

DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO RÁPIDO PARA DETERMINACIÓN DE NIVELES DE TOXINAS PARALIZANTES EN MOLUSCOS DEL MAR ARGENTINO

DEVELOPMENT OF A QUICK ENZYMOIMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF PARALYTIC SHELLFISH POISON LEVELS IN MOLLUSCS OF THE ARGENTINE SEA

Alejandra B. Goya (Departamento de Toxinas Marinas, Laboratorio Regional Mar del Plata, Senasa, Argentina), **Andrew Turner** (Centro para la Ciencia del Medio Ambiente, Pesca y Acuicultura [Cefas], Weymouth, Dorset, Reino Unido) y **Rodolfo G. Goya** (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata [CONICET-UNLP], Argentina).

Resumen: Las toxinas paralizantes de los moluscos (TPM) son las ficotoxinas de mayor relevancia en nuestro país por su impacto sanitario y por las pérdidas económicas que se registran como consecuencia de las vedas o los decomisos de moluscos producidos durante los brotes tóxicos. Los métodos utilizados para su detección, el bioensayo en ratón y la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), requieren instalaciones especiales de laboratorio.

Existe un creciente interés en el desarrollo de ensayos relativamente sencillos para el *screening* de TPM. En este contexto, los inmunoensayos en microplacas han revelado un alto potencial como métodos rápidos, específicos, relativamente económicos y de sensibilidad adecuada. Ninguno ha sido desarrollado aún en nuestro país. El proyecto que se describe en este artículo aspira a capitalizar la experiencia multidisciplinaria de expertos locales y extranjeros para iniciar el desarrollo de un inmunoensayo rápido para STX y derivados, destinado a laboratorios de control o como método de campo, con instrumentación de baja complejidad.

El diseño en el ámbito nacional de un kit de inmuno detección para TPM aportaría una nueva tecnología para los laboratorios de control y una herramienta de alerta temprana para municipios costeros, pescadores y sectores vinculados a la extracción de moluscos que permita evitar decomisos de partidas y prevenir intoxicaciones.

Palabras clave: inmunoensayos, toxinas paralizantes de los moluscos, screening TPM.

Abstract: The paralytic shellfish poisons (PSP) are the most important phycotoxins, both because of their impact on human health and due to the economic costs generated by bans on shellfish harvesting or confiscations during toxic algal blooms. The toxin monitoring methods used, mouse bioassay and high performance liquid chromatography (HPLC), require specialized equipment or special laboratory facilities.

There is a growing interest in the development of relatively simple tests that allow a rapid *screening* for PSP. In this context, microtitre plate-based immunoassays have revealed a high potential for the development of field methods that are fast, specific, cost-effective and sufficiently sensitive. None has yet been developed in our country. This project aims at capitalizing on the expertise of a multidisciplinary team of both Argentine and foreign experts in order to begin the development of a rapid immunoassay for PSP, simple enough to be used by low complexity laboratories as well as in the field.

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

Key words: immunoassay, Paralytic Shellfish Poisons, PSP screening.

INTRODUCCIÓN

En este artículo, se describe el proyecto distinguido con el 2.º premio a la investigación científica y transferencia de equipos consolidados en el certamen "Premio Senasa a la Investigación y Transferencia en Calidad e Inocuidad Agroalimentarias 2013-2014".

El objetivo del proyecto es iniciar el desarrollo en la Argentina de un inmunométodo de *screening* rápido para Toxinas Paralizantes de los Moluscos que pueda emplearse en laboratorios de baja complejidad y en los sitios de extracción de moluscos en el ámbito del Mar Argentino.

CONCEPTOS GENERALES SOBRE BIOTOXINAS MARINAS Y MAREAS ROJAS

Mareas rojas y floraciones de algas nocivas (FAN)

Entre los organismos microscópicos que conforman el plancton, las microalgas representan el componente vegetal que, a través de la fotosíntesis, produce materia orgánica y genera oxígeno. Su importancia es fundamental para las demás formas de vida, ya que constituyen la base alimentaria de la cadena trófica marina. Dependiendo de ciertos factores medioambientales (temperatura, luz, pH, disponibilidad de ciertos nutrientes y salinidad, entre otros) pueden presentarse variaciones en la abundancia de las microalgas en un lugar específico, y en determinadas circunstancias puede ocurrir la proliferación masiva de una especie en particular, la cual se vuelve predominante. Este fenómeno natural se conoce como floración o *bloom*. Si la especie en multiplicación es pigmentada, al alcanzar una concentración cercana al millón de células por litro, se producirá un cambio de color o "discoloración" en el agua, visible como una mancha de extensión variable sobre la superficie del mar y cuya tonalidad (roja, parda, verde) dependerá del tipo de pigmento presente. Este fenómeno es comúnmente conocido con el nombre de "marea roja", y aunque el término tuvo su origen en la tonalidad rojiza de las aguas producida por algunas especies planctónicas, se utiliza habitualmente en un sentido más amplio para designar a cualquier proliferación microalgal, asociada o no a un cambio de color en el medio acuático, que puede ocasionar algún efecto nocivo.

De unas 5.000 especies fitoplanctónicas marinas existentes en todo el mundo, solo alrededor de 300 son capaces de multiplicarse hasta alcanzar densidades de millones de células por litro, pero no todas estas floraciones ocasionan discoloraciones. Solo unas 80 especies son conocidas como productoras de toxinas. Sin embargo, la proliferación de las no tóxicas también puede ocasionar perjuicios. Algunas de ellas, en gran número pueden disminuir el contenido de oxígeno disuelto en el agua o dañar mecánicamente las branquias de los peces, particularmente de aquellos criados en condiciones de confinamiento, y así ocasionar mortandades masivas.

En cuanto a las algas tóxicas, su acción nociva radica en ciertos compuestos químicos producidos durante su metabolismo. Algunos de ellos son exotoxinas que, liberadas al medio, pueden afectar a diversas especies, mientras que otros corresponden a endotoxinas cuya transferencia y acumulación

en organismos marinos se produce a través de la cadena alimentaria. Por esta misma vía, llegan al hombre y a otros vertebrados, a quienes pueden causar enfermedad o muerte según la naturaleza química del tóxico y la dosis ingerida.

Sobre la base de estas consideraciones, el término "mareas rojas" tiende a ser reemplazado por el de "floraciones algales nocivas" (FAN), que se aplica a cualquier población microalgal, planctónica o bentónica cuya aparición, incluso en concentraciones celulares no muy elevadas, implique un efecto nocivo en la salud humana, las explotaciones de acuicultura y turísticas de zonas costeras y en las poblaciones naturales de organismos marinos (Reguera, 2002).

Microalgas productoras de toxinas

Las especies de algas conocidas hasta el momento como productoras de toxinas pertenecen en su mayoría al grupo de los dinoflagelados, organismos unicelulares provistos de flagelos con los que se movilizan durante la fase de vida libre. Otro grupo está representado por las diatomeas, de las que muy pocas especies se han identificado como tóxicas. Estos organismos inician su multiplicación respondiendo a situaciones ambientales favorables y algunas especies productoras de toxinas muy potentes pueden resultar dañinas aunque no alcancen concentraciones celulares elevadas que discoloren el agua (Reguera, 2002).

Grandes variaciones de toxicidad son posibles en una misma especie: puede ser tóxica en un sitio e inocua en otros por influencia de las condiciones del medio. Algunas especies tóxicas pasan a estados de resistencia ante condiciones adversas y, pueden permanecer por largos períodos en el sedimento marino en forma de quistes. Estos pueden concentrar más toxinas que la célula vegetativa original y se estima que contribuyen a la toxicidad de los moluscos en ausencia de un *bloom* proliferativo y a la acumulación de toxinas en crustáceos o peces que se alimentan en el sedimento.

Los dinoflagelados asociados con la mayoría de los episodios tóxicos que han afectado al hombre son principalmente de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Prorocentrum* y *Dinophysis* mientras que las diatomeas corresponden al género *Pseudo-nitzschia*.

Biotoxinas fitoplanctónicas

Las biotoxinas marinas de origen fitoplanctónico, conocidas también como ficotoxinas, son metabolitos secundarios producidos por microalgas toxígenas. Aún se desconoce por qué las microalgas producen toxinas y cuál es su rol en la naturaleza. Las ficotoxinas ingresan a la cadena trófica marina a través de organismos que se alimentan de plancton y pueden ser transmitidas a los humanos cuando estos consumen productos pesqueros contaminados con estas

sustancias. La característica de estos compuestos tóxicos es la falta de evidencia organoléptica, es decir, los mariscos o peces contaminados no muestran alteraciones en su sabor, olor o color. Por otra parte, son termo- y ácido-estables, por lo que no es posible prevenir intoxicaciones a través de los procedimientos normales de elaboración de los alimentos si se encuentran en los productos crudos en concentraciones que superan determinados valores críticos.

Los moluscos bivalvos son uno de los organismos que se alimentan principalmente de microalgas mediante mecanismos de filtración y, por tanto, son capaces de adquirir toxicidad y ser transvectores primarios de toxinas sin ser afectados por ellas (Balech, 1986). Además de estos, deben considerarse los transvectores secundarios, es decir, predadores de los primarios, como ciertos gasterópodos que se alimentan de bivalvos (Shumway, 1995).

Diversos cuadros de intoxicación han sido descriptos en el hombre de acuerdo con el tipo de toxina ingerida y basándose en ellos fueron clasificados la mayoría de los grupos tóxicos. Algunos de estos compuestos —los que hasta el momento se han identificado tanto en moluscos contaminados como en especies de microalgas toxígenas del Mar Argentino— son las *toxinas paralizantes de los moluscos* (TPM o PSP), las *toxinas diarreas de los moluscos* (TDM o DSP) y las *toxinas amnésicas de los Moluscos* (TAM o ASP).

Toxinas paralizantes de los moluscos (TPM)

Las TPM constituyen el grupo tóxico de mayor incidencia en nuestro país, tanto en episodios de toxicidad en moluscos como en casos de intoxicación en humanos. El principal componente, la saxitoxina (STX), es un alcaloide de gran potencia. Por sustituciones naturales en su molécula se producen compuestos análogos cuyo mecanismo de acción es común, pero con potencias tóxicas que varían según la estructura molecular (Kao, 1993). Más de cuarenta análogos han sido identificados hasta la actualidad, aunque no todos ellos están siempre presentes. La mayoría de los moluscos contienen varias de estas toxinas en diferentes proporciones y la toxicidad total estará relacionada con los tipos de análogos presentes en cada especie de molusco en particular.

Las TPM son esencialmente neurotóxicas y su actividad biológica está basada en un bloqueo selectivo de los canales de sodio, estructuras proteínicas ubicadas en la membrana externa celular. Mediante una unión reversible actúan cerrando los canales de sodio de algunas membranas excitables e impiden el transporte de iones sodio al interior de la célula, con lo cual se bloquea la generación y la propagación de los potenciales de acción en axones nerviosos y fibras de músculo esquelético (Kao, 1993).

Los síntomas de una intoxicación en mamíferos están básicamente asociados con este mecanismo, y tanto el comienzo como la gravedad del cuadro en humanos dependen de diversos factores: dosis ingerida, tipos de compuestos presentes y susceptibilidad individual. Luego de un período de latencia que promedia los 30 minutos a las 3 horas, aparecen progresivamente parestesias, parestesias y parálisis, y la muerte —en casos graves—, resulta de una falla respiratoria, lo que, dependiendo de la dosis, puede ocurrir entre las 2 y las 25 horas posteriores a la ingesta (Scoging, 1998). No existen antidotos, y el tratamiento es sintomático y de sostén.

La presencia de estas toxinas en los alimentos de origen marino representa un serio problema que compromete la inocuidad alimentaria y la protección de la salud pública. Además, el cierre de áreas de producción o de extracción de moluscos durante los episodios de toxicidad tiene un impacto económico negativo tanto en los sectores vinculados a la industria pesquera como en el sector turístico.

DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE TOXINAS PARALIZANTES (TPM) EN MOLUSCOS DEL MAR ARGENTINO

Relevancia y justificación del proyecto

Las toxinas paralizantes de los moluscos (TPM) 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 o decomisos 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 para exportación. A fin de proteger a los consumidores, se establecieron niveles máximos permitidos de toxinas en los moluscos y diversos métodos oficiales de análisis para su determinación. Desafortunadamente, no existe en nuestro país un método para el *screening* rápido de TPM.

El bioensayo en ratón (AOAC 959.08, Association of Analytical Communities, 2005a) es el método oficial de referencia y el más utilizado en todo el mundo para la detección de TPM. Si bien ha demostrado ser adecuado para la protección de la salud pública, existen cada vez más controversias por el uso de animales vivos y, además, es necesario de contar con instalaciones especiales. Considerables esfuerzos se están aplicando para desarrollar ensayos o análisis alternativos a los bioensayos con animales vivos. Es necesario que sean más sensibles, específicos, rápidos y robustos y que permitan cuantificar la toxicidad de la muestra. Técnicas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) han sido validadas y aprobadas en años recientes. Se trata de valiosas herramientas de análisis que permiten una identificación

individual y una precisa cuantificación de diferentes toxinas presentes en las muestras. Sin embargo, los equipos e insumos son costosos, se necesita contar con personal altamente entrenado y, generalmente, los tiempos de análisis son extensos. Por este motivo, los ensayos bioquímicos han aparecido como un método de *screening* para determinar biotoxinas marinas en múltiples muestras con rapidez y a bajo costo. La mayoría de los ensayos bioquímicos para toxinas marinas son inmunoensayos basados en el reconocimiento por afinidad entre antígenos y anticuerpos. Son muy sensibles y muy fáciles de aplicar. Además de la especificidad, la reacción cruzada (capacidad de interactuar con otras moléculas con estructura similar) representa una ventaja en el reconocimiento de todos los miembros de un mismo grupo tóxico, como es el caso de las toxinas TPM.

En la Argentina los laboratorios oficiales que realizan el control de toxinas TPM solo utilizan el método de bioensayo en ratón. Si bien algunos cuentan con equipos HPLC, ninguno aplica esta técnica cromatográfica para detectar dichas toxinas. El mayor problema, además de los costos, radica en la obtención de estándares comerciales, que deben ser importados. Los estándares disponibles en el mercado no cubren toda la familia de análogos del grupo TPM y periódicamente nuevos derivados son detectados en moluscos de todo el mundo.

Existe un creciente interés en el desarrollo de ensayos relativamente sencillos que permitan un *screening* de TPM en moluscos. En este contexto, los inmunoensayos en microplacas han revelado un alto potencial para el desarrollo de métodos de campo rápidos, específicos, costo-efectivos y de sensibilidad adecuada. Ninguno ha sido desarrollado aún en nuestro país. La presente propuesta aspira a capitalizar la experiencia multidisciplinaria de un grupo de expertos locales y extranjeros con el fin de iniciar el desarrollo de un inmunoensayo de *screening* rápido para STX y sus derivados que pueda ser empleado en laboratorios de control o como método de campo con instrumentación de baja complejidad.

El diseño en el ámbito nacional de un kit de inmunodetección para TPM aportaría una nueva tecnología para los laboratorios de control y una herramienta de alerta temprana para municipios costeros, pescadores y sectores vinculados a la extracción de moluscos que permitiría evitar decomisos de partidas y prevenir intoxicaciones.

OBJETIVOS

General

Iniciar el desarrollo en nuestro país de un inmunométodo de *screening* rápido que pueda realizarse en laboratorios de baja complejidad y en los sitios de extracción de moluscos en el ámbito del Mar Argentino.

Específicos

1- Generar en conejos un anticuerpo policlonal contra STX y caracterizarlo a fin de determinar el porcentaje de reactividad cruzada con moléculas relacionadas con la STX.

2- Utilizando el anticuerpo generado, diseñar un enzimoensayo competitivo rápido.

3- A fin de comparar los resultados del nuevo ensayo con las determinaciones mediante métodos validados (HPLC y bioensayo en ratón) se proponen los siguientes subobjetivos:

3a- Determinar la concentración de TPM en muestras de diversas especies de moluscos bivalvos recogidas durante episodios de toxicidad, mediante el método de referencia de bioensayo en ratón.

3b- Determinar el perfil de toxinas presentes en cada muestra de molusco analizada en el subobjetivo 3a, utilizando técnicas de HPLC pre y pos columna. Calcular la concentración total de TPM hallada en cada muestra.

3c- Comparar, en las mismas muestras, los resultados de toxicidad total obtenidos por el nuevo inmunoensayo con los resultados obtenidos por HPLC y bioensayo en ratón.

PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGÍA

Se utilizarán muestras de bivalvos recogidas en el Mar Argentino durante episodios de brotes algales tóxicos ocurridos entre los años 2006 y 2012 pertenecientes al banco de muestras del Departamento de Toxinas Marinas del Laboratorio Regional Mar del Plata del Senasa. Estas se han mantenido a -20 °C, en recipientes cerrados e identificados. También se utilizarán las muestras frescas que se estimen necesarias para completar este estudio. Las procedentes de bancos de moluscos en altamar serán recogidas por buques que operan sobre el recurso en zonas marítimas específicas para este estudio.

Bioensayo en ratón para TPM

Se aplicará el método oficial AOAC 959.08 (Association of Analytical Communities, 2005a) para determinar la concentración de toxinas TPM en las muestras de moluscos. Las de carne de molusco que se han mantenido congeladas desde el año 2006 serán reevaluadas, a fin de constatar si han ocurrido cambios en la concentración tóxica determinada inicialmente. Las muestras de moluscos frescos se lavarán con agua de red y se procederá al desvalvado para obtener las partes comestibles (carne o pulpa). Se realizará un homogeneizado utilizando una licuadora de mano (*minipimer*) y se pesarán 100 g. Se agregarán 100 ml de solución de HCl 0,1 M y se homogeneizará con un dispositivo específico marca Ultra-turrax. Se medirá el pH, que deberá estar dentro del rango 3.0-3.9. Se ajustará, si fuera necesario, por goteo y mezcla continua,

con una solución de HCl 5 M (para acidificar), o con solución de OHNa 0,1 M (para alcalinizar). La mezcla se hervirá cinco minutos, se dejará enfriar a temperatura ambiente y se verificará el pH (rango aceptable: 3,0-3,9). Se restituirá el volumen a 200 ml con solución acidulada en una probeta. Se centrifugará el extracto ácido y el líquido sobrenadante se inyectará en ratones albinos cepa CF1, por vía IP. Según el tiempo de supervivencia de los ratones inoculados se realizarán los cálculos de toxicidad mediante la tabla de Sommer y Meyer (Unidades Ratón/100 g de muestra), que serán convertidos a microgramos equivalentes de saxitoxina ($\mu\text{g STX eq}/100 \text{ g}$) por medio del Factor de Conversión calculado oportunamente en el laboratorio. Se harán las diluciones y cálculos correspondientes para aquellos extractos que produzcan la muerte de ratones en menos de cinco minutos (Figura 1).



Figura 1: Esquema del bioensayo en ratón según el método AOAC 959.08

Dosaje de TPM por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

Porciones de las mismas muestras analizadas por bioensayo en ratón se evaluarán bajo la supervisión del Dr. Andrew Turner en el Centro para la Ciencia del Medio Ambiente, Pesca y Acuicultura (Cefas) del Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, utilizando dos métodos de HPLC (pre y pos columna) validados internacionalmente:

- 1) HPLC LC-FLD con oxidación pre-columna (Pre-Cox) (AOAC 2005.06, Association of Analytical Communities, 2005b)
- 2) HPLC LC-FLD con oxidación post-columna (PCOX) (AOAC 2011.02, Association of Analytical Communities, 2011)

Además de la determinación de la toxicidad total en cada muestra, serán obtenidos los perfiles de análogos del grupo TPM presentes en cada especie de molusco analizada y las proporciones relativas de cada uno de ellos.

El protocolo de dosaje será el siguiente:

La extracción de la muestra se efectuará siguiendo el método AOAC. Los homogenatos utilizados en el bioensayo en ratón en el Senasa serán enviados congelados al laboratorio británico para su evaluación por HPLC. Alícuotas de cada homogenato (5 g) se pesarán en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml, y se agregarán 3,0 ml de ácido acético al 1%. Después de mezclar los contenidos de los tubos utilizando un agitador tipo vórtex, se mantendrán por cinco minutos en un baño de agua a 100 °C. Luego, los tubos se enfriarán con agua de grifo, y se centrifugarán por 10 minutos a 4500 rpm. Se recogerá cada sobrenadante en tubos de 15 ml, se añadirán 3 ml de ácido acético al 1% en cada uno, y se volverán a centrifugar por 10 minutos. Se diluirá el sobrenadante dentro del mismo tubo, utilizando agua destilada hasta un volumen final de 10 ml. Los extractos así obtenidos se utilizarán en las determinaciones por HPLC con oxidación pre- y post-columna.

1) Análisis por HPLC LC-FLD con oxidación pre-columna (Pre-Cox) (AOAC 2005.06), ilustrado en la Figura 2.

AOAC 2005.06 (Association of Analytical Communities, 2005b) es un método oficial de análisis de la AOAC que implica el uso de una oxidación pre-columna de las TPM antes de la cromatografía de los productos tóxicos derivatizados. El método ya ha sido validado por un número de laboratorios (Lawrence et al, 2005), incluso con un estudio interlaboratorio completo de la AOAC, y se ha implementado en el programa oficial de control sanitario en varios países como el Reino Unido, Irlanda, Portugal y Nueva Zelanda. Homogeneizados de moluscos se extraen en ácido acético al 1% antes de que los extractos centrifugados sean lavados utilizando una etapa de extracción en fase sólida de fase inversa. El fraccionamiento de intercambio de iones también se utiliza para permitir la cuantificación precisa de los congéneres específicos de las TPM. El método permite tanto la detección cualitativa de toxinas en las muestras como un análisis cuantitativo de las concentraciones totales de toxinas. Se utilizan dos métodos de oxidación para garantizar que las toxinas TPM sean cuantificadas con precisión.

2) Análisis por HPLC LC-FLD con oxidación poscolumna (PCOX) (AOAC 2011.02), ilustrado en la Figura 3.

El AOAC 2011.02 (Association of Analytical Communities, 2011) es otro método oficial que implica el uso de una derivatización en línea poscolumna de las toxinas TPM cromatografiadas previo a la detección por fluorescencia (FLD). El método de LC-FLD con oxidación poscolumna también ha sido validado en varios laboratorios (Van de Riet *et al.*, 2011) y se ha implementado en los programas oficiales de control de moluscos en Noruega, Canadá y Alaska. Extractos ácidos de los mariscos se analizan después de una simple etapa de precipitación de proteínas, sin que sean necesarios pasos de limpieza adicionales previos al análisis.

Ambos métodos (pre- y post-columna) han mostrado una buena comparación entre sí en una gran variedad de especies de moluscos obtenidos en diferentes países. Para la mayoría de las especies, los resultados de toxicidad medidos por LC-FLD tienen buena correlación con los resultados de toxicidad obtenidos por el método biológico oficial (bioensayo en ratón AOAC 959.08).

Ambos métodos cromatográficos permiten la determinación de niveles totales de TPM, así como la evaluación de los perfiles tóxicos individuales presentes en la muestra.

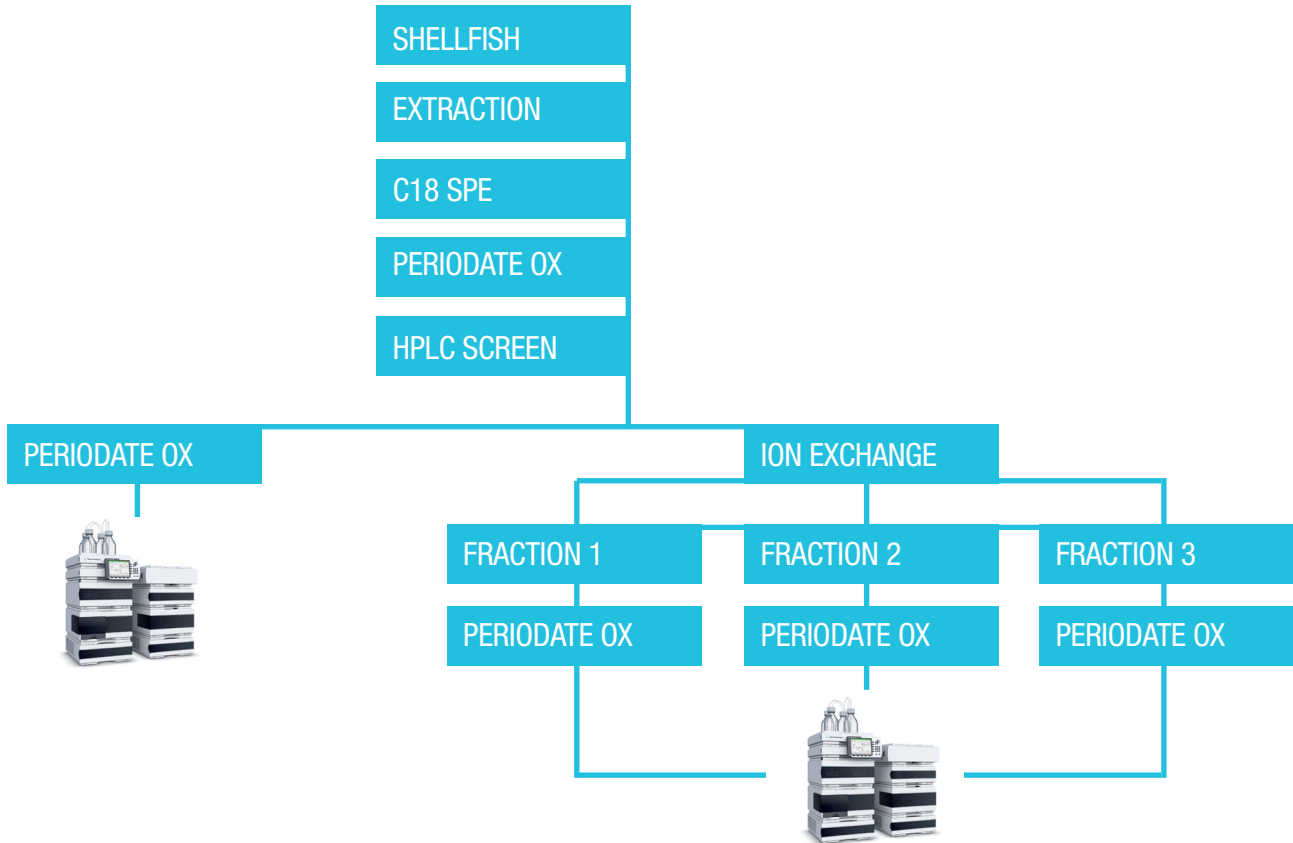


Figura 2: Oxidación pre-columna LC-FLD (AOAC 2005.06)

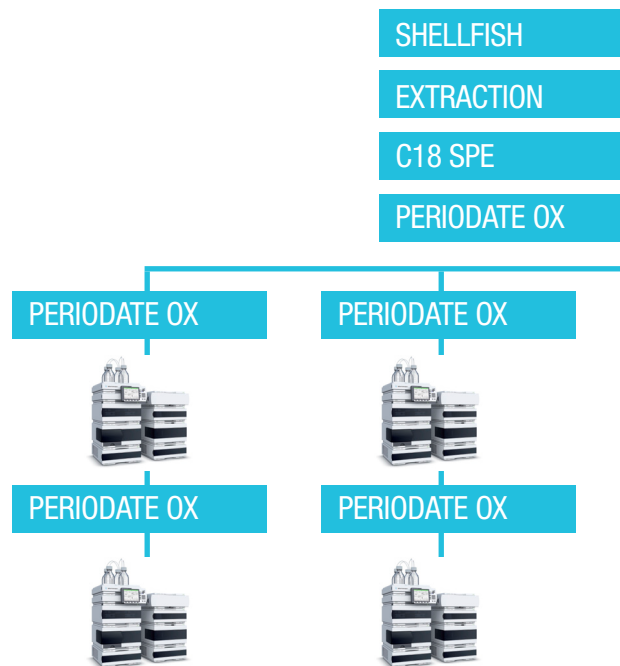


Figura 3: Oxidación post-columna (AOAC 2011.02) (PCOX)

DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO PARA TPM

Generación de un suero anti-TPM: se generará en conejos un antisuero policlonal contra STX sintética. La toxina previamente acoplada a la proteína carrier Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) será inyectada intramuscularmente (1 mg de complejo por inyección) en conejos de unos 4 kg según un protocolo de inmunización consistente en una primera inyección del complejo emulsionado con adyuvante de Freund completo, seguida cada diez días por dos refuerzos en los que el antígeno se emulsiona con adyuvante incompleto de Freund. Diez días después del segundo refuerzo se procede a sangrar los conejos y obtener el antisuero correspondiente.

Inmunoensayo para TPM

Procedimiento: la STX inmunorreactiva (STXir) se determinará por ELISA. En microplacas *low-binding* de 96 pocillos se mezclarán 60 µl de muestra filtrada o de STX sintética (*standard*) con 60 µl de anti-STX (dilución óptima a determinar) y se incubará 1 h a 37 °C. La mezcla se transferirá a una placa de ELISA de *high-binding* recubierta con 100 mg de STX sintética por pocillo y se incubará a 37 °C durante una hora. Luego, se lavarán los pocillos con PBST (buffer fosfato salino con 0,1 % de tritón X-100).

La cantidad de anticuerpo anti-STX unido a la fase sólida se determinará 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 evaluarán por colorimetría leyéndolas a 450 nm en un lector de microplacas portátil.

Se medirán diferentes concentraciones de estándar comercial de STX con las que se elaborarán curvas de calibración. La sensibilidad que se espera alcanzar con este método es de al menos 300 nanogramos STX/ml, lo que es satisfactorio para un ensayo de *screening*.

También se efectuarán estudios de especificidad comparando la reactividad cruzada del anticuerpo contra STX (tomada como 100 %) versus Decarbamoyl STX, GTX 2 & 3, GTX, Decarbamoyl GTX 2 & 3 y Decarbamoyl NeoST.

Medición de TPM en muestras de moluscos

Preparación de las muestras: en el caso del ELISA por desarrollarse en este proyecto, las muestras se homogeneizarán del mismo modo que para el bioensayo en ratón. En este caso, 5 µl de sobrenadante se diluirán con 5 ml de buffer de ensayo y se utilizará directamente en la determinación.

Las muestras provistas por el Senasa se evaluarán cuantitativamente empleando el nuevo inmunoensayo, y se estimarán las respectivas concentraciones por interpolación en una cur-

va estándar de STX comercial. Se compararán los resultados con los obtenidos por bioensayo y por HPLC.

RESULTADOS ESPERADOS

a) Obtención de un anticuerpo policlonal de alta especificidad contra STX, adecuado para un inmunoensayo competitivo. Esto se efectuará en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP).

b) Determinación, en el Senasa Mar del Plata, de la concentración de TPM en muestras de diversas especies de moluscos bivalvos recogidas durante episodios de toxicidad, mediante el método de referencia de bioensayo ratón.

c) Determinación, en el Reino Unido, por HPLC pre- y post-columna y registro del perfil de toxinas presentes en las mismas muestras evaluadas por bioensayo.

d) Diseño e implementación, utilizando el anticuerpo generado de un inmunoensayo semicuantitativo rápido de baja complejidad inicialmente evaluado con estándares comerciales de STX (en el INIBIOLP).

e) Comparación, utilizando las mismas muestras empleadas en b) y c), de los resultados de toxicidad total obtenidos por inmunoensayo con los resultados obtenidos por HPLC y bioensayo en ratón.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Analytical Communities (2005a), «AOAC Official Method 959.08. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action», en AOAC Official methods for analysis, 18th Edition Chapter 49: Natural toxins (chapter ed. M.W. Truckses), Gaithersburg, MD, USA, AOAC International, pp. 79-80.

Association of Analytical Communities (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.

Association of Analytical Communities (2011), «AOAC Official Method 2011.02 Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Mussels, Clams, Oysters and Scallops», en Post-column Oxidation Method (PCOX), First Action 2011, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

Balech, E. (1986), «Moluscos tóxicos, dinoflagelados y aguas rojas. Actualización de conocimientos», *Anales Sociedad Científica Argentina*, Tomo CCXIII, pp. 61-78.

Kao, C. Y. (1993), «Paralytic shellfish poisoning», en I. R. Falconer (ed.), *Algal toxins in seafood and drinking water*, Academic Press, London and New York, Cap 4, pp. 75-86.

Lawrence, J. F.; Niedzwiadek, B. y C. Menard (2005), «Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study», *Journal of AOAC International*, vol. 88, n.º 6, pp. 1714-1732.

Reguera, B. (2002), «Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas», en Sar, E. A., Ferrario, M. E. y B. Reguera (eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*, Madrid, Instituto Español de Oceanografía, pp. 21-52.

Scoging, A. C. (1998), «Marine biotoxins», *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84:41S-50S.

Shumway, S. (1995), «Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors», *Reviews in Fisheries Science*, vol. 3, n.º 1, pp. 1-31.

Van de Riet, J. M.; Gibbs, R. S.; Muggah, P. M.; Rourke, W. A.; MacNeil, J. D y M. A. Quilliam (2011), «Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: collaborative study», *Journal of AOAC International*, vol. 94, N.º 4, pp. 1154-1176.