

DETECCIÓ DE PESTICIDES EN SÒLS PER TÈCNiques D'ELISA BASEDES EN PARTÍCULES MAGNÈTIQUES

Anna Oubiña, Jordi Gascón i Damià Barceló¹

RESUM

Durant els últims cinc anys hom ha observat un important increment en el nombre de treballs en el camp de les tècniques immunoenzimàtiques, com són els immunoassaigs (EIA, *Enzyme Immunosorbent Assay*) per detectar pesticides. La tecnologia dels EIA es coneix des de fa uns vint anys; de fet, és una tècnica prou acurada i sensible, molt utilitzada en els diagnòstics clínics i veterinaris; per tant, és lògic i, de fet, inevitable emprar aquestes tècniques en el camp del medi ambient.

Els EIAs són tècniques basades en anticossos, que combinen les propietats d'unió dels analits als anticossos amb els avantatges d'amplificació del senyal d'un enzim. Al nostre laboratori estem aplicant aquestes tècniques immunoenzimàtiques des de fa més d'un any. Els anticossos emprats presenten la particularitat de trobar-se units a partícules magnètiques que fan que els resultats obtinguts siguin més pulcres i precisos comparats amb altres tipus d'ELISAs.

1. Departament de Química Ambiental. CID-CSIC. c/ Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.

PARAULES CLAU: ELISA, EIA, immunoassaig, partícules magnètiques.

RESUMEN

Durante los últimos cinco años se ha observado un incremento importante en el número de trabajos en el campo de las técnicas immunoenzimáticas, como son los inmunoensayos (EIA, *Enzyme Immunosorbent Assay*) para detectar pesticidas. La tecnología de los EIA se conoce desde hace unos veinte años; de hecho, es una técnica bastante metódica y sensible, muy utilizada en los diagnósticos clínicos y veterinarios; por tanto, es lógico y, de hecho, inevitable utilizar estas técnicas en el campo del medio ambiente.

Los EIAs son técnicas basadas en anticuerpos, que combinan las propiedades de unión de los analitos a los anticuerpos con las ventajas de amplificación de la señal de una enzima. En nuestro laboratorio estamos aplicando estas técnicas immunoenzimáticas desde hace más de un año. Los anticuerpos utilizados presentan la particularidad de encontrarse unidos a partículas magnéticas que hacen que los resultados

obtenidos sean más pulcros y precisos comparados con otros tipos de ELISAs.

PALABRAS CLAVE: ELISA, EIA, inmunoensayo, partículas magnéticas.

ABSTRACT

During the last five years there has been seen a significant increase in the number of papers in the field of immunoenzymatic techniques, such as immunoassays (EIA, Enzyme Immunosorbent Assay) to detect pesticides. EIA technologies have been known for twenty years. In fact, it is a through and sensitive technique very widely used in clinical and veterinary diagnosis. Consequently, the use of these techniques in the environmental field is logical and, in fact, unavoidable.

The EIA techniques are based on antibodies and they combine the properties of the union of analytes to antibodies with the advantages of signal enlargement of an enzyme. In the laboratory, these immunoenzymatic techniques have been used for over a year. The antibodies used have the peculiarity of being linked to magnetic particles, making the results more through and accurate when compared with other ELISAs.

KEY WORDS: ELISA, EIA, immunoassay, magnetic particles.

1. INTRODUCCIÓ

Els nivells de pesticides als sòls solen ésser determinats per extracció amb

dissolvents o, més recentment, per extracció en fluid supercrític (SFE). La detecció i quantificació d'aquests pesticides es realitza actualment amb mètodes cromatogràfics, com són la cromatografia líquida (HPLC) i la cromatografia de gasos (GC). No obstant, als últims cinc anys s'ha produït un important increment en el nombre de treballs que utilitzen les tècniques immunoenzimàtiques, com són els immunoassaigs (EIA, *Enzyme Immunosorbent Assay*) per detectar pesticides.

Els immunoassaigs són una de les tècniques actuals més eficaces i emprades en la química clínica. Els EIAs són tècniques basades en anticossos, que combinen les propietats d'unió dels analits als anticossos amb els avantatges d'amplificació del senyal d'un enzim. Presenten una sèrie d'avantatges quan es comparen amb els mètodes de cromatografia líquida i de gasos. Són mètodes senzills (es poden aplicar al camp), sensibles (amb límits de detecció que sovint són inferiors als 10-20 ng/L), ràpids (permeten d'analitzar centenars de mostres per dia), són extraordinàriament selectius, a causa de la interacció antigen/anticòs, i són barats (5-15 \$ enfront 100 US \$ quan la determinació es realitza per GC o HPLC). La reacció immunoquímica contribueix a l'alta selectivitat, com a conseqüència de l'extraordinària capacitat discriminatòria dels anticossos, i de l'alta sensibilitat, per la poderosa capacitat catalítica dels enzims.

La utilització dels immunoassaigs per a la quantificació de compostos orgànics no és una nova tecnologia. Actualment més de la meitat del total dels immunoassaigs clínics del mercat s'han

TAULA I. Avantatges i desavantatges dels ELA

Avantatges	Desavantatges
— Simplicitat i facilitat d'ús	— Cost de desenvolupament i temps
— Especificitat de l'analit	— Interferències
— Elevada capacitat per al tractament d'un gran nombre de mostres	— Nova tecnologia en el camp agroquímic i del medi ambient
— Mínima preparació de la mostra	
— Baix límit de detecció	
— Baix cost per mostra	
— Aplicabilitat	

construït per analits amb un baix pes molecular, la qual cosa representa aproximadament 580.000.000 de dòlars en vendes als Estats Units en 1990. Molts dels formats d'immunoassaig que s'han aplicat exitosament en el camp clínic poden ésser transferits directament a l'anàlisi ambiental. Els assaigs poden ésser quantitius o bé de *screening* (qualitatius).

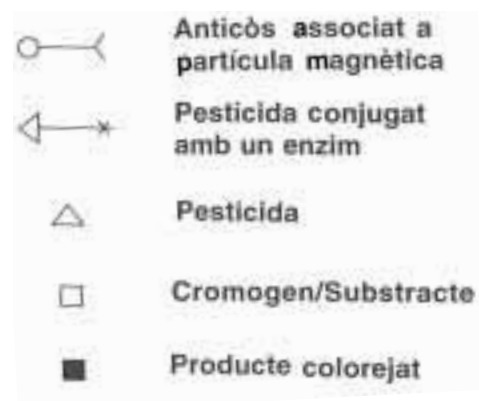
Els immunoassaigs clínics es diferencien dels ambientals perquè els primers, molt freqüentment, quantifiquen compostos polars a matrius sanguínies o d'orina. En canvi, les aplicacions ambientals i alimentàries dels immunoassaigs, freqüentment requereixen el desenvolupament d'anticossos contra analits que són lipofílics i que es troben associats a matrius de diversa complexitat com els sediments i de greixos animals.

Una de les raons per les quals els immunoassaigs són atractius per al desenvolupament de mètodes de *screening* de camp és que en la majoria dels casos les matrius ambientals o fisiològiques poden ésser analitzades amb poca preparació de la mostra. Això, no obstant, depèn de l'anticòs, de l'analit i del format de l'assaig.

Malgrat tot el que s'ha explorat dins del camp de la química analítica, els immunoassaigs encara es consideren un mètode analític nou, tot i que ja tenen més de tres dècades d'història des dels treballs pioners de Yalow i Berson als anys cinquanta. A hores d'ara existeixen moltes variacions sobre la tècnica, però resten els principis, i totes les variacions van dirigides cap a l'augment de l'afinitat dels anticossos *versus* els antígens complementaris. Com qualsevol tècnica analítica, els immunoassaigs presenten avantatges i desavantatges (vegeu taula I).

Els ELISAs (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) es basen en la combinació d'anticossos lligats a suports sòlids, amb reaccions enzimàtiques sensibles, per a produir sistemes capaços de detectar nivells molt baixos de composts químics. La tècnica que empren al nostre laboratori es basa en la utilització de partícules magnètiques com a suport sòlid i un medi de separació en un sistema ELISA per detectar pesticides. Les partícules magnètiques subministren el suport sòlid per als anticossos. Com a conseqüència que els anticossos es troben uniformement dispersats a tota la reacció de mescla, permeten reaccions

FIGURA 1. *Components de l'immunoassaig per a pesticides*



cinètiques ràpides. A més, aquest sistema contribueix a separar l'enzim lliure del lligat, raó per la qual és un mètode molt simple i de fàcil utilització.

Fins ara, en els immunoassaigs s'han aplicat una gran varietat de mètodes de separació, que inclouen tubs recoberts, sistemes de partícules i mètodes de separació basats en doble anticòs. Els sistemes de tubs i microplaques recobertes permeten la separació de la etiqueta lliure i unida sense centrifugació, però presenten dos desavantatges principals: primer, que la superfície del tub/placa limita la quantitat d'anticòs que es pot emprar a la reacció; segon, que l'anticòs es troba massa lluny dels antígens i alenteix la reacció entre l'anticòs i l'antigen. Els sistemes de partícules normalment es dipositen durant l'assaig i han d'ésser centrifugats per a separar l'etiqueta lliure de la unida. Finalment, els mètodes de doble anticòs requereixen un període addicional d'incubació per al segon anticòs. El sistema de partícules magnètiques que utilitzem al nostre laboratori resol

aquests problemes comuns als immunoassaigs.

2. METODOLOGIA

La utilització d'aquest sistema per a la detecció i quantificació d'un pesticida consta de diferents passos. A la figura 1 es mostren els diferents components d'un ELISA.

Al primer pas (figura 2a), s'afegeix el pesticida que volem detectar juntament amb el pesticida marcat amb un enzim a un tub que conté anticòs enganxats a partícules magnètiques. Tant el pesticida com el pesticida marcat (conjugat) competeixen pels llocs d'unió a l'anticòs sobre les partícules magnètiques. Aquesta reacció immunològica continua durant 15-30 minuts (depenent del tipus de pesticida).

Al segon pas (figura 2b), s'aplica un camp magnètic per retenir les partícules magnètiques (amb pesticida i pesticida marcat units als anticòs sobre les partícules, proporcionalment a llur concentració original) al tub i permetre decantar l'excés de reactius. Després de la decantació, les partícules són rentades dos cops amb una solució de rentat.

Al tercer pas (figura 2c), la presència de pesticida marcat es detecta afegint el substrat de l'enzim, peròxid d'hidrogen i el cromogen 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB), que generen un producte acolorit. Després d'una curta incubació (20 minuts), es para i s'estabilitza la reacció de color afegint-hi àcid. Considerant que el pesticida

FIGURA 2a. Reacció immunològica

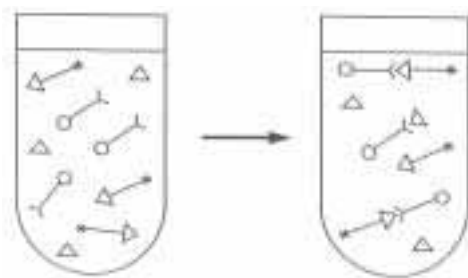


FIGURA 2b. Separació mitjançant partícules magnètiques

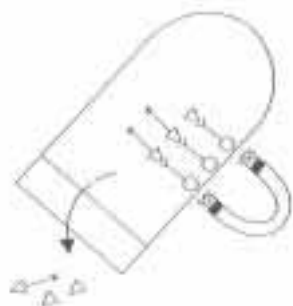


FIGURA 2c. Desenvolupament del color



marcat ha estat en competició amb el pesticida de la mostra pels llocs de l'anticòs, el desenvolupament del color és proporcional al pesticida marcat amb l'enzim i inversament proporcional a la concentració del pesticida de la mostra.

3. DISCUSSIÓ

Al nostre grup s'està realitzant una tasca amb kits comercials per a l'anàlisi de diferents pesticides a aigües, així com la validació amb les tècniques convencionals de cromatografia líquida i de gasos (Gascón i Barceló, 1994; Gascón *et al.*, 1995a; Gascón *et al.*, 1995b; Marco *et al.*, 1995; Oubiña *et al.*, 1995a; Oubiña *et al.*, 1995b). A hores d'ara hem començat a treballar amb la comparació de dues tècniques d'extracció, SFE (*Supercritical Fluid Extraction*) i Soxhlet, amb la detecció per GC-NPD i ELISA. Els immunoassaigs, tant comercials com no comercials, s'han comprovat en experiments de camp amb sòls per diferents grups durant el període 1989-1993. Com a exemple tenim dos estudis (Leavitt *et al.*, 1991; Goh *et al.*, 1991). Les mostres de sòls varen ésser recollides, extretes i mesurades amb EIA. Com a mètode de referència s'utilitzà GC. La correlació entre les dades trobades en ambdós mètodes va ésser elevada, encara que en una sèrie d'experiments (Leavitt *et al.*, 1991) els valors del EIA varen ésser menors que els del GC, a causa de l'efecte de recuperació, mentre que en una altra sèrie d'experiments (Goh *et al.*, 1991) va succeir el contrari, probablement per l'efecte de la reactivitat creuada. La conclusió que se'n va derivar va ésser que l'EIA està indicat per a la determinació d'atrazina a mostres de sòl. Altres exemples de determinació a sòls de diferents pesticides són Goh *et al.*, 1992; Lawruk *et al.*, 1993; Hill *et al.*, 1994. D'altra banda, també s'han realitzat nombrosos estudis amb altres productes, com són els PCBs (Harrison i Melnychuk, 1995).

4. CONCLUSIONS

La disponibilitat de *kits* comercials d'immunoassaig per a l'anàlisi de pesticides i contaminants químics perillosos al mercat és una clara indicació que aquesta tecnologia té un lloc propi al camp del medi ambient com un mètode per a complementar les tècniques analítiques convencionals. Malgrat que és una tècnica relativament nova en el camp de l'anàlisi de pesticides, els immunoassaigs es perfilen com una tecnologia amb molt futur, especialment als assaigs de camp, on es poden eliminar els costos derivats de l'anàlisi de mostres negatives. Els *kits* d'immunoassaig que es troben en aquests moments al mercat estan dissenyats per ésser suficientment sensibles per a l'assaig de mostres directament sense cap necessitat de realitzar passos de concentració o *clean-ups*. A més, entre els beneficis d'aquestes tècniques es troba el seu alt grau d'especificitat, que permet a l'analista analitzar moltes mostres amb poca o cap preparació d'aquestes.

Els ELISAs són ràpids, selectius, sensibles i analíticament vàlids, però s'hauria d'emprar més esforç en el desenvolupament d'algunes àrees, que inclourien nous sistemes per a pesticides que són difícils de determinar pels mètodes convencionals i la utilització d'anticossos pel *clean-up* de la mostra abans del test convencional. D'altra banda, el desenvolupament d'ELISAs multianalit sembla que és una línia de recerca que té molt de futur en aquest camp (Brecht i Abuknesha, 1995). Malgrat tot, es necessitaria estar més familiaritzat, no només amb l'ELISA, sinó també amb altres conceptes i tècniques

immunològiques i bioanalítiques. I és clar que el futur pertany a la biotecnologia i ciències afins.

BIBLIOGRAFIA

- BRECHT, A.; ABUKNESHA, R. (1995). «Multi-analyte Immunoassays Application to Environmental Analysis». *Trends in Analytical Chemistry*, 14, p. 361-371.
- GASCÓN, J.; BARCELÓ, D. (1994). «Rapid Magnetic Particle-Based ELISA Assay Compared with Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detection for Determining Atrazine in Freeze-Dried Water Samples». *Chromatographia*, 38, p. 633-636.
- GASCÓN, J.; DURAND, G.; BARCELÓ, D. (1995a). «Pilot Survey for Atrazine and Total Chlorotriazines in Estuarine Waters Using Magnetic Particle-Based Immunoassay and Gas Chromatography-Nitrogen/Phosphorus Detection». *Environmental Science & Technology*, 29, p. 1.551-1.556.
- GASCÓN, J.; MARTÍNEZ, E.; BARCELÓ, D. (1995b). «Determination of Atrazine and Alachlor in Natural Waters by a Rapid-Magnetic Particle-Based ELISA. Influence of Common Cross-reactants: Deethylatrazine, Deisopropylatrazine, Simazine and Metolachlor». *Analytica Chimica Acta*.
- GOH, K. S.; HERNÁNDEZ, J.; POWELL, S. J.; GARRETSON, C.; TROIANO, J.; RAY, M.; GREENE, C. D. (1991). «Enzyme Immunoassay for the Determination of Atrazine Residues in Soil». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, p. 30-36.
- GOH, K. S.; RICHMAN, S. J.; TROIANO, J.; GARRETSON, C. L.; HERNÁNDEZ, J.; HSU, J.; WHITE, J.; BARRY, T. A.; RAY,

- M.; TRAN, D.; MILLER, N. K. (1992). «ELISA of Simazine in Soil: Applications for a Field Leaching Study». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, p. 554-560.
- HARRISON, R. O.; MELNYCHUK, N. (1995). «Rapid Analysis of PCBs in Soil by Enzyme Immunoassay». *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 59, p. 179-185.
- HILL, A. S.; SKERRIT, J. H.; BUSHWAY, R. J.; PASK, W.; LARKIN, K. A.; THOMAS, M.; KORTH, W.; BOWMER, K. (1994). «Development and Application of Laboratory and Field Immunoassays for Chlorpyrifos in Water and Soil Matrices». *J. Agric. Food Chem.*, 42, p. 2.051-2.058.
- LAWRUK, T. S.; LACHMAN, C. E.; JOURDAN, S. W.; FLEEKER, J. R.; HERZOG, D. P.; RUBIO, F. M. (1993). «Determination of Metolachlor in Water and Soil by a Rapid Magnetic Particle-Based ELISA». *J. Agric. Food Chem.*, 41, p. 1.426-1.431.
- LEAVITT, R. A.; KELLS, J. J.; BUNKELMANN, J. R.; HOLLINGWORTH, R. M. (1991). «Assessing Atrazine Persistence in soil Following a Severe Drought». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, p. 22-29.
- MARCO, M. P.; CHIRON, S.; GASCÓN, J.; HAMMOCK, B. D.; BARCELÓ, D. (1995). «Validation of Two Immunoassay Methods for Environmental Monitoring of Carbaryl and 1-Naphthol in Ground Water Samples». *Analytica Chimica Acta*.
- OUBIÑA, A.; GASCÓN, J.; FERRER, I.; BARCELÓ, D. (1995a). «Evaluation of a Magnetic Particle-Based ELISA for the Determination of Chlorpyrifos-ethyl in Natural Waters and Soil Samples». *Environmental Science & Technology*.
- OUBIÑA, A.; GASCÓN, J.; BARCELÓ, D. (1995b). «Novel Approach for Determining the Cross-reactivities of Immunoassays. Effect of Common Cross-reactants for Chlorpyrifos-ethyl in Water Matrices Using Magnetic Particle-Based ELISA». *Environmental Science & Technology*.