

## BIOTOXINAS EN MOLUSCOS DEL MAR ARGENTINO: DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN Y RESULTADOS DE MEDICIÓN

### BIOTOXINS IN MOLLUSKS OF ARGENTINIAN SEA: DESCRIPTION OF RAPID METHODS OF DETECTION AND RESULTS OF MEASUREMENT

**Alejandra Beatriz Goya** (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [Senasa] - Laboratorio Regional Mar del Plata, Departamento de Toxinas Marinas – Argentina), **Andrew Turner** (Centro para la Ciencia del Medio Ambiente, Pesca y Acuicultura [Cefas] - Weymouth, Dorset, Reino Unido), **Mariana Astiz** (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata [CONICET-UNLP] - La Plata, Argentina), **Rodolfo Goya** (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata [CONICET-UNLP], La Plata, Argentina)

#### Resumen

Las aguas del Mar Argentino son periódicamente afectadas por floraciones de especies fitoplanctónicas productoras de Toxinas Paralizantes de los Moluscos (TPM). En este marco, constituye un requisito indispensable para los mercados externos que el país cuente con herramientas adecuadas para garantizar la inocuidad de los productos que se comercializan. El presente proyecto comenzó con la evaluación y el desarrollo de algunos métodos, y se propuso dos objetivos específicos:

a) Poner a punto el dosaje de TPM basado en el uso de sinaptoneurosomas (SN) de cerebro de ratón en presencia del agente despolarizante veratridina y del compuesto fluorescente voltaje-sensible rodamina 6G. Como referencia se utiliza un estándar de saxitoxina (STX).

b) Diseñar un ensayo inmunológico competitivo rápido para TPM empleando inicialmente un anticuerpo comercial contra STX y, subsecuentemente, utilizando la IgG anti-TPM que se genere en el curso del desarrollo del proyecto. Mediante el bioensayo en ratón y HPLC (en el Reino Unido), se determinó la concentración de TPM en muestras de diversas especies de moluscos bivalvos recogidas durante episodios de toxicidad en distintos puntos del Mar Argentino, comparándose así los resultados de HPLC y bioensayo en ratón.

**Palabras clave:** inmunoensayos, Sinaptoneurosomas Toxinas Paralizantes de los Moluscos, *screening* TPM.

#### Abstract

The Paralytic Shellfish Poisons (PSP) are derivatives of saxitoxin (STX). These phycotoxins are of the highest relevance in Argentina both for their health impact as well as for the economic costs generated by bans the harvesting of shellfish or forfeitures during toxic algal blooms. The potential risk of contamination with PSP requires the toxicological monitoring of harvesting areas and the sanitary control of specimens captured at sea before they are released to the domestic and international markets.

1) Consequently, our first goal aims at setting up a membrane potential assay using mouse brain synaptoneurosomes for the determination of PSP toxin content of mussels and other bivalve species important to the Argentinian shellfish industry.

2) Our second goal is to set up a fast competitive microplate immunoassay for STX that allows a rapid screening for PSP in the field.

The development of an immunodetection kit for PSP in our country would provide a new biotechnological tool for control laboratories and a means of early warning for coastal communes, fishermen and sectors involved to the shellfish exploitation, thus preventing intoxication episodes and shellfish forfeitures.

**Keywords:** immunoassay, Paralytic Shellfish Poisons, Synaptoneurosomes PSP screening.

#### Introducción

##### Marco de esta presentación

En este artículo se presenta un análisis de dos métodos de *screening* rápido para Toxinas Paralizantes de los Moluscos (TPM), que consideramos adecuados para ser desarrollados en la Argentina a un costo accesible. Se trata de técnicas que pueden emplearse en laboratorios de baja complejidad y en los sitios de extracción de moluscos del Mar Argentino. También se presentan los principales resultados obtenidos hasta el momento de bioensayo en ratón y se reseñan las dificultades encontradas.

## Impacto económico y sanitario de las neurotoxinas marinas en la Argentina

Las aguas del Mar Argentino son periódicamente afectadas por floraciones de especies fitoplanctónicas productoras de TPM. A través de la cadena trófica, estas biotoxinas se acumulan en organismos marinos y contaminan recursos de interés pesquero, tales como moluscos bivalvos y gasterópodos, lo que implica un serio riesgo para la salud pública y, por tal motivo, deben ser aplicados estrictos planes de vigilancia sanitaria.

Las TPM derivan de un componente principal, la saxitoxina (STX), y existen más de cincuenta análogos naturales, variables en potencia, pero con idéntico mecanismo de acción (Goya, 2009). Son alcaloides termoestables y neurotóxicos que bloquean los canales de sodio voltaje-dependientes de las células, conduciendo así a la muerte por parálisis respiratoria (Wiese *et al.*, 2010). Estas fitotoxinas marinas son las de mayor relevancia en la Argentina no solo por su impacto sanitario, sino por los costos económicos que se originan en los períodos de veda a la extracción de moluscos o por decomisos de partidas contaminadas durante los brotes de floraciones algales tóxicas. El potencial riesgo de contaminación con TPM obliga al monitoreo toxicológico de las zonas costeras de extracción y al control posdesembarque de los especímenes capturados en altamar como paso previo a su liberación para consumo local o a la exportación.

## Dosaje de TPM en moluscos bivalvos y gasterópodos del Mar Argentino

El bioensayo en ratón (Association of Analytical Communities [AOAC] 959.08) (Anon AOAC, 2005a) es el método de referencia en la Argentina, y aún el más utilizado en todo el mundo, para determinar la concentración de TPM en moluscos. Si bien ha demostrado ser adecuado para la protección de la salud pública, se requieren instalaciones que incluyan facilidades de bioterio e infraestructura para el trabajo con animales. En años recientes, se han validado técnicas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), que permiten la identificación de ciertos

análogos presentes en moluscos y la cuantificación tóxica total (Anon AOAC, 2005b). Sin embargo, el equipamiento requerido es complejo, y los tiempos de análisis, prolongados. En nuestro país no se aplican técnicas cromatográficas para el control de TPM, pues los costos operativos son elevados y se requiere de personal altamente especializado.

## Ensayos funcionales alternativos para TPM

Se han descrito ensayos funcionales alternativos para TPM en bivalvos de interés para la industria pesquera. Una de estas alternativas está constituida por los ensayos con neuronas en cultivo (Manger *et al.*, 1995; Okumura *et al.*, 2005) que son reproducibles, sensibles y correlacionan bien con el bioensayo en ratón. Sin embargo, requieren de instalaciones y personal capacitado para el trabajo con cultivos celulares. En este contexto, un ensayo funcional alternativo –que ofrece una serie de atractivas ventajas en relación con los cultivos neuronales o el bioensayo en ratón– utiliza vesículas neuronales, denominadas sinaptoneurosomas (SN), obtenidas de cerebro de ratón (Nicholson *et al.*, 2002). Los SN permiten detectar con gran sensibilidad la actividad neurotóxica de las TPM en un extracto tisular y son de una mayor reproducibilidad y fácil estandarización respecto del bioensayo en ratón. Se trata de un procedimiento funcional, confiable y de bajo costo, que correlaciona bien con el bioensayo en ratón y requiere solo cuarenta minutos para obtener resultados. Debidamente validado, podría constituir una alternativa al bioensayo en ratón, minimizando así el uso de animales. La ventaja de SN sobre los métodos analíticos, que solo identifican ciertos análogos de STX, es que detecta cualquier análogo de las TPM presente en los moluscos.

## Ensayos de campo para TPM

Existe un creciente interés en el desarrollo de ensayos relativamente sencillos que permitan un *screening* de campo para TPM. En este contexto, los inmunoensayos en microplacas han revelado un alto potencial para la implementación de métodos de campo, rápidos,

específicos, costo-efectivos y de sensibilidad adecuada (Micheli *et al.*, 2002). Ninguno ha sido desarrollado aún en nuestro país.

## RELEVANCIA ECONÓMICO-SANITARIA DEL PRESENTE PROYECTO

El sector pesquero argentino ha experimentado una significativa expansión en los últimos años, en especial en las exportaciones de productos, aunque también en el consumo interno. De hecho, ha superado en volumen y divisas las exportaciones de carne vacuna (Informe de febrero de 2014 de IES Consultores). En este marco, constituye un requisito indispensable para los mercados externos que el país cuente con herramientas adecuadas para garantizar la inocuidad de los productos que se comercializan.

La experiencia del Laboratorio de Biotoxinas Marinas del Senasa en Mar del Plata ha revelado la necesidad de un ensayo funcional sencillo como el de sinaptoneurosomas, que detecte TPM en productos pesqueros externos a la cadena de comercialización tradicional. Tal es el caso de los moluscos bivalvos de zonas intermareales, que pueden ser fácilmente recolectados por lugareños o turistas para consumo familiar, lo que ocurre frecuentemente en las costas patagónicas. Los municipios costeros, a través de sus áreas de bromatología, se beneficiarían al disponer de un ensayo funcional confiable y reproducible, de bajo costo y baja complejidad, que permitiría realizar monitoreos de TPM en los moluscos de sus playas y alertar rápidamente a la población local ante apariciones de brotes de TPM en su jurisdicción.

Otro ejemplo de productos pesqueros para los que no existe monitoreo de TPM son los peces no eviscerados, con que los oceanarios y grandes acuarios del país alimentan a valiosos mamíferos como orcas, delfines y lobos de mar. Han llegado consultas al laboratorio de Senasa Mar del Plata sobre muertes o enfermedad de mamíferos de estos establecimientos cuya causa no pudo identificarse, existiendo la sospecha de que el origen pudo estar en la presencia de TPM en las vísceras de los peces con que se los alimenta (Goya, 2014).

Asimismo, el diseño de un ELISA para TPM posibilitaría producir en el país un kit costo-efectivo

de inmunodetección rápida, que permita el *screening* para TPM en zonas marítimas de extracción comercial de bivalvos o en áreas donde se practica el cultivo de ostras y otros moluscos, a fin de efectuar el monitoreo toxicológico del recurso antes de su extracción.

## DOSAJE DE TPM BASADO EN EL USO DE SINAPTO-NEUROSOMAS

### Fundamento del ensayo

En este bioensayo, la veratridina provoca la apertura reversible de canales de sodio en preparaciones de vesículas sinaptoneurosomales de cerebro de ratón, impidiendo así un balance transmembrana adecuado. En estas condiciones, el agregado de un bloqueante de canales de sodio como la STX o sus análogos (TPM) inhibe el efecto de la veratridina, promoviendo, de un modo dependiente de la concentración de toxina, cambios en el potencial de membrana de las vesículas, el cual es monitoreado mediante un colorante fluorescente sensible al voltaje, la Rodamina 6G.

### Procedimiento de obtención de los sinaptoneurosomas

Se sacrifica un ratón por dislocación cervical y el cerebro entero se trocea y homogeniza en 2.5 mL de solución de ensayo (Hepes 20 mM, pH 7,4 conteniendo NaCl 125 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, glucosa 10 mM y albúmina bovina 1 mg/mL). El homogenizado se diluye con 12,5 mL adicionales de solución de ensayo, se filtra a través de dos capas de una malla de nylon de 100 µm y se centrifuga a 1000 g por 15 minutos. El sobrenadante se descarta, el *pellet* se resuspende en 10 mL de solución de ensayo y se vuelve a centrifugar a 1000 g 15 minutos. El *pellet* final de SN se resuspende en 1 mL de la solución de ensayo.

La obtención de los SN demora unos 40 minutos y cuando se almacenan en hielo no sufren deterioro en la respuesta al potencial de membrana por al menos 6 horas posteriores a su preparación.

*Cuantificación de la fluorescencia emitida por Rodamina 6G*      *Obtención de los resultados*

Las mediciones se realizan en un espectrofluorómetro a 520 nm ( $\lambda_{exc}$ ) y 550 nm ( $\lambda_{em}$ ). En una cubeta de cuarzo con 3 mL de solución de ensayo (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 16 mM, Hepes 20 mM, ajustado a pH 7,4 con Tris-base), se agrega veratridina (100  $\mu$ M concentración final), estándares de STX de concentración conocida (para la puesta a punto del método) o extractos de molusco. La reacción se lleva a cabo en un ambiente termostatzado a 35 °C. Veinte segundos antes de iniciar la lectura, se adiciona Rodamina 6G (0,18  $\mu$ M concentración final) y 100 segundos después se agregan los SN (1 mg de proteína), midiéndose la fluorescencia hasta los 300 segundos (Fig. 1).

La intensidad de fluorescencia obtenida con los estándares de STX (o con las muestras) y veratridina combinados se expresan como porcentaje de la intensidad de fluorescencia de la veratridina en ausencia de la toxina. El porcentaje de inhibición de la muestra se relaciona luego con la curva estándar (sigmoideal) realizada con STX comercial. Se estima la concentración de TPM expresándola como equivalentes de STX/100gr de muestra de molusco. Se valida la técnica utilizando recursos estadísticos.

**Figura 1**

**Obtención de sinaptoneurosomas (SN)**



**Cuantificación de potencial de membrana**



**Características del ensayo con SN**

El ensayo de cada muestra demora unos siete minutos hasta obtener el resultado, tiempo que es comparable al del bioensayo en ratón. Además es posible adaptarlo a un formato en placas de 96 pocillos, aumentando de ese modo la cantidad de muestras que se pueden analizar al mismo tiempo. El método requiere del uso de animales, pero con el cerebro de un ratón es posible ensayar alrededor de veinte muestras independientes, por lo que se reduce en un 95 % el uso de animales de experimentación comparado con el bioensayo en ratón.

Todos estos atributos de la técnica, sumados a su alta correlación con los resultados del bioensayo en ratón ( $r_2 = 0,84$ ,  $n = 120$  informado en (Nicholson *et al.*, 2002), la hacen muy atractiva en razón de la disminución

de costos y menor necesidad de animales. Nuestro objetivo de mediano plazo es desarrollar preparaciones estabilizadas de SN “listas para usar” que puedan distribuirse en forma de kit a laboratorios bromatológicos de comunidades costeras, acuarios y oceanarios.

## INMUNOENSAYO PARA TPM

La STX inmunorreactiva (STXir) se determina adaptando un diseño de ELISA de fase sólida previamente establecido en nuestro laboratorio para otro analito (Reggiani *et al.*, 2006). Como anticuerpo, se utiliza un suero comercial anti-STX (Agrisera, Suecia).

### Procedimiento

En microplacas low-binding de 96 pocillos, se mezclan 60 µl de muestra filtrada o de STX sintética (estándar) con 60 µl de anti-STX (dilución óptima a determinar) y se incuba una hora a 37 °C. La mezcla se transfiere a una placa de ELISA de high-binding recubierta con 100 ng de STX sintética por pocillo y se incuba a 37 °C durante una hora. Luego, se lavan los pocillos con PBST (buffer fosfato salino con 0,1% tritón X-100).

La cantidad de anticuerpo anti-STX unido a la fase sólida se determina usando el kit ABC (Universal ABC elite® kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE. UU.), empleando el sustrato de la peroxidasa ABTS para el desarrollo del color. Las microplacas así procesadas se evalúan por colorimetría, y se leen a 450 nm en un lector de microplacas.

Se miden diferentes concentraciones de estándar comercial de STX con los que se construyen curvas de calibración. La sensibilidad que es posible alcanzar con este método es de al menos 100 ng STX/mL, lo que resulta satisfactorio para un ensayo de *screening*.

### Bioensayo en ratón para TPM

Se aplica el método oficial (AOAC 959.08) para determinar la concentración de toxinas TPM en las muestras de moluscos frescos, que se lavan con agua

de red y se procede al desvalvado para obtener las partes comestibles (carne o pulpa). Se obtiene un homogeneizado utilizando una licuadora de mano (minipimmer), y se pesan 100 g. Se agregan 100 mL de solución de HCl 0,1 M y se homogeneiza con Ultraturrax. Se mide el pH, que debe estar dentro del rango 3,0-3,9.

Se ajusta, si fuera necesario, por goteo y mezcla continua, con una solución de HCl 5 M (para acidificar), o con solución de NaOH 0,1 M (para alcalinizar). La mezcla se hierve cinco minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y se verifica el pH (rango aceptable: 3,0-3,9). Se restituye el volumen a 200 mL con solución acidulada en una probeta. Se centrifuga el extracto ácido y el líquido sobrenadante se inyecta en ratones albinos de la cepa CF1 por vía IP. Según el tiempo de supervivencia de los ratones inoculados, se realizan los cálculos de toxicidad mediante la tabla de Sommer y Meyer (Unidades Ratón/100 g de muestra), que son convertidos a microgramos equivalentes de saxitoxina por kilogramo de muestra (µg STXeq/kg) por medio del Factor de Conversión, calculado oportunamente en el laboratorio. Se hacen las diluciones y cálculos correspondientes para aquellos extractos que producen la muerte de ratones en menos de cinco minutos. El límite máximo permitido por las regulaciones sanitarias es de 800 µg STX eq/kg de tejido de molusco.

## RESULTADOS OBTENIDOS CON EL BIOENSAYO EN RATÓN

### Determinación de la toxicidad y perfiles de Toxinas Paralizantes de los Moluscos en los gasterópodos *Zidona dufresnei* y *Adelomelon beckii* del Mar Argentino

A partir de 41 muestras *Zidona dufresnei* y *Adelomelon beckii* examinadas en este estudio, 38 fueron positivas (detectables) por el bioensayo en ratón, mientras que las 3 que resultaron negativas indujeron síntomas de toxicidad en los ratones, aunque no muerte (Tabla 1). Una de las 38 muestras restantes fue positiva, ligeramente sobre el límite de detección, por lo que no pudo ser cuantificada. Los niveles de TPM detectados abarcaron un rango que se extendió desde inmediatamente encima del límite de detección hasta un valor máximo de 22.468 µg STX eq/kg en una muestra



de vísceras. El nivel máximo de TPM en el tejido muscular comestible del pie fue de 3.365 µg STX eq/kg en un espécimen capturado durante el invierno de 1991, con varias muestras de pies musculares con niveles de TPM mucho mayores que el límite permitido por la legislación. Se dispuso de un número limitado de determinaciones de TPM por bioensayo en ratón conducidas en diferentes partes del animal. Dichos resultados mostraron un alto nivel de acumulación de toxinas en las vísceras, pero no en el pie muscular, que es la porción comestible del caracol. Por tanto, el mayor riesgo de intoxicación para los consumidores está en la ingesta de las vísceras o caldos preparados con el animal entero. La ingesta del pie muscular implica bajo riesgo de intoxicación aun en épocas de floraciones algales de moderada toxicidad.

Tabla 1. Resumen de las 41 muestras de caracol analizadas en este estudio: especies, parte analizada del caracol, área de cosecha, fecha de recolección de las muestras y toxicidad de PSP (µg STX eq/kg) por bioensayo de ratón (BER) y cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) con una postcolumna de derivación de fluorescencia (LC-FLD)

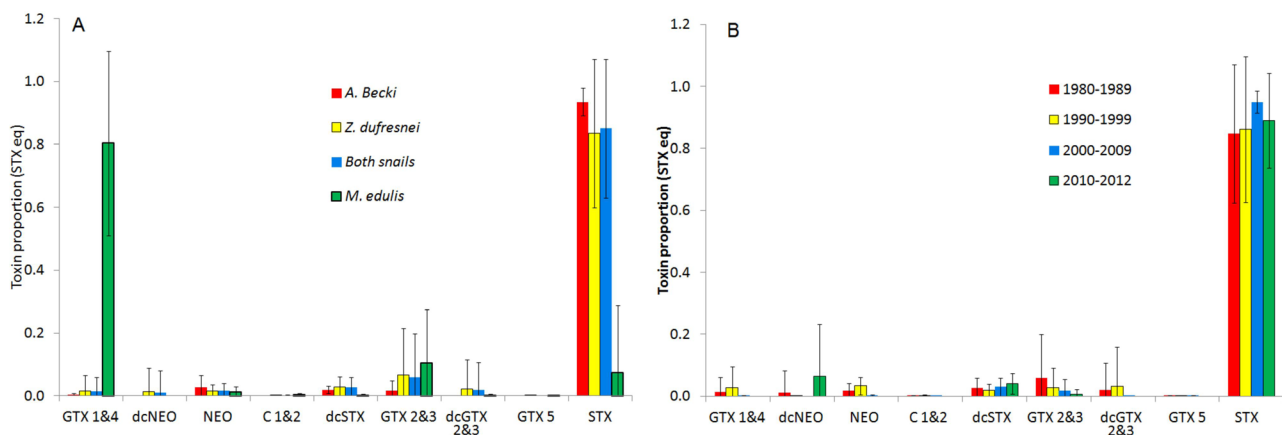
| Muestra         | Especies | Parte del caracol | Área de captura     | Fecha      | Estación  | BER   | LC-FLD |
|-----------------|----------|-------------------|---------------------|------------|-----------|-------|--------|
| 28 <sup>a</sup> | Zd       | Vísceras          | 38°00`              | 07/11/1986 | Primavera | 22468 | 9250   |
| 29              | Zd       | Vísceras          | 38°15`              | 23/03/1987 | Otoño     | 20727 | 18275  |
| 30              | Zd       | Vísceras          | 38°15`              | 24/03/1987 | Otoño     | 31314 | 28532  |
| 32              | Zd       | Mucus             | 38°15`              | 28/04/1987 | Otoño     | 7317  | 5226   |
| 33              | Ab       | Alimento cocido   | 37°00`              | 28/04/1987 | Otoño     | 1159  | 2031   |
| 40              | Zd       | Pie               | 37°30`              | 19/12/1987 | Primavera | 1986  | 1791   |
| 41              | Zd       | Pie               | 43°00`              | 29/01/1988 | Verano    | 2206  | 2098   |
| 43              | Zd       | Pie               | 38°10`              | 18/05/1988 | Otoño     | 3164  | 3793   |
| 46              | Zd       | Pie               | 42°00`              | 15/09/1989 | Invierno  | 1759  | 1840   |
| 47              | Zd       | Pie               | 41°00`              | 17/10/1989 | Primavera | 1911  | 3197   |
| 48              | Zd       | Pie               | 41°00`              | 08/11/1989 | Primavera | 2010  | 275    |
| 50              | Zd       | Pie               | 39°40`              | 13/08/1990 | Invierno  | 1820  | 3076   |
| 52              | Zd       | Pie               | 38°10`              | 28/08/1990 | Invierno  | 1615  | 2322   |
| 57              | Zd       | Pie               | 40°00`              | 30/11/1990 | Primavera | 2662  | 3608   |
| 60              | Zd       | Pie               | 38°30`              | 06/03/1991 | Primavera | 2367  | 1713   |
| 61              | Zd       | Pie               | 37°00`              | 18/07/1991 | Invierno  | 2242  | 1221   |
| 62              | Zd       | Pie               | 39°00`              | 22/07/1991 | Invierno  | 2660  | 5002   |
| 64              | Zd       | Mucus             | 38°00`              | 23/07/1991 | Invierno  | 2557  | 4835   |
| 63              | Zd       | Pie               | 39°00`              | 29/07/1991 | Invierno  | 3365  | 2348   |
| 92              | Zd       | Pie               | 39°00`              | 03/09/1993 | Invierno  | 2101  | 3354   |
| 77              | Zd       | Pie               | 38°00`              | 11/05/1994 | Invierno  | 3830  | 3418   |
| 81              | Zd       | Pie               | 37°53`S / 57°04`W   | 08/11/1994 | Primavera | 1520  | 2168   |
| 80              | Zd       | Vísceras          | 37°50`              | 24/11/1994 | Primavera | 17102 | 21636  |
| 86              | Zd       | Pie               | 38°00`              | 10/02/1995 | Verano    | 1934  | 3129   |
| 87              | Zd       | Pie               | 37°50`              | 13/03/1995 | Verano    | 1554  | 3106   |
| 88              | Zd       | Pie               | 38°00`              | 25/04/1996 | Otoño     | 1677  | 1768   |
| 78              | Zd       | Pie               | 39°00` <sup>b</sup> | 7/10/1996  | Primavera | 540   | 946    |
| 79              | Zd       | Vísceras          | 39°00` <sup>b</sup> | 10/10/1996 | Primavera | 16810 | 10744  |
| 91              | Ab       | Pie               | 37°50`              | 31/05/1997 | Otoño     | Pos   | 2049   |
| 116             | Ab       | Pie               | 38°00`              | 06/06/2005 | Otoño     | 960   | 1325   |
| 119             | Ab       | Pie               | 38°00`              | 08/03/2006 | Verano    | 1070  | 1666   |
| 5669            | Ab       | Pie               | 38°00`              | 03/07/2006 | Invierno  | 990   | 701    |

|       |    |                  |                 |            |           |      |     |
|-------|----|------------------|-----------------|------------|-----------|------|-----|
| 122   | Zd | Visceras cocidas | un <sup>b</sup> | 01/11/2009 | Primavera | 400  | 60  |
| 20209 | Zd | Pie              | 37°00'          | 08/09/2010 | Invierno  | 580  | 373 |
| 22809 | Zd | Pie              | 39°17'          | 21/07/2011 | Invierno  | 360  | 442 |
| 23000 | Zd | Pie              | 38°00'          | 19/08/2011 | Invierno  | 410  | 490 |
| 23002 | Zd | Pie              | 39°17'          | 19/08/2011 | Invierno  | 420  | 475 |
| 23424 | Zd | Pie              | 37°00'          | 07/10/2011 | Primavera | 370  | 206 |
| 130   | Zd | Pie              | 38°00'          | 15/02/2012 | Verano    | <LOD | 74  |
| 131   | Zd | Pie              | 38°00'          | 17/02/2012 | Verano    | <LOD | 115 |
| 132   | Zd | Pie              | 38°00'          | 17/02/2012 | Verano    | <LOD | 62  |

Un = localización desconocida; <sup>a</sup> Muestra que no forma parte del programa oficial de control. <sup>b</sup> Productos asociados con la aparición (brote) de PSP; Zd = *Z. dufresnei*; Ab = *A. beckii*. Pos = PSP positiva (>LOD) pero con toxicidad no cuantificada; LOD = límite de detección (300-350 µg STX eq/kg).

Los datos cualitativos de las mediciones por High Performance Liquid Chromatography con una Postcolumna de Derivación de Fluorescencia (LC-FLD) obtenidos de cada muestra de caracol permitieron el cálculo de las proporciones relativas de cada toxina o par epimérico de toxinas en términos de su contribución al total, expresada en equivalentes de STX. La Figura 2A ilustra los perfiles de toxina promedio determinados en *A. beckii* y *Z. dufresnei* separada y conjuntamente. Además, se han incluido con fines comparativos los perfiles medios de 24 muestras de mejillones de la especie *Mytilus edulis* capturados en un área geográfica similar. El gráfico muestra la dominancia del compuesto primario STX en ambas especies de caracol, donde la STX representa en promedio un 85 % de la toxicidad total de las muestras. Otras toxinas presentes a niveles cuantificables fueron GTX2&3, dc STX y NEO, mientras que solo se encontraron ocasionales trazas de GTX1&4, C1&2 y dcGTX2&3. No se detectó GTX5 mientras que dc NEO solo se halló en una muestra. Los perfiles de toxina cuantificados en las dos especies de caracol resultaron similares, sin diferencias obvias. Por tanto, no se encontró evidencia significativa de contrastes en la acumulación de toxina o su biotransformación en las especies estudiadas. La Figura 2B ilustra los perfiles de toxina promedio (y las correspondientes desviaciones estándar [SD]) en muestras de caracol capturadas en cada una de las cuatro décadas que abarca el estudio. Los datos se resumen de la manera mostrada a fin de estimar si alguno de los perfiles varió entre 1980 y 2012. Globalmente, el gráfico indica que la dominancia de la STX en las muestras de caracol ha sido una característica constante de los gasterópodos contaminados, sin evidencia de cambios a lo largo de los años.

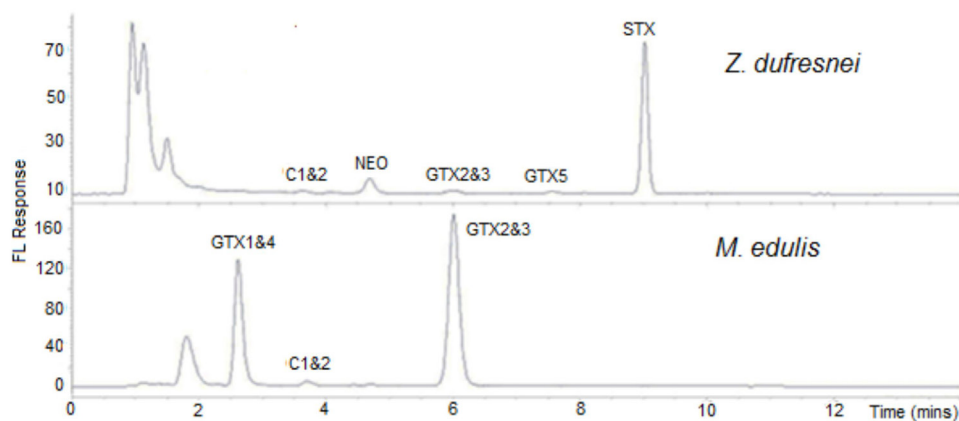
Figura 2 (A y B)



El perfil medio calculado en las 24 muestras de mejillones fue notablemente diferente a los perfiles determinados en los caracoles, como se ejemplifica en el cromatograma de la Figura 3.

En los mejillones dominaron la toxinas GTX (especialmente GTX1&4 así como la GTX2&3), observándose sólo bajas concentraciones relativas de STX. El derivado NEO se detectó en algunos mejillones y se detectaron trazas de C1&2 en alrededor del 25 % de las muestras. Se concluye en que existen diferencias marcadas en los perfiles de toxinas en caracoles y mejillones capturados en ubicaciones geográficas similares. Considerando el amplio período de tiempo durante el cual se recogieron las muestras y la baja variabilidad asociada a las proporciones de los perfiles medios de toxinas halladas en los caracoles, existe una biotransformación de las toxinas GTX presente en los mejillones a STX en los caracoles, presumiblemente debido a la predación de los caracoles carnívoros sobre los mejillones.

Figura 3



## PUESTA A PUNTO DE UN INMUNOENSAJO EN RATÓN

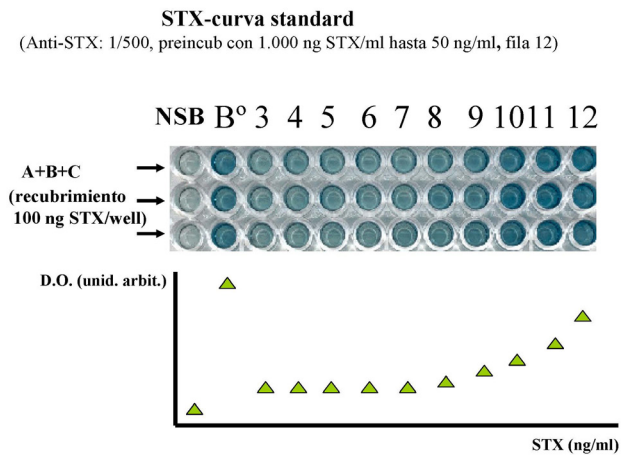
Brevemente, en microplacas low-binding de 96 pocillos se mezclaron 60 µl de STX sintética (estándar) con 60 µl de anti-STX (dilución final elegida 1/500) y se incubaron una hora a 37 °C. La mezcla se transfirió a una placa de ELISA de high-binding recubierta con 100 ng de STX sintética por pocillo y se incubó a 37°C durante una hora. Luego, se lavaron los pocillos con PBST (buffer fosfato salino con 0,1 % tritón X-100).

La cantidad de anticuerpo anti-STX unido a la fase sólida se determinó usando el kit ABC (Universal ABC *elite*® kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE. UU.), empleando el sustrato de la peroxidasa ABTS para el desarrollo del color. Las microplacas así procesadas se evaluaron por colorimetría leyéndolas a 450 nm en un lector de microplacas Bio Tek.

El recubrimiento de las placas con STX fue poco reproducible, por lo que estamos tratando de mejorar este aspecto del ensayo que resulta crítico para obtener un kit útil. Nuestras pruebas sugieren que el buffer carbonato en el que se diluye la STX para el recubrimiento, inactiva la STX debido a su alcalinidad, conduciendo así a una pobre y variable unión al anticuerpo contra STX. La Figura 4 muestra una curva de calibración en la que la placa fue recubierta satisfactoriamente con la STX. Debemos señalar que este tipo de resultados no fue el más común debido a los problemas de recubrimiento antes señalados.



Figura 4



NSB: unión no específica; Bo: unión máxima del anticuerpo en ausencia de STX en el medio; Filas 3 a 12: corresponden a 1000-800-700-600-500-400-300-200-100-50 ng STX / ml, respectivamente; DO: densidad óptica. Cada línea es un triplicado.

### Inmunización de conejos contra TPM

Se realizaron intentos para generar en conejos un antisuero policlonal contra TPM, utilizando como inóculo un pool de TPM obtenidas de extractos de moluscos de alta toxicidad provenientes del banco de muestras del Departamento de Toxinas Marinas del Laboratorio Regional de Mar del Plata del Senasa.

La toxina presente en este concentrado se conjugó a la proteína carrier seroalbúmina bovina (BSA), se procedió a inyectar intramuscularmente mediante varias masas de inóculo (rango: 0,2 mg a 2 mg de complejo por inyección) en conejos de unos 4 kg según un protocolo de inmunización consistente en una primera inyección intramuscular del complejo emulsionado con adyuvante de Freund completo, seguidos en el día 10 y 17 por dos refuerzos subcutáneos en los que el antígeno se emulsiona con adyuvante incompleto de Freund. Con las dosis más altas, los animales mostraron signos de toxicidad severa, hecho que obligó a discontinuar la inmunización. Con las dosis más bajas de inóculo, no se logró detectar un título mínimo de antisuero. Actualmente estamos evaluando procedimientos de conjugación alternativos que reduzcan la toxicidad de los extractos sin afectar su inmunogenicidad.

## BIBLIOGRAFÍA

Anon (2005a), "AOAC Official Method 959.08. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action", en *AOAC Official methods for analysis*, 18<sup>th</sup> Edition Chapter 49: Natural toxins (chapter ed. M.W. Truckses), Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, pp. 79-80.

Anon (2005b), *AOAC Official method 2005.06 Quantitative determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection*, Gaithersburg, MD, USA, AOAC International

Goya, A. B. (2014), "Morbi-mortalidad de fauna marina asociada a floraciones de algas tóxicas", Tercer Congreso Latinoamericano de Rehabilitación de Fauna Marina, San Clemente del Tuyú, Argentina.

Goya, A. B. (2009), "Red tides and marine biotoxins", *INFOPESCA Int.* N.º 38 (abril / junio), pp. 26-32.

Manger, R. L. *et al.* (1995), "Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts", *J AOAC Int* N.º 8 (2), pp. 521-527.

Micheli, L. *et al.* (2002), "Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis", *Anal Bioanal Chem* Vo. 373, pp. 678-684.

Nicholson. R. A. *et al.* (2002), "A rapid and sensitive assay for paralytic shellfish poison (PSP) toxins using mouse brain synaptoneurosomes", *Toxicon* N.º 40, pp. 831-838

Okumura, M. *et al.* (2005), "A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay", *Toxicon* N.º 46 (1), pp. 93-98.

Reggiani P. C., *et al.* (2006), “Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats”, *Gene therapy* Vo. 13, pp. 1214-1221.

Wiese, M. *et al.* (2010), “Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs”, *Mar Drugs* N.º 8, pp. 2185-2211.