

Método de análisis destinado a la detección de Toxinas Marinas en productos pesqueros en El Salvador

Amaya, Oscar.¹ Ruiz, Gerardo.¹ & Quintanilla, Rebeca.¹

¹ Laboratorio de Toxinas Marinas LABTOX-UES. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Ciudad Universitaria. Final de Av. Mártires y Héroes del 30 julio, San Salvador, El Salvador, América Central.

Correo: oscar.amaya@ues.edu.sv, gearuro@gmail.com, rebekquintanilla@gmail.com

Resumen: Desde el 2011, investigadores del Laboratorio de Toxinas Marinas (LABTOX-UES) han puesto en marcha el ensayo receptor ligando (RBA) para estimar concentraciones analíticas de toxinas de tipo paralizante (PSP, por su nombre en inglés) en moluscos bivalvos y otros productos pesqueros, lo cual ha permitido brindar respuesta oportuna a brotes tóxicos de Mareas Rojas en El Salvador. Además del análisis de toxinas en moluscos, el método fue adaptado para analizar cangrejos, caracoles, tortugas marinas, y otros organismos de origen marino contaminados con potentes venenos generados por microalgas que pueden transferirse al hombre a través de la cadena alimentaria. La aplicación de este método ha permitido establecer una alerta temprana sobre la presencia de toxinas PSP durante brotes tóxicos de Mareas Rojas en 2011, 2012, 2013 y 2017 en El Salvador. LABTOX-UES ha proporcionado información técnica a las autoridades estatales fortaleciendo sus decisiones para establecer vedas a la extracción, comercialización y consumo de moluscos, mitigando el impacto en la salud pública y muy posiblemente salvaguardando vidas humanas. Instituciones como el Laboratorio de Ambiente Marino en Mónaco del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA-EEUU), han sido garantes en la aplicación de esta metodología al inter-comparar resultados. El Salvador es el primer país de América Latina en la aplicación de este ensayo en formato de microplacas.

Palabras claves: Mareas Rojas, Microalgas, Saxitoxinas, Moluscos, Ensayo Receptor Ligando.

Abstract: Since 2011, researchers at the Laboratory of Marine Toxins (LABTOX-UES) have implemented the AOAC official method 2011.27 receptor binding assay (RBA) to quantify the analytical concentration of paralytic-type toxins (PSP) in bivalve molluscs, this has allowed to provide timely response to toxic outbreaks of Red Tides and other effects in El Salvador. In addition, the method was adapted to analyze saxitoxins in crabs, snails, sea turtles, and other marine organisms contaminated with potent poisons associated with microalgae that can be transferred to humans through the food chain. The application of this method has allowed to establish an early warning about the presence of PSP toxins during toxic outbreaks of Red Tides in 2011, 2012, 2013, 2014 and 2017. LABTOX-UES has provided technical information to officials of state institutions strengthening their decisions to establish closures for the extraction, commercialization and consumption of mollusks, mitigating the impact on public health and most likely safeguarding human lives. Other institutions such as the Marine Environment Laboratory in Monaco of the International Atomic Energy Agency (IAEA) and the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA-USA), have been guarantors in the application of this methodology when comparing results. El Salvador is the first country in Latin America to apply this test in microplate format.

Key words: Red Tides, Microalgae, Saxitoxins, Molluscs, Ligand Receptor Assay.

INTRODUCCIÓN

Las Proliferaciones Algas Nocivas, comúnmente denominadas “Mareas Rojas”, pueden llegar a producir potentes toxinas de tipo paralizante (PSP) las cuales tienen un grave impacto en la salud pública y causan millonarias pérdidas a la industria pesquera en la costa del Pacífico de El Salvador, además de perjudicar especies amenazadas como las tortugas marinas. En 2011, 2012, 2013 y 2017 altos niveles de toxinas PSP asociadas a la microalga *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* fueron detectados en especies de moluscos, crustáceos y tortugas marinas; llegando en algunos casos a emitir vedas por parte

de las instituciones del Estado (Fig.1). A finales de septiembre y principios de octubre de 2013 ocurrió una mortandad de tortugas marinas, cuya cifra oficial declarada por funcionarios del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador, fue de 201 tortugas marinas que arribaron muertas a diferentes playas de la costa salvadoreña, principalmente en el departamento de La Libertad. El LABTOX-UES, con el apoyo técnico del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la Administración Oceánica y Atmosférica Nacional (NOAA) ha implementado el ensayo receptor ligando o Receptor Binding Assay (RBA, por sus siglas en inglés) para la detección

de toxinas PSP en mariscos. Después de su validación por la AOAC (2011.27), este método oficial está siendo probado en diferentes laboratorios del mundo como un método rápido, sensible y alternativo al bioensayo en ratones.

Metodología.

Las muestras de ostras (*Crassostrea iridiscens*), caracoles (*Plicopurpura columellaris*), cangrejos (*Carcinus maenas*), mejillones (*Modiolus capax*) y tortugas marinas (*Chelonia mydas* y *Lepidochelis olivacea*) se prepararon de acuerdo a un proceso análogo a la metodología de extracción de saxitoxina para el bioensayo de ratón (AOAC 959.08). Dichas muestras fueron homogenizadas y se tomaron de 1 a 2g de tejido, utilizando como solvente de extracción, un volumen equivalente de HCl al 0.1 N.

El pH del extracto se mide y corrige (si es necesario) para obtener un valor entre 3,0 y 4,0. Posteriormente, dicho extracto es llevado a ebullición durante 5 min y se deja enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, el extracto es centrifugado (3400xg) y se limpia el sobrenadante con un filtro de tamaño de poro de 0.45 micras. Los extractos ácidos de las muestras se analizaron utilizando la técnica del ensayo receptor ligando para saxitoxinas (STX). Dicha técnica se basa en la interacción específica entre las toxinas y su blanco farmacológico, es decir, el canal de sodio dependiente de voltaje, en el sitio 1 para este tipo de toxinas y especies equivalentes o análogas. En este ensayo, una toxina radiomarcada ([³H] saxitoxina) compete con moléculas no marcadas para los sitios de los canales de sodio, presentes en una preparación de membrana de cerebro de rata o cerdo. Cuando se alcanza el equilibrio de unión, las [³H] saxitoxinas libres se eliminan por filtración y [³H] saxitoxinas ligadas al receptor se cuantifican por medio de un contador de centelleo líquido. La reducción de la cantidad de [³H] saxitoxina ligada al receptor es directamente proporcional a la cantidad de toxina no marcada presente; que representa, la cantidad de saxitoxina presente en la muestra o estándar de análisis.

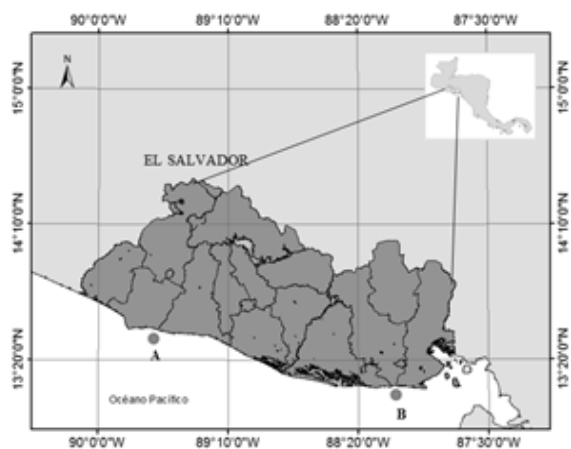


Fig. 1. Ubicación de estaciones de muestreo en las zonas afectadas por los eventos de floraciones algales nocivas ocurridas en 2011, 2012 y 2013, en El Salvador.

Resultados y Discusión.

Se detectó actividad de saxitoxina similar en todas las muestras analizadas para los eventos de Marea Roja registrados entre 2011 a 2013. Los límites de detección del ensayo fueron aproximadamente 7,6 µg eq de STX/100 g de tejido, es decir, 10 veces menor que la del bioensayo en ratones. Las muestras se diluyeron, como fuese necesario, siempre que su concentración de toxinas PSP excede el rango lineal de la curva de calibración. Se realizaron tres diluciones en total en las proporciones de 1:10, 1:50 y 1:200; entre las cuales, está ubicada la concentración correspondiente al límite regulatorio internacional para moluscos de 80 µg eq de STX/100 g de tejido. Las concentraciones superiores a 2,500 µg eq de STX/100 g de tejido se detectaron en ostras y cangrejos en septiembre de 2011 (Figs. 2-3). El análisis de saxitoxina en tejidos de hígado, intestino y estómago de tortugas marinas arrojó acumulación de saxitoxina en concentraciones desde 116.11 hasta 478.28 µg eq de STX/100 g de tejido (Fig 3). También se analizaron ostras en las que se determinaron concentraciones de 58.33 µg eq de STX/100 g de tejido, es decir, por debajo del nivel regulatorio adoptado en El Salvador para toxina paralizante de 80.00 µg eq de STX/100 g.

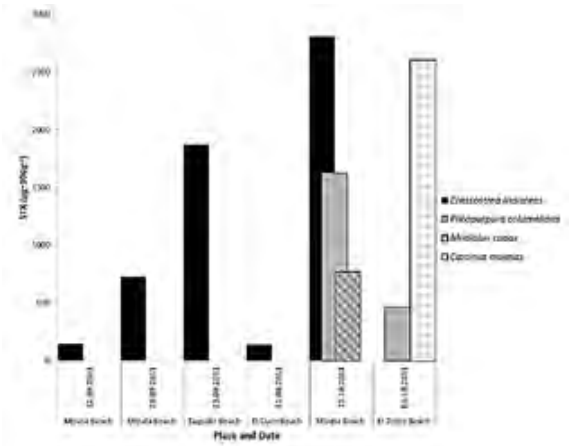


Fig. 2. Niveles de toxinas PSP (mg equiv. STX • 100 g-1 de tejido) determinados por RBA en 4 especies de mariscos (tres bivalvos y crustáceos uno) en El Salvador.

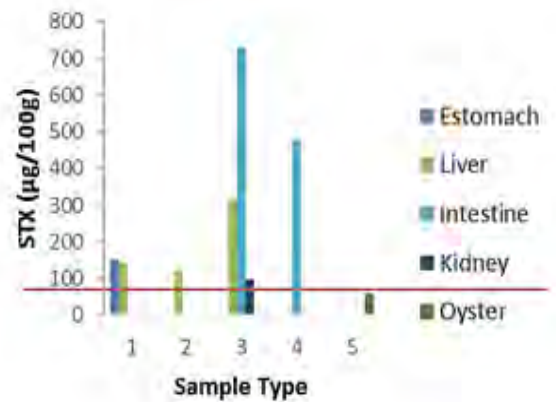


Fig. 3. Concentraciones analíticas de saxitoxinas encontrados en tortugas marinas y ostras en El Salvador durante agosto y septiembre de 2013, utilizando el ensayo receptor ligando RBA, la línea roja horizontal representa el nivel regulatorio en El Salvador

Altas densidades celulares de *Pyrodinium bahamense var compressum* se encontraron a 0 m, 3 m y 12 m de profundidad, durante los eventos tóxicos en aguas en la costa de El Salvador (Fig.4). Las toxinas PSP relacionadas con la proliferación del

dinoflagelado *Pyrodinium bahamense var compressum*, son recurrentes en El Salvador.



Fig. 4. . Micrografías de la microalga productora de PSP *Pyrodinium bahamense var. compressum*, que ha causado brotes tóxicos en El Salvador en septiembre de 2011, octubre de 2012 y agosto de 2013.

Conclusión.

El método oficial del ensayo receptor ligando (RBA), AOAC 2011.27 tiene la capacidad de analizar muestras de ostras, peces, cangrejos, caracoles tortugas marinas y otros productos del mar, con una amplia gama de niveles de toxinas. LABTOX-UES mantiene un monitoreo permanente de fitoplancton tóxico en la costa salvadoreña. Los informes de las densidades celulares y la concentración analítica de toxinas en moluscos se entregan a la comisión nacional de marea roja CONAMAR, conformada por el MARN, CENDEPESCA y MINSAL. La coordinación con las instituciones del Estado cuando se producen las mareas rojas es esencial. Para la mortandad de tortugas del año 2013, sugerimos que el fitoplancton tóxico se transmitió a las tortugas marinas a través de medusas como vectores de toxinas causándoles la muerte.

Los esfuerzos en curso se están dedicando a poner en práctica el método RBA para análisis de ciguatoxinas.

La aplicación del ensayo receptor ligando RBA, como un ensayo funcional (que permite la estimación del potencial tóxico en base a procesos bioquímicos) de gran sensibilidad, ha permitido una detección temprana de la presencia de toxinas PSP en productos pesqueros en El Salvador y probablemente han contribuido a salvar vidas humanas.

Es necesario implementar métodos que producen una respuesta rápida a los brotes tóxicos de Mareas Rojas en El Salvador. Popularizar el método RBA es un reto en América Latina y el Caribe.

Agradecimientos

Gracias al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) proyectos RLA7014 y ELS7007, por su apoyo para establecer el laboratorio LABTOX-UES y de la Administración Oceánica y Atmosférica Nacional (NOAA) para la cooperación y asistencia técnica. Al Consejo de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador CIC-UES por el aporte institucional del 5%

de contrapartida. A las autoridades de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática por el respaldo decidido a esta unidad de investigación.

Referencias Bibliográficas.

Barraza, J. 2009. *Toxicon* 54: 895-896.

Amaya, O. et al 2012. *Harmful Alge News* 45

Powell C et al 1999. *Natural Toxins* 7: 393-400.

Van Dolah F. et al 2009. *Journal of AOAC International* 92: 1705-1713.

Amaya, O. et al 2014. *Harmful Alge News* 48