JH (ccacgattctggccggcctggcctgaggagacrgtgacctgggtcc) (where R = A or G). The ~400 bp PCR products were gel-purified and then cloned into the phagemid vector pComb3X using the SfiI restriction sites introduced by the primers (underlined). The ligated vector was then purified by isopropyl alcohol precipitation and was used to transform supercompetent E. coli ER2738 (Lucigen, Middleton, WI). The transformed cells were cultured and were superinfected with helper M13KO7 (Invitrogen) at the beginning of the exponential phase to generate the phage library.

Library Selection. Microtiter ELISA strips (Maxisorp, Nunc) were coated with 0.5 μ g/mL of MC-BSA (100 μ L/ well) overnight at 4 °C and then blocked with 3% BSA in PBS (250 μ L/well). The phage library (10¹² transducing units) was mixed with PBS, 0.05% Tween 20 (PBST) containing 1% of BSA and was dispensed in three microtiter wells. After 2 h, the plate wells were washed 10 times, incubated half an hour in PBST at 4 °C, and washed again 10 times, after which the bound phages were eluted and selected following three different strategies (Figure 1): (1) sequential competition, the bound phages were eluted by competition using 100, 20, and 1 μ g/L of MC-LR in the first, second, and third round of panning, respectively. (2) Simultaneous competition, the bound phages were eluted by incubation with 100 mM glycine-HCl, pH 2.7



Figure 1. Schematic representation of the three strategies of panning used to isolate the antimicrocystin nanobodies: sequential competition (1), simultaneous competition (2), and off-rate selection (3).

F1.1 H6.1 G9.1 B10.1 C9.1	FR1 MAQVQLVQSGGSVQIGGSLRLSCLVS .EEIA. .EEL.T.DA.	CDR1 GRIFSNYA 	FR2 MAWFRQPAGKEREFVAR A VGAS. .GA	CDR2 ISWNGGST S.ST. .N.SD.R. .N.SD.R.	FR3 YYGDSVKGRFTISRDNVRNTAYLQMTSLKPEDSAVYYC AA. AN. A A. A A. A	CD3 AVGGAKDILYHTERYGY DR SR SR	FR4 WGQGTQVTVSS (5) (2) (2)
A2.3 D9.2	MAQVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GGISRVNV	AGWYRQAPGQQREMVAV	IRSGGRI-	NYADFVKGRFTFSRDDAKQTIYLQMDNLKSEDTAVYYC DPA	YGSLLETGTFQYREY	WGQGTQVTVSS (9) (2)
H11.3 F11.3 B2.2 C3.2	MAQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS EEA.DK.	GHIPGMVT .R .R	GAWFRQAPEKEREFVAS AT	VRWRGT S S T	DYADSVKGRFTLSRDDAKQTIFLQMDNLKPEDTAVYYC .QS.VY.N. YN.N.VY.N. .N.RN.V.NN.	AARFTSYSDRYDYTSSDEYPY N.HH. AHH. HH.	WGRGTQVTVSS

Figure 2. Amino acid sequence alignment of VHH clones selected using different panning strategies. Green, red and black are used to denote VHH sequences isolated using sequential competition, simultaneous competition or off-rate selection, respectively. The sequences are grouped according to the similitude of their CDRs. The frequency of repeated sequences is shown between brackets. Hyphens and dots represent gaps and identical residues, respectively.



Figure 3. Inhibition curves obtain with VHH isolated by sequential competition. Standard curves were normalized by expressing the experimental absorbance values (A), as (A/A_0) × 100, where A_0 is the absorbance value at zero analyte concentration. Values were fitted to a four-parameter logistic equation using the Origin Microcal 7.5 package software. ELISAs were performed in triplicates, mean, and standard deviation are indicated.

(100 μ L/well) for 10 min, the eluted phages were transferred to an Eppendorf tube, immediately neutralized with 2 M Tris base, supplemented with MC-LR (10 fg/mL), and incubated for 30 min. After that, the phages were dispensed (50 μ L/well) in 6 wells coated with MC-BSA, and after 1 h the unbound phages were collected. (3) Off-rate selection, the bound phages were incubated overnight with 100 μ g/L of MC-LR in PBST, and after thorough washing, the phages were eluted by incubation with trypsin (10 mg/mL) in tris buffer saline for 30 min.

Nanobody Screening. After panning, the pool of selected VHH genes were gel purified from the SfiI digested phagemid and cloned *en masse* in the pINQ-BtH6 vector.²⁰ For overexpression of the biotin ligase of *E. coli*, the ligated vector was purified and transformed in electrocompetent BL21 (DE3) *E. coli* cells harboring the pCY216 vector.²¹ For high-throughput screening, single colonies were inoculated in 500 μ L of biotinylation medium (LB containing, 50 μ g/mL kanamycin, 35 μ g/mL chloramphenicol, 0.04% of L-arabinose, and 100 μ M D-biotin) in 96 deep well culture blocks (Greiner, Monroe, NC). The expression of the nanobodies was induced at Abs 600 nm = 0.5 AU with 3 μ M IPTG for 4 h at 37 °C with shaking. After centrifugation, the supernatants were collected

and assayed in ELISA plates coated with MC-BSA, in the presence or absence of 10 μ g/L of MC-LR. The bound nanobodies were detected with a streptavidin-peroxidase (HRP) conjugate (Pierce, Rockford, IL). For the initial assessment of the assay sensitivity, individual clones were produced in identical conditions in 10 mL cultures, and the biotinylated nanobodies were extracted by sonication from the cells pellets and titrated on plates coated with 0.5 μ g/mL (100 μ L/well) of MC-BSA to select the appropriate dilution (readout ~1 AU) to be used for the competitive curves.

Nanobody Expression and Microcystin Competitive ELISA. Large scale production of individual biotinylated nanobodies was performed in shaker flasks using the above culture conditions. The cell pellet was collected by centrifugation, and after sonication the cell extract was further incubated (1 h) with biotin (100 μ M) to increase the rate of biotinylation of the nanobodies.²⁰ After centrifugation at 10 000g, the biotinylated nanobodies were purified on Ni-NTA agarose columns (GE Life Sciences), dialyzed against PBS and kept at -20 °C until used. The coating conditions and nanobody concentration for the ELISA assay were optimized by checkerboard titration. The ELISA plates were coated overnight with MC-BSA at 4 °C and blocked using 1% gelatin (Sigma) in PBS. A volume of 40 μ L of sample or MC-LR standards (triplicates) supplemented with 10 μ L of 1 M Tris, 0.3 M NaCl, 0.2 M EDTA, 1% BSA, pH 7.4 buffer were combined with 50 μ L of the biotinylated nanobody and incubated for 1 h and washed. Then the wells were incubated with 100 μ L of streptavidin-HRP, and after extensive washing, the peroxidase activity was measured by addition of 100 μ L of TMB peroxidase substrate (0.4 mL of 6 mg of 3,3',5,5'tetramethylbenzidine in 1 mL of DMSO + 0.1 mL of 1% H₂O₂ in water, in a total of 25 mL of 0.1 M acetate buffer, pH 5.5). After 15 min, the enzyme reaction was stopped by the addition of 50 μ L of 2 N H₂SO₄, and the absorbance was read at 450 nm using a Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, GE). The limit of detection (LOD) was calculated as concentration of MC-LR that corresponds to the readout of the blank plus 3 standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Library Construction and Panning by Sequential Competition. The library was prepared out of 10^8 peripheral blood leukocytes obtained from the immunized llama, with a final size of 4.3×10^7 clones. Three panning strategies were used that are schematized in Figure 1. Initially, the library was selected on BSA-MC-LR by competitive elution of the phage with decreasing concentrations of the toxin (sequential competitive selection) using 100, 20, and 1 µg/L MC-LR in

Analytical Chemistry



Figure 4. Inhibition curves obtain with VHHs isolated by simultaneous competition. Standard curves were normalized by expressing the experimental absorbance values (*A*), as $(A/A_0) \times 100$, where A_0 is the absorbance value at zero analyte concentration. Values were fitted to a four-parameter logistic equation using the Origin Microcal 7.5 package software. ELISAs were performed in triplicates; mean and standard deviation are indicated.



Figure 5. Inhibition curves obtain with VHHs isolated by off-rate selection. Standard curves were normalized by expressing the experimental absorbance values (*A*), as (A/A_0) × 100, where A_0 is the absorbance value at zero analyte concentration. Values were fitted to a four-parameter logistic equation using the Origin Microcal 7.5 package software. ELISAs were performed in triplicates; mean and standard deviation are indicated.

successive rounds of panning. The VHH genes carried by the phage isolated in the third round of panning were cloned in mass into the expression vector pINQ-BtH6, transformed into *E. coli* BL21 carrying the pCY216 plasmid and grown individually in 96 deep-well blocks, as described by Rossotti et al.²⁰ This system allows producing nanobodies with a 15-mer peptide tag that carries a Lys residue that is biotinylated *in vivo* by the overexpressed biotin ligase of *E. coli*. The 96 clones were then assayed on BSA-MC-LR plates in the presence or absence of 10 μ g/L of MC-LR. Clones showing the highest inhibition

Table 1. MC-LR Structure and Congener Cross-Reactivity (Crs-r) of the Nanobody ELISA^a

	VHH A	2.3	VHH H11.3			
microcystin	IC50 μ g/L	Crs-r %	IC50 µg/L	Crs-r %		
LR	0.37 ± 0.02	100	1.19 ± 0.04	100		
DMLR	0.47 ± 0.01	79	1.35 ± 0.04	88		
LA	1.2 ± 0.1	30	3.3 ± 0.3	36		
LY	6.7 ± 2.7	6	5.4 ± 0.4	22		
HtyR	0.61 ± 0.03	61	1.5 ± 0.1	79		
YR	1.01 ± 0.03	37	2.8 ± 0.3	43		
LW	6.7 ± 0.5	6	1.7 ± 0.1	70		
WR	1.12 ± 0.05	33	2.1 ± 0.2	56		
DMRR	0.86 ± 0.04	43	1.42 ± 0.03	84		
RR	0.83 ± 0.05	45	1.1 ± 0.1	106		
LF	6.0 ± 0.5	6	≥50 Mdha	≤2		



^{*a*}DM, the MeAsp is demethylated; HtyR, homotyrosine substitutes for the leucine residues. Cross-reactivity (%) was calculated as IC50 (MC-XX)/IC50 (MC-LR)/100. All measurement were performed in triplicates.

were selected and sequenced, Figure 2. Five different clones were identified. There was a high degree of similitude in their CDR3. The assay sensitivity attained with each of these clones is shown in Figure 3. The concentration of MC-LR producing 50% inhibition (IC50) was similar but unfortunately rather high to detect the toxin at the recommended guideline values.

Panning by Simultaneous Competition. When the error in the measurement of the signal and nonspecific binding are low, the key element that drives the sensitivity of competitive assays is the affinity of the antibody for the analyte in solution.²² Competitive elution (sequential competitive selection) during panning promotes the selection of VHHs that cross-react with the analyte but not necessarily selects the clones with the highest affinity for the analyte. This is because the competition does not occur simultaneously, first the phage is bound to the immobilized hapten, and after washing, the phage needs to detach from the phage in order to be able to react with the competing analyte in solution. This step could limit the selection of VHHs that bind to the immobilized hapten with slow k_{off} (which typically associates with high affinity clones). To avoid this, we devised a panning strategy that is based on the simultaneous competition between the immobilized hapten and competing analyte. To this end, in each round of panning the phages were initially enriched by selection on the immobilized hapten, eluted using acidic conditions and neutralized. This enriched fraction was then incubated with substoichiometric amounts of the analyte, let to compete, and then transferred to fresh wells coated with the immobilized hapten. Under these conditions, the phage borne nanobodies with the highest affinity would be isolated because they will be forming immunocomplexes and thus will not be able to react with the immobilized hapten. After three rounds of panning using this strategy, the VHH genes were transferred to

Table 2. Recovery	(%)	from	Water	Samples	Spiked	with MC-LR ^a
-------------------	-----	------	-------	---------	--------	-------------------------

sample	unspiked	spiking with MC-LR 0.2 μ g/L		spiking with M	C-LR 0.5 μ g/L
ID	(MCs µg/L)	(MCs µg/L)	recovery (%)	(MCs µg/L)	recovery (%)
DB1	0.94 ± 0.07	ND	ND	1.53 ± 0.12	118
DB2	0.48 ± 0.09	ND	ND	0.89 ± 0.03	82
DP1	0.94 ± 0.07	ND	ND	1.47 ± 0.06	106
DY1	1.02 ± 0.01	ND	ND	1.55 ± 0.14	106
DY2	0.42 ± 0.04	ND	ND	0.97 ± 0.05	110
DY3	0.84 ± 0.06	ND	ND	1.36 ± 0.07	104
DY4	0.37 ± 0.02	ND	ND	0.96 ± 0.05	118
TB1	<lod< td=""><td>ND</td><td>ND</td><td>0.60 ± 0.01</td><td>120</td></lod<>	ND	ND	0.60 ± 0.01	120
TY1	<lod< td=""><td>ND</td><td>ND</td><td>0.60 ± 0.02</td><td>120</td></lod<>	ND	ND	0.60 ± 0.02	120
DB3	0.19 ± 0.01	0.41 ± 0.09	109	0.65 ± 0.04	92
DB4	0.41 ± 0.03	0.59 ± 0.01	90	0.90 ± 0.07	98
DB5	0.22 ± 0.05	0.41 ± 0.03	97	0.63 ± 0.05	82
DB6	0.28 ± 0.01	0.44 ± 0.03	80	0.78 ± 0.05	100
DY5	1.07 ± 0.07	1.27 ± 0.08	98	1.50 ± 0.04	86
DY6	0.22 ± 0.05	0.41 ± 0.03	95	0.63 ± 0.05	82
DY 7	0.08 ± 0.01	0.29 ± 0.04	105	0.58 ± 0.03	100
DB7	<lod< td=""><td>0.20 ± 0.04</td><td>99</td><td>0.53 ± 0.06</td><td>106</td></lod<>	0.20 ± 0.04	99	0.53 ± 0.06	106
DB8	<lod< td=""><td>0.23 ± 0.03</td><td>115</td><td>0.44 ± 0.04</td><td>88</td></lod<>	0.23 ± 0.03	115	0.44 ± 0.04	88
DP2	<lod< td=""><td>0.23 ± 0.09</td><td>114</td><td>0.52 ± 0.07</td><td>104</td></lod<>	0.23 ± 0.09	114	0.52 ± 0.07	104
TB2	<lod< td=""><td>0.19 ± 0.02</td><td>94</td><td>0.57 ± 0.06</td><td>114</td></lod<>	0.19 ± 0.02	94	0.57 ± 0.06	114
TB3	<lod< td=""><td>0.24 ± 0.02</td><td>120</td><td>0.55 ± 0.04</td><td>110</td></lod<>	0.24 ± 0.02	120	0.55 ± 0.04	110
TB4	<lod< td=""><td>0.22 ± 0.01</td><td>108</td><td>0.51 ± 0.05</td><td>102</td></lod<>	0.22 ± 0.01	108	0.51 ± 0.05	102
TP1	<lod< td=""><td>0.18 ± 0.02</td><td>92</td><td>0.60 ± 0.06</td><td>119</td></lod<>	0.18 ± 0.02	92	0.60 ± 0.06	119
TP2	<lod< td=""><td>0.24 ± 0.02</td><td>120</td><td>0.55 ± 0.08</td><td>110</td></lod<>	0.24 ± 0.02	120	0.55 ± 0.08	110
TY2	<lod< td=""><td>0.20 ± 0.03</td><td>98</td><td>0.53 ± 0.04</td><td>106</td></lod<>	0.20 ± 0.03	98	0.53 ± 0.04	106
TY3	<lod< td=""><td>0.16 ± 0.01</td><td>81</td><td>0.50 ± 0.07</td><td>100</td></lod<>	0.16 ± 0.01	81	0.50 ± 0.07	100
TY4	<lod< td=""><td>0.20 ± 0.06</td><td>102</td><td>0.52 ± 0.04</td><td>104</td></lod<>	0.20 ± 0.06	102	0.52 ± 0.04	104

^aMCs, global microcystin concentration measured by the A2.3 ELISA as MC-LR equivalents. Sample ID, D and T refer to dam or tap water, respectively, while B, P, and Y refer to three different water reservoirs along the Rio Negro in Uruguay. <LOD, undetectable; ND, not determined. All measurement were performed in triplicates.

the pINQ-BtH6 vector, cultured in 96-wells blocks and preselected as before in the presence or absence of MC-LR. Clones showing the highest inhibition were selected and sequenced and are shown in red in Figure 2. Three different clones were identified that were unrelated to the clones isolated with the previous panning strategy. The inhibition curves are shown in Figure 4. The IC50 values were similar to those obtained with the sequential competitive panning scheme, except for clone D9.2 that had an IC50 = $2.2 \pm 0.06 \,\mu$ g/L with a LOD = 0.4 μ g/L. While there was a 2-fold increase in sensitivity, the LOD attained was still modest.

Panning by Off-Rate Selection. In order to explore additional selection strategies, we performed a selection scheme based on binding kinetics, which is commonly used for the selection of high affinity antibody fragments to macromolecules. In this approach, the phage population is bound to the immobilized hapten, and after stringent washing conditions, the bound phages are incubated with a large molar excess of the analyte for extended periods, to be finally eluted after digestion with trypsin. This promotes the selection of phages bearing VHHs with the slowest k_{off} , which typically translates in the selection of VHHs with high affinity for the immobilized hapten. However, there is no warranty that these VHHs will cross-react with high affinity with the analyte, and in fact, this method may select for VHHs that do not react at all with the analyte, particularly when the structure of the analyte derivative used for conjugation is significantly different. This may not be the case of MC-LR, which is comparatively a large

hapten (MW 995 Da) that is conjugated using the thiol-ene chemistry with minor modifications of its structure. Following this procedure, we performed three rounds of panning, cloned the selected VHH genes into the pINQ-BtH6 vector, cultured individual clones in 96-wells blocks, and preselected the VHHs as before. Clones showing the highest inhibition were sequenced. Three different sequences were identified, A2.3, which was highly represented, and two related sequences H11.3 and F11.3, Figure 2. As shown in the figure, VHH A2.3 was similar to clone D9.2, and the latter were similar to clones B2.2 and C3.2, but none of the sequences were identical. Clones A2.3 and H11.3 were used to develop competitive assays for MC-LR, Figure 5. They performed with an important improvement in sensitivity: A2.3, IC50 = 0.28 ± 0.021 and LOD = 0.05; and H11.3, IC50 = 0.63 ± 0.064 and LOD = 0.08 $\mu g/L$.

Analysis of Cross-Reactivity and Recovery. With more than 80 congeners with variable toxicity and relative occurrence, the environmental monitoring of microcystins is complex. To deal with this matter, most guidelines have been issued with reference to MC-LR, the most frequent and best studied congener. The common structure of microcystins and the cross-reactivity of nanobodies A2.3 and H11.3 is shown in Table 1. Owing to the structural similitude of microcystins, antibodies typically exhibit a variable degree of cross-reactivity. Both VHHs reacted strongly with polar variants containing the Arg residue, including the most frequent chemical congeners, LR, YR, RR, and its modifications DM, LR, DM, RR, and HtyR,

which often coexist in natural blooms.¹⁴ VHH H11.3 had the highest reactivity against the less toxic MC RR variant, and thus the VHH A2.3 ELISA will be particularly responsive to MC-LR, which is the most toxic and frequently the dominant congener occurring in cyanobacterial blooms. On the other hand, VHH H11.3, which has a more even cross-reactivity, could be used to obtain a more general assessment of the global content of MCs, but still the hydrophobic congeners will be underestimated.

Matrix interference was studied using water collected from three dam reservoirs and tap water obtained after potabilization treatment from these reservoirs. A total of 27 samples were selected on the basis of their low or undetectable initial concentration of MCs measured by VHH A2.3 ELISA and were analyzed after spiking with 0.5 μ g/L (27 samples) or 0.2 μ g/L (18 samples) of MC-LR. Recovery was excellent in both conditions of spiking, showing the applicability of the method for the direct determination of microcystins (see Table 2).

CONCLUSIONS

We explored three strategies for the selection of antihapten nanobodies from the same library. The production of in vivo biotinylated nanobodies in a 96-well-culture format allowed to assay the relative inhibition of a large number of clones for each panning condition and thus to select the "most-promising clones" from each group in a highly representative manner. The three forms of panning produced different subsets of VHHs. This was evident in the case of the sequential competitive selection where all clones were highly similar and shared samelength CDRs. In the case of the second and third panning strategy, there were two groups of highly similar sequences represented by clones A2.3 and H11.3. Despite the fact that these two forms of panning isolated VHHs with similar sequences, each selection strategy isolated a unique set of sequences. It is interesting to note that the VHHs that performed with the highest sensitivity came out from the offrate selection method and second from the simultaneous competition one, which so far have not been used for the selection of antihapten nanobodies. While most probably this is case specific and can be different for other compounds, our results show the importance of using different strategies of panning, in addition to the standard competitive selection, to optimize the development of immunoassays for small analytes. In practical terms, the selection method also provides nanobodies that are already biotinylated in a site-specific manner facilitating their detection or oriented immobilization. The best VHH, A2.3, allowed to develop a reliable in vivo biotinylated nanobody-based assay for MC-LR, which performed with similar high sensitivity and comparable crossreactivity than other broadly reactive antibodies to MCs previously reported.^{19,23,24} This assay can be used for direct analysis of untreated samples, detecting concentrations of the toxin that are well below the most strict guidelines.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.anal-chem.7b01221.

MALDI-TOF analysis of conjugates (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Fax: +598 24874320. E-mail: ggonzal@fq.edu.uy. *E-mail: bbrena@fq.edu.uy.

ORCID [©]

Gualberto González-Sapienza: 0000-0003-1824-0611

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported with funds provided by Grants CSIC 149 UdelaR, FMV 104085 ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay), and PEDECIBA. M.P.-S. and N.B. are recipients of scholarships from ANII.

REFERENCES

(1) Ladenson, R. C.; Crimmins, D. L.; Landt, Y.; Ladenson, J. H. Anal. Chem. 2006, 78, 4501-4508.

(2) van der Linden, R. H.; Frenken, L. G.; de Geus, B.; Harmsen, M. M.; Ruuls, R. C.; Stok, W.; de Ron, L.; Wilson, S.; Davis, P.; Verrips, C. T. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1999**, 1431, 37–46.

(3) Kim, H. J.; McCoy, M. R.; Majkova, Z.; Dechant, J. E.; Gee, S. J.; Tabares-da Rosa, S.; Gonzalez-Sapienza, G. G.; Hammock, B. D. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1165–1171.

(4) Pardon, E.; Laeremans, T.; Triest, S.; Rasmussen, S. G.; Wohlkonig, A.; Ruf, A.; Muyldermans, S.; Hol, W. G.; Kobilka, B. K.; Steyaert, J. Nat. Protoc. **2014**, *9*, 674–693.

(5) Frenken, L. G.; van der Linden, R. H.; Hermans, P. W.; Bos, J. W.; Ruuls, R. C.; de Geus, B.; Verrips, C. T. *J. Biotechnol.* 2000, 78, 11–21.

(6) Fanning, S. W.; Horn, J. R. Protein Sci. 2011, 20, 1196-1207.

(7) Alvarez-Rueda, N.; Behar, G.; Ferre, V.; Pugniere, M.; Roquet, F.; Gastinel, L.; Jacquot, C.; Aubry, J.; Baty, D.; Barbet, J.; Birkle, S. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1680–1690.

(8) Spinelli, S.; Frenken, L. G.; Hermans, P.; Verrips, T.; Brown, K.; Tegoni, M.; Cambillau, C. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1217–1222.

(9) Yau, K. Y.; Groves, M. A.; Li, S.; Sheedy, C.; Lee, H.; Tanha, J.; MacKenzie, C. R.; Jermutus, L.; Hall, J. C. *J. Immunol. Methods* **2003**, 281, 161–175.

(10) Tabares-da Rosa, S.; Rossotti, M.; Carleiza, C.; Carrion, F.; Pritsch, O.; Ahn, K. C.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. Anal. Chem. **2011**, 83, 7213–7220.

(11) Liu, X.; Xu, Y.; Wan, D. B.; Xiong, Y. H.; He, Z. Y.; Wang, X. X.; Gee, S. J.; Ryu, D.; Hammock, B. D. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1387–1394.

(12) He, T.; Wang, Y.; Li, P.; Zhang, Q.; Lei, J.; Zhang, Z.; Ding, X.; Zhou, H.; Zhang, W. Anal. Chem. 2014, 86, 8873-8880.

(13) Wang, J.; Bever, C. R.; Majkova, Z.; Dechant, J. E.; Yang, J.; Gee, S. J.; Xu, T.; Hammock, B. D. Anal. Chem. **2014**, *86*, 8296–8302.

(14) Chorus, I.; Bartram, J., E&F Spon, L., UK., Ed.; World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland, 1999.

(15) de Figueiredo, D. R.; Azeiteiro, U. M.; Esteves, S. M.; Goncalves, F. J.; Pereira, M. J. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2004**, *59*, 151– 163.

(16) Dorr, F. A.; Pinto, E.; Soares, R. M.; Feliciano de Oliveira e Azevedo, S. M. *Toxicon* **2010**, *56*, 1247–1256.

(17) EPA, U. S.; EPA 820R15100, Washington, DC, 2015.

(18) Moorhead, G.; MacKintosh, R. W.; Morrice, N.; Gallagher, T.; MacKintosh, C. FEBS Lett. **1994**, 356, 46–50.

(19) Pirez, M.; Gonzalez-Sapienza, G.; Sienra, D.; Ferrari, G.; Last, M.; Last, J. A.; Brena, B. M. *J. Environ. Manage.* **2013**, *114*, 63–71.

(20) Rossotti, M.; Tabares, S.; Alfaya, L.; Leizagoyen, C.; Moron, G.; Gonzalez-Sapienza, G. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 2015, 1850, 1397–1404.

(21) Chapman-Smith, A.; Turner, D. L.; Cronan, J. E., Jr.; Morris, T. W.; Wallace, J. C. *Biochem. J.* 1994, 302 (3), 881–887.
(22) Davies, C. Introduction to Immunoassay Principles. In *The*

(22) Davies, C. Introduction to Immunoassay Principles. In *The Immunoassay Handbook*, 3rd ed.; Wild, D., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005.

(23) Weller, M. G.; Zeck, A.; Eikenberg, A.; Nagata, S.; Ueno, Y.; Niessner, R. Anal. Sci. 2001, 17, 1445–1448.

(24) Zeck, A.; Weller, M. G.; Bursill, D.; Niessner, R. Analyst 2001, 126, 2002–2007.

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

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

Rapid quantitative analysis of microcystins in raw surface waters with MALDI MS utilizing easily synthesized internal standards

Amber F. Roegner^a, Macarena Pírez Schirmer^{b,c}, Birgit Puschner^a, Beatriz Brena^b, Gualberto Gonzalez-Sapienza^{c,*}

^a Department of Molecular Biosciences, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA
^b Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
^c Cátedra Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history: Received 6 August 2013 Received in revised form 13 December 2013 Accepted 19 December 2013 Available online 31 December 2013

Keywords: Microcystins Cyanotoxins Cyanobacterial blooms Quantitative MALDI-TOF Internal standards

ABSTRACT

The freshwater cyanotoxins, microcystins (MCs), pose a global public health threat as potent hepatotoxins in cyanobacterial blooms; their persistence in drinking and recreational water has been associated with potential chronic effects in addition to acute intoxications. Rapid and accurate detection of the over 80 structural congeners is challenged by the rigorous and time consuming clean up required to overcome interference found in raw water samples. MALDI-MS has shown promise for rapid quantification of individual congeners in raw water samples, with very low operative cost, but so far limited sensitivity and lack of available and versatile internal standards (ISs) has limited its use. Two easily synthesized S-hydroxyethyl-Cys(7)-MC-LR and -RR ISs were used to generate linear standard curves in a reflectron MALDI instrument, reproducible across several orders of magnitude for MC-LR, -RR and -YR. Minimum quantification limits in direct water samples with no clean up or concentration step involved were consistently below 7 µg/L, with recoveries from spiked samples between 80 and 119%. This method improves sensitivity by 30 fold over previous reports of quantitative MALDI-TOF applications to MCs and provides a salient option for rapid throughput analysis for multiple MC congeners in untreated raw surface water blooms as a means to identify source public health threats and target intervention strategies within a watershed. As demonstrated by analysis of a set of samples from Uruguay, utilizing the reaction of different MC congeners with alternate sulfhydryl compounds, the m/z of the IS can be customized to avoid overlap with interfering compounds in local surface water samples.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Contamination of natural surface waters by toxic cyanobacteria is a growing problem worldwide, resulting in serious animal and human health hazards. Microcystins (MCs) are the most common hepatotoxins and tumour promoters produced by freshwater cyanobacteria (de Figueiredo et al., 2004). They encompass a large family of cyclic heptapeptide toxins, composed of uncommon amino acids, including several D-amino acids and the characteristic Adda group (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10phenyldeca-4(E),6(E)-dienoic acid) (Fig. 1). Structural variation is observed in all amino acids, but major MC analogues occur due to variations in the L-amino acids "X" and "Z" (Rinehart et al., 1994). More than 80 MC congeners have







^{*} Corresponding author. Cátedra Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Instituto de Higiene, Av. Alfredo Narro 3051, piso 2, Montevideo 11600, Uruguay. Tel.: +598 24874334.

E-mail address: ggonzal@fq.edu.uy (G. Gonzalez-Sapienza).

^{0041-0101/\$ –} see front matter @ 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.007



Fig. 1. Structure and synthesis of thiol-modified microcystins. The general structure of microcystins is displayed at the left, denoting the characteristic ADDA βamino acid, and "X" and "Z" representing variable L-amino acids. Internal standards were prepared by the well-known reaction of sulfhydryl compounds with the methylene group of the *N* methyldehydroalanine (Mdha) residue of MCs. The reaction occurred almost instantaneously under nitrogen gas.

been described to date, ranging in size between 909 and 1115 Da, and are produced by a broad range of cyanobacteria species in fresh and brackish surface water blooms (Codd, 2000; Donohue et al., 2008). Potent inhibitors of highly conserved protein phosphatase 1 and 2A (Runnegar et al., 1995), microcystin toxicity impacts a broad range of plant and animal species, including humans. In spite of similar phosphatase inhibitory capacity, MCs differ greatly in their acute toxicity from poorly toxic, $LD_{50} > 1200 \text{ mg/kg}$, to highly toxic variants such as MC-LR ($LD_{50} = 50 \text{ mg/kg}$) (Rinehart et al., 1994). These differences appear to be related to their toxicokinetics, since the mechanism of cellular uptake occurs via specific organic anion transporting polypeptides that mediate selective congener transport (Fischer et al., 2010).

Enhanced by environmental perturbations and increasing global water temperatures, cyanobacterial blooms result from heavy nutrient loading, and their increased occurrence has emerged as worldwide concern (Codd, 2000; Pearson et al., 2010). While many cyanobacterial species are known producers of microcystins, reasons for toxin production remain unknown and the presence of a bloom does not guarantee the presence of toxic compounds (Pearson et al., 2010). Moreover, the production of individual MC congeners varies among genera, species and strains, and toxin production can vary considerably within hours (Wood et al., 2011). This variability presents a serious challenge to public health officials and water treatment facility managers by requiring to optimize sampling, minimize public health risk and target interventions in the management of recreational or source water bodies (Dodds et al., 2009). The WHO has established a provisional guideline value of 1 μ g/L for microcystin LR in drinking water, but recent evidence in animal intoxications suggests the prevalence and consequences of potentially overlooked congeners (Dietrich and Hoeger, 2005; Donohue et al., 2008). Similarly, a reference health alert value of 20 µg/L has been suggested to minimize the toxicity risk by accidental ingestion of recreational waters (Chorus et al., 2000), and many countries have adopted similar limits for bloom risk assessment ranging from 15 to 25 µg/L (Chorus, 2012).

The most widely used analytical methods for the detection and quantification of MCs rely on chromatographic separation techniques such as high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to UV or MS detection, and a reference standard HPLC/UV method (ISO 20179:2005) has been issued by the International Organization for Standardization. In normal practice and for regulatory purposes, the analysis of the MC content in drinking water is restricted to the use of these reference methods. To fulfill the sensitivity required by the WHO advisory level of $<1 \mu g/L$ of MC-LR, these chromatographic methods often require large sample volumes, concentration and clean steps, as well as the sequential analysis of samples (Meriluoto et al., 2000). This processing makes the methods comparatively less attractive for screening purposes, particularly when large numbers of samples need to be analyzed on a regular basis within a timely fashion. To this end, other techniques, particularly immunochemical methods, are currently used to study the ecology of cyanobacterial communities or monitor the evolution of these communities in source or recreational waters (Pirez et al., 2013; Qin et al., 2010; Znachor et al., 2006). ELISA is a convenient option because it allows for the parallel analysis of large sample loads in a fast and cost efficient manner. However, commercially available ELISAs, detecting the side chain ADDA common to all microcystins, show variable cross reactivity and only detect total microcystins, missing the information on individual congeners with variable degree of toxicity (Msagati et al., 2006). In addition, most ELISAs perform within a narrow linear range, about one order, while environmental water and scum samples may contain MC concentrations ranging from a few µg/L to hundreds of thousands. With an extended linear range, short time of analysis (<30 s), high-throughput capacity and minimal requirements for sample preparation, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) coupled with time of flight (TOF) mass spectrometry (MS) offers a salient option for comprehensive analysis of environmental water samples (Pan et al., 2007; Pusch and Kostrzewa, 2005).

To date, MALDI-TOF MS mostly has been utilized qualitatively to identify MC variants in cyanobacterial colonies and surface water blooms (Erhard et al., 1997; Ferranti et al., 2011; Welker et al., 2002), and its use for MC quantification is rather recent (Howard and Boyer, 2007; Puddick et al., 2011). Quantitative detection by MALDI-TOF based on peak response has poor reproducibility, mainly due to spotto-spot variability in crystal formation (Duncan et al., 2008; Szajli et al., 2008). However, this can be overcome using an

internal standard (IS), and the best results are obtained when this compound mimics the physicochemical properties of the analyte throughout all steps of the analytical process (Szajli et al., 2008). The use of a stable isotopelabeled form of the analyte (isotopomer) is an obvious way to accomplish that goal, but requires special chemicals and can be difficult to prepare and purify. In the initial report of a quantitative MALDI-TOF application for MCs (Howard and Boyer, 2007), three potential internal standards were assayed, and the best method detection limit (MDL) for MC-LR was obtained with nodularin (a pentapeptide cyanotoxin with similar basic ring structure to microcystins), which outperformed a [¹⁵N]10-isotopomer of microcystin-YR and the peptide hormone angiotensin I. More recently. Puddick et al., in order to reduce the cost of the analysis, used angiotensin I as internal standard in combination with different sample preparation techniques, but being a linear peptide, angiotensin as IS did not attain the MDL values previously obtained with nodularin (Puddick et al., 2011). This highlights the importance of using internal standards that resemble the physicochemical properties of the target compound.

With this in mind, we explored the use of derivatives of MCs as internal standards for quantitative detection of MC by MALDI-TOF MS. To this end, we utilized a well-known and simple synthesis to prepare ISs by reaction of MCs with thiol-containing compounds readily available in most laboratories. To further improve the detection limit of the method introduced by Howard and Boyer, we utilized reflectron MALDI-TOF equipment that provides improved resolution and better sensitivity. We demonstrate that these ISs can be used for sensitive detection of MCs by direct analysis of unprocessed surface water samples, with an extended linear range and high recoveries. The ability to identify and quantify common microcystins with minimal processing of the raw water sample will dramatically reduce time for screening of a broad number of samples.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Microcystin-LR, and microcystin-RR were obtained from GreenWater Laboratories (Palatka, FL); microcystin-YR, β mercaptoethanol (99.9%), and trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Alphacyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and a standard peptide calibration solution were obtained from Bruker Daltonics (Denmark). HPLC grade acetonitrile and methanol were obtained from Baker (Phillipsburg, NJ), along with sodium borate and sodium chloride for the preparation of the borate buffer.

2.2. Preparation of internal standards

Two internal standards (IS-1 and IS-2) were prepared from microcystin-LR (MC-LR) and microcystin-RR (MC-RR), respectively, by reaction of the *N* methyldehydroalanine (Mdha) group with sulfhydryl compounds, Fig. 1 (Smith and Boyer, 2009). For each 0.1 μ M of MC dissolved in 50% methanol/50% 100 μ M borate buffer, pH 10.5; 10 μ l of β - mercaptoethylamine or β -mercaptoethanol were added and allowed to react under nitrogen gas for several hours at room temperature. One microliter of the reaction mix was taken initially every 15 min and then hourly, and after dilution in 100 µl of MilliQ water was analyzed by MALDI-TOF for relative appearance and disappearance of peaks. After completion, the reaction mixture was diluted with 10% methanol, acidified to pH 3.0 with 5% glacial acetic acid and purified using solid phase extraction (SPE C18, Phenomenex, Torrance, CA). The methanol eluted (*S-aminoethyl-/S-hydroxyethyl-Cys*(7) microcystin) adduct was dried under nitrogen gas to eliminate any residual sulfhydryl compound, reconstituted in 200 µl of methanol, quantified using HPLC, aliquoted into 50 µl and stored at -20 °C until further use.

2.3. MALDI-TOF-MS

CHCA, which has been reported to deliver relatively homogenous samples in crystal formation (Szajli et al., 2008), was prepared as a saturated solution (>21 mg/ml) in 50% (v/v) acetonitrile and 50% (v/v) 0.1% TFA MilliQ water. The matrix was mixed with internal standard and sample and permitted to air dry. A Microflex LRF MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MS, USA) with a 337 nm nitrogen laser was operated in positive ion reflectron mode with delayed extraction and optimized in the m/z range from 500 Da to 2 kDa. Calibrations were performed with a peptide calibration standard mix (Bruker Daltonics). The laser was fired 100 times at each of ten locations for each sample well on a 96 well plate for a cumulative 1000 shots per sample well taken at 30% intensity. More specific details of sample well preparation and quantification with internal standard are provided in the Supplemental materials.

2.4. MALDI spot preparation and quantification with IS

Ten microliters of sample were thoroughly mixed with 1 µl of the appropriate concentration of internal standard $(30, 40, 300 \text{ or } 400 \,\mu\text{g/L}, \text{ as stated})$, followed by the addition of 10 µl of CHCA solution. Following thorough mixing, 2 µl of the solution was placed on the MALDI sample plate. Unless otherwise specified, eight 2 µl replicate spots were aliquoted and allowed to air dry at room temperature. Ten shots were taken at each spot on the 96 well stainless steel plate with the laser firing 100 times at each shot for a cumulative 1000 shots per well at 30% intensity. The data point (intensity or area) was determined as an arithmetic mean. Initially, ratios of both peak intensity and peak area of microcystin congener divided by the equivalent intensity and area of internal standard peak were determined for each spot in order to account for spot-to-spot variation across the plate and heterogeneity of crystal formation. The stainless steel plate was thoroughly cleaned between analyses according to manufacturer instructions, and was routinely checked to avoid any carry over contamination.

2.5. Calibration curves and detection limits

To study the linear range of the method, MC-LR, MC-RR and MC-YR were dissolved in 100% methanol (1 mg/mL) and further diluted in MilliQ water to twelve concentrations ranging between 0 and 5000 μ g/L. These samples were prepared for analysis as described (Supporting information) using IS-1 and IS-2 at 300 μ g/L and 400 μ g/ L, respectively, in 100% methanol. Standard solutions were prepared in MilliQ water for determination of a method detection limit (MDL) or and in a reference cyanobacterialbloom water sample (ref-CB) for minimum quantification limit (MQL). At least seven concentrations of the standards were prepared in the 0–100- μ g/L range, using IS-1 and IS-2 at a working concentration of 30 μ g/L and 40 μ g/L, respectively (Supporting information). The ref-CB water sample consisted of a pool of representative water samples from blooms with less than 0.25 μ g/L of total MCs, as determined by ELISA (Brena et al., 2006).

2.6. Surface water sample preparation and spiking recoveries

Surface water samples collected from three water bodies along the Rio Negro in northern Uruguay, kept chilled under transport and frozen at −20 °C until ready for analysis. Following three cycles of freeze/thaw to fully rupture the cyanobacterial cells, 1.0 mL of the water sample was centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min, followed by syringe filtration with a 0.22 μm filter (Millipore, MA). An initial survey determination of the concentrations of MC-LR, MC-RR, and MC-YR in the surface water samples were made utilizing IS-2 with the method described in Section 2.4. Then nine samples covering a range of MC concentrations were selected and spiked with 100 µg/L of MC-LR, MC-RR and MC-YR, simultaneously, and percent recovery was determined along with total concentrations. A bloom showing extremely high MC concentration was spiked with 1000 µg/L and diluted 10 fold before analysis. Calibration curves were performed for each new analysis. MALDI well spot preparation and laser operation were maintained as for standard curves.

2.7. Safety considerations

Acutely toxic to mammals, the LD₅₀ (i.p.) for microcystins range between 36 and 122 μ g/kg for mice and rats with an inhalation toxicity of 43 μ g/kg. It is much less bioavailable with an oral LD₅₀ of 5 mg/kg^{2.3} Proper personal protective equipment was worn (gloves, lab coat) when handling any of the congener standards or handling any bloom samples. Care was also taken to not aerosolize any powder forms of standards or bloom materials.

3. Results and discussions

3.1. Preparation of internal standards

We initially optimized the conditions for the reaction of β -mercaptoethylamine and β -mercaptoethanol with the Mdha group of MC-LR. The reaction proceeded very rapidly at high pH as determined by MALDI analysis of time course samples; prepared in borate buffer pH 10.5, all MC-LR was converted to the S-aminoethyl- or S-hydroxyethyl-Cys(7)-MC- LR derivative within seconds (*data not shown*). Initial experiments suggested that both compounds

performed equally well as IS but the hydroxyethyl conjugate (IS-1, MW_{average} = 1073.30 Da, MH⁺ = 1073.7) showed better reproducibility and thus was selected. A second internal standard, the β -mercaptoethanol derivative of MC-RR (IS-2, MW_{average} = 1116.33 Da, MH⁺ = 1116.6), was prepared similarly, and the eventual fragmentation of both IS was studied under different conditions of laser energy. Preliminary tests showed that dilutions of ISs of 30–300 µg/ L were suitable for quantitative analysis of MCs across a broad range of concentrations. Using these concentrations, a tradeoff value of 30% laser intensity was determined to have maximal sensitivity at low concentrations of MCs, while minimizing the fragmentation of the internal standards, Fig. 2.

We then focused our study on the three most common polar congeners found in cyanobacterial blooms, namely MC-LR, MC-RR, and MC-YR, which produced peaks at 995.6 (m/z), 1038.6 (m/z), and 1045.6 (m/z), respectively. Fig. 3 shows their spectra at trace concentrations, in the presence of 40 µg/L of IS-2. In all cases, there were peaks proportional to the concentration of MC, no interference of IS fragments were observed in the case of MC-LR and MC-YR, despite the fact that a fragment, or a low concentration contaminant of the IS, occurred at 1048.5 (m/z). In the case of MC-RR a trace peak corresponding to this MC was observed in the blank, presumably as a consequence of marginal IS-2 fragmentation, but the signal was very weak and did not interfere with the quantification of MC-RR. Similar results with even less interference of contaminant peaks were obtained when IS-1 was used (data not shown).

3.2. MDL and MQL with IS-1

generated calibration IS-1 curves (Supporting information, Fig. A.1-A.3) of standards with excellent linearity in the 0–5000 μ g/L range and R^2 values >0.99. As previously described (Welker et al., 2002), the polar congeners generated strong $[M + H]^+$ signals likely because of protonation of the basic arginine side chains. Not surprisingly, MC-RR calibration curves generated a much greater signal (approximately twice the slope) as compared with MC-LR and MC-YR, confirming the role of protonation of the basic arginine side chains; this increased signal probably explains the improve MDL observed for MC-RR as compared with the two other congeners. Table 1 summarizes calculated limit of detection and quantification for IS-1 (Supporting information, Fig. A.1–A.3 and B.1-B.3) using standard solutions prepared in MilliQ water.

Good correlation was observed between values generated by ratio of intensities (peak height) of microcystin congener to internal standard and the corresponding ratio of areas (peak area). Previously, it has been reported that the peak height ratio is more suitable for MALDI quantification because the integration of a selected baseline and range can be highly variable, particularly when using a linear, nonflectron mode (Duncan et al., 2008; Howard and Boyer, 2007). Previous reports indicated little difference between R^2 values for MC standard solutions when using non microcystin internal standards, but a higher coefficient of variation (CV) for peak area ratios, a higher limit of detection, and a smaller linearity of range (Howard and



Fig. 2. Mass Spectra of S-hydroxyethyl-Cys(7) microcystin LR (IS-1) and S-hydroxyethyl-Cys(7) microcystin RR (IS-2). Both standards (40 µg/L) were spotted on the MALDI target as previously described (2 µl per spot), and were analyzed at 30% of laser intensity.

Boyer, 2007). We did not observe a substantial difference in limit of detection between peak area and peak height minimum detection limits; however, the linear range obtained using peak area appeared to decrease with increasing microcystin standard solution indicated by the divergence of the standard curves at higher concentrations, so peak intensity was adopted for quantification.

3.3. MDL and MQL with IS-2

We expected similar results with respect to linearity of range and minimum detection limit. Likely due to the presence of two arginine side chains, IS-2 exhibited greater ionization than IS-1, resulting in decreased slopes for the calibration standard curves for all three microcystin congeners as compared with IS-1 (Supporting information, Fig. C.1–C.3 and D.1–D.3). However, the limit of detection was not affected, MDL = 2.8, 1.4, and 4.5 μ g/L, respectively for MC-LR, MC-RR and MC-YR, Table 2, and were very close to the values obtained with IS-1. These data suggest the limit of detection operates independently of ionization of internal standard. The use of lower concentrations of IS, which produced peaks of similar size to those of the MC standards, did not significantly affect the detection limit (data not shown). To study the potential influence of the sample matrix, this time MQL was quantified using MC standards diluted in the ref-CB water sample. Under these conditions, the calculated MOL were 6.5, 4.6, and 6.4 µg/L, for MC-LR, MC-RR and MC-YR, respectively. Contributing to the robustness of this method, sample matrix effects appear to have minimal effect on MQLs. While the peak height intensity and peak area curves appear to diverge a bit, this discrepancy had minimal effect on quantification. MDL curves in MilliQ water yielded similar results (data not shown). While these detection limits remain above the provisional guideline provided by the WHO for drinking

water, it is worth noting that a concentration step was not employed prior to the screening of samples. The method has the potential to be adapted for screening of drinking water with an additional concentration step. Regardless, a major advantage is that it allows screening of a large number of untreated surface water samples almost simultaneously.

3.4. Selection of IS

The utility of any IS may be severely threatened by the occurrence of common compounds of similar mass in the sample, as demonstrated in the case of the bloom samples taken from three water bodies in northern Uruguay along the Rio Negro. Upon an initial screening without internal standard, a number of the samples were determined to contain an unknown peak at 1072.6 (m/z). Post source decay (PSD) analysis of this peak did not show the distinctive fragmentation products (ADDA fragment $[PhCH_2CH(OCH_3)]^+ = 135 (m/z), [Mdha-Ala + H]^+ = 155$ (m/z), [Glu-Mdha + H]⁺ = 213 (m/z), [ADDA-fragment-Glu- $Mdha]^+ = 375.0 (m/z)$ of the MC core, ruling out that this was a MC congener. Due to the close proximity to the peak of IS-1 (1073.6 m/z) and the high signal intensity of the 1072.6 m/z compound IS-1 could not be used with our particular set of samples. Nevertheless, IS-1 may prove useful for surface water analysis in other regions of the world, with different contaminants and should not be discounted. This result actually prompted the synthesis of IS-2 after an additional screening of up to 20 raw surface water samples showed that no interfering compounds with similar m/z value to the calculated mass of IS-2 (1116.6 m/z) occurred in the samples. This case highlights the importance of a simple and flexible IS synthesis strategy that makes it possible to design the m/z of the IS to maximally avoid interference present in samples. In particular, blooms



Fig. 3. Mass spectra of low concentrations of MC-LR, MC-RR and MC-YR in presence of IS-2. The spectra were prepared with 10 µl of the relevant concentration of microcystin standard prepared in MilliQ water with 1 µl of IS-2 (diluted to a final concentration of 40 µg/L) and then thoroughly mixed with 10 µl of CHCA matrix. The 2 µl spots were allowed to dry and then shot at 30% intensity.

Table	1

100

Determination of MDL and MQL for MC-LR, MC-RR, MC-YR standard solutions using both peak height and peak area ratios with IS-1.	

Congener	Ratio parameter	Regression equation	R^2	CV ^a	$MDL (\mu g/L)^{b}$	$MQL (\mu g/L)^{c}$
MC-LR	Peak height	y = 0.0095x + 0.04	0.989	6.7	2.8	4.5
	Peak area	y = 0.0093x + 0.06	0.991	8.6	2.6	4.3
MC-RR	Peak height	y = 0.0222x - 0.005	0.996	10.3	1.6	2.6
	Peak area	y = 0.0214x - 0.01	0.994	8.5	0.87	3.6
MC-YR	Peak height	y = 0.0096x - 0.0001	0.991	4.3	4.5	6.2
	Peak area	y = 0.0092x - 0.009	0.996	6.2	3.9	4.2

 $^a\,$ CV, coefficient of variation determined for 100 $\mu g/L$ of MCs.

 $^{\rm b}\,$ MDL was determined based on standard solutions of 5 $\mu g/L$ for MC-LR and MC-RR and 10 $\mu g/L$ for MC-YR.

^c MQL was determined with standard solutions prepared in MilliQ water.

Table 2

Determination of MDL and MQL for MC-LR, MC-RR, MC-YR standard solutions	using both	n peak height and	peak area ratios with IS-2.
---	------------	-------------------	-----------------------------

Congener	Ratio parameter	Regression equation	<i>R</i> ²	CV ^a	$MDL (\mu g/L)^b$	$MQL (\mu g/L)^{c}$
MC-LR	Peak height	y = 0.0033x - 0.017	0.984	18.5	2.8	6.5
	Peak area	y = 0.0031x - 0.010	0.991	25.3	1.8	4.4
MC-RR	Peak height	y = 0.0124x - 0.057	0.991	6.2	1.4	4.6
	Peak area	y = 0.0116x - 0.050	0.992	3.1	2.3	4.3
MC-YR	Peak height	y = 0.0025x - 0.013	0.992	7.7	4.5	6.4
	Peak area	y = 0.0021x - 0.0087	0.985	9.8	3.6	4.5

^a CV, coefficient of variation determined for 100 µg/L of MCs.

^b MDL was determined based on standard solutions of 5 µg/L for MC-LR and MC-RR and 10 µg/L for MC-YR; to study matrix effect.

^c MQL was determined with standard solutions prepared in the reference water sample ref-CB.

in this region of the world have been shown to produce uncommon MCs (Andrinolo et al., 2007; Neumann et al., 2000), so we emphasize the importance of pre-screening bloom samples for potential interfering peaks. In particular, the presence of [D-Asp³,ADMAdda⁵, Dhb⁷] MC-HtyR (MW = 1073) (Beattie et al., 1998) could interfere with IS-1, and [L-MeLan⁷] MC-LR (MW = 1115) (Namikoshi et al., 1995) could interfere with IS-2, if present in the bloom sample.

3.5. Spike recoveries for surface bloom samples

Table 3 shows the results and spike recoveries of samples taken during the blooming season from three reservoirs in northern Uruguay along the Rio Negro, utilizing peak height ratios. The results and spike recoveries quantified utilizing peak area ratio are available in Supporting information, Table A. Fortification with congeners was performed simultaneously, using $100 \mu g/L$ of the respective congener (except for wbB4 that was spiked with $1000 \mu g/L$). The concentration of the spiked MCs was chosen to be of

the same order than its original concentration in the sample, in order to fulfill our goal of developing a method that could be used for direct screening of unprocessed raw water samples. All spike recoveries were between 80 and 120%. Determined concentrations were highly reproducible and values by peak height and peak area corresponded closely throughout the spiking experiments. As mentioned, for each spiking set, a calibration curve with three to four data points was established with each microcystin congener standard and IS-2. We did all initial experiments using eight replicate well spots, but data analysis showed that three replicates might be used without altering estimated concentrations or recovery of spiked samples (*data not included*).

4. Conclusions

Previous work on the quantitative use of MALDI-TOF for MC analysis showed that the best sensitivity was obtained when nodularin was used as IS (Howard and Boyer, 2007; Puddick et al., 2011). This is probably due to the high

Table 3

Spike recoveries for surface water bloor	m samples calculated w	ith peak height ratio u	sing the internal standard IS-2.
--	------------------------	-------------------------	----------------------------------

Sample	MC-LR		MC-RR		MC-RR	
	Initial conc. µg/L	Recovery %	Initial conc. µg/L	Recovery %	Initial conc. μg/L	Recovery %
wbA 1	307	116	234	119	439	107
wbA 2	157	93.9	41.6	87.7	55.7	80.2
wbB 1	235	94.5	198	80.0	347	97
wbB 3	76.3	84.5	< MQL	82.1	45.0	109
wbB 4	12000	84.4	1470	99.8	1240	79.0
wbB 5	35.3	84.2	ND	86.2	ND	108
wbC 1	49.5	81.1	< MQL	90.3	< MQL	108
wbC 2	417	80.4	53.5	93.5	95.8	94
wbC I	27.4	86.2	ND	89.9	ND	110

All samples were spiked with 100 μ g/L of each congener except for sample wbB 4 4 that was spiked with 1000 μ g/L.

similitude of nodularin with the common structure of MCs. However, nodularin has a smaller amino acid ring, its size (m/z 825.4) is close to interfering peaks of the MALDI matrix; in addition, it is a cyanobacterial toxin and could become target of the analysis. As an alternative, the reaction of sulfhydryl groups with the Mdha moiety of commercial or in-house purified MCs offers a simple and versatile method to prepare ISs for MC quantification that preserve the physicochemical characteristics of these toxins. Additionally, the combination of different MC congeners paired with different sulfhydryl compounds allows for adjustment of the m/z of the IS to the particular pattern of common interfering compounds in the samples, as demonstrated by the advantageous use of IS-2 versus IS-1 when a frequent interfering compound of 1072.6 m/z was found in surface water blooms in Uruguay. The combination of ISs highly similar to the analyte with the high sensitivity and resolution of the reflectron mode MALDI-TOF allowed direct analysis of raw water samples with increased sensitivity. Although still not sufficient for direct screening of drinking water, the method fulfills our purpose of developing a rapid screening tool for monitoring environmentally relevant concentrations of MCs using small volumes of untreated samples. Indeed, the MQL for untreated surface water obtained in this study was 6.5, 4.6 and 6.4 µg/L for MC-LR, MC-RR and MC-YR, respectively, while Howard and Boyer using a linear MALDI-TOF instrument found a MQL for cell extracts of 190, 230 and 190 µg/L, respectively. With this 30 folds increase in sensitivity, the method performs within a linear range of 7-5.000 μ g/L, which is of great relevance for the intended application of the technique. Certainly, this range covers the reference values of $<15-25 \mu g/L$ that has been adopted by many countries as an immediate public health action level for recreational waters (Chorus, 2012), and it also covers the vast majority of the concentrations of these congeners found in fresh water reservoirs and needed to be monitored to manage the progression of cyanobacterial blooms (Pirez et al., 2013). High throughput spatial and temporal monitoring could substantially enhance our understanding of human health risks presented by cyanobacterial blooms and inform public health recommendations. In addition, spatial and temporal monitoring could help identify potential factors or environmental triggers for enhanced toxin production in hopes of future prevention. Considering that the new method allows for quantification of some of the major MC congeners from few microliters of unprocessed sample with a rapid per sample analysis that allows processing of numerous samples at a time with minimal instrument maintenance and per-sample cost, together with rapid turnaround time for results, the method offers a salient option with which researchers, treatment water facilities or public health agencies can address cyanobacterial blooms, an ever increasing human and animal health concern.

Funding

This work was supported by NIH Fogarty International Center Grant TW05718, CSIC 400/2008, and ANII FMV 7263. The U.S. Fulbright Student Research Fellowship (Montevideo, Uruguay) and the USEPA STAR Graduate Student Fellowship provided support for the first author.

Protocols

No human subjects or experimental animals were involved with the research presented in this manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to report.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.007.

References

- Andrinolo, D., Pereira, P., Giannuzzi, L., Aura, C., Massera, S., Caneo, M., Caixach, J., Barco, M., Echenique, R., 2007. Occurrence of Microcystis aeruginosa and microcystins in Río de la Plata river (Argentina). Acta Toxicól. Argent. 15, 8–14.
- Beattie, K.A., Kaya, K., Sano, T., Codd, G.A., 1998. Three dehydrobutyrine (Dhb)- containing microcystins from the cyanobacterium Nostoc sp. Phytochemistry 47, 1289–1292.
- Brena, B.M., Diaz, L., Sienra, D., Ferrari, G., Ferraz, N., Hellman, U., Gonzalez-Sapienza, G., Last, J.A., 2006. ITREOH building of regional capacity to monitor recreational water: development of a noncommercial microcystin ELISA and its impact on public health policy. Int. J. Occup. Environ. Health 12, 377–385.
- Chorus, I., 2012. Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment, Risk Management and Regulations in Different Countries. Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt), Dessau-Rosslau.
- Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 3, 323–347.
- Codd, G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. Ecol. Eng. 16, 51–60.
- de Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Goncalves, F.J., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 151–163.
- Dietrich, D., Hoeger, S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? Toxicol. Appl. Pharmacol. 203, 273–289.
- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T., Thornbrugh, D.J., 2009. Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. Environ. Sci. Technol. 43, 12–19.
- Donohue, J., Orme-Zavaleta, J., Burch, M., Dietrich, D., Hawkins, B., Lloyd, T., Munns, W., Steevens, J., Steffensen, D., Stone, D., Tango, P., 2008. Risk assessment Workgroup report. Adv. Exp. Med. Biol. 619, 759–829.
- Duncan, M.W., Roder, H., Hunsucker, S.W., 2008. Quantitative matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Brief. Funct. Genomic Proteomic 7, 355–370.
- Erhard, M., von Dohren, H., Jungblut, P., 1997. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. Nat. Biotechnol. 15, 906–909.
- Ferranti, P., Nasi, A., Bruno, M., Basile, A., Serpe, L., Gallo, P., 2011. A peptidomic approach for monitoring and characterising peptide cyanotoxins produced in Italian lakes by matrix-assisted laser desorption/ionisation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 1173–1183.
- Fischer, A., Hoeger, S.J., Stemmer, K., Feurstein, D.J., Knobeloch, D., Nussler, A., Dietrich, D.R., 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 245, 9–20.
- Howard, K.L., Boyer, G.L., 2007. Quantitative analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 79, 5980–5986.

- Meriluoto, J., Lawton, L., Harada, K., 2000. Isolation and detection of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. Methods Mol. Biol. 145, 65–87.
- Msagati, T.A., Siame, B.A., Shushu, D.D., 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. Aquat. Toxicol. 78, 382–397.
- Namikoshi, M., Sun, F., Choi, B., Rinehart, K.L., Carmichael, W.W., Evans, W.R., Beasley, V.R., 1995. Seven more microcystins from Homer lake cells: application of the general method for structure assignment of peptides containing,-dehydroamino acid unit(s). J. Org. Chem. 60, 3671–3679.
- Neumann, U., Campos, V., Cantarero, S., Urrutia, H., Heinze, R., Weckesser, J., Erhard, M., 2000. Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of Microcystis sp. from a Chilean lake. Syst. Appl. Microbiol. 23, 191–197.
- Pan, C., Xu, S., Zhou, H., Fu, Y., Ye, M., Zou, H., 2007. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. Anal. Bioanal. Chem. 387, 193–204.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. Mar. Drugs 8, 1650–1680.
- Pirez, M., Gonzalez-Sapienza, G., Sienra, D., Ferrari, G., Last, M., Last, J.A., Brena, B.M., 2013. Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: simple and affordable methods may be the answer. J. Environ. Manag, 114, 63–71.
- Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Craig Cary, S., Hamilton, D.P., 2011. Enhanced sample preparation for quantitation of microcystins by

matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. Phytochem. Anal., 285–291.

- Pusch, W., Kostrzewa, M., 2005. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in screening and diagnostic research. Curr. Pharm. Des. 11, 2577–2591.
- Qin, B., Zhu, G., Gao, G., Zhang, Y., Li, W., Paerl, H.W., Carmichael, W.W., 2010. A drinking water crisis in Lake Taihu, China: linkage to climatic variability and lake management. Environ. Manag. 45, 105–112.
- Rinehart, K., Namikoshi, M., Choi, B., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 6, 159– 176.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S.M., Lee, E.Y., Zhang, L., 1995. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. Biochem Biophys. Res. Commun. 216, 162–169.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., 2009. Standardization of microcystin extraction from fish tissues: a novel internal standard as a surrogate for polar and non-polar variants. Toxicon 53, 238–245.
- Szajli, E., Feher, T., Medzihradszky, K.F., 2008. Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS. Mol. Cell. Proteomics 7, 2410–2418.
- Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., von Dohren, H., 2002. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. Environ. Toxicol. 17, 367–374.
- Wood, S.A., Rueckert, A., Hamilton, D.P., Cary, S.C., Dietrich, D.R., 2011. Switching toxin production on and off: intermittent microcystin synthesis in a Microcystis bloom. Environ. Microbiol. Rep. 3, 118–124.
- Znachor, P., Jurczak, T., Komarkova, J., Jezberova, J., Mankiewicz, J., Kastovska, K., Zapomelova, E., 2006. Summer changes in cyanobacterial bloom composition and microcystin concentration in eutrophic Czech reservoirs. Environ. Toxicol. 21, 236–243.

Ultrasensitive MALDI-TOF quantitation of microcystins in complex matrices by direct on-target analysis of nanobody-captured toxins

Oriented functionalization of nanoparticles with *in vivo* biotinylated nanobodies for rapid MALDI-TOF ultrasensitive quantitation of toxins in biological samples

¹Macarena Pírez-Schirmer, ²Beatriz M. Brena, and ^{1*}Gualberto González-Sapienza ¹Cátedra de Inmunología and ²Cátedra de Bioquímica, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UdelaR, Uruguay

Keywords: Cyanotoxins, Nanobody, Single domain antibodies, quantitative MALDI-TOF, biological samples

Corresponding author: Gualberto González-Sapienza: <u>ggonzal@fq.edu.uy</u>, Phone: +598 24874334

ABSTRACT

Here we present a new analytical method where immunoconcentration is coupled to quantitative MALDI-TOF analysis allowing in minutes the identification and highly sensitive detection of microcystins as model targets. Samples can be processed in parallel and the method is particularly suitable for direct analysis of untreated biological samples. A key element of the immunosorbent is a site-specific *in vivo* biotinylated 15 kDa nanobody of broad cross-reactivity with MCs that is immobilized in an oriented and tightly packed fashion on magnetic beads, providing a highly efficient capture of the toxin. The nanobody on the beads is partially loaded with an easily synthesized internal standard for MS quantitation. After capture, the beads are directly dispensed on the MALDI target enabling the identification and sensitive quantitation of the MC congeners. Since salts and contaminants are removed during the concentration step, no clean-up or other sample treatments are needed. The method was validated with water and serum samples with excellent precision and recoveries at quantitation limits of 0.025 ppb of MC.

INTRODUCTION

Nanobodies (Nb), the recombinant variable domain obtained from camelid heavy chain only antibodies have opened their way as an advantageous alternative to conventional antibodies for diagnostic and analytical applications ^{1,2}. They are easier to isolate from antibody libraries than scFv or Fab and can be produced at high yields and low cost by bacterial fermentation³. Their superior stability, small size and easy genetic manipulation also makes possible to generate recombinant chimeric or tagged nanobodies that enable novel developments and improvements in immunodetection². One of such modification results from the genetic fusion of a biotin acceptor peptide to their C-terminus, which allows their site-specific in vivo biotinylation by over expression of a biotin ligase during their production in *E. coli*^{4,5}. In that way, the biotinylated nanobodies can be efficiently immobilized in an oriented manner on streptavidin coated surfaces, attaining high coating densities due to their small size (15 kDa; $4 \times 2.5 \times 3$ nm) and thus boosting the assay sensitive in immunoassays or biosensor applications ⁶⁻⁹. This also offers an easy way of preparing efficient nanobody immunoadsorbents for high-fold concentration and further analysis of trace analytes. In this work we describe the use of magnetic beads decorated with nanobodies for immunoconcentration of cyanobacterial microcystins (MCs) and its direct analysis by quantitative MALDI-TOF.

Cyanobacterial blooms and their toxic products are receiving increase attention as a serious health problem. Cyanobacteria produce toxins that affect humans through consumption or recreational use of contaminated fresh water sources, and they also affect the wildlife and domestic animals^{10,11}. Microcystins are among the most common cyanobacteria metabolites found in aquatic ecosystems and form a highly diverse group of heptapeptide liver toxins with a large number of structural variants which vary in toxicity ¹²,**figure S1**. The most studied MC is
MC-LR that is one of the most toxic congeners and commonly produced by many species of cyanobacteria ^{13,14}. In addition to its hepatotoxic effects, MC-LR has also been possessed with neurotoxic, reproductive and tumor promoting effects ¹⁵⁻¹⁷. The toxicological evidence on MC LR was the main reason why the World Health Organization recommended a guideline value of 1 μ g/L for MC-LR in drinking water, which has been adopted by regulatory authorities in many countries ^{13,18}.

Different methods have been developed for the analysis of MC-LR including instrumental and immunochemical tests, but many of them are either not informative about the occurrence of individual congeners, are not sensitive enough to detect trace amounts of the toxin, or are difficult to use with complex matrices requiring laborious cleanup procedures that limit the parallel analysis of big sample loads. To overcome these limitations we developed an alternative method that is based on the following premises: a) MCs are small and thus the binding capacity of any immunoadsorbent becomes limited by the size, orientation and packing of the antibody, making the biotinylated nanobodies excellent candidates for the task. b) Since the molecular weight of the MCs variants is around the 900-1100 Da range, the MALDI-TOF instruments in reflector mode are particularly suitable for the accurate and sensitive detection of the individual congeners. c) The soft ionization characteristic of MALDI-TOF would allow the ionization of MCs by disruption of the nanobody-MCs complexes without the generation of antibody fragment ions that may interfere with their analysis. d) While MALDI-TOF is not commonly used for quantitative analysis, it can precisely quantitate the ion abundance by referencing the peak intensity to that of an internal standard with similar physicochemical properties than the target analyte¹⁹⁻²¹. Under these bases, we developed the method shown in **figure 1**. The nanobody A2 to MC-LR that is used to capture the toxin was isolated from a llama antibody phage display

library using an off-rate selection strategy that selected for its high affinity. Nb A2 has broad cross-reactivity with other MCs and has been previously used for the sensitive detection of the toxin by ELISA ²². Due to the concentration/separation step, the new method surpassed the sensitivity attained by ELISA with the same nanobody and gets rid of matrix contaminants being thus more compatible with biological samples. In addition, it provides the identification of the captured variants.

MATERIALS AND METHODS

Microcystin-LR, YR and RR were from (Alexis, Enzo Life Sciences, Exeter, UK). Alphacyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and the low molecular weight peptide calibration standard were obtained from Bruker Daltonics, (Frederikssund, Denmark). MagnaBind[™] Streptavidin Beads (MB) were from (Thermofisher, MA, USA). HPLC grade methanol and acetonitrile were from Baker (Phillipsburg, NJ). Bovine serum albumin (BSA) was from Golden West Biologicals (Temecula, CA, USA) trifluoroacetic acid (TFA), β-mercaptoethanol (99.9%), and all other reagents were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO).

Synthesis of the Internal standard (IS). The IS was prepared by reaction of MC-YR with β mercaptoethanol as described before ²³. Briefly, 250 µl of 0.1 µM MC-YR dissolved in 50% methanol/50% 100 mM borate buffer, pH 10.5 were reacted with 10 µl of β -mercaptoethanol for 6 h a room temperature under nitrogen. The mixture was diluted 5 times with water, acidified to pH 3 with acetic acid and extracted on a SPE C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) column. IS standard was then eluted with methanol, quantitated by HPLC/UV, and kept a -20°C.

Preparation of the immunosorbent. All separation steps using the MBs were performed using Eppendorf tubes as follows: the MBs were briefly centrifuged at 6000 x g for 1 min, were

concentrated on one side of the tube under a strong magnetic field for 1 min, and the liquid phase was gently removed with a pipette. Washing was performed by resuspension of the MBs in 1ml of phosphate saline buffer, pH 7.4 (PBS) containing 0.1% of Tween 20, followed by two additional washes with the same buffer. All steps were performed using buffers and tubes chilled on ice to avoid aggregation of the MBs. To prepare the immunosorbent, 200 μ L of MBs were washed as described and were resuspended in 1 mL of 0.2% BSA (PBS-BSA) containing 40 μ g/mL of the *in vivo* biotinylated nanobody A2. After 30 min a room temperature, the MBs loaded with Nb (A2-MB) were washed, resuspended in 200 μ L PBS-BSA and kept at 4°C until used. To include the IS in the immunosorbent, 100 μ l of Nb-MBs were incubated with 5 ng of the IS for 30 min, the A2-IS-MBs were then washed, resuspended in 100 μ L of PBS-BSA and kept at 4°C until used.

Immunoconcentration and Nb-QMS analysis of MCs. One mL of sample or MC standards was supplemented with 100 μ L of 10 x PBS-BSA and 5 μ L of A2-IS-MB. Ten minutes later, the beads were washed as described before, and two additional washes with 0.002% Tween 20 in MilliQ water were included to remove inorganic salts that could interfere with the MALDI-TOF analysis. After the final wash, the beads were resuspended in 20 μ L of CHCA matrix (10 mg/mL in acetonitrile:water (50:50 v/v) with 0.05% TFA) and 2 μ L/spot were dispense on three spots of the MALDI target and permitted to dry at room temperature. The analysis was performed in a Microflex LRF MALDI-TOF (Bruker Daltonics) operated in positive ion reflectron mode using a 337 nm nitrogen laser and delayed extraction. The instrument was optimized in the 800-2000 *m*/*z* range and the laser (50% potency) was fired 250 times at each of 8 individual places per spot (2000 shots per spot). The calibration curves were obtained by plotting the ratio of the ion intensity of the individual MCs divided by the ion intensity of the IS by triplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

As discussed above, nanobodies have numerous properties that make them a salient option for immunoanalytical applications. We have described methods for their selection that are based on their *in vivo* biotinylation, which not only facilitates the high throughput selection of the best clones, but as mentioned before, provides site-specific biotinylated nanobodies that can be immobilized strongly in an oriented fashion on streptavidin/avidin-coated solid supports ²². In this study, we took advantage of this feature to prepare an immunoadsorbent to capture and concentrate trace amounts of MCs using streptavidin small magnetic beads (MBs) pre-loaded with the biotinylated anti-MC nanobody A2 and an internal standard, **figure 1**.



Figure 1. Schematic representation of the analysis of MCs by nanobody-captured analyte detection by quantitative MALDI-TOF (Nb-QMS). Streptavidin coated magnetic beads, that have been pre-loaded with the biotinylated nanobody A2 and an internal standard, are used to capture the MCs. After magnetic concentration and washing, the beads are mixed with matrix and directly analyzed by MALDI-TOF.

The addition of beads to the matrix promotes a more even distribution of the analyte on the MALDI target. Since our aim was to be able to analyze the MB-captured toxins directly on the MALDI target, we initially studied the influence of the MBs on the MC-LR signal, figure 2. While there was a small decrease in peak intensity in the presence of beads, the latter promoted a more even crystallization of the matrix yielding a more uniform distribution of MC-LR across the target surface. This is of great relevance for the quantitative analysis of the toxin because it reduces the occurrence of regions of analyte accumulation. The uneven distribution of the analyte is also counteracted by the addition of an internal standard as discuss below.



Figure 2. Effect of the presence of MB on the crystallization and intensity of the MC-LR

peak. Two microliters of a mixture of equal volumes of MC-LR (0.5 μ g/L in TA) and α -CHCA (20 mg/mL in TA) were spotted on the target in the absence (A) or presence (B) of MBs (25 μ g/L) and the intensity of the 995.5 m/z peak was collected at 8 different points in each spot (250 shots/point). The box and whisker representation of the peak intensity obtained for 5 spots of each condition is shown at the bottom (P<0.05)

Immunoconcentration with Nb A2 allows direct detection of small amounts of MC-LR by MALDI-TOF. We next prepared the immunosorbent beads by preloading the streptavidin MBs with and excess of the biotinylated nanobody A2. This nanobody recognizes different MC congeners²² and carries a C-terminal 15-mer peptide tag that is biotinylated *in vivo* when it is produced in *E. coli* cells that overexpress the biotin ligase BirA ⁵. According to the biotin binding capacity reported by the manufacturer the MBs could bind 3.5 nmoles (~50 µg) of biotinylated Nb per mg, which corresponds to a MC-LR binding capacity of 3.5 µg/mg. To studied whether the MCs captured on the beads could be directly analyzed on the MALDI-target, one mL of PBS containing different concentrations of MC-LR was incubated with 5 µL of MBs (50 µg) pre-loaded with Nb A2 (A2-MBs). The washed beads were resuspended in 20 µL of matrix and were directly analyzed by MALDI-TOF. Under these conditions, which represent a 50 x concentration, it was possible to detect up to 12.5 ng/L of MC-LR (with a signal/noise ratio of the MH+ 995.5 ion =3.2 ± 0.1), **figure 3**.



target. The sample (1 mL) was immuno-concentrated using 5 μ L of beads, which after washing were resuspended in 20 μ L of matrix resulting in a 50-fold concentration. Each concentration of the toxin was analyzed in three separated experiments.

The Nb-coated beads can be equipped with an internal standard to quantitate the toxin Considering that the ion current in MALDI-TOF is proportional to the amount of analyte, the method has an intrinsic potential for quantitative analysis. However, as already discussed, a major hindrance to the use of MALDI-TOF for quantitative purposes is the heterogeneous incorporation of the toxin during crystallization. The addition of an internal standard (IS), which has similar mass and physicochemical characteristics than the analyte, adjusts for some of the unevenness intrinsic to sample preparation and ion detection. Previously, we have used ISs prepared by the reaction of sulfhydryl compounds with the methylene group of the N methyldehydroalanine (Mdha) residue of MC congeners²³. This is a straightforward reaction where the entire amount of MC is converted into the final product. In this study, we synthesized the IS by reacting MC-YR with β -mercaptoethanol (MH+ 1123.657 Da), figure S2. We chose MC-YR because it is one of the heaviest MC congeners and after derivatization it will shift away from the m/z range of most MCs. As expected, owing to the fact that the nanobody A2 was isolated from a llama immunized with MC-LR conjugated to thiolated ovalbumin using the same chemistry, the IS showed strong reactivity with the Nb A2 (not shown). This enabled its preloading on the A2-MBs to generate a ready-to-use adsorbent (A2-IS-MB) equipped with the nanobody and the IS. The amount of IS to be added to the A2-MBs was chosen to give an ion intensity equal to that of a 0.25 µg/L MC-LR sample. This only consumes a minor fraction (0.14%) of the total MC-binding capacity of the beads, which does not affect the capturing capacity of the beads.

In our setting, a small amount of beads (5 μ L) are used to bind the MCs present in a relatively larger volume of sample (1 mL). This provides a high concentration ratio, but could turn

unfavorable for the rapid and quantitative capture of the toxins; however, as shown in **figure 4**, this was not the case. The relative intensity of the MH+ 995.5 Da ion to the IS reached its maximum after 4.5 min, and even after a short incubation time of 1.5 min most of the MC-LR was already bound to the beads. Based on this, 10 min was adopted as the sample incubation time.



Figure 4. Kinetics of the binding of MC-LR to the A2-IS-MBs. The A2-IS-MBs were incubated for different periods with 0.1 μ g/L MC-LR and the relative intensity of the MH+ 995.5 Da to the IS ion was determined by triplicates.

The Nb-QMS method performed with high sensitivity and no matrix interference. Based on the previous experiments we optimized the Nb-QMS method for the quantitation of MCs as described in the Method section. Figure 5 shows the titration curves obtained in the 0-0.1 μ g/L and 0-5 μ g/L range. At low concentrations, a second-order polynomial adjustment was used,

while a linear regression was satisfactory at higher concentrations. The limit of detection (LD) defined as the concentration of MC-LR corresponding to the MC-LR/IS intensity of the zero sample (n=16) plus 3 standard deviation was 0.0125 μ g/L.



Figure 5. MC-LR Nb-QMS titration curves. Two curves are shown in the 0-0.1 μ g/L (left) and 0-5.0 μ g/L (right) range. Each concentration was determined by triplicates.

Since our goal was to develop a method for trace analysis, the accuracy of the Nb-QMS was studied in the sub-microgram/L range. To this end, we initially analyzed the recovery of MC-LR from tap and fresh water samples spiked with various amounts of the toxin. The fresh water samples were collected from dam reservoirs in the Rio Negro, Uruguay, and only those samples with <0.2 μ g/L of initial MC-LR were used. **Table 1** shows that excellent recoveries wereobtained even al the lowest spiking concentration tested, indicating that the limit of quantitation of the method in this matrix is at least of 0.025 μ g/L.

		Spiked w/ MC-LR 0.025 µg/L		Spiked w/ MC-LR 0.050 µg/L		Spiked w/ MC-LR 0.10	
	Unspiked					μg/L	
	MC µg/L	MC µg/L	%Recovery	MC µg/L	%Recovery	MC µg/L	%Recovery
T1	<ld< td=""><td>nd</td><td>nd</td><td>0.056 ± 0.003</td><td>112</td><td>0.118 ± 0.010</td><td>118</td></ld<>	nd	nd	0.056 ± 0.003	112	0.118 ± 0.010	118
T2	<ld< td=""><td>0.025 ± 0.003</td><td>99</td><td>0.038 ± 0.003</td><td>76</td><td>0.067 ± 0.001</td><td>67</td></ld<>	0.025 ± 0.003	99	0.038 ± 0.003	76	0.067 ± 0.001	67
T3	<ld< td=""><td>0.029 ± 0.002</td><td>117</td><td>0.047 ± 0.007</td><td>94</td><td>0.103 ± 0.006</td><td>103</td></ld<>	0.029 ± 0.002	117	0.047 ± 0.007	94	0.103 ± 0.006	103
T4	<ld< td=""><td>0.028 ± 0.003</td><td>112</td><td>0.059 ± 0.004</td><td>118</td><td>0.090 ± 0.005</td><td>90</td></ld<>	0.028 ± 0.003	112	0.059 ± 0.004	118	0.090 ± 0.005	90
T5	<ld< td=""><td>$0.024 \ \pm 0.002$</td><td>94</td><td>0.048 ± 0.003</td><td>96</td><td>0.083 ± 0.004</td><td>83</td></ld<>	$0.024 \ \pm 0.002$	94	0.048 ± 0.003	96	0.083 ± 0.004	83
F1	<ld< td=""><td>0.029 ± 0.003</td><td>116</td><td>0.044 ± 0.003</td><td>89</td><td>0.073 ± 0.011</td><td>73</td></ld<>	0.029 ± 0.003	116	0.044 ± 0.003	89	0.073 ± 0.011	73
F2	<ld< td=""><td>0.028 ± 0.003</td><td>113</td><td>0.056 ± 0.004</td><td>112</td><td>0.122 ± 0.011</td><td>122</td></ld<>	0.028 ± 0.003	113	0.056 ± 0.004	112	0.122 ± 0.011	122
F3	<ld< td=""><td>0.025 ± 0.002</td><td>100</td><td>0.038 ± 0.001</td><td>76</td><td>0.069 ± 0.001</td><td>69</td></ld<>	0.025 ± 0.002	100	0.038 ± 0.001	76	0.069 ± 0.001	69
F4	<ld< td=""><td>0.026 ± 0.005</td><td>102</td><td>0.036 ± 0.003</td><td>72</td><td>0.076 ± 0.005</td><td>76</td></ld<>	0.026 ± 0.005	102	0.036 ± 0.003	72	0.076 ± 0.005	76
F5	<ld< td=""><td>0.026 ± 0.005</td><td>103</td><td>0.048 ± 0.004</td><td>97</td><td>0.097 ± 0.001</td><td>97</td></ld<>	0.026 ± 0.005	103	0.048 ± 0.004	97	0.097 ± 0.001	97
F6	<ld< td=""><td>$0.028 \ \pm 0.002$</td><td>111</td><td>0.051 ± 0.003</td><td>102</td><td>0.079 ± 0.004</td><td>79</td></ld<>	$0.028 \ \pm 0.002$	111	0.051 ± 0.003	102	0.079 ± 0.004	79
F7	0.050 ± 0.009	0.080 ± 0.006	120	0.100 ± 0.006	100	0.131 ± 0.007	82
F8	0.102 ± 0.007	0.124 ± 0.002	91	0.156 ± 0.004	108	0.184 ± 0.004	82
F9	0.055 ± 0.001	0.086 ± 0.003	91	0.113 ± 0.006	116	0.149 ± 0.004	98
F10	0.093 ± 0.006	0.113 ± 0.004	81	0.139 ± 0.002	92	nd	nd
F11	0.043 ± 0.007	0.073 ± 0.004	123	0.094 ± 0.003	103	0.124 ± 0.005	82
F12	0.184 ± 0.004	nd	nd	0.237 ± 0.004	107	0.294 ± 0.011	110

Table 1. Analysis of spiked water samples by Nb-QMS

LD: limit of detection. All samples were analyzed in triplicates. T=tap and F= fresh water samples.

The precision of the method was established using a water sample with undetectable concentration of MC-LR that was spiked with 0.025 or 0.050 μ g/L of the toxin. The sample was analyzed in quintuplicates, 5 times in the same day (intra-day precision) or 5 times in five different days (inter-day precision) the RSD% in both cases was lower than the acceptance

criteria (RSD< 20%) for bioanalytical assays suggested by the SANTE guidance document of the European Union²⁴.

methou						
Spike concentration						
(µg/L)	0.025	0.050				
Intra-day precision						
Replicates	5	5				
Mean value (µg/L)	0.025	0.049				
RSD%	1.6	3.6				
Inter-day precision						
Days	5	5				
Mean	0.025	0.049				
RSD%	7.7	8.0				

Table 2. Precision parameters of the Nb-QMS

mathad

Each sample replicate was analyzed in five different target spots. RSD%: Percentage of the relative standard deviation

The use of MBs not only allows concentrating the toxin, but it also works as a purification step. This is an advantageous feature because it gets rid of potential interferences during MALDI analysis when the toxin is determined in complex matrices. To test this, different serum samples were spiked with the toxin and analyzed by the Nb-QMS method. In spite of the fact that the serum samples were analyzed directly without dilution, there was no interference from the matrix and the spectra were clean and similar to the ones obtained with water samples, **figure S3**. The Nb-QMS performed with excellent recoveries, and the limit of quantitation was unaffected, **table 3**.

	Unspiked	Spiked w/ MC-LR 0.025 µg/L		Spiked w/ MC-LR 0.050 μg/L		Spiked w/ MC-LR 0.10 μg/L	
		%		%		%	
Sample	MC µg/L	MC µg/L	Recovery	MC µg/L	Recovery	MC µg/L	Recovery
Human 1	<ld< td=""><td>0.027±0.002</td><td>109</td><td>0.047±0.003</td><td>93</td><td>0.092±0.004</td><td>92</td></ld<>	0.027±0.002	109	0.047±0.003	93	0.092±0.004	92
Human 2	<ld< td=""><td>0.027±0.001</td><td>108</td><td>0.057 ± 0.004</td><td>114</td><td>0.105±0.005</td><td>105</td></ld<>	0.027±0.001	108	0.057 ± 0.004	114	0.105±0.005	105
Bovine 1	<ld< td=""><td>0.030±0.007</td><td>120</td><td>0.043±0.002</td><td>86</td><td>0.103±0.004</td><td>103</td></ld<>	0.030±0.007	120	0.043±0.002	86	0.103±0.004	103
Bovine 2	<ld< td=""><td>0.027 ± 0.002</td><td>107</td><td>0.051±0.003</td><td>103</td><td>0.097±0.003</td><td>97</td></ld<>	0.027 ± 0.002	107	0.051±0.003	103	0.097±0.003	97
Bovine 3	<ld< td=""><td>0.029±0.002</td><td>115</td><td>0.044±0.003</td><td>88</td><td>0.086±0.014</td><td>86</td></ld<>	0.029±0.002	115	0.044±0.003	88	0.086±0.014	86
Ovine	<ld< td=""><td>0.024±0.002</td><td>94</td><td>0.051±0.002</td><td>102</td><td>0.080±0.003</td><td>80</td></ld<>	0.024±0.002	94	0.051±0.002	102	0.080±0.003	80
Llama 1	<ld< td=""><td>0.021±0.002</td><td>82</td><td>0.045±0.002</td><td>90</td><td>0.083±0.003</td><td>83</td></ld<>	0.021±0.002	82	0.045±0.002	90	0.083±0.003	83
Llama 2	<ld< td=""><td>0.028±0.002</td><td>112</td><td>0.053±0.004</td><td>106</td><td>0.079±0.003</td><td>79</td></ld<>	0.028±0.002	112	0.053±0.004	106	0.079±0.003	79
Llama 3	<ld< td=""><td>0.028±0.002</td><td>113</td><td>0.059±0.002</td><td>117</td><td>0.111±0.003</td><td>111</td></ld<>	0.028±0.002	113	0.059±0.002	117	0.111±0.003	111

Table 3. Analysis of spiked serum samples by Nb-QMS

Finally, in addition to the individual analysis of MC-LR, the Nb-QMS can be used to detect other MCs. Since the A2 nanobody cross-reacts to a large extend with different congeners, most of the MC variants that can be analyzed by MALDI-TOF can be detected simultaneously by Nb-QMS if present in a given sample. This is exemplified in **figure 4S**, showing the titration curves obtained by simultaneous capturing of MC-LR, RR and YR, three of the most common MCs

found in local blooms. While this shows that the precise measuring of individual congeners would require dedicated standard curves due to slight variation in the ionization efficiency of each variant, these curves can be acquired from the same runs requiring not additional efforts other than the preparation of a combined standard.

CONCLUSIONS

The method presented here attains detection levels that are well below the WHO guide line value and the strictest limits imposed by the regulations in different countries. To a large extent, this was accomplished due to the outstanding properties of nanobodies that allowed to prepared solvent-oriented and high-density stable immunosorbents. The A2-IS-MBs could be kept as a ready-to-use reagent, and the inclusion of IS not only enables the quantitation of toxin but it also compensates for losses of MBs during the separation/washing steps, which is critical considering the high volume to beads ration. In addition to the sensitive detection of MCs the Nb-QMS method also provides information about the mass of the captured congeners allowing in many cases their identification. This is extremely useful because the toxicity varies among MC variants. Comparing to ELISA methods, it also helps to avoid the interference of ADDAcontaining byproducts that commonly appear after chlorination in water treatment utilities. Indeed, most ELISA kits used in these plants are based on antibodies that are highly reactive to the ADDA group, and therefore these byproducts may give place to false positive results²⁵. In addition to drinking water, the increasing problem of cyanobacterial blooms threatens our capacity to ensure the safety of food products. In that regard, the microcystin Nb-QMS method is a powerful tool to monitor the occurrence of trace amounts of these toxins in food and to understand its traffic in the food chain in contaminated ecosystems.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported with funds provided by grants CSIC 984 UdelaR, FMV 136206 ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay) and PEDECIBA. MP is a recipient of a scholarship from ANII and CAP (Comisión Académica de Posgrado, UDELAR).

SUPPORTING INFORMATION: Figure S1. General structure of MCs. Figure S2. Synthesis of internal standard and MALDI-TOF spectra. Figure S3. Representative spectra of the MC-LR peak obtained after analysis of serum samples spiked with 0.025 μ g/L of the toxin. Figure S4. Simultaneous detection of MC-LR MC-RR and MC-YR by Nb-QMS.

ORCID

Gualberto Gonzaalez-Sapienza: 0000-0003-1824-0611

REFERENCES

- (1) De Meyer, T.; Muyldermans, S.; Depicker, A. Trends Biotechnol 2014, 32, 263-270.
- (2) Gonzalez-Sapienza, G.; Rossotti, M. A.; Tabares-da Rosa, S. *Frontiers in immunology* 2017, 8, 977.
- (3) Muyldermans, S. Annu Rev Biochem 2013, 82, 775-797.
- (4) Beckett, D.; Kovaleva, E.; Schatz, P. J. Protein Sci 1999, 8, 921-929.
- (5) Rossotti, M.; Tabares, S.; Alfaya, L.; Leizagoyen, C.; Moron, G.; Gonzalez-Sapienza, G. *Biochimica et biophysica acta* **2015**, *1850*, 1397-1404.
- (6) Rossotti, M. A.; Pirez, M.; Gonzalez-Techera, A.; Cui, Y.; Bever, C. S.; Lee, K. S.;

Morisseau, C.; Leizagoyen, C.; Gee, S.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Analytical chemistry* **2015**, *87*, 11907-11914.

- (7) Zhu, M.; Gong, X.; Hu, Y.; Ou, W.; Wan, Y. J Transl Med 2014, 12, 352.
- (8) Li, M.; Zhu, M.; Zhang, C.; Liu, X.; Wan, Y. Toxins (Basel) 2014, 6, 3208-3222.
- (9) Hernot, S.; Unnikrishnan, S.; Du, Z.; Shevchenko, T.; Cosyns, B.; Broisat, A.; Toczek, J.;

Caveliers, V.; Muyldermans, S.; Lahoutte, T.; Klibanov, A. L.; Devoogdt, N. *J Control Release* **2012**, *158*, 346-353.

- (10) Carmichael, W. W.; Boyer, G. L. Harmful Algae 2016, 54, 194-212.
- (11) Cheung, M. Y.; Liang, S.; Lee, J. J Microbiol 2013, 51, 1-10.
- (12) Svircev, Z.; Drobac, D.; Tokodi, N.; Mijovic, B.; Codd, G. A.; Meriluoto, J. *Arch Toxicol* 2017, *91*, 621-650.
- (13) Chorus, I.; Falconer, I. R.; Salas, H. J.; Bartram, J. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* **2000**, *3*, 323-347.

- (14) de Figueiredo, D. R.; Azeiteiro, U. M.; Esteves, S. M.; Goncalves, F. J.; Pereira, M. J. *Ecotoxicol Environ Saf* **2004**, *59*, 151-163.
- (15) Chen, L.; Chen, J.; Zhang, X.; Xie, P. J Hazard Mater 2016, 301, 381-399.
- (16) Hu, Y.; Chen, J.; Fan, H.; Xie, P.; He, J. Environ Sci Pollut Res Int 2016, 23, 7211-7219.
- (17) Zegura, B. Mini Rev Med Chem 2016, 16, 1042-1062.
- (18) Ibelings, B. W.; Backer, L. C.; Kardinaal, W. E.; Chorus, I. Harmful Algae 2015, 49, 63-74.
- (19) Bucknall, M.; Fung, K. Y.; Duncan, M. W. J Am Soc Mass Spectrom 2002, 13, 1015-1027.
- (20) Schwarzinger, C.; Gabriel, S.; Beissmann, S.; Buchberger, W. J Am Soc Mass Spectrom2012, 23, 1120-1125.
- (21) Szajli, E.; Feher, T.; Medzihradszky, K. F. Mol Cell Proteomics 2008, 7, 2410-2418.
- (22) Pirez-Schirmer, M.; Rossotti, M.; Badagian, N.; Leizagoyen, C.; Brena, B. M.; Gonzalez-Sapienza, G. *Analytical chemistry* **2017**, *89*, 6800-6806.
- (23) Roegner, A. F.; Schirmer, M. P.; Puschner, B.; Brena, B.; Gonzalez-Sapienza, G. *Toxicon* **2014**, *78*, 94-102.
- (24) SANTE; 2017. 2017.
- (25) He, X.; Stanford, B. D.; Adams, C.; Rosenfeldt, E. J.; Wert, E. C. *Water Res* 2017, *126*, 515-523.

TOC



Ultrasensitive MALDI-TOF quantitation of microcystins in complex matrices by direct on-target analysis of nanobody-captured toxins

¹Macarena Pírez-Schirmer, ²Beatriz M. Brena, and ^{1*}Gualberto González-Sapienza
¹Cátedra de Inmunología and ²Cátedra de Bioquímica, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UdelaR, Uruguay



Figure S1. Structure of microcystin LR. Microcystins are a family of cyclic heptapetide toxins. The basic structure is formed by 2 protein and 5 non-protein amino acids. The 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca;4,6-dienoic acid (ADDA) is common among MC congeners, while the variation of the two protein amino acids is the main cause of their structural diversity. MeAsp, D-erythro-b-methylaspartic acid, Mdha, N-methyl-dehydroalanine.



Figure S2. Synthesis of the internal standard and MALDI-TOF spectra. The top spectrum corresponds to MC-YR and the bottom one to the unpurified IS, showing that all the MC-YR was reacted to yield the IS.



Figure S3. Representative spectra of the MC-LR peak obtained after analysis of serum samples spiked with 0.025 μ g/L of the toxin.



Figure S4. Simultaneous detection of MC-LR MC-RR and MC-YR by Nb-QMS. Top, spectra of the three MCs captured from standard solutions on Nbi-MBs and analyzed directly on the MALDI target. The peak of the IS is not shown. Each concentration of the toxins was analyzed in three separated experiments. Bottom, titration curves of the three MCs derived from the data shown on the top of the figure.