

## **IDENTIFICACIÓN FIDEDIGNA DE LOS AGENTES DE EPISODIOS TÓXICOS DE LOS MARISCOS**

**Expositor: Beatriz Reguera.**

**Instituto Español de Oceanografía (IEO), Centro Oceanográfico de Vigo, España.**

Una de las cuestiones clave cuando tiene lugar una intoxicación alimentaria por consumo de moluscos bivalvos cocinados es identificar el agente tóxico. La identificación fidedigna del causante requiere una serie de pasos que incluye: identificación de toxinas en los bivalvos, identificación de toxinas en el plancton y aislamiento y cultivo del organismo bajo sospecha. Tan sólo podremos estar seguros de la identificación cuando las toxinas encontradas en los bivalvos, en el plancton y en el cultivo del agente sospechoso sean comparables.

Los síntomas de los intoxicados nos pueden guiar sobre el tipo de toxinas que se sospecha causaron el síndrome. En la mayor parte de los casos es posible trazar el origen del producto e incluso conseguir una porción para realizar un ensayo de ratón o mejor aún un análisis químico del extracto lipofílico/hidrofílico de la carne del molusco. El análisis de concentrados de plancton (arrastré de red, agua bombeada y filtrada, etc.) del lugar de procedencia de los moluscos contaminados nos permitirá confirmar si el agente tóxico se encuentra aún presente en la comunidad planctónica. En caso positivo, el examen de una muestra de plancton viva nos permitirá identificar especies “sospechosas” e intentar su aislamiento y cultivo (ver Reguera et al. 2011).

El desarrollo de técnicas analíticas cada vez más sensibles, tales como la cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS), pueden acortar este proceso. Los equipos de última generación permiten analizar extractos de muestras constituidas por unas pocas decenas de células aisladas por micro-manipulación, obviando así los procesos de aislamiento y establecimiento de cultivo monoalgal. No obstante, los cultivos constituyen una materia prima imprescindible para futuros estudios de caracterización fisiológica de las especies, y permiten dilucidar el perfil de toxinas, incluyendo toxinas minoritarias presentes por debajo del nivel de detección en muestras reducidas. La misma especie puede presentar cepas muy tóxicas en ciertas regiones y cepas débilmente tóxicas o incluso no tóxicas en otras. Por ello, cada localidad debe adquirir conocimientos sobre el potencial tóxico de las cepas de su localidad y evitar el uso de “*trigger levels*” (umbrales de concentración celular de las especies problema) generalizados como medida para incrementar los controles sanitarios.

La detección de la presencia de especies potencialmente tóxicas es una herramienta de alerta temprana muy útil en los programas de monitoreo. De ahí la importancia de mantener esta “lista dinámica” al día e incorporar a la misma cualquier nueva especie asociada con “toxinas emergentes”.

### **Errores más frecuentes**

1. Asumir que la especie dominante en el plancton es la causante de la contaminación observada en los moluscos. Este error fue el que condujo a expertos holandeses a principios de los 70 a señalar a *Prorocentrum micans* y otros *Prorocentrum* planctónicos como los causantes de intoxicación diarreica (DSP) por consumo de mejillones cocinados. La especie causante, en este caso, era el dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, presente en concentraciones  $10^2$ - $10^3$  veces menores que *Prorocentrum*. Además, si los muestreos no son suficientemente frecuentes o con una adecuada cobertura espacial, cabe la posibilidad de que el agente tóxico ya no se encuentre presente en el momento del muestreo.

2. Dar por seguro que las células que contienen toxinas son las mismas que las produjeron *de novo*. Esto fue lo que condujo a la errónea identificación del dinoflagelado heterótrofo *Protoperdinium crassipes* como el agente de la contaminación de moluscos con azaspirácidos (AZP). Años después se demostró que *P. crassipes* no era más que un vector de las toxinas producidas por el diminuto *Azadinium spinosum* (Krock et al. 2009). La lista de nuevas especies del género *Azadinium* productoras de azaspirácidos va en aumento.
3. Generalizar sobre el potencial tóxico de una especie concreta. La información de lo que ocurre en otras partes del mundo es tan sólo orientativa. Es necesario determinar las características toxinológicas de las cepas de cada región. A modo de ejemplo, la “especie” *Alexandrium tamarense*, perteneciente al “Grupo I” del complejo *tamarense/catenella/fundyense*, es la especie FAN más peligrosa en Argentina. Por el contrario, hay cepas no tóxicas de *Alexandrium tamarense*, pertenecientes al “Grupo III” del mismo complejo, en la Península Ibérica (España y Portugal) y sur de Inglaterra (Lilly et al., 2007). *Dinophysis acuminata* es el principal causante de contaminación de bivalvos con toxinas diarreicas (ácido okadaico, dinophysistoxinas) y prolongadas vedas de recolección de mariscos en la costa Atlántica de Europa. La misma especie presenta niveles de toxinas  $10^3$  veces inferiores en el noreste de USA, donde raras veces causa problemas (Reguera et al. in press).

En el caso de Argentina, los eventos de DSP del 2010 en la provincia de Buenos Aires demuestran que las especies de *Dinophysis* representan una amenaza para la salud pública. Sería conveniente determinar la contribución a estos eventos de las principales sospechosas (*D. cf. acuminata* y *D. caudata*) mediante análisis de LC-MS de células aisladas o aún mejor de cultivos de estas especies. Una vez confirmada la asociación de espirólidos (toxina de acción rápida) con *Alexandrium ostenfeldii* en el Canal de Beagle, es necesario evaluar la contribución de estas toxinas a las muertes, con síntomas atípicos, de los ratones de bioensayo en las distintas provincias del país. En Europa hay cepas de esta especie que producen tanto espirólidos como toxinas paralizantes, cepas que sólo producen toxinas PSP y cepas que sólo producen espirólidos.

Por último, no hay que olvidar que los extractos lipofílicos de bivalvos son a veces verdaderos “cocktails” de toxinas liposolubles, reflejo de la comunidad fitoplanctónica filtrada por los bivalvos, que pueden incluir: toxinas diarreicas (OA, DTXs), pectenotoxinas (PTXs), yesotoxinas (YTX), azaspirácidos (AZP) e iminas cíclicas (espirólidos, pinnatoxinas). Algunos contribuyentes a este complejo pueden ser células planctónicas de muy pequeño tamaño y aparición esporádica en el plancton que pueden fácilmente pasar desapercibidas (Ej. identificación de *Vulcanodinium rugosum* como productor de pinnatoxinas) (Nézan & Chomérat 2011). Los expertos en control sanitario en cooperación con los biólogos de los centros de monitoreo de fitoplancton deberán resolver las incertidumbres sobre la identificación de los agentes tóxicos en muestras “multi-toxinas” complejas.

## Referencias

- Krock, B., Tillmann, U., John, U., Cembella, A.D. 2009. Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8: 254-263.
- Lilly, E. L., Halanych, K. M., Anderson, D. M. 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 43, 1329–1338.
- Nézan, E., Chomérat, N. 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie Algologie*, 32: 3-18.
- Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S. 2011. *Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas*. IOC of UNESCO and IAEA, Paris and Viena 2011. IOC Manuals and Guides 59 (Spanish only). [http://hab.ioc-unesco.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=23&Itemid=20](http://hab.ioc-unesco.org/index.php?option=com_content&view=article&id=23&Itemid=20)
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P.A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J., Blanco, J. *In press*. *Dinophysis* toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Mar. Drugs*