



Biotoxines marines: nous mètodes de detecció

Autor: Institut de Recerca i Tecnologia Alimentàries (IRTA)

El terme *toxines marines* engloba un espectre variat de compostos produïts majoritàriament per algunes espècies de microalgues marines, principalment del grup de les dinoflagel·lades i diatomees. Aquests compostos suposen un risc alimentari en acumular-se en organismes marins de consum, i donen lloc a diferents quadres i graus d'intoxicació (des de símptomes lleus fins a la mort) depenent de la naturalesa de la toxina consumida, de la concentració i de les característiques del consumidor afectat. Tradicionalment, s'han agrupat i legislat per la seva simptomatologia i per l'organisme vector mitjançant el consum del qual s'ha produït la intoxicació, si bé a mesura que es va aprofundint en el coneixement d'aquests compostos es proposen noves terminologies (per exemple, per al grup que s'anomenava *toxines diarriques* actualment es proposa el terme més ampli *toxines lipofíliques*, dins del qual es trobarien les diarriques, entre altres), tècniques associades, etc. Així, les biotoxines marines se solen agrupar en:

- Toxines amnèsiques, que causen amnèsia per consum de marisc (*amnesic shellfish poisoning, ASP*).
- Toxines diarriques, que causen diarrea per consum de marisc (*diarrhoeic shellfish poisoning, DSP*).
- Toxines paralitzants, que causen paràlisi per consum de marisc (*paralytic shellfish poisoning, PSP*).
- Toxines neurotòxiques, que causen neurotoxicitat per consum de marisc (*neurotoxic shellfish poisoning, NSP*).
- Azaspiràcids, que causen una intoxicació característica per consum de marisc (*azaspiracid shellfish poisoning, AZP*).

- Ciguatoxines, que causen la síndrome coneguda com a ciguatera per consum de peix (*ciguatera fish poisoning, CFP*).

Des de fa anys s'executen de manera rutinària programes de vigilància de les zones de producció per tal de garantir la innocuïtat dels productes de la pesca i l'aqüicultura. Aquests programes responen a un seguit de reglaments i legislacions, tant nacionals com europeus, en què s'especifica, entre d'altres, les concentracions màximes permeses de cada grup de toxines i els mètodes analítics acceptats per determinar aquestes concentracions.

L'Agència de Protecció de la Salut analitza la presència de toxines ASP, PSP i toxines lipofíliques en mol·luscos bivalves que es comercialitzen en el mercat, en el marc del sistema de vigilància sanitària d'aliments a Catalunya (SIVAC).

L'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), a sol·licitud de la Direcció General de Pesca i Afers Marítims, duu a terme un programa de seguiment intensiu sobre la presència de toxines en les zones de producció de marisc a Catalunya. També desenvolupa projectes de recerca per al seguiment d'aquestes toxines en el medi (aigua, fitoplàncton, productes de la pesca i de la aquicultura) i per al desenvolupament i la millora dels mètodes de determinació de toxines, que presentem seguidament.

Actualment les proves de detecció que s'utilitzen són el bioassaig amb ratolí (*mouse bioassay, MBA*) per a les toxines lipofíliques i PSP, l'anàlisi química per HPLC amb derivatització precolumna i detecció de fluorescència (HPLC-FD precolumna) per a les toxines PSP i l'anàlisi química per HPLC amb detecció d'absorbància o un kit comercial immunoenzimàtic basat en l'especificitat dels anticossos per detectar les toxines ASP.

Abril de 2011
Pàgina 1 de 3





La recerca en el camp de les toxines marines avança en l'ús de noves tècniques analítiques, necessàries tant per millorar la detecció i la quantificació de toxines ja conegudes d'una manera més ràpida (reducció del temps d'emissió de resultats, i per tant del temps de presa de decisió) i efectiva (eliminació / reducció d'interferències en els resultats), com per detectar nous compostos tòxics per als quals no es tingui un mètode desenvolupat. També és un requeriment de la Unió Europea reduir l'ús d'animals en les tasques de control rutinàries, de manera que es fan grans esforços a trobar un mètode alternatiu al MBA que garanteixi la mateixa protecció al consumidor assolida per aquest mètode.

L'IRTA ha treballat en el desenvolupament i la validació d'un mètode basat en cromatografia de líquids i detecció amb espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) per determinar i quantificar toxines lipofíliques. Aquest mètode permet discriminar els compostos tòxics de naturalesa lipofílica que no són causants del DSP, com les yessotoxines, de les que sí ho són. Les yessotoxines són les interferents principals en el MBA per a toxines lipofíliques a les costes catalanes, per la qual cosa l'ús del LC-MS/MS reduiria el nombre de resultats positius falsos (no causats per DSP) i, per tant, els tancaments de les zones de producció. Els bons resultats obtinguts en diferents exercicis de comparació entre laboratoris han comportat un canvi legislatiu en l'àmbit europeu, que preveu la substitució del MBA per a tasques de control de les toxines lipofíliques, i l'ha deixat per a casos de recerca puntuals.

Tot i que fa anys que s'accepta legalment el mètode HPLC-FD precolumna per a l'anàlisi de toxines PSP no s'utilitza àmpliament en tasques de control a causa del llarg temps d'execució en comparació del MBA i la complexitat dels perfils de toxines que poden presentar les mostres.

L'IRTA treballa en la validació d'un mètode basat en HPLC-FD, però amb derivatització postcolumna, que sembla ser molt més ràpid i amb menys marge d'interpretació dels resultats que el precolumna.

Altres mètodes de detecció en fase experimental a l'IRTA són els assaigs basats en cultius cel·lulars (*cell-based assays*, CBA). Aquestes proves, de la mateixa manera que el bioassaig amb ratolí, permeten detectar nous compostos tòxics, així com l'estudi dels mecanismes d'acció, ja que es poden utilitzar diferents línies cel·lulars i substàncies agonistes, antagonistes i/o moduladores de l'efecte de la toxina. En el cas concret de la ciguatera, el CBA està resultant ser adequat per fer un primer control de presència / absència de les biotoxines, ja que és ràpid, fiable i sensible; aquesta primera tria permetria analitzar per LC-MS/MS només les mostres sospitoses de presentar aquestes toxines, i reduir el cost i augmentar el nombre de controls.

Finalment, una línia de recerca en fort creixement és el desenvolupament de proves enzimàtiques i immunològiques, i dels biosensors corresponents. Pel que fa a les proves enzimàtiques, les basades en la inhibició de fosfatases per detectar toxines lipofíliques diarriques estan agafant un fort impuls.

Recentment s'han dut a terme proves amb kits comercials en diferents laboratoris per comparar-ne els resultats obtinguts en l'anàlisi de mostres. Els prometedors resultats semblen indicar que la utilització d'aquests equips com a eina de cribatge podria ser una realitat bastant immediata.

Els biosensors anirien un pas més enllà. En aquests dispositius biotecnològics, la part biològica (enzim, anticòs, cèl·lula, etc.) sensible a l'analit (en aquest cas, la toxina objectiu) està íntimament lligada a un transductor. Aquest transductor transforma el "senyal" biològic provocat





per l'anàlisi en un senyal elèctric quantificable. La recerca va dirigida a augmentar la sensibilitat dels biosensors, és a dir, que siguin capaços de detectar quantitats molt petites, i la miniaturització d'aquests. Un dispositiu portàtil, sensible i ràpid, amb una resposta clara i quantificable, és una idea molt atractiva per als organismes de control.

Actualment, s'ha avançat molt en la conversió dels assajos de la inhibició de fosfatases en biosensors, així com en el desenvolupament d'immunosensors basats en anticossos per detectar àcid ocaidaic del grup de les toxines DSP. A més, també s'investiga en la fabricació de biosensors per detectar toxines PSP.

Abril de 2011
Pàgina 3 de 3



MÉS INFORMACIÓ

- [Dictamen científic sobre les biotoxines marines en marisc - Palitoxines](#)
- [Update on Methodologies Available for Ciguatera Determination: Perspectives to Confront the Onset of Ciguatera Fish Poisoning in Europe.](#)
- [Marine biotoxins in the Catalan littoral: could biosensors be integrated into monitoring programmes?](#)
- Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (ed.). Manual on harmful marine microalgae; UNESCO: Paris France, 2003; p. 793.
- [Directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu i del Consell de 22 de setembre de 2010 relativa a la protecció dels animals utilitzats per a finalitats científiques](#)