

# ANEXO IV

**JACUMAR  
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

## **INFORME FINAL**

**Título:**

**Comparación de metodologías para la determinación de toxinas paralizantes en bivalvos relacionadas con el Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). Aplicación a la acuicultura en España**

**(Proyecto “JACUMAR PSP”)**

El presente informe se completa con el Anexo A: Resultados del ejercicio intercomparativo entre los diferentes análisis y ensayos

## **RESUMEN EJECUTIVO (MÁXIMO 10 PÁGINAS)**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

**TITULO:** Comparación de metodologías para la determinación de toxinas paralizantes en bivalvos relacionadas con el Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). Aplicación a la acuicultura en España

**FECHAS DE REALIZACIÓN** Enero de 2007 a Junio de 2011

### **DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos: Jorge Diogène Fadini  
Organismo/ Centro: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)  
Correo electrónico: jorge.diogene@irta.es

### **Comunidades Autónomas participantes**

ANDALUCIA  
CATALUNYA  
GALICIA

### **2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL**

#### **2.1. OBJETIVOS**

**Objetivo 1: Comparación de métodos de determinación de toxinas paralizantes.** Este objetivo se centra en el establecimiento y comparación de métodos analíticos y bioquímicos para la determinación de toxinas paralizantes (PSP).

**Objetivo 2: Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento.** Se desea evaluar la aplicabilidad de los métodos de determinación de toxinas paralizantes dentro de los actuales programas de vigilancia.

#### **2.3. METODOLOGÍA (muy resumida)**

**Metodologías asociadas al objetivo 1:  
Comparación de métodos de determinación de toxinas PSP**

- 1.1) Metodologías accesorias.
- 1.2) Metodologías de determinación de toxinas.

### 1.1) Metodologías accesorias

Datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya: Presencia de microalgas productoras de toxinas PSP y de toxinas en moluscos

Obtención de patrones certificados.

Obtención de muestras de campo, en particular durante episodios críticos: Obtención de moluscos con toxinas.

Experimentación en mar: exposiciones de mejillones en condiciones semi-controladas en el que se expondrá de forma controlada, o semi-controlada a bivalvos “limpios”, es decir, carentes de toxinas, a floraciones naturales de toxinas en zonas semi-confinadas (por ejemplo puertos).

Cultivos de microalgas tóxicas: Cultivos de microalgas tóxicas: cultivo de microalgas a pequeña y mediana escala.

Experimentación en laboratorio: A partir de cultivos de microalgas productoras de toxinas paralizantes se realizarán exposiciones de mejillones

Purificación de extractos HPLC, preparativa: Estudio de procedimientos de extracción en fase sólida y líquido-líquido para el análisis de los extractos.

### 1.2) Metodologías de determinación de toxinas:

El bioensayo ratón para toxinas paralizantes de la AOAC

Desarrollo e implementación de metodologías cromatográficas, LC-FD (pre i post-columna), LC-MS-MS. Perfiles tóxicos.

Evaluación de la citotoxicidad de toxinas y extractos

Utilización y evaluación del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™

Correlación y concordancia entre los resultados obtenidos de determinación de las toxinas paralizantes mediante los diferentes métodos: el bioensayo ratón, las determinaciones por cromatografía, LC-MS-MS como indicadores de toxicidad.

### **Metodologías asociadas al objetivo 2:**

#### **Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento**

La metodología utilizada para contrastar la aplicabilidad de los métodos a los programas de seguimiento se realizará a dos niveles:

2.1) Estudio continuo de factores asociados a la implementación de las metodologías.

2.2) Una evaluación del potencial técnico y de infraestructuras en cada una de las comunidades autónomas.

## 2.4. RESULTADOS

### Datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya:

Los datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya han sido fundamentales para el seguimiento de microalgas de interés y para el reconocimiento de toxinas en moluscos a lo largo de toda la ejecución del proyecto. Cabe resaltar que si bien ha habido episodios puntuales de toxinas paralizantes a lo largo de todo el proyecto, en ningún caso éstas han estado las más representativas de los problemas identificados en las tres comunidades. Los datos de episodios de toxinas PSP permiten concluir de la vigencia de la problemática abordada en el proyecto y que persiste como un elemento clave a seguir de cerca de cara a asegurar la calidad alimentaria del producto e inocuidad hacia el consumidor, elementos claves para el desarrollo del sector.

### Obtención de patrones certificados

En este sentido las conclusiones son pocas, si bien cabe resaltar que los patrones certificados siguen estando disponibles en el NRC (Halifax, Canadá) aunque cabe resaltar que no ha habido un fundamental avance en la disponibilidad de nuevos patrones de referencia. Por ello podemos concluir que la disponibilidad de patrones y material de referencia en el mercado, principalmente para el interés de los laboratorios de control, es modesta y que debería haber a nivel internacional cierto esfuerzo para incrementar la disponibilidad. Se identifican carencias en relación a patrones de las toxinas GTX6, C3 y C4. En particular la carencia de GTX6 afecta al análisis de toxinas asociadas a floraciones de *Gymnodinium catenatum*.

### Obtención de muestras de campo, en particular durante episodios críticos:

La obtención de muestras de campo durante episodios de toxicidad PSP ha sido crucial para la ejecución del proyecto. En este sentido, fundamentalmente por episodios acontecidos en Andalucía y Galicia se ha podido disponer de material contaminado con toxinas PSP lo cual ha permitido la comparación entre métodos de ensayo, objeto de la actual propuesta.

### Experimentación en mar:

La experimentación en mar para obtener material de referencia durante proliferaciones de microalgas productoras de toxinas PSP ha resultado una estrategia clave en el caso de Catalunya. Fruto de la proliferación de la microalga *A. minutum* en puertos de Catalunya a lo largo de la ejecución del proyecto, se han podido realizar exposiciones semi-controladas de moluscos durante episodios lo cual ha permitido obtener material de referencia contaminado utilizado en el marco de este proyecto. Las muestras obtenidas, han sido empleadas para la comparación de metodologías, y muy recientemente han sido donadas al Laboratorio Comunitario de Referencia de toxinas marinas en Vigo, para la realización de ejercicios inter-laboratorios en toda la UE.

### Cultivos de microalgas tóxicas

El cultivo de microalgas tóxicas es fundamental para una mejor comprensión de las toxinas que puedan estar presentes en las diferentes áreas geográficas del litoral español. Constituye una base para identificar las toxinas que posteriormente el propio molusco puede metabolizar en diferentes derivados. Por ello, estos cultivos pueden ser primordiales para la puesta a punto de metodologías, con la ventaja inicial de que resulta un material que pueda presentar menos interferencias debido a la matriz. En el marco del proyecto los cultivos de *A. minutum* y *G. catenatum* han sido los cultivos utilizados.

### Experimentación en laboratorio:

La experimentación en laboratorio para la obtención de material de referencia a partir de exposiciones controladas de moluscos a cultivos de microalgas ha mostrado dificultades. Si bien las exposiciones controladas en laboratorio son posibles y podrían representar una buena estrategia siempre que se desee obtener pequeñas cantidades de material de referencia, la obtención de mayores cantidades puede necesitar largas etapas de puesta a punto de las metodologías de exposición de los moluscos a las microalgas tóxicas, y la disponibilidad de infraestructuras relativamente complejas.

### Purificación de extractos HPLC

De la evaluación del efecto matriz sobre las columnas de separación se determina que su vida útil es muy corta. Por lo que se podría concluir que la fase de preparación de muestras a partir de moluscos nos encontramos con un paso de limpieza no resuelto actualmente y que limita en gran medida la duración de las columnas además de la habitual presencia de interferentes no tóxicos. Si a esto le sumamos el efecto añadido de la variabilidad de los perfiles de toxinas, relacionado con el fitoplancton de la zona, podemos concluir que resulta muy difícil la aplicación rutinaria de esta metodología, en particular dentro de un programa de Control y Seguimiento.

## 1.2) Metodologías de determinación de toxinas:

### El bioensayo ratón para toxinas paralizantes de la AOAC

Este método ha resultado ser eficaz en la aplicación de los programas de control de biotoxinas desde los años 60. Tiene dos importantes ventajas que son su rapidez para actuar sobre situaciones de alerta, desde 1,5 a 3,7 horas se puede disponer del resultado de 1 y/o 5 muestras y la segunda es que mide toxicidad. Por lo contrario presenta las desventajas de que es inespecífico y utiliza animales de experimentación, hecho que la legislación europea pretende reducir por ética animal (Commission Recommendations 2007/526/EC de 18 de junio). En el presente proyecto se detectan diferencias significativas entre laboratorios, aunque éstas son moderadas en los niveles próximos al cierre

### Desarrollo e implementación de metodologías cromatográficas, LC-FD, LC-MS-MS. Perfiles tóxicos.

#### **LC-MS/MS**

Es posible utilizar la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas con interfase electrospray para la determinación de las toxinas de tipo PSP en moluscos bivalvos. La tecnología de detección de triple cuadrupolo se mostró suficientemente sensible en general, pero no la de trampa iónica. Cromatográficamente, la tecnología HILIC con una columna de tipo zwitteriónica resultó la más adecuada. No obstante, al igual que en con otros métodos cromatográficos para la separación de estas toxinas, la obturación parcial de las columnas cuando se inyectan extractos de bivalvos es muy rápida, requiriendo, por tanto el desarrollo de métodos de preparación de la muestra adaptados a tanto a las condiciones cromatográfica (HILIC) como a las de ionización en el espectrómetro de masas (ESI), antes de que se pueda utilizar para el control rutinario de la toxicidad de bivalvos.

#### *HPLC-PreColumna*

Para poder abordar un monitoring intenso ( $\geq 25$  muestras/día) con el método HPLC-FD con oxidación precolumna (AOAC) exclusivamente, requeriría automatizar la etapa de preparación de muestra. Su uso como complementario del bioensayo encarece el coste total del ensayo sin que se mejore en operatividad, ni seguridad debido al aumento en la demora de entrega de resultados. Existe una relación importante entre la aplicabilidad de la técnica de HPLC-FD con oxidación precolumna y el perfil tóxico de las muestras de moluscos, tanto es así que, para el caso de moluscos afectados por *Alexandrium minutum*, podría ser factible su aplicación en programas de control, mientras que en los moluscos afectados por *Alexandrium catenella* serían difíciles y en episodios de *Gymnodinium catenatum* lo haría prácticamente inviable. Existe la posibilidad en este caso de emplear el método de forma abreviada como método de cribado en conjunción con el bioensayo ratón, que se emplearía en caso de identificar toxinas por cromatografía. La utilización de esta técnica requeriría un

calibrado detallado contra el bioensayo o con materiales tóxicos específicamente diseñados para esta calibración.

### *HPLC-PostColumna*

Los métodos de HPLC-PostColumna empleados en este proyecto no son equivalentes al método biológico, ni económicamente, ni en tiempo de respuesta, ni desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, por lo que se necesita una depuración mayor para que cumplan los requerimientos exigidos por la legislación para la erradicación del método biológico. Pese a esto, el método de Cromatografía líquida de Alta Eficacia con oxidación Postcolumna es de gran ayuda a la hora de estudiar perfiles y comportamientos ante episodios tóxicos de tipo Paralizante. La eficacia del método en relación al bioensayo depende considerablemente de la matriz biológica en la que se hallen las toxinas. Las dispersiones son, en general similares a las obtenidas con bioensayo.

### Evaluación de la citotoxicidad de toxinas y extractos

En el marco del actual proyecto se ha puesto a punto el ensayo de citotoxicidad para la determinación de toxinas PSP abordando diferentes modelos celulares, entre ellos alguno como el modelo celular NG108-15 que anteriormente no se había empleado. Ello ha permitido confirmar el ensayo de citotoxicidad como un utensilio práctico para la identificación de toxinas PSP. No obstante en el marco de este proyecto se ha intentado optimizar el protocolo para evaluar toxinas del PSP en moluscos. Hemos podido constatar que el modelo de citotoxicidad tiene una capacidad limitada para su aplicación a identificación de toxinas presentes en moluscos por lo que su empleo como herramienta de cribado queda comprometida, entendemos fundamentalmente debido al efecto matriz de los moluscos. Su aplicación a la identificación de la toxicidad de microalgas resulta posible.

### Utilización y evaluación del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™

Entre las diferentes metodologías propuestas, el test de diagnóstico rápido para toxinas paralizantes MIST Alert™ puede ser una buena herramienta de cribado que demuestra identificar toxinas paralizantes cuando éstas se encuentran a concentraciones entorno al límite máximo permitido. Por ello su uso como herramienta de cribado de forma continuada queda comprometido dado que no da seguridad de que la presencia de toxinas PSP a concentraciones cercanas o ligeramente superiores al LMP puedan ser detectadas, con lo que el cumplimiento de los actuales reglamentos quedaría en entredicho. El presente test MIST Alert™ presenta un elevado número de falsos positivos en valores cercanos pero inferiores a LMP y por tanto que su uso en un sistema de control debe restringirse

a el cribado de muestras, dejando a otras técnicas la obtención de resultados definitivos.

## 2.5. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN

El desarrollo del actual proyecto ha permitido consolidar una red estable de laboratorios y profesionales que han podido interaccionar para la obtención de material tóxico fundamental para la ejecución del presente proyecto (y aplicable a muchos otros) y complementándose respecto a un amplio abanico de metodologías. Ello de cara al sector fortalece la capacidad técnica y científica dentro del campo de las toxinas marinas en España.

Cabe resaltar que por la propia estructura de la propuesta, centrada en la valoración y desarrollo de metodologías de análisis, el impacto de la ejecución de este proyecto sobre el sector de producción de moluscos debe ser medido en relación a la aplicabilidad de los resultados en los laboratorios de control. De esta manera, los resultados del proyecto son de inmediata aplicación en los laboratorios que ejecutan los programas de vigilancia relativos a la calidad de las zonas de producción de marisco. Con ello han mejorado las garantías que puede tener el sector respecto a las actuaciones de los laboratorios de control, que ahora disponen de informaciones adicionales, mejora de protocolos, resultados sobre la posible implementación de metodologías nuevas y estrategias aplicables al diseño de los propios programas de vigilancia. Igualmente, los laboratorios de control, a lo largo de todo el proyecto, han podido equiparse con nuevas infraestructuras, adoptar nuevos protocolos y capacitarse en nuevas metodologías. Se estima que el proyecto ha tenido el impacto deseado.

## 2.6. VALORACIÓN

El presente proyecto ha sido ejecutado de forma correcta, cumpliendo con los objetivos propuestos y permitiendo disponer en España, tras la ejecución del proyecto, de una mejor comprensión y ejecución de las metodologías de ensayo y análisis de toxinas paralizantes. Igualmente el proyecto ha permitido establecer una mejor comunicación e intercambio entre los laboratorios que ejecutan estos protocolos. Con ello, si bien han podido surgir dificultades a lo largo del proyecto, éstas han sido solventadas y podemos decir que las expectativas formuladas en la propuesta inicial han sido cubiertas.

## 2.7. DIFUSIÓN

Nuestra valoración respecto a la difusión del proyecto es correcta. Entendemos que del proyecto no se han derivado excesivas publicaciones científicas, si bien cabe señalar que los objetivos del proyecto preveían que la aplicabilidad de los resultados del proyecto serían de orden interno para la propia gestión de los programas de vigilancia y toma de decisiones respecto a las metodologías empleadas tal como se formulaba en la propuesta: “los resultados de este proyecto definirán estrategias útiles para su adaptación en los programas de vigilancia de toxinas en zonas de producción de moluscos a nivel nacional”.

## 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

Se puede concluir que no han surgido incidencias notables en el desarrollo del proyecto que hayan condicionado su ejecución, salvo la necesidad de solicitar una prórroga de 6 meses para concluir el proyecto.

## INDICE

INFORME FINAL EXTENSO.....	15
1. Datos administrativos .....	15
2. Resultados técnicos del plan nacional.....	25
2.1 Objetivos iniciales .....	25
2.2 Objetivos realizados .....	27
2.3 Metodología .....	28
2.4 Resultados .....	35
 Objetivo 1: Comparación de métodos de determinación de toxinas paralizantes.....	       35
1.1 Metodología asociadas .....	35
- Datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya: Seguimiento de episodios tóxicos.....	   35
- Obtención de Patrones Certificados .....	44
- Obtención de muestras de campo, en particular durante episodios críticos .....	   45
- Experimentación en mar .....	49
- Cultivos de microalgas tóxicas .....	54
- Experimentación en laboratorio .....	61
- Purificación de extractos HPLC.....	65
1.2 Metodologías de determinación de toxinas .....	79
El Bioensayo Ratón para toxinas paralizantes de la AOAC. ....	  79
Desarrollo e implementación de metodologías cromatográficas, LC-FD, LC-MS-MS. Perfiles tóxicos.....	   80
• LC-Precolumna .....	80
• LC-Postcolumna .....	90
• LC-MS/MS .....	124
• Evaluación de la citotoxicidad de toxinas y extractos .....	 126
• Utilización y evaluación del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™ .....	  136

- Correlación y concordancia entre los resultados obtenidos de determinación de las toxinas paralizantes mediante los diferentes métodos: el bioensayo ratón, las determinaciones por cromatografía, LC-MS-MS como indicadores de toxicidad. ....139

Objetivo 2: Estudio de la aplicabilidad de seguimiento de los métodos en los programas de seguimie.....169

- 2.1) Estudio continuo de factores asociados a la implementación de las metodologías .....169
- 2.2) Evaluación del potencial técnico y de infraestructuras en cada una de las comunidades autónomas .....184

2.5 Conclusiones .....	214
2.6 Valoración .....	224
2.7 Difusión .....	227
2.8 Incidencias de desarrollo .....	228

## **INFORME FINAL EXTENSO**

### **1.- DATOS ADMINISTRATIVOS**

**TITULO:** Comparación de metodologías para la determinación de toxinas paralizantes en bivalvos relacionadas con el Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). Aplicación a la acuicultura en España

### **FECHAS DE REALIZACIÓN**

Inicio: Enero 2007

Finalización: Abril 2012

### **DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos: Jorge Diogène Fadini  
Organismo/ Centro: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)  
Centre- Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Teléfono: 977745427  
Fax: 977744138  
Correo electrónico: jorge.diogene@irta.cat  
Dirección postal completa: Ctra Poble Nou, km 5,5 (43540) Sant Carles de la Ràpita

### **PARTICIPANTES POR CADA COMUNIDAD AUTÓNOMA**

#### **CATALUNYA**

##### **CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

Tipo: Empresa Pública de I+D  
Nombre: **Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)**  
CIF: Q-5855049-B  
Nombre Representante Legal: Eliecer López Jiménez

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: de la Iglesia González  
Nombre: Pablo  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: pablo.delaignlesia@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Fernández Tejedor  
Nombre: Margarita  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: margarita.fernandez@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Elandaloussi  
Nombre: Laurence Myriam  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: laurence.elandaloussi@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Giménez Papiol  
Nombre: Gemma  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: gemma.gimenez@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Caillaud  
Nombre: Amandine  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: amandine.caillaud@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Cañete Ortiz  
Nombre: Elisabeth  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: elisabeth.canete@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Casanova Morisco  
Nombre: Alexis  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: alexis.casanova@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

Apellidos: Eixarch  
Nombre: Helena  
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).  
Centro: Sant Carles de la Ràpita  
Departamento: Seguimiento del Medio Marino  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977745427  
Fax.: 977744138  
Correo electrónico: helena.eixarch@irta.cat  
Dirección Postal: 43540

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo: Público (Generalitat de Catalunya)  
Nombre: **Departament de Salut Laboratori Salut Pública de Tarragona**  
CIF: S0800504C  
Nombre Representante Legal: Joan Guix Oliver

#### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Aguilar Mármol  
Nombre: Carme  
Organismo: Generalitat de Catalunya. Departament de Salut  
Laboratori Salut Pública de Tarragona  
Departamento: Área Microbiología y Biotoxinas  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977.24.96.23  
Fax.: 977.21.89.54  
Correo electrónico: carme@gencat.cat  
Dirección Postal: 43002

Apellidos: Solsona Colomer  
Nombre: M<sup>a</sup> Josep  
Organismo: Generalitat de Catalunya. Departament de Salut  
Laboratori Salut Pública de Tarragona  
Departamento: Área Microbiología y Biotoxinas  
Equipo: N/A  
Teléfono: 977.24.96.23  
Fax.: 977.21.89.54  
Correo electrónico: MJOSE.SOLSONA@gencat.cat  
Dirección Postal: 43002

#### CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo: Público  
Nombre: **Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC).**  
CIF: Q2818002D  
Nombre Representante Legal: Dr. Albert Palanques Monteys

#### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Llaveria Almacellas  
Nombre: Gisella  
Organismo: Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC).  
Departamento: Biología Marina i Oceanografía

Equipo: N/A  
Teléfono: 93 230 9595  
Fax.: 93 230 95 55  
Correo electrónico: llaveria@icm.csic.es  
Dirección Postal: 08003 Barcelona

## **ANDALUCÍA**

### **CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

Tipo de centro: Agencia pública  
Nombre: **Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros**  
CIF: Q4100797B  
Nombre Representante Legal: Dña Isabel Liviano Peña.

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Mamán Menéndez  
Nombre: Luz  
Organismo: Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía  
Centro: Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros  
Departamento: Área de Fitoplancton y Oceanografía  
Equipo:  
Teléfono: 959 024 730  
Fax.: 959 024 752  
Correo electrónico: luz.m.menendez@juntadeandalucia.es  
Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km.12, 21459. El Rompido-Cartaya. HUELVA

Apellidos: Fernández Fuentes  
Nombre: Lourdes  
Organismo: Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía  
Centro: Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros  
Departamento: Área de Biotoxinas  
Equipo:  
Teléfono: 959 024 730  
Fax.: 959 024 752  
Correo electrónico: lourdes.fernandez.fuentes@juntadeandalucia.es  
Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km.12, 21459. El Rompido-Cartaya. HUELVA

Apellidos: Ocaña García-Donas  
Nombre: M<sup>a</sup> Asunción  
Organismo: Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía  
Centro: Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros  
Departamento: Área de Biotoxinas  
Equipo:  
Teléfono: 959 024 730  
Fax.: 959 024 752  
Correo electrónico: masuncion.ocana.ext@juntadeandalucia.es  
Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km.12, 21459. El Rompido-Cartaya. HUELVA

Apellidos: Fernández Lozano  
Nombre: Raúl  
Organismo: Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía  
Centro: Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros  
Departamento: Área de Fitoplancton y Oceanografía  
Equipo:  
Teléfono: 959 024 730  
Fax.: 959 024 752  
Correo electrónico: raul.fernandez.ext@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km.12, 21459. El Rompido-Cartaya. HUELVA

Apellidos: Jaén Carbonell

Nombre: David

Organismo: Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía

Centro: Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros

Departamento: Área de Fitoplancton y Oceanografía

Equipo:

Teléfono: 959 024 730

Fax.: 959 024 752

Correo electrónico: david.jaen.ext@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km.12, 21459. El Rompido-Cartaya. HUELVA

Apellidos: Gordillo Moreno

Nombre: M<sup>a</sup> Mercedes

Organismo: Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía

Centro: Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros

Departamento: Área de Biotoxinas

Equipo:

Teléfono: 959 024 730

Fax.: 959 024 752

Correo electrónico: mercedes.gordillo.ext@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km.12, 21459. El Rompido-Cartaya. HUELVA

## **GALICIA**

### **CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

Tipo: Agencia pública

Nombre: **Centro de Investigacións Mariñas (CIMA). Dirección Xeral de Desenvolvemento Pesqueiro. Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia**

CIF: S-1511001-H

Nombre del representante legal: Susana Rodríguez Carballo

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Blanco Pérez

Nombre: Juan

Organismo: Centro de Investigaciones Mariñas. Xunta de Galicia.  
Consellería do Mar

Departamento:

Equipo:

Teléfono: 886206340

Fax:

Correo electrónico: jblanco@cimacoron.org

Dirección postal: CIMA. Pedras de Corón s/n. 36620 Vilanova de Arousa

Apellidos: Escudeiro Rossignoli

Nombre: Araceli

Organismo: Centro de Investigaciones Mariñas. Xunta de Galicia.  
Consellería do Mar

Departamento:

Equipo:

Teléfono: 886206364

Fax:

Correo electrónico: ara@cimacoron.org

Dirección postal: CIMA. Pedras de Corón s/n. 36620 Vilanova de Arousa

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo: Ente Público

Nombre: **Instituto Tecnológico para o control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR)**

CIF: Q3600376B

Nombre Representante Legal: M<sup>o</sup> Covadonga Salgado Blanco

## DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Arévalo Bartolomé

Nombre: Fabiola Fernanda

Organismo: Xunta de Galicia-Consellería do Medio Rural e Mar

Centro: INTECMAR

Departamento: Unidade de Biotoxinas

Equipo:

Teléfono: 986 512322/20

Fax.: 986 512300

Correo electrónico: farevalo@intecmar.org

Dirección Postal: Peirao de Vilaxoán S/N. 36611 .Vilagarcía de Arousa-  
Pontevedra

Apellidos: Correa Jorge  
Nombre: Jorge  
Organismo: Xunta de Galicia- Consellería do Medio Rural e Mar  
Centro: INTECMAR  
Departamento: Unidade de Biotoxinas  
Equipo:  
Teléfono: 986 512322/20  
Fax.: 986 512300  
Correo electrónico: jcorrea@intecmar.org  
Dirección Postal: Peirao de Vilaxoán S/N. 36611 .Vilagarcía de Arousa- Pontevedra

Apellidos: Franco Soler  
Nombre: José Mariano  
Organismo: CSIC  
Departamento: Unidad Asociada CSIC/IEO de fitoplancton tóxico  
Equipo:  
Teléfono: 986492111  
Fax:  
Correo electrónico: jose.franco@vi.ieo.es  
Dirección postal: IEO. Subida a Radiofaro s/n. San Miguel de Oia. Vigo

Apellidos: Riobó Agulla  
Nombre: Pilar  
Organismo: CSIC  
Departamento: Unidad Asociada CSIC/IEO de fitoplancton tóxico  
Equipo:  
Teléfono: 986492111  
Fax:  
Correo electrónico: pilar.riobo@vi.ieo.es  
Dirección postal: IEO. Subida a Radiofaro s/n. San Miguel de Oia. Vigo

Apellidos: Paz Pino  
Nombre: Beatriz  
Organismo: CSIC  
Departamento: Unidad Asociada CSIC/IEO de fitoplancton tóxico  
Equipo:  
Teléfono: 986492111  
Fax:  
Correo electrónico: bea.paz@vi.ieo.es  
Dirección postal: IEO. Subida a Radiofaro s/n. San Miguel de Oia. Vigo

Apellidos: Cacho Barrio  
Nombre: Emiliano  
Organismo: Sanidad Exterior  
Departamento:  
Equipo:

Teléfono: 98698915

Fax:

Correo electrónico: [ecacho@intecmar.org](mailto:ecacho@intecmar.org)

Dirección postal: Sanidad Exterior. Estación marítima del puerto de Vigo.  
36201 Vigo

Apellidos: López-Santacruz Serraller

Nombre: Ana

Organismo: Sanidad Exterior

Departamento:

Equipo:

Teléfono: 98698915

Fax:

Correo electrónico:

Dirección postal: Sanidad Exterior. Estación marítima del puerto de Vigo.  
36201 Vigo

Apellidos: Merino Fernández

Nombre: David

Organismo: Sanidad Exterior

Departamento:

Equipo:

Teléfono: 98698915

Fax:

Correo electrónico:

Dirección postal: Sanidad Exterior. Estación marítima del puerto de Vigo.  
36201 Vigo

## 2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

### 2.1. OBJETIVOS INICIALES

- 1) Comparación de métodos de determinación de toxinas PSP y
- 2) Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento

#### **Objetivo 1: Comparación de métodos de determinación de toxinas paralizantes**

Este objetivo se centra en el establecimiento y comparación de métodos analíticos y bioquímicos para la determinación de toxinas paralizantes (PSP). En el caso de los métodos cromatográficos se desarrollarán y aplicarán métodos de cromatografía líquida con derivatización PRE-columna y POST-columna y detección fluorimétrica de los derivados fluorescentes. Además se utilizará la aproximación de la cromatografía líquida de interacción hidrofílica para el desarrollo de un método de análisis de toxinas paralizantes utilizando la espectrometría de masas para la detección de los compuestos sin necesidad de derivatización. Entre los métodos bioquímicos a desarrollar y aplicar se encuentran los tests MIST Alert<sup>TM</sup> de Jellett y los ensayos citotóxicos que utilizan modelos celulares (por ejemplo Neuro2a ). La comparación de todos estos métodos se realizará con muestras naturales y patrones, y se realizará un interlaboratorio para establecer la variabilidad y aplicabilidad de los métodos entre laboratorios. Se establecerán correlaciones en función de la respuesta del bioensayo del ratón.

Para llevar a cabo este objetivo será necesario la utilización de las muestras derivadas de los programas de control de Andalucía, Galicia y Catalunya, la toma de muestra durante episodios tóxicos, la utilización de muestras expuestas a proliferaciones microalgales tanto en el campo como en el laboratorio.

De esta manera será posible establecer los parámetros de calidad de los distintos métodos: sensibilidad de detección, rango de linealidad, reproducibilidad, falsos positivos y negativos y recuperación de cada una de las toxinas en las diferentes matrices, y se podrá establecer la aplicabilidad de cada uno de los protocolos desarrollados a la determinación de toxinas paralizantes en mejillones y fitoplancton.

Igualmente se establecerá la robustez en el cálculo de la toxicidad de cada uno de los extractos mediante las distintas metodologías.

## **Objetivo 2: Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento.**

Se desea evaluar la aplicabilidad de los métodos de determinación de toxinas paralizantes dentro de los actuales programas de vigilancia. Se tendrán en cuenta factores que puedan determinar la aplicabilidad de los métodos tales como la rapidez de análisis, el proceso de preparación de muestra, el coste de análisis y la preparación del personal.

Se propondrán las metodologías más adecuadas a los programas de control estableciéndose los parámetros para su correcta utilización. Se propondrán igualmente sistemas de gestión de las diferentes metodologías en los laboratorios de vigilancia para garantizar respuestas fiables en los plazos más breves.

Se definirán los métodos más adecuados para el establecimiento de planes de vigilancia en las distintas regiones de estudio en concordancia con las características regionales, que incluyen el perfil tóxico de las muestras según el área geográfica, las especies de bivalvos del sector productivo, el potencial técnico disponible, etc....

## 2. 2. OBJETIVOS REALIZADOS

Todas las tareas asociadas a los objetivos han sido realizadas, si bien como se comenta en el apartado de dificultades, las exposiciones controladas en laboratorios en las cuales se han expuesto mejillones a microalgas con toxinas, han sido limitadas ya que se han mostrado dificultades y una cierta complejidad como estrategia de trabajo.

## 2.3. METODOLOGÍA

La presente propuesta plantea dos objetivos principales que resumimos:

- 1) Comparación de métodos de determinación de toxinas PSP y
- 2) Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento.

Las metodologías descritas a continuación se refieren a estos dos objetivos por separado.

### **Metodologías asociadas al objetivo 1:** **Comparación de métodos de determinación de toxinas PSP**

Para la consecución de este objetivo se propone una aproximación metodológica pluridisciplinar que consta de los diferentes apartados que describimos a continuación. Inicialmente, la propuesta se apoya en datos obtenidos dentro de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya. A partir de estos datos, se definirán muestreos estratégicos para el estudio de la presencia de toxinas paralizantes y que consisten en obtención de muestras, ya sea procedentes del medio natural o de experimentaciones *in situ*. Los experimentos en laboratorio completan los estudios de toxinas paralizantes del medio con el cultivo de microalgas productoras de toxinas paralizantes en situaciones controladas. Para la valoración de métodos de determinación de toxinas paralizantes, planteamos una aproximación comparativa. El conjunto de metodologías propuesto para la consecución de este objetivo se describe según dos grupos:

- 1.1) Metodologías accesorias.
- 1.2) Metodologías de determinación de toxinas.

#### **1.1) Metodologías accesorias**

##### **Datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya:**

Estos programas aportarán a este proyecto, datos de toxicidad en mejillón y otros bivalvos eventualmente (ostra, ostrón, coquina, ...) obtenidos a partir del bioensayo ratón para para PSP (método AOAC) al igual que datos sobre las densidades de microalgas productoras de toxinas paralizantes a partir de contajes sobre muestras fijadas sedimentadas (Utermöhl). Se tendrán en cuenta, en función de las poblaciones de fitoplancton y posibles toxinas presentes, interferencias de otras toxinas con el bioensayo para PSP. Los programas de vigilancia también podrán aportar datos cromatográficos y de espectrometría de masas que identifiquen las toxinas presentes.

### Obtención de patrones certificados

Se encuentran patrones certificados de toxinas paralizantes STX, NEO, GTX2,3, GTX1,4, dcSTX, dc GTX2,3, C1, C2 disponibles comercialmente a través del National Research Council, Institute for Marine Biosciences de Canada. Estos patrones serán utilizados en este estudio, tomándose la precaución de consensuar su uso de forma coordinada entre los diferentes grupos.

### Obtención de muestras de campo, en particular durante episodios críticos:

Recogida de muestras intensiva durante episodios tóxicos de importancia (proliferación de microalgas o aumentos en las concentraciones de toxinas paralizantes) para suplir el material con toxinas paralizantes que se utilizará en este estudio. Se muestrearán bivalvos (mejillón, ostra, ostrón, vieira, almeja, almejón, curruco, ...) así como fitoplancton. La purificación del extracto se llevará a cabo mediante extracción líquido:líquido, cromatografía preparativa y HPLC. Una de las principales dificultades para el establecimiento de métodos analíticos de control de toxinas marinas, posteriormente aplicables a programas de vigilancia en zonas de producción, es no poseer estándares comerciales para la gran mayoría de toxinas y metabolitos conocidos hasta la fecha. Por ejemplo, en las costas catalanas se han registrado en puertos episodios de proliferaciones de la microalga tóxica *Alexandrium minutum* que es productora de toxinas paralizantes.

### Experimentación en mar:

Por otra parte, se recurrirá a resultados experimentales en el medio, en el que se expondrá de forma controlada, o semi-controlada a bivalvos "limpios", es decir, carentes de toxinas, a floraciones naturales de toxinas en zonas semi-confinadas (por ejemplo puertos). Por ejemplo, el puerto de Arenys de Mar, en la costa catalana, presenta floraciones recurrentes de la microalga *Alexandrium minutum* y en el puerto de Tarragona, se dan regularmente floraciones de *A. catenella*. Una situación equivalente se da con diversas especies en las costas de Andalucía y Galicia. Este punto podrá ser relevante de cara a exposiciones de mejillones en condiciones semi-controladas. Con ello, se podrá obtener material de referencia para la posterior evaluación del contenido en toxinas paralizantes.

### Cultivos de microalgas tóxicas

Cultivos de microalgas tóxicas: cultivo de microalgas a pequeña y mediana escala. El centro IRTA-Sant Carles de la Rápita así como el laboratorio Agua del Pino en Huelva, el laboratorio del Instituto Español de Oceanografía en Vigo y el laboratorio del CIMA, en Piedras de Corón poseen colecciones de cultivos de diferentes cepas de microalgas productoras de toxinas paralizantes: *Alexandrium minutum*, *A. catenella* y *Gymnodinium catenatum* entre otros. Estos cultivos se realizarán a pequeña, mediana y gran escala y serán utilizados para la producción

de material de referencia, estándares o como material para la exposición a bivalvos.

La recuperación de las células se realizará mediante metodologías clásicas de filtración, sedimentación y centrifugación. Las células recuperadas, podrán congelarse para su preservación (-20 a - 80 °C) o procesarse para la extracción de toxinas, para su cuantificación y su purificación parcial.

#### Experimentación en laboratorio:

A partir de cultivos de microalgas productoras de toxinas paralizantes se realizarán exposiciones de mejillones en cuerda en acuarios o exposiciones de individuos en compartimentos.

Tras las fases de exposición de los bivalvos, se procederá a la recuperación de los individuos, tomándose medidas biométricas y se extraerá la vianda entera o el hepatopáncreas para posteriores extracciones y estudio de las toxinas presentes y de su actividad citotóxica.

Se estudiarán los perfiles de toxinas (HPLC-MS) y las características toxicológicas de los extractos (citotoxicidad y bioensayo de ratón) de mejillones durante los procesos de absorción y eliminación de toxinas paralizantes y se intentará la caracterización estructural, de los derivados o metabolitos implicados mediante LC-MS<sup>n</sup>.

#### Purificación de extractos HPLC, preparativa

Estudio de procedimientos de extracción en fase sólida y líquido-líquido para el análisis de los extractos. Purificación de extractos mediante cromatografía preparativa y HPLC. Recolección de fracciones correspondientes a los distintos picos cromatográficos. Clean-up de los extractos que presentan bioactividad mediante HPLC.

### **1.2) Metodologías de determinación de toxinas:**

#### El bioensayo ratón para toxinas paralizantes de la AOAC

Esta metodología se ejecuta rutinariamente por laboratorios acreditados ENAC para la determinación de toxinas paralizantes según el bioensayo ratón de la AOAC. Por ello, la metodología descrita para este ensayo será aplicada en todos los casos para las muestras de bivalvos recogidas de forma rutinaria en los diferentes programas de seguimiento de Andalucía, Galicia y Catalunya.

## Desarrollo e implementación de metodologías cromatográficas, LC-FD, LC-MS-MS. Perfiles tóxicos.

Se realizará una caracterización de perfiles tóxicos de las toxinas paralizantes presentes en extractos naturales de fitoplancton, cultivos de microalgas y bivalvos mediante cromatografía líquida acoplada a detección fluorimétrica (LC-FD) con derivatización pre- y postcolumna, y detección por espectrometría de masas (LC-MS-MS).

Se obtendrán los perfiles tóxicos correspondientes a exposición de toxinas a bivalvos, tanto en estudios en el medio natural (seguimiento de episodio tóxico, utilización del mejillón como sistema de preconcentración natural), como en el laboratorio bajo condiciones controladas. En los experimentos en el medio natural se utilizarán parámetros oceanográficos (temperatura, salinidad, O<sub>2</sub>) y la presencia de microalgas para una descripción de las condiciones físicas en las que se desarrollan las proliferaciones tóxicas.

Dentro de los planteamientos en la puesta a punto de metodología de separación y cuantificación, con oxidación postcolumna y detección fluorimétrica, de las 7 toxinas que caracterizan la toxicidad de una muestra se pretende usar eluyentes que puedan ser compatibles con LC-MS al mismo tiempo que con la técnica más convencional de la oxidación postcolumna, tales como el acetato amónico con ácido heptafluorbutírico (Lagos et al. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil, *Toxicon*. 37,1359-1373), de forma que se puedan verificar también por MS la identidad de los analitos analizados con técnicas más asequibles en general.

## Evaluación de la citotoxicidad de toxinas y extractos

El potencial citotóxico de las toxinas patrones y los extractos se evaluará mediante métodos de citotoxicidad para la identificación y la evaluación de la toxicidad inespecífica y específica de toxinas paralizantes sobre cultivos celulares de neuroblastomas (Por ejemplo Neuro-2 A). Estas metodologías se orientan hacia toxinas que, como las toxinas paralizantes, actúan a nivel de los canales de sodio. Se estudiará los efectos inespecíficos de las toxinas y los extractos sobre la muerte celular, cuantificándose las concentraciones inhibitoras de 50% de la población celular (IC<sub>50</sub>). De cara a obtener una respuesta citotóxica más específica del grupo de toxinas, se evaluarán los efectos morfológicos (alteraciones de las membranas, de los orgánulos y del citoesqueleto), efectos fisiológicos (niveles de Ca intracelular, actuación sobre canales de Na, ...) y eventualmente efectos genotóxicos o mutagénicos. Estos ensayos más específicos permitirán, si cabe, una diagnosis del tipo de toxina presente en muestras con un contenido en toxinas desconocido. Se realizará una evaluación de la toxicidad de estándares, de extractos procedentes de cultivos de microalgas productoras de toxinas paralizantes, de extractos de bivalvos y muestras del medio natural. De forma a aumentar la especificidad de la respuesta de los

ensayos de citotoxicidad, se combinarán estos ensayos de citotoxicidad con etapas previas de pre-purificación de los extractos, por ejemplo, separando las toxinas más hidrofílicas de las más lipofílicas. Ello permitiría el diferenciar la respuesta de toxinas con diferente polaridad y eliminar posibles interferencias entre ciertos compuestos.

A diferencia del bioensayo ratón y de las metodologías de determinación de toxinas paralizantes por cromatografía, los ensayos de citotoxicidad para toxinas paralizantes requieren un estudio más profundo sobre su validez y marco de aplicación. Así pues, la utilización de esta metodología deberá pasar por etapas de puesta a punto previa a los estudios comparativos entre métodos.

#### Utilización del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™

La utilización de este método se abordará estrictamente según las especificaciones técnicas prescritas por el fabricante. Su aplicación se extenderá a los diferentes tipos de muestras anteriormente citados (muestras de agua, cultivos, extractos de bivalvos) para la identificación de muestras tóxicas/no tóxicas según la sensibilidad del método que discrimina entre muestras con contenido inferior o superior a los 400 ug Eq. STX/1000 g de vianda.

#### Correlación y concordancia entre los resultados obtenidos de determinación de las toxinas paralizantes mediante los diferentes métodos: el bioensayo ratón, las determinaciones por cromatografía, LC-MS-MS como indicadores de toxicidad.

Los programas de vigilancia de niveles de toxinas PSP en Andalucía, Galicia, Catalunya y en Europa se fundamentan en el análisis mediante bioensayo del ratón. El acceso a los datos de este ensayo *in vivo*, obtenidos dentro de los programas de vigilancia, y el análisis cromatográfico de estas muestras y determinación de toxinas paralizantes nos permitirán establecer comparaciones entre los diferentes métodos y poder llegar a establecer en un futuro, una primera validación de estos métodos, como se ha realizado en laboratorios de control en Irlanda y Nueva Zelanda.

Ello permitirá una evaluación del potencial de los indicadores descritos al igual que un estudio de correlaciones entre variables que permita la identificación de discordancias o concordancias que puedan orientarnos en la elección de métodos analíticos. Estos resultados podrían permitir, por ejemplo, la explicación de toxicidades y comportamientos atípicos de toxinas PSP en procesos de depuración. Igualmente, estos resultados podrían proponer mejoras de los protocolos.

Dentro del ejercicio de correlación y concordancia de los resultados obtenidos se tendrá en cuenta el factor "laboratorio" y se realizarán ejercicios intercomparativos entre laboratorios de forma que se pueda describir la aplicabilidad de los métodos.

Adicionalmente, los resultados de evaluación de toxicidad y toxinas mediante el bioensayo ratón y análisis cromatográfico permitirán la evaluación de los ensayos de citotoxicidad para la determinación de toxinas paralizantes.

### Evaluación del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™

La evaluación del test MIST Alert™ (o Jellet Rapid Test) este test radicará en la evaluación del número de muestras que resulten positivas o negativas para este método respecto a valoraciones obtenidas mediante los otros ensayos. Ello permitirá obtener niveles de concordancia del kit con cada una de las otras metodologías de determinación, utilizando como método de referencia, el bioensayo ratón de la AOAC. Se cuantificará, además del grado de concordancia, la eventualidad de falsos positivos y falsos negativos, intentando cuantificar su frecuencia.

### **Metodologías asociadas al objetivo 2:**

#### **Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento**

La metodología utilizada para contrastar la aplicabilidad de los métodos a los programas de seguimiento se realizará a dos niveles:

- 2.1) Estudio continuo de factores asociados a la implementación de las metodologías y
- 2.2) Evaluación del potencial técnico y de infraestructuras en cada una de las comunidades autónomas

#### **2.1) Estudio continuo de factores asociados a la implementación de las metodologías.**

Para cada metodología, se procederá a una evaluación, cuando pueda ser objetiva, de los siguientes parámetros:

- Listado de los equipos y las infraestructuras necesarias
- Coste aproximado de los equipamientos (adquisición y mantenimiento)
- Tiempo de ejecución del ensayo
- Costes del material fungible
- Coste por muestra
- Requerimientos de personal
- Horas/persona/muestra
- Puntos débiles
- Puntos fuertes
- (no se excluyen otros parámetros)

La valoración se realizará a través de un formulario que se distribuirá a los laboratorios participantes en esta propuesta.

## **2.2) Una evaluación del potencial técnico y de infraestructuras en cada una de las comunidades autónomas.**

Cada comunidad evaluará el potencial técnico y humano existente, y dentro del marco de aplicación regional, las características asociadas al programa de seguimiento que se ejecuta para toxinas paralizantes y demás parámetros.

Ello permitirá estimar el potencial existente en cada comunidad para adoptar uno u otro método de determinación de toxinas paralizantes. Igualmente, permitiría identificar los requerimientos necesarios para realizar cambios de estrategia o de metodologías.

El resultado de esta evaluación a nivel regional podrá extenderse a nivel nacional de forma a identificar acciones concretas de colaboración y complementación. Se podrá contrastar la formación de una posible red de programas de vigilancia en España, coordinada, que tenga como objetivo el disponer de todas las metodologías necesarias para la determinación de toxinas paralizantes en territorio español, de forma a poder responder de forma eficaz a lo largo de todo el litoral español, ante episodios graves de toxicidad paralizante e incluso situaciones de toxicidad inexplicada.

## 2.4. RESULTADOS

### **OBJETIVO 1: Comparación de métodos de determinación de toxinas PSP**

#### **1.1 ) Metodologías asociadas**

### **Datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya: Seguimiento de episodios tóxicos:**

#### **ANDALUCIA 2008**

Se ha realizado el informe anual de los episodios de toxinas paralizantes ocurridos en el litoral andaluz durante el año 2008. Los datos para el informe se han recogido de la Memoria Anual de Control y Seguimiento de las Condiciones Sanitarias en la Zonas de Producción de Moluscos Bivalvos que realiza el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. En el informe se destacan las incidencias de cada grupo de toxinas, señalando las especies de moluscos bivalvos afectadas, así como las especies de fitoplancton causantes del episodio tóxico.

De esta forma, se puede señalar que la aparición de toxinas paralizantes en el litoral andaluz durante 2008 ha sido baja, con la presencia de toxicidad a principios de año como continuación de un episodio que se desarrolló en los últimos meses de 2007. Este episodio afectó exclusivamente al litoral mediterráneo, y estuvo asociado a proliferaciones de la especie *Gymnodinium catenatum*.

#### **GALICIA 2008**

Se ha llevado a cabo el seguimiento de los episodios tóxicos de la costa de Galicia durante el año 2008. En este año la incidencia de las toxinas PSP ha sido muy baja detectándose en contadas ocasiones y en áreas de extensión reducida. El agente causante fue *Alexandrium*, cuya distribución está asociada a los aportes de agua dulce y, dada la comentada poca extensión de las proliferaciones, únicamente en una ocasión afectó a los cultivos de mejillón muy próximos a la desembocadura del Río Miño (ensenada de Baiona), siendo las poblaciones de bivalvos infaunales explotables las más afectadas.

Se realizaron un total de 2533 análisis de PSP en mejillón cultivado en viveros flotantes y 1049 análisis para otras especies de bivalvos.

Ría/Zona	Molusco	Fecha prohibición	Fecha apertura	Total días	Especie fitoplancton
Baiona	Mejillón	23/06/2008	07/07/2008	14	<i>Alexandrium sp.</i>
Camariñas	batea	23/06/2008	07/07/2008	14	<i>Alexandrium sp.</i>
Vigo IV.1	Infaunal	24/06/2008	08/07/2008	14	<i>Alexandrium sp.</i>
Vigo IV.2	Infaunal	17/06/2008	26/06/2008	9	<i>Alexandrium sp.</i>
Vigo IV.2	Infaunal	19/02/2008	05/03/2008	14	<i>Alexandrium sp.</i>
Vigo IV.2	Infaunal	03/06/2008	18/07/2008	45	<i>Alexandrium sp.</i>
Vigo IV.2	Infaunal	26/08/2008	10/09/2008	15	<i>Alexandrium sp.</i>

**Tabla 1.** Relación de prohibiciones por toxicidad PSP en zonas de producción de moluscos infaunales y mejillón cultivado en viveros flotantes de Galicia en el 2008.

## CATALUNYA 2008

Se ha llevado a cabo el seguimiento de los episodios tóxicos de la costa de Catalunya durante el 2008.

La frecuencia de muestreo de bivalvos para el análisis de presencia de toxinas PSP ha sido semanal en las dos bahías del Delta del Ebro (CAT1-02, Bahía de Alfacs; CAT1-05, Bahía del Fangar), puesto que es donde se concentra el cultivo de bivalvos como el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), el ostrón (*Crassostrea gigas*), la ostra plana (*Ostrea edulis*) aunque en muy bajas cantidades, la almeja fina (*Tapes decussata*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), y donde también hay una importante actividad extractiva de bancos naturales de otros moluscos como la navaja (*Solen sp.*) o la cañailla (*Bolinus brandaris*). En el resto del litoral catalán se encuentran bancos naturales, principalmente de cañailla (*Bolinus brandaris*), almejón (*Callista chione*) y coquina (*Donax trunculus*); el volumen de extracción es significativamente menor, por lo que la frecuencia de muestreo de bivalvos para su análisis ha sido semestral y se han condicionado muestreos adicionales en función de los datos de presencia de fitoplancton productor de toxinas PSP en las playas y puertos adyacentes (alertas por presencia de *Alexandrium sp.* a densidades superiores a 1 000 células por litro) facilitados por la Agencia Catalana de l'Aigua (ACA), con la que colaboramos.

No se ha cerrado ninguna zona de producción por detección de toxinas PSP por encima del nivel máximo legal permitido (800 µg equivalentes de STX por Kg de vianda). De 287 análisis realizados por MBA (método oficial), sólo se han detectado toxinas PSP en una ocasión, en coquina de la zona CAT1-09 (Cap Gros – Vilanova i la Geltrú) analizada a raíz de una alerta por presencia de *Alexandrium minutum* en el puerto de Vilanova i la Geltrú a principios de abril, pero por debajo del límite máximo legal permitido (390 µg equivalentes de STX por Kg de vianda).

## ANDALUCIA 2009

Como parte del proyecto se realiza una recogida de datos de la presencia de toxinas paralizantes en nuestras costas con el fin de realizar el “Informe anual de seguimiento de episodios tóxicos de Toxinas Paralizantes del litoral andaluz durante 2009”.

Los datos para el informe se han recogido de la Memoria Anual de Control y Seguimiento de las Condiciones Sanitarias en la Zonas de Producción de Moluscos Bivalvos que realiza el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. En el informe se destacan las incidencias de cada grupo de toxinas, señalando las especies de moluscos bivalvos afectadas, así como las especies de fitoplancton causantes del episodio tóxico.

Durante el año 2009 la tendencia de los datos indica la existencia de dos episodios escasamente diferenciados en el tiempo, uno en verano (agosto-septiembre) y otro en otoño (octubre-noviembre), con una mayor incidencia en zonas del mar Mediterráneo, aunque los valores registrados, en pocas ocasiones sobrepasaron el límite legal.

### Litoral atlántico:

En la costa de Huelva se obtuvieron escasos valores cuantificables en el mes de agosto, todos ellos ligeramente superiores al límite de cuantificación y sin alcanzar el límite legal. Afectaron a coquina (*Donax trunculus*) y a chirila (*Chamelea gallina*).

La especie *Gymnodinium catenatum* (productora de toxinas paralizantes) centra la gran mayoría de sus registros en Huelva en los meses de verano y salvo en dos casos puntuales, donde supera incluso el nivel de cierre cautelar (máx. 10.200 cels/L), el resto son poco relevantes.

En Cádiz no se alcanzó en ninguna especie el límite de cuantificación a excepción del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) procedente de la acuicultura, que, aunque con escasos resultados positivos, llegó a tener valores cercanos a los 4.000 µg eq STX. 2·HCl/kg repartidos entre agosto y noviembre.

*Gymnodinium catenatum* aparece en el litoral atlántico de la provincia de Cádiz entre los meses de agosto y diciembre, con máximos centrados casi exclusivamente en agosto.

### Litoral mediterráneo:

En cuanto a las muestras del litoral mediterráneo de Cádiz, se evidencian también pequeños incrementos en los valores, coincidentes con el período estival, con

algunos valores cuantificables en el mejillón. Sin embargo, en ninguno de los casos se superó el límite legal.

Las muestras de corruco (*Acanthocardia tuberculata*), procedentes de zonas de producción de Cádiz no han superado en ningún caso, a diferencia de lo sucedido en años anteriores, el límite legal establecido para esta especie: 3.000 µg eq STX. 2:HCl/kg.

*Gymnodinium catenatum* también aparece en la zona mediterránea de Cádiz entre agosto y diciembre, siendo en agosto donde se encuentran los valores máximos. Las concentraciones alcanzadas son por lo general bajas, superando el nivel de alerta en tan solo tres ocasiones (máx. 2.040 cels/L).

En Málaga la situación fue bastante parecida a lo sucedido en Cádiz. Aparecen incrementos en los valores de toxicidad coincidentes con el período estival en el mejillón de acuicultura, detectándose valores por encima del límite legal en dos ocasiones durante el mes de agosto.

Los resultados de las muestras de corruco (*Acanthocardia tuberculata*) procedentes del litoral malagueño, solo registran en tres de las zonas de producción de la costa de Málaga valores superiores al límite legal. En el resto no se obtuvieron resultados positivos.

Respecto a *Gymnodinium catenatum*, mantiene el mismo comportamiento que el observado en la provincia de Cádiz, con máximos durante el mes de agosto (máx. 2320 cels/L) y datos puntuales de escasa entidad hasta finales de año

Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados del litoral de Granada no se consideran relevantes mientras que en las muestras del litoral de Almería no se detecta ningún valor que sobrepase el límite de cuantificación de la técnica.

En Almería *Gymnodinium catenatum* aparece entre los meses de septiembre con valores aislados que apenas superan el límite de cuantificación.

## GALICIA 2009

EL INTECMAR realizó el seguimiento de los episodios de PSP en la costa gallega. EL balance de episodios de 2009 se presenta en la tabla 2, donde se observa que tanto *Gymnodinium catenatum* como *Alexandrium minutum* estuvieron implicados en los cierres.

Especie de fitoplancton	Molusco	Ría	Periodo
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Mejillón (batea)	Rías Baixas	Octubre – Noviembre
<i>Alexandrium</i> sp.	Molusco infaunal	Baiona Camariñas Ares	Junio – julio – septiembre Mayo – junio Junio

**Tabla 2.** Resumen de episodios de toxicidad por PSP detectados en las costas gallegas durante el 2009.

## CATALUNYA 2009

El IRTA ha llevado a cabo el seguimiento de los episodios tóxicos de la costa de Catalunya durante el 2009; parte de los análisis (por MBA) de estas muestras se realizaron en el LTASP.

La frecuencia de muestreo de bivalvos para el análisis de presencia de toxinas PSP ha sido semanal en las dos bahías del Delta del Ebro (CAT1-02, Bahía de Alfacs; CAT1-05, Bahía del Fangar), puesto que es donde se concentra el cultivo de bivalvos como el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), el ostión (*Crassostrea gigas*), la ostra plana (*Ostrea edulis*) aunque en muy bajas cantidades, la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), y donde también hay una importante actividad extractiva de bancos naturales de otros moluscos como la navaja (*Solen sp.*) o la cañailla (*Bolinus brandaris*). En el resto del litoral catalán se encuentran bancos naturales, principalmente de cañailla (*Bolinus brandaris*), almejón (*Callista chione*) y coquina (*Donax trunculus*); el volumen de extracción es significativamente menor, por lo que la frecuencia de muestreo de bivalvos para su análisis ha sido semestral y se han condicionado muestreos adicionales en función de los datos de presencia de fitoplancton productor de toxinas PSP en las playas y puertos adyacentes (alertas por presencia de *Alexandrium sp.* a densidades superiores a 1.000 células por litro) facilitados por la Agencia Catalana de l'Aigua (ACA), con la que colabora el IRTA.

Se cerró una zona de producción en marzo – abril (CAT1 – 09, Cap Gros – Vilanova i la Geltrú) durante 48 días, al detectarse toxinas PSP por encima del nivel máximo legal permitido (800  $\mu\text{g}$  equivalentes de saxitoxina por kg de vianda;  $\mu\text{g eqSTX kg}^{-1}$ ) originadas por *Alexandrium minutum*. Sin embargo no se pudo obtener grandes cantidades de material tóxico puesto que hay escasez de producto (coquina, *Donax trunculus*) en esta zona, hecho que también condicionó el tiempo de cierre dadas las dificultades en la obtención de muestras de seguimiento. A parte de este episodio, sólo se detectaron toxinas tipo PSP, por debajo del límite legal, en dos muestras de mejillón de la bahía de Alfacs (muestreadas el 23 de febrero y el 2 de marzo; con 367 y 400  $\mu\text{g eqSTX kg}^{-1}$ , respectivamente), coincidiendo con el aumento de densidad de una floración de *A. minutum* en la bahía (máximo de  $3,2 \times 10^6$  células por litro el 8 de marzo)

## GALICIA 2010

En la siguiente tabla se resumen los episodios de cierre debidos a toxinas PSP en 2010. Todos han sido debidos a *Alexandrium minutum*.

Especie de fitoplancton	Molusco	Ría	Periodo	Total días
<i>A. minutum</i>	Infaunal	Ares-Betanzos	junio	30
<i>A. minutum</i>	Infaunal	Camariñas	julio	28
<i>A. minutum</i>	Berberecho	Baiona VIGO-IV.2	junio-septiembre	88

**Tabla 3.** Resumen de episodios de toxicidad por PSP detectados en las costas gallegas durante el 2010.

## ANDALUCIA 2010

No podemos hablar en 2010 de episodios tóxicos extensos en el tiempo o que afectaran a un gran número de especies, pero la presencia de fitoplancton tóxico se ha manifestado en casos puntuales con toxicidad cuantificable, aunque en escasas ocasiones ha llegado a sobrepasar el límite legal. Esto es extensible también al corruco (*Acanthocardia tuberculata*) que ha presentado a lo largo de este año un comportamiento excepcional con escasos resultados positivos a lo largo del litoral de andaluz.

No obstante podemos localizar dos momentos diferenciados en los que se han detectado toxinas paralizantes en moluscos bivalvos en la costa andaluza: meses de febrero a abril, y de octubre a noviembre, llegando en algunas zonas hasta el mes de diciembre.

### Litoral atlántico:

Tanto el litoral de la provincia de Huelva como la zona atlántica del litoral de Cádiz han tenido un comportamiento similar en 2010, no detectándose en moluscos bivalvos la presencia de toxinas paralizantes.

La especie *Gymnodinium catenatum*, productora de toxinas paralizantes, tan solo presenta un registro en la costa oriental de Huelva en una concentración por debajo del límite de cuantificación de la técnica de recuento para esta especie.

### Litoral mediterráneo:

En las muestras analizadas en el litoral mediterráneo de Cádiz, se evidencian pequeños incrementos en los valores de toxicidad. Esto se observa en los periodos de tiempos comprendidos entre enero/marzo y octubre/noviembre con algunos valores cuantificables en el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Sin embargo en ninguno de los casos se superó el límite legal.

Las muestras de corruco de la zona mediterránea de Cádiz no han superado en ningún caso el límite legal establecido para esta especie: 3000  $\mu$ g eq STX. 2.HCl/kg.

*Gymnodinium catenatum* se muestra únicamente en las zonas de la franja mediterránea de la provincia y lo hace en dos periodos, entre febrero y mitad de mayo y en agosto-octubre. En cualquier caso los niveles de concentración son significativamente bajos (máx. 1160 cels/L)

Málaga es la única provincia andaluza que presenta valores por encima del límite legal en 2010. En los meses de febrero y marzo se alcanzan valores positivos en corruco en una de las zonas de producción prolongándose estos resultados hasta

el mes de julio. También se observan resultados cuantificables en mejillón llegando a sobrepasar en una ocasión el límite legal.

Sin embargo el episodio que se presenta con mayor intensidad tiene lugar en los meses de octubre a noviembre. Algunas de las zonas de producción de la provincia se ven afectadas con resultados positivos en corruco. También aparecen valores cuantificables en otras especies como chirla, mejillón y concha fina, aunque sólo en la primera aparecen valores que sobrepasan el límite legal en el mes de octubre.

De forma semejante a la provincia de Cádiz, el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* aparece en los 5 primeros meses y los 5 últimos del año. En el primer periodo se obtiene un valor máximo de 1880 cels/L, mientras en el segundo se registra un dato puntual que constituye el máximo anual con 10520 cels/L.

En las provincias de Granada y Almería no se observan valores positivos en ninguna de las especies analizadas aunque sí podemos destacar la detección de toxinas en el mes de marzo y diciembre en la chirla.

*Gymnodinium catenatum* muestra un comportamiento similar al resto de provincias mediterráneas con datos en los periodos marzo-mayo y septiembre-noviembre, con ausencia en los meses centrales del año. Se detecta un máximo de 1940 céls/L en el litoral más occidental de Almería.

## CATALUNYA 2010

El IRTA ha llevado a cabo el seguimiento de los episodios tóxicos de la costa de Catalunya durante el 2010; parte de los análisis (por MBA) de estas muestras se realizaron en el LTASP.

La frecuencia de muestreo de bivalvos para el análisis de presencia de toxinas PSP ha sido semanal en las dos bahías del Delta del Ebro (CAT1-02, Bahía de Alfacs; CAT1-05, Bahía del Fangar), puesto que es donde se concentra el cultivo de bivalvos como el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), el ostión (*Crassostrea gigas*), la ostra plana (*Ostrea edulis*) aunque en muy bajas cantidades, la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), y donde también hay una importante actividad extractiva de bancos naturales de otros moluscos como la navaja (*Solen* sp.) o la cañailla (*Bolinus brandaris*). En el resto del litoral catalán se encuentran bancos naturales, principalmente de cañailla (*Bolinus brandaris*), almejón (*Callista chione*) y coquina (*Donax trunculus*); el volumen de extracción es significativamente menor, por lo que la frecuencia de muestreo de bivalvos para su análisis ha sido semestral y se han condicionado muestreos adicionales en función de los datos de presencia de fitoplancton productor de toxinas PSP en las playas y puertos adyacentes (alertas por presencia de *Alexandrium* sp. a densidades superiores a 1.000 células por litro) facilitados por la Agencia Catalana de l'Aigua (ACA), con la que colabora el IRTA.

No ha habido cierres por toxicidad PSP en 2010, pero sí alertas por presencia de especies productoras de toxinas PSP a altas densidades. En la Tabla 4 se resumen los episodios de alerta que han afectado a las zonas de producción, y en la Tabla 5 las alertas en los puertos.

ZONA	Densidad máxima <i>A. minutum</i> (células L <sup>-1</sup> )	PERIODO	Contenido toxinas PSP (µg eqSTX kg <sup>-1</sup> )
CAT1-02, Bahía de Alfacos	3672	Marzo - mayo	380
	1836	Agosto	374
CAT1-05, Bahía de Fangar y Golfo de la Ampolla	2 x 10 <sup>3</sup>	Mayo	No detectado
	1377	Agosto	No detectado

**Tabla 4.** Episodios de alerta de toxicidad PSP detectados por la presencia en altas concentraciones de *A. minutum* en la zona.

Puerto	Especie	Concentración máxima	Periodo
Ametlla de Mar	<i>A. minutum</i>	1 x 10 <sup>4</sup>	Agosto
Cambrils	<i>A. minutum</i>	2,2 x 10 <sup>6</sup>	Mayo
Tarragona	<i>A. catenella</i>	7,3 x 10 <sup>4</sup>	Junio
	<i>A. catenella</i>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	Julio
Vilanova i la Geltrú	<i>A. minutum</i>	1,9 x 10 <sup>4</sup>	Junio
	<i>A. minutum</i>	2,8 x 10 <sup>4</sup>	Julio
Barcelona	<i>A. minutum</i>	4,6 x 10 <sup>5</sup>	Mayo
	<i>A. minutum</i>	1,3 x 10 <sup>4</sup>	Agosto
Olímpico	<i>A. minutum</i>	5 x 10 <sup>4</sup>	Junio
	<i>A. minutum</i>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	Diciembre
Arenys de Mar	<i>A. minutum</i>	2,2 x 10 <sup>6</sup>	Marzo
	<i>A. minutum</i>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	Julio
Palamós	<i>A. minutum</i>	5 x 10 <sup>4</sup>	Junio
L'Estartit	<i>A. minutum</i>	4,7 x 10 <sup>4</sup>	Julio

**Tabla 5.** Alertas en los puertos durante 2010. Obsérvese que *A. minutum* fue la principal especie implicada, a excepción de las alertas en el puerto de Tarragona.

## ANDALUCIA 2011

A lo largo de 2011 se han localizado dos momentos diferenciados en los que se ha detectado la presencia de toxinas paralizantes en muestras procedentes de la costa andaluza: meses de junio y julio, y de noviembre y diciembre, si bien con diferentes intensidades.

Para describir lo sucedido podemos diferenciar dos zonas dentro del litoral andaluz, zona atlántica y zona mediterránea, cada una de ellas con una dinámica diferenciada con respecto a la otra en el desarrollo de episodios tóxicos.

### Litoral atlántico:

La costa andaluza bañada por el océano Atlántico corresponde al litoral de la provincia de Huelva y parte de la de Cádiz. Los resultados obtenidos en las

muestras analizadas de estas zonas no superaron el límite de cuantificación de la técnica (400 µg eq STX 2.HCl/kg) en ningún caso.

#### Litoral mediterráneo:

La zona mediterránea corresponde al resto de la costa de Cádiz, Málaga, Granada y Almería. Se aprecian dos épocas en las que se detectan toxinas paralizantes en las especies analizadas.

En verano la incidencia de valores por encima del nivel establecido se limita a cuatro de las zonas de producción de la provincia de Málaga, desarrollándose a partir del mes de junio y extendiéndose hasta el mes de septiembre.

Otro momento de presencia de toxinas paralizantes es la época invernal, detectándose a partir del mes de noviembre, con máximos de toxicidad en el mes de diciembre y persistiendo el episodio durante los primeros meses de 2012. Las zonas de producción afectadas son las mismas comentadas para el episodio estival.

En el resto de provincias se detecta la presencia de toxinas pero en niveles situados entre el límite de cuantificación de la técnica y el límite legalmente establecido.

## **Obtención de patrones certificados:**

Los patrones certificados para toxinas paralizantes siguen estando disponibles en el National Research Council de Canadá (NRC, Halifax, Canadá) al igual que al inicio del proyecto, aunque cabe resaltar que no ha habido un fundamental avance en la disponibilidad de nuevos patrones de referencia. En la actualidad son estos los patrones que están disponibles en la página web del NRC

<http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/programs/imb/crmp.html>

### Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) Toxins

CRM-C1&2-b

CRM-dcGTX2&3-b

CRM-dcNEO-c

CRM-dcSTX-b

CRM-GTX1&4-c

CRM-GTX2&3-c

CRM-GTX5-b

CRM-NEO-c

CRM-STX-f

Se puede por ello concluir que respecto a material certificado, éste está disponible, principalmente para aplicaciones analíticas. Sin embargo material certificado o de referencia para requerimientos mayores, sigue siendo éste escaso lo cual ha podido solventarse en el marco de este proyecto mediante actuaciones propias del proyecto para obtener material de referencia con toxinas. Por ello podemos concluir que la disponibilidad de patrones y material de referencia en el mercado, principalmente para el interés de los laboratorios de control, es modesta, cara y de difícil acceso y que debería haber a nivel internacional cierto esfuerzo para incrementar la disponibilidad. Se identifican carencias en relación a patrones de las toxinas GTX6, C3 y C4. En particular la carencia de GTX6 afecta al análisis de toxinas asociadas a floraciones de *Gymnodinium catenatum*.

## **Obtención de muestras de campo, en particular durante episodios críticos:**

### **ANDALUCIA 2008**

#### **1. Conservación de muestras de diferentes especies de bivalvos**

Se han conservado muestras de moluscos bivalvos con cantidades de toxinas paralizantes cuantificadas mediante bioensayo de ratón. Se ha pretendido conseguir variabilidad tanto en el tipo de matrices obtenidas como en el rango de toxicidad que presentan. El objetivo es poder estudiar el comportamiento de cada uno de los métodos desarrollados para obtener así datos precisos para valorar algunos parámetros como la sensibilidad, a distintos niveles y en cada matriz.

La variedad de matrices conservadas ha estado limitada por la aparición natural de microalgas productoras de toxinas paralizantes en la columna de agua y la sensibilidad que cada especie de moluscos bivalvo a su presencia.

Las especies conservadas en mayor proporción para el desarrollo del proyecto son corruco (*Acanthocardia tuberculata*), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y concha fina (*Callista chione*), y también han podido obtenerse en cantidades más moderadas matrices tóxicas de vieira (*Pecten maximus*), chirla (*Chamelea gallina*) y almeja chocha (*Venerupis rhomboides*).

#### **2. Creación de un listado de muestras de bivalvos disponibles y la toxicidad en cada una de ellas**

Se ha creado un listado de muestras tóxicas disponibles para la realización de las analíticas necesarias para el proyecto. Estas muestras se han puesto además a disposición de los diferentes grupos de trabajo para la realización de pruebas comunes.

Durante 2008 se han empleado muestras tóxicas de diferentes matrices, para verificar el perfil tóxico que presentan empleando el protocolo de cromatografía líquida con derivatización post-columna.

### **GALICIA 2008**

**Recogida y análisis de muestras de moluscos. Selección por niveles de toxicidad.**

Materiales recogidos:

Muestras de almeja (*Ruditapes philippinarum*), berberecho (*Cerastoderma edule*), longueirón (*Solen marginatus*) y vieira (*Pecten maximus*) procedentes de las

zonas de producción de moluscos infaunales y pectínidos de Galicia, recogidas en ausencia de episodios tóxicos por biotoxinas PSP.

Muestras de almeja (*Ruditapes philippinarum*), berberecho (*Cerastoderma edule*) procedentes de las zonas de producción de moluscos infaunales de Galicia, recogidas en presencia de episodios tóxicos de biotoxinas PSP producidos por *Alexandrium* sp.

#### Métodos:

Determinación de biotoxinas PSP por bioensayo en ratón: AOAC Oficial Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison. Biological Method.

Las muestras de moluscos una vez desconchadas, pesadas y homogeneizadas, se analizaron para determinar el nivel de toxicidad, siendo posteriormente alicuotados en lotes de diferente peso de acuerdo con la técnica a emplear por cada laboratorio. Tabla 6.

Molusco	IEO	IRTA	INTECMAR
Almeja (blanco)	<b>Si</b>	Si	Si
Almeja nivel 420 µg/Kg	Si	Si	Si
Almeja nivel 950 µg/Kg	Si	Si	Si
Berberecho blanco	Si	No	Si
Berberecho nivel 450 µg/Kg	Si	No	Si
Berberecho nivel 1270 µg/Kg	Si	No	Si
Vieira (blanco)	Si	No	Si
Longueirón (blanco)	Si	No	Si

**Tabla 6.** Relación de moluscos naturalmente contaminados con PSP en episodios de *Alexandrium* sp.

## CATALUNYA 2008

Se tiene un registro del material tóxico obtenido durante el 2008 ( y almacenado de años anteriores) para la ejecución del proyecto (Tabla 7). Se dispone principalmente de mejillón y ostrón intoxicados por *Alexandrium minutum* en cantidades suficientes para suministrar a los demás participantes, así como de extractos de filtros obtenidos durante floraciones naturales (“blooms”) de esta microalga.

Las muestras fueron procesadas en fresco; los bivalvos abiertos y homogeneizados antes de ser congelados a -20°C, el agua filtrada y los filtros conservados en ácido acético al 1% a 4°C hasta su extracción.

Fecha	Localización	Especie	Tipo de muestra	Cantidad (g)
01/03/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Alexandrium minutum</i>	Filtros	
01/03/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Alexandrium minutum</i>	Filtros	
01/03/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Alexandrium minutum</i>	Filtros	
01/04/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	1 220
01/04/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	1 150
01/04/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	950
01/05/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	1 039
01/05/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	925
01/05/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	391
01/05/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	498
01/05/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	486
01/05/06	Arenys de Mar (Barcelona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	408
08/04/08	Vilanova i la Geltrú (Tarragona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	1 300
08/04/08	Vilanova i la Geltrú (Tarragona)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Homogenados	2 300
08/04/08	Vilanova i la Geltrú (Tarragona)	<i>Crassostrea gigas</i>	Homogenados	600
08/04/08	Vilanova i la Geltrú (Tarragona)	<i>Alexandrium minutum</i>	Filtros	

**Tabla 7.** Muestras disponibles para el proyecto JACUMAR PSP, recogidas hasta diciembre de 2008 (la cantidad se expresa en gramos de vianda fresca sin concha).

## GALICIA 2009

Se seleccionaron muestras de mejillón sometidas a procesos naturales de intoxicación con especies de fitoplancton predominantes de *Gymnodinium catenatum*.

Las muestras de mejillón una vez desconchadas, pesadas y homogeneizadas, se analizaron para determinar el nivel de toxicidad, siendo posteriormente alicuotados en lotes de diferente peso de acuerdo con la técnica a emplear por cada laboratorio. Los niveles seleccionados fueron de 400 y 800 µg STX equiv./Kg. La caracterización inicial de la toxicidad se realizó según procedimiento interno del laboratorio. Determinación de biotoxinas PSP por bioensayo en ratón: AOAC Oficial Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison. Biological Method.

## CATALUNYA 2009

En el 2009 se actualizó el registro del material tóxico disponible (desde 2008 y años anteriores) y se trabajó sobre todo en la obtención de material tóxico durante los episodios en puertos, y en laboratorio.

Las muestras fueron procesadas en fresco; los bivalvos abiertos y homogeneizados antes de ser congelados a -20°C.

En la Tabla 8 se presentan el material obtenido durante el 2009.

Fecha	Puerto Origen	Especie	Cantidad (g)
Febrero	Vilanova i la Geltrú	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1.000
		<i>Crassostrea gigas</i>	100
Marzo	Vilanova i la Geltrú	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1.000
		<i>Crassostrea gigas</i>	250
Mayo	Cambrils	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1.200
		<i>Crassostrea gigas</i>	600
		<i>Ruditapes</i> sp.	250

**Tabla 8.** Muestras disponibles para el proyecto JACUMAR PSP, recogidas durante el 2009 (la cantidad se expresa en gramos de vianda fresca sin concha). Se obtuvieron por exposición de los bivalvos durante floraciones naturales de *Alexandrium minutum* en los puertos y fechas indicados

## ANDALUCIA 2010

En 2009 se definió un plan de trabajo para realizar el estudio comparativo de las metodologías para la determinación de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos. El plan fue retomado y revisado en la reunión de coordinación que se realizó en Vigo en enero de 2010, concretándose las fechas en las que este plan de trabajo se llevaría a cabo a lo largo del año.

Fueron revisados los análisis programados, así como matrices, rangos de toxicidad y técnicas con las que cada grupo de investigación obtendría los resultados. Se especificó al mismo tiempo las muestras que tendrían que ser intercambiadas y el método y tiempo de conservación para cada una de ellas.

Del plan de trabajo se determinaron las necesidades de matrices y la toxicidad de las muestras.

En 2010 no se produjeron episodios tóxicos de interés que propiciaran la obtención de muestras tóxicas, por lo que en el L.C.C.RR.PP. se han empleado las matrices que se conservaban para este fin desde el primer año del proyecto.

Las muestras se prepararon cuidando especialmente la realización del homogeneizado, asegurando la consecución de alícuotas que se conservaron en congelación a temperaturas por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En las fechas establecidas se realizaron los envíos de las muestras tipo C (las analizadas después de al menos 15 días de congelación y de haber sido transportadas). Tanto las destinadas a cromatografía como a MBA se conservaron en tubos tipo falcon de 50 mL sellados con parafina en láminas. Los envíos se hicieron manteniendo las muestras congeladas, aunque prácticamente el 100% llegaron descongeladas a su destino.

## CATALUNYA 2010

En el 2010 se actualizó el registro del material tóxico disponible (desde 2008 y años anteriores). Se ha cumplido con el compromiso de disponer de suficiente

matriz de mejillón con toxinas producidas por *Alexandrium minutum* para poder repartir entre todos los participantes en el comparativo previsto. También se dispone de matriz de ostión con este mismo perfil de toxinas, así como otras matrices recogidas durante episodios tóxicos y alertas útiles para desarrollar los métodos dentro del laboratorio.

## Experimentación en mar:

### CATALUNYA 2008

Al no darse episodios tóxicos por PSP en el litoral catalán durante el 2008 que afectaran a bivalvos de bancos naturales ni de zonas de cultivo, se ha procedido a la exposición de bivalvos en floraciones naturales en puertos; esta práctica se ha seguido en el 2009 y se propone mantener como medio de obtención de material tóxico en las cantidades requeridas por el proyecto.

En el 2008 se realizó una exposición durante una floración de *Alexandrium minutum* (presencia de medio millón de células por litro aproximadamente) en el puerto de Vilanova i la Geltrú (Tarragona) a principios de abril. Se sumergieron mejillón y ostrón originarios de la bahía de Alfacs en dos puntos del puerto (Figura 1) el 8 de abril, y se recogieron el 11 de abril. Se tomó también muestra de agua fijada con formol de los puntos al inicio y al final de la exposición para estimar las densidades de *A. minutum* a las que estuvieron expuestos los bivalvos, más 30 litros de agua del puerto sin fijar al final de la exposición, de los que se obtuvo filtros para analizar.

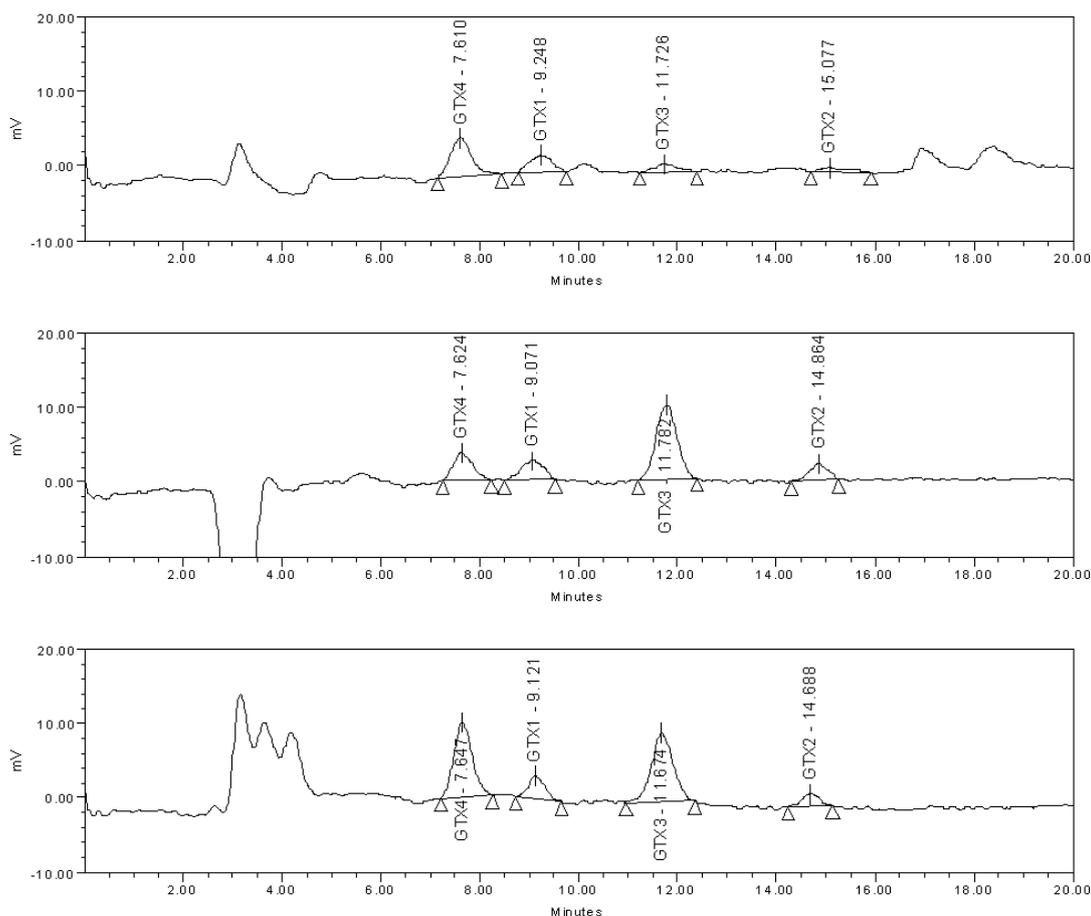


**Figura 1.** Localización de los puntos de exposición de los bivalvos durante la floración de *A. minutum* ocurrida en el puerto de Vilanova i la Geltrú entre el 8 y el 11 de abril de 2008.

Esta exposición ha servido para preparar el material de análisis de la primera comparativa que se llevará a cabo en el 2009 con dos de las matrices de bivalvos representativas para el proyecto, intoxicadas con una de las especies de fitoplancton de interés; véase el balance final de muestras obtenidas con esta práctica en la Tabla 9. También se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC con derivatización post-columna de ambos bivalvos y del fitoplancton presente en el agua (Figura 2).

Bivalvo	µg equivalentes de STX por 100 g de vianda*					Cantidad de muestra (g)
	GTX4	GTX1	GTX3	GTX2	Total	
Mejillón	79,87	49,20	5,42	2,16	<b>136,65</b>	1 300
Mejillón	78,61	34,73	4,08	1,41	<b>118,84</b>	2 300
Ostrón	39,35	55,82	6,85	2,28	<b>104,30</b>	600

**Tabla 9.** Perfil tóxico de los homogenados de bivalvos enteros obtenidos de la exposición en el puerto de Vilanova i la Geltrú en el 2008. \*Resultados obtenidos mediante análisis por HPLC pre-columna por el grupo del Dr. Franco (CSIC, grupo de Galicia).

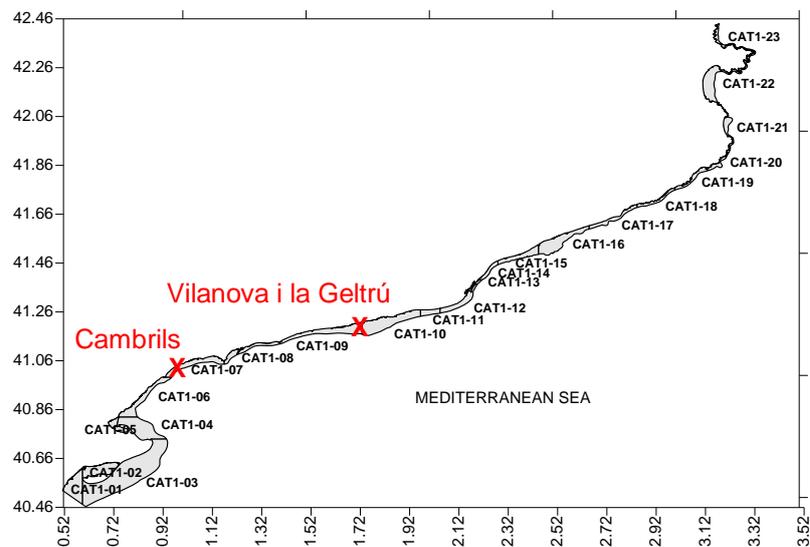


**Figura 2.** Cromatogramas obtenidos del análisis de los filtros con *A. minutum* (superior), del ostrón (medio) y del mejillón (inferior), muestreados al final de la exposición en el puerto de Vilanova i la Geltrú, mediante HPLC con derivatización post-columna.

## CATALUNYA 2009

El IRTA ha continuado con la práctica de exponer bivalvos a floraciones naturales en puertos de fitoplancton productor de toxinas PSP como medio de obtención de material tóxico, con resultados desiguales.

En el 2009 se realizaron tres exposiciones en puertos; dos en el puerto de Vilanova i la Geltrú y una tercera en el puerto de Cambrils (Figura 3). Los puntos de exposición del puerto de Vilanova i la Geltrú fueron los mismos que en la exposición de 2008 (Figura 4).



**Figura 3.** Zonas de producción de la costa catalana y localización de los puertos de Cambrils y Vilanova i la Geltrú.



**Figura 4.** Localización de los puntos de exposición de los bivalvos durante las floraciones de *A. minutum* en los puertos de Vilanova i la Geltrú (izquierda) y Cambrils (derecha) en el 2009.

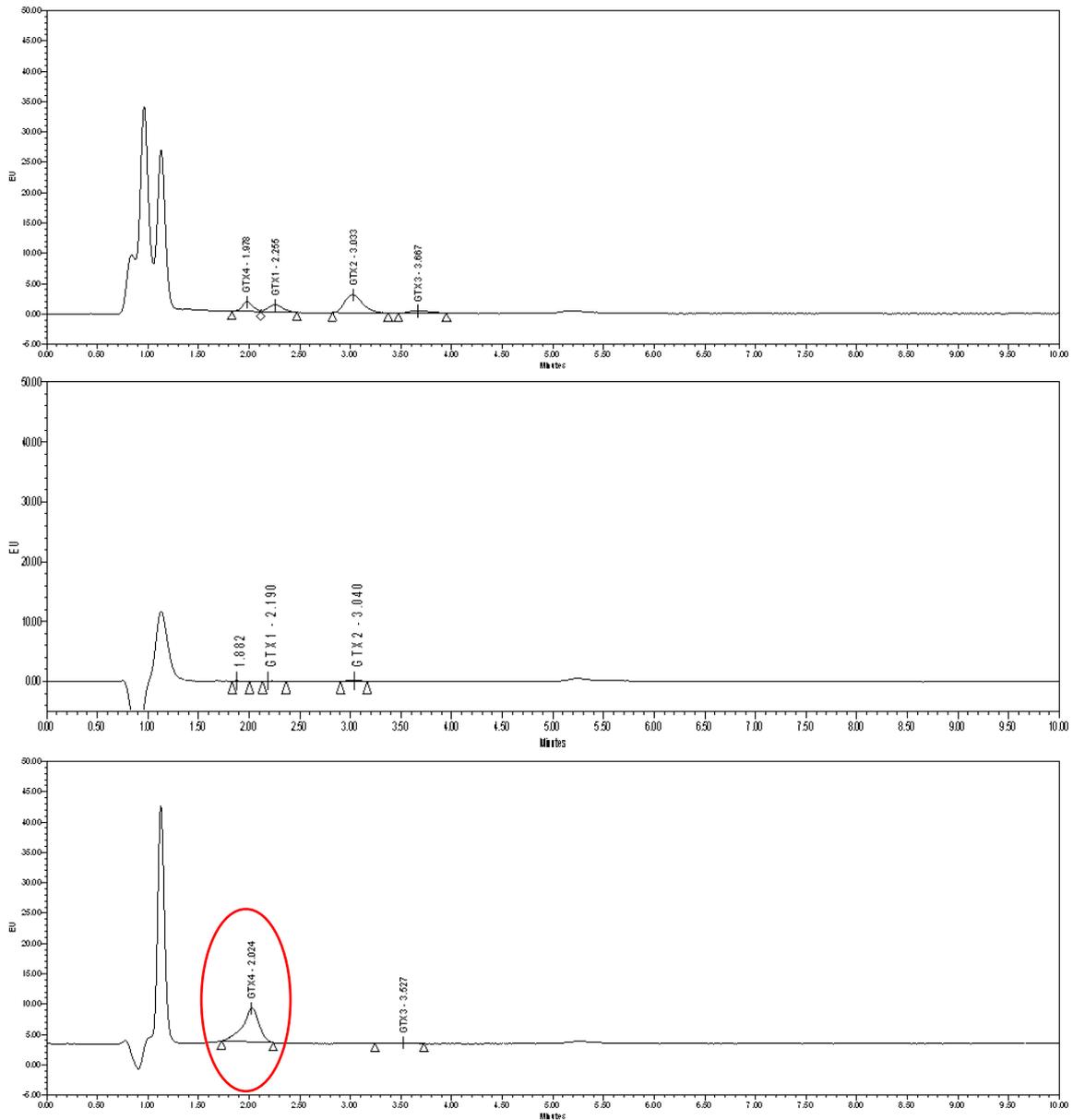
Las muestras de bivalvos obtenidas se mandaron a analizar al laboratorio del CSIC de Galicia por HPLC con derivatización post-columna, obteniendo niveles de toxicidad diferentes según la especie de bivalvo expuestos a la misma floración (Tablas 10 y 11, y Figura 5). En base a estos resultados, se ha acordado usar las muestras de ostión para el ejercicio comparativo en Catalunya, y las de mejillón para repartir entre los integrantes del proyecto. Sin embargo, se debe replantear una estrategia más adecuada para conseguir matriz de almeja tóxica.

Puerto	Densidad de <i>A. minutum</i> (cél L <sup>-1</sup> )	Fecha inicio exposición	Duración (días)	Moluscos bivalvos expuestos
Vilanova i la Geltrú	39.840	19 febrero	6	Mejillón Ostión
Vilanova i la Geltrú	817.550	10 marzo	3	Mejillón Ostión
Cambrils	21.995	19 mayo	8	Mejillón Ostión Almeja

**Tabla 10.** Exposiciones en puertos durante el 2009.

Puerto	Bivalvo	ng $\mu\text{L}^{-1}$				$\mu\text{g STXeq kg}^{-1}$
		GTX4	GTX1	GTX2	GTX3	
Vilanova i la Geltrú	Mejillón	0,62	0,66	0,48	0,03	2.702,71
	Ostión	0,16	0,24	0,14	0,01	849,12
Vilanova i la Geltrú	Mejillón	0,37	0,24	0,24	0,01	1.256,91
	Ostión	0,00	0,01	0,01	0,00	30,55
Cambrils	Mejillón	0,00	0,02	0,00	0,00	45,90
	Ostión	0,00	0,00	0,00	0,00	1,46
	<b>Almeja</b>	<b>3,23</b>	0,00	0,00	0,01	<b>*4.926,41</b>

**Tabla 11.** Perfil tóxico de los homogenizados de bivalvos enteros obtenidos de las exposiciones en puertos en el 2009. Resultados obtenidos mediante análisis por HPLC post-columna por el grupo del Dr. Franco (CSIC, grupo de Galicia). \*Muestra analizada por MBA en el LTASP con resultado negativo; la cuantificación por HPLC post-columna se debe posiblemente a un interferente de la matriz de almeja ya detectado con anterioridad, que coeluye con la GTX4. Véase cromatograma correspondiente en la Figura 5.



**Figura 5.** Cromatogramas obtenidos del análisis del mejillón expuesto en Vilanova i la Geltrú en febrero (superior), del ostión expuesto en Vilanova i la Geltrú en marzo (centro) y de la almeja expuesta en Cambrils (inferior), mediante análisis por HPLC con derivatización post-columna. El pico correspondiente a la GTX4 en el cromatograma de la almeja posiblemente se trate de un interferente (círculo rojo).

## CATALUNYA 2010

Se repitió la exposición de almeja a *Alexandrium minutum* en el puerto de Sant Carles de la Ràpita, pero sin obtener niveles tóxicos en esta matriz. No se realizaron más actividades para la obtención de material tóxico puesto que se dispone de suficiente cantidad de mejillón y ostión tóxico de años anteriores.

## Cultivos de microalgas tóxicas:

### ANDALUCIA 2008

Realización de cultivos y creación de un listado de microalgas productoras de toxinas paralizantes disponibles para el desarrollo del proyecto.

Se han realizado cultivos de *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium andersonii*, y *Gymnodinium catenatum* entre otros y se mantienen para su empleo durante el desarrollo del proyecto de especies de algas tóxicas.

### GALICIA 2008

Actualmente se está cultivando las siguientes cepas: *A. fundyense* (CCMP1719) seleccionada por presentar un amplio perfil de toxinas; y las cepas de *A. minutum* (VGO650), (AL18A) y (AMAD021) que contienen GTX 1, GTX2, GTX3 y GTX4. La finalidad es dar lugar a mezclas con diferentes composiciones de toxinas para ensayos de toxicidad, estudios de Reproducibilidad, Sensibilidad y rango de linealidad.

### CATALUNYA 2008

El IRTA dispone de cepas de microalgas de diferentes especies, tanto productoras como no productoras de toxinas. De las productoras de toxinas PSP, hay cepas de *A. minutum* aisladas en 2002 del puerto de Arenys de Mar, mantenidas y estabilizadas en condiciones de laboratorio.

En el 2008 se procedió al aislamiento de células de fitoplancton presentes en una muestra de agua recogida en el puerto de Arenys de Mar durante una floración de *A. minutum* en octubre; se han establecido y cultivado 4 cepas nuevas, posiblemente de *A. minutum*, que se mantienen a la espera de su identificación taxonómica y el análisis de su perfil tóxico y toxicidad. También se intentó el aislamiento de *Alexandrium catenella* de un bloom en el puerto de Tarragona, pero no se llegó a establecer ninguna cepa.

### ANDALUCIA 2009

Se ha continuado con el mantenimiento de los cultivos de *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium andersonii*, y *Gymnodinium catenatum* entre otros. Además se conservan tres cepas diferentes de *Gymnodinium catenatum*.

Se ha analizado algunas de estas cepas por el método de cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna con el fin de estudiar detalles de las toxinas que contienen.

En las figuras que se muestran a continuación se observan los perfiles tóxicos tres cepas de *G. catenatum* estudiadas. En cada una de ellas se muestran los cromatogramas obtenidos tanto en el extracto original sin diluir, como en el extracto hidrolizado. Además se presenta también el cromatograma obtenido al analizar las muestras sin el reactor, es decir sin el proceso de oxidación post columna, con el fin de detectar los picos naturalmente fluorescente y facilitar así la determinación de las toxinas existentes.

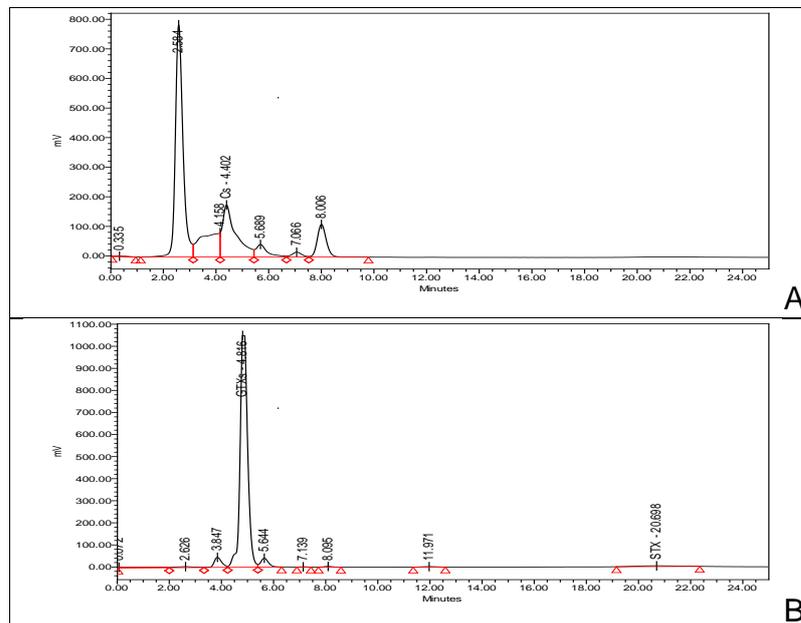
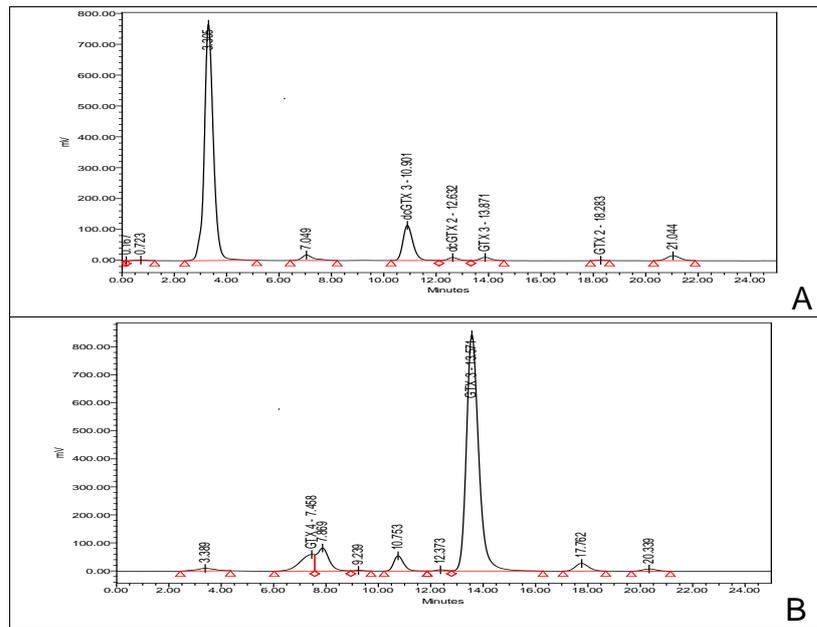


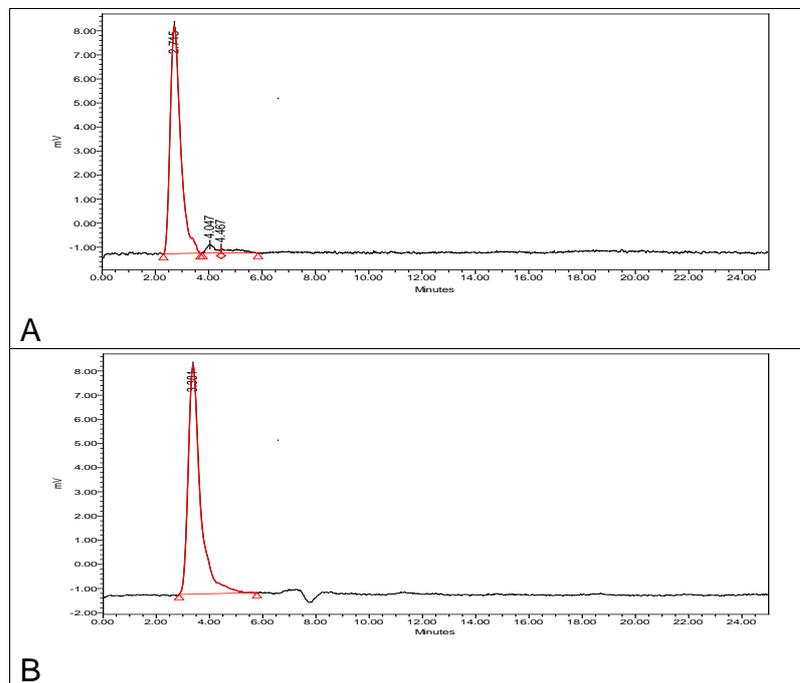
Figura 6: Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 05 empleando el eluyente primero

A: muestra sin diluir. B: muestra hidrolizada.



**Figura 7:** Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 05 empleando el eluyente segundo.

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada.



**Figura 8:** Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 05 sin post-columna

**A:** Eluyente primero. **B:** Eluyente segundo.

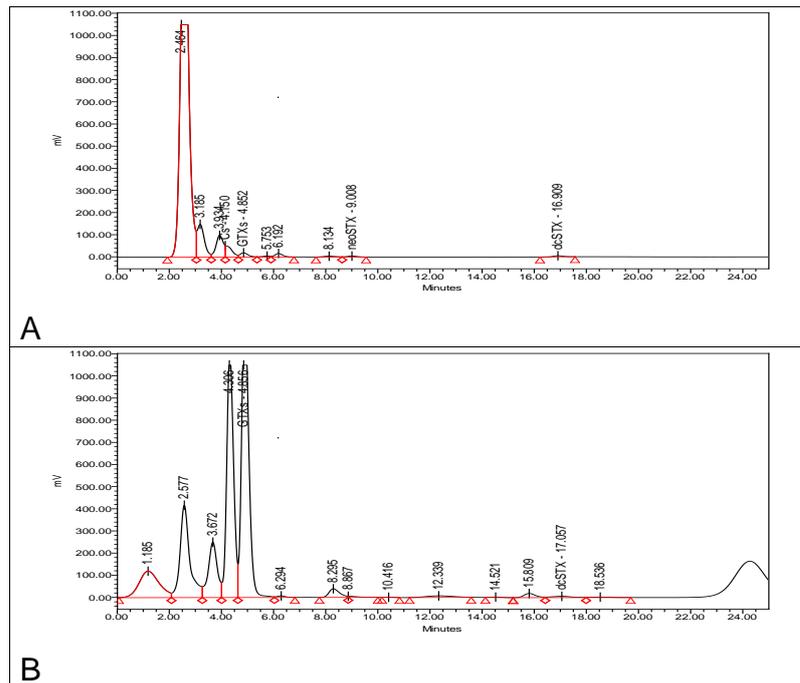


Figura 9: Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 07 empleando el eluyente primero

A: muestra sin diluir. B: muestra hidrolizada.

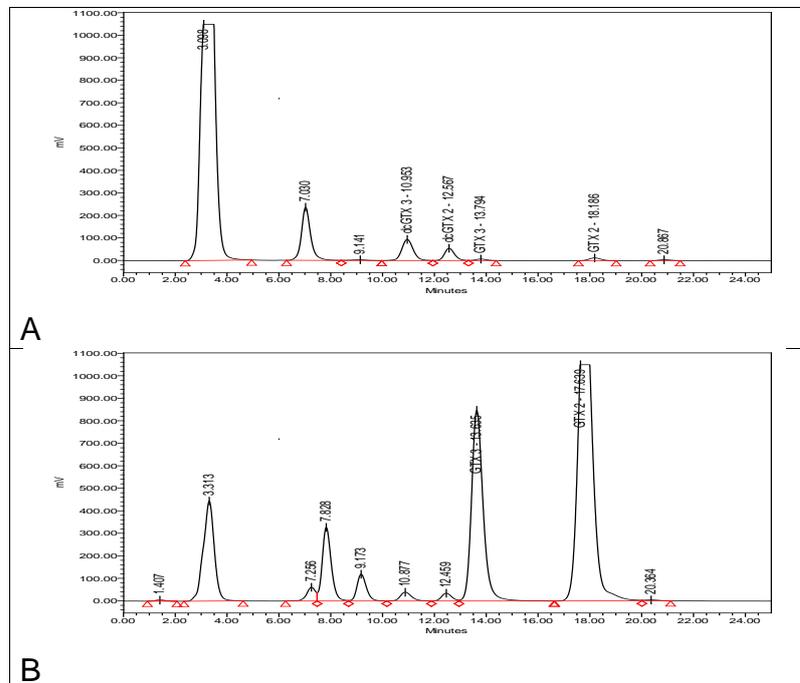
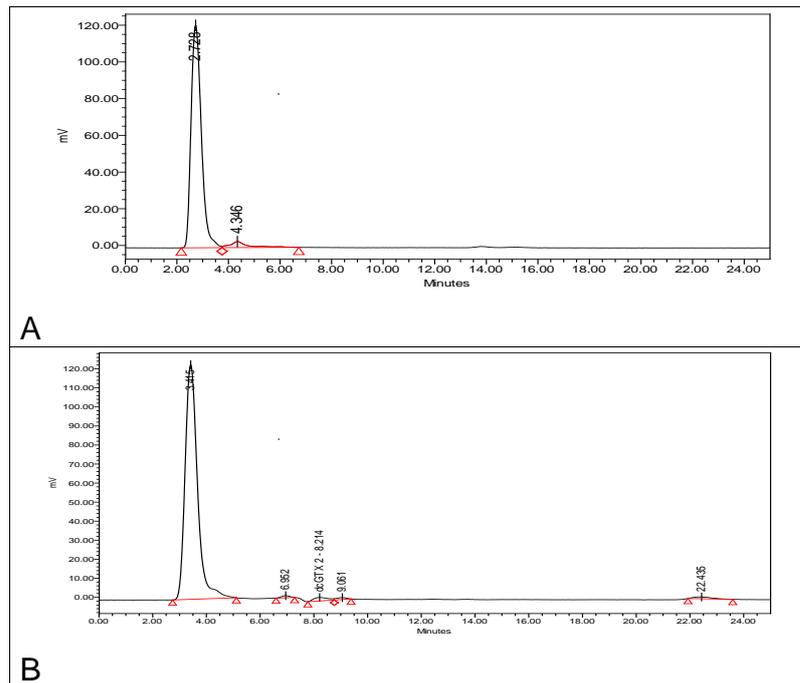


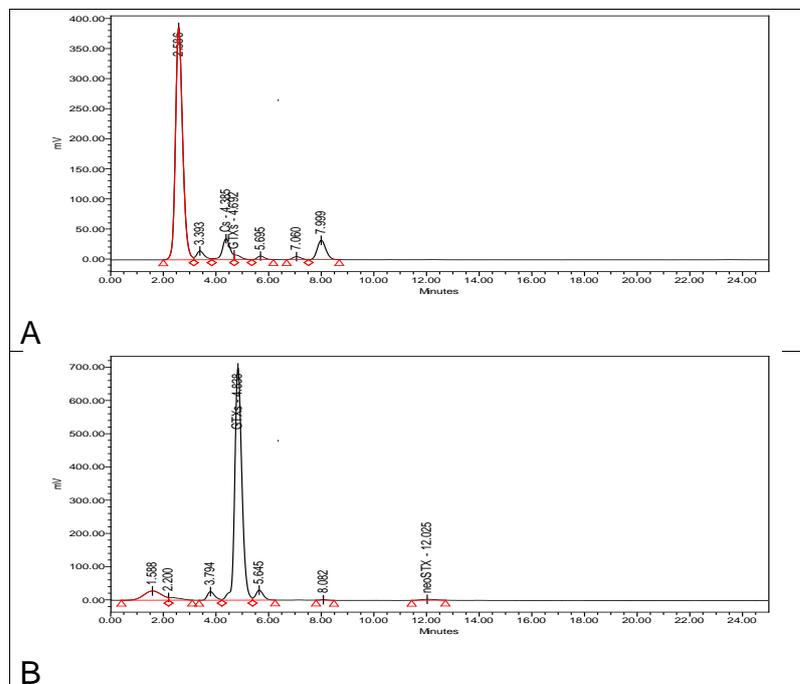
Figura 10: Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 07 empleando el eluyente segundo.

A: muestra sin diluir. B: muestra hidrolizada.



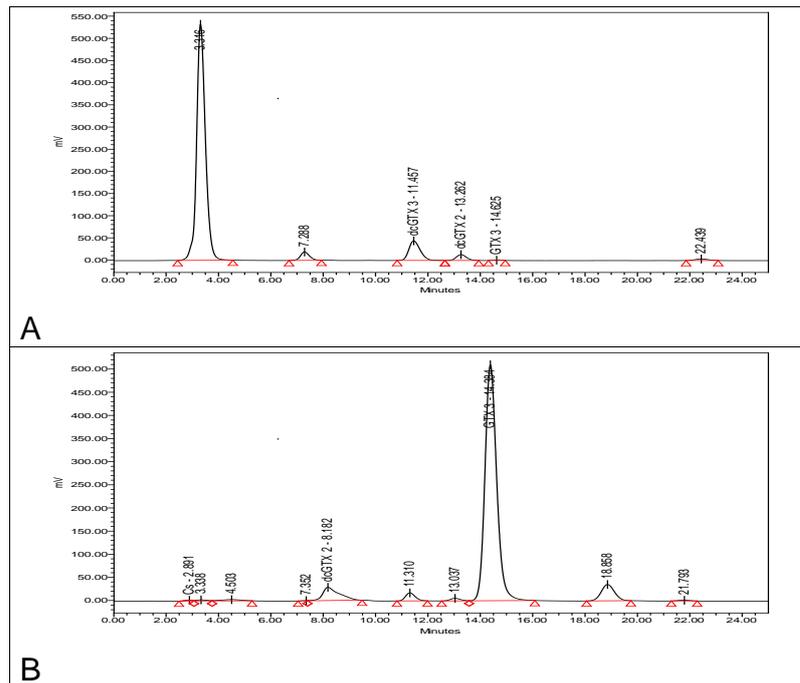
**Figura 11:** Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 07 sin post columna

**A:** Eluyente primero. **B:** Eluyente segundo.



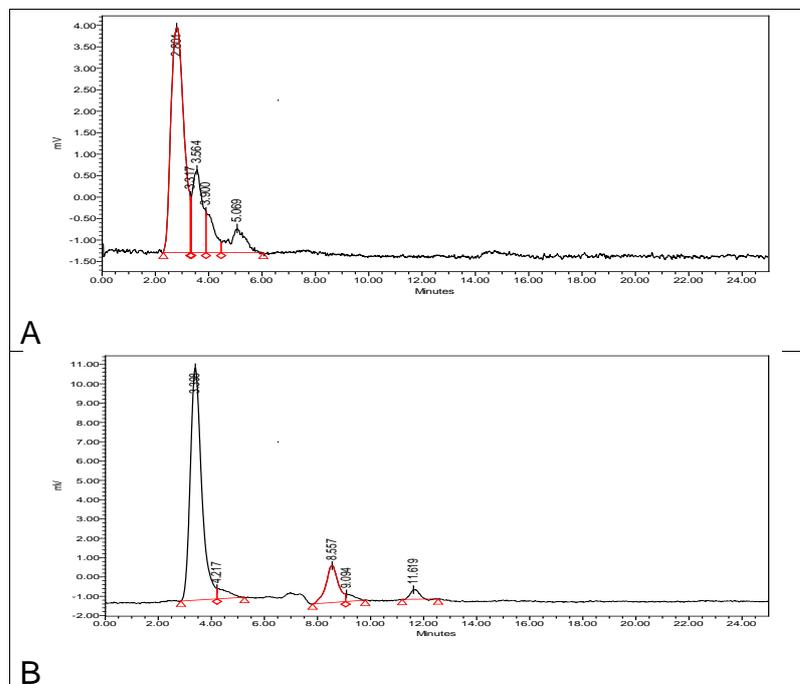
**Figura 12:** Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 09 empleando el eluyente primero

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada.



**Figura 13:** Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 09 empleando el eluyente segundo.

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada.



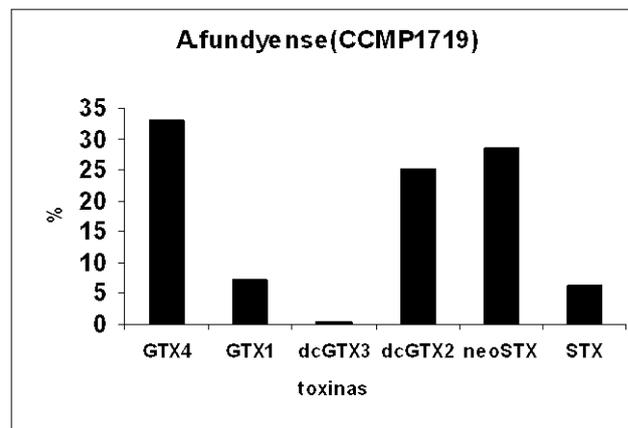
**Figura 14:** Cromatogramas obtenidos con *G. catenatum*, cepa 09 sin post columna

**A:** Eluyente primero. **B:** Eluyente segundo.

## GALICIA 2009

Se seleccionó la cepa CCMP1719 de *Alexandrium fundyense* perteneciente a la Colección de Cultivos del Centro Oceanográfico de Vigo (CCVIEO) por presentar un variado perfil de toxinas (Figura 15), de interés para su uso en ensayos de toxicidad, estudios de reproducibilidad, sensibilidad y rango de linealidad.

Para ello se mantuvieron en régimen semicontinuo dos cultivos de 8 L de dicha cepa. El volumen total cultivado fueron 40 L, con una cosecha final de  $1.85 \cdot 10^7$  células (peso húmedo 9.25 g).

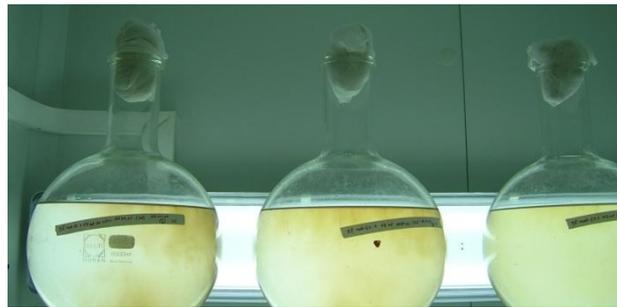


**Figura 15.** Se muestra el perfil de toxinas y abundancia de las mismas en porcentaje para la cepa CCMP1719 de *Alexandrium fundyense*.

## CATALUNYA 2009

El IRTA dispone de cepas de microalgas de diferentes especies, tanto productoras como no productoras de toxinas. Se ha iniciado el cultivo a mayor escala, para su posterior análisis mediante HPLC con derivatización pre-columna, de 15 cepas de la colección: *Alexandrium minutum* (4), *Gymnodinium* sp. (1), *Alexandrium pseudogonyaulax* (1), *Alexandrium peruvianum* (2) y 7 cepas de células aisladas durante una floración de *Alexandrium minutum* en el puerto de Arenys, pendientes de identificar taxonómicamente.

También se ha cultivado a gran escala (Figura 16) una de las cepas recientemente aisladas de *Alexandrium minutum* (SCR001), para su uso en las exposiciones en laboratorio que se describen a continuación (punto 1.4.). Se utilizaron balones con 6L de medio ES no autoclavado (36 ‰ de salinidad), mantenidos en una cámara isoterma (18 – 20°C constantes) con 12h de luz. Al cabo de un mes desde su inoculación se conseguían las densidades necesarias para su uso.



**Figura 16.** Balones de cultivo de 8 L con *Alexandrium minutum*.

## GALICIA 2010

Al igual que en 2009, durante 2010 se cultivó la cepa CCMP1719 de *Alexandrium fundyense* perteneciente a la Colección de Cultivos del Centro Oceanográfico de Vigo (CCVIEO) con el objetivo de generar una biomasa abundante para su uso en ensayos de toxicidad, estudios de reproducibilidad, sensibilidad y rango de linealidad. Se procesaron 40 L de cultivo durante este año. Combinando las cosechas de células de 2009 y 2010 se puede estimar una biomasa final entre  $3.5$  y  $4 \cdot 10^7$  células.

## CATALUNYA 2010

David Nós, durante su estancia de prácticas de formación en el IRTA supervisado por Margarita Fernández, aisló 3 cepas de *Alexandrium catenella* originarias del puerto de Tarragona. Estas cepas están estabilizadas en la colección de microalgas del IRTA, y a disposición del proyecto.

## Experimentación en laboratorio:

### CATALUNYA 2008

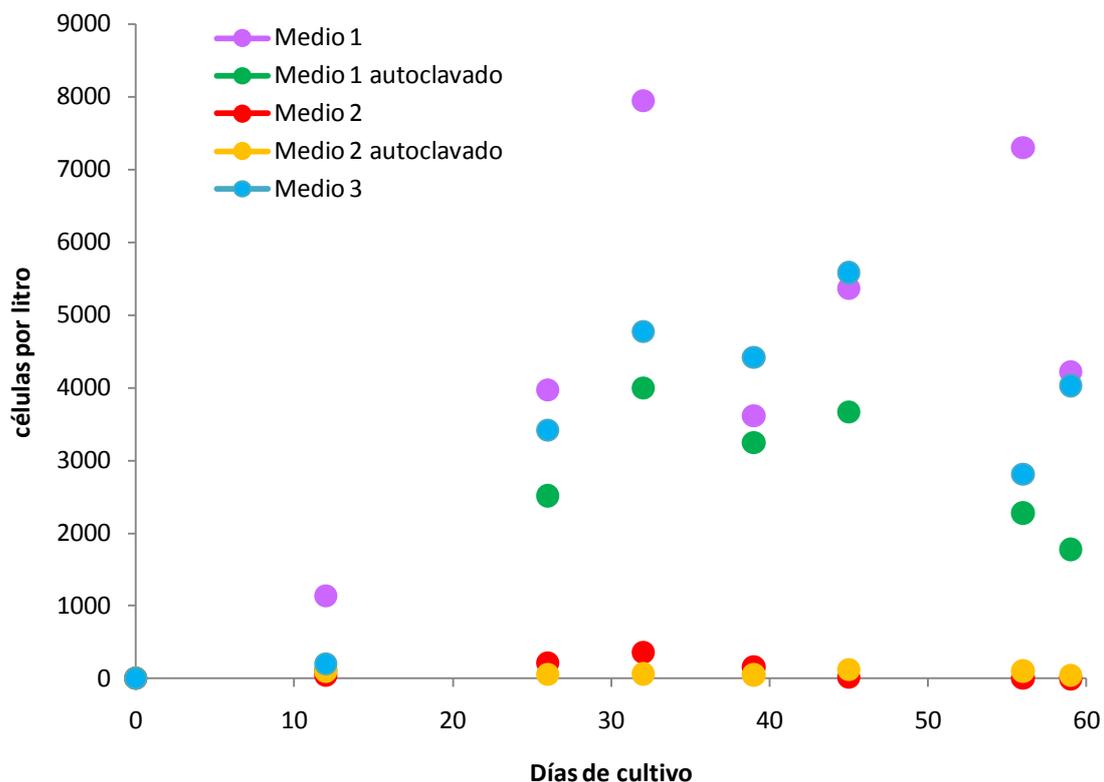
Esta tarea es específica del grupo de Catalunya; no intervienen las demás CCAA aunque podrán disponer del material tóxico que se genere.

El centro del IRTA dispone de instalaciones para el cultivo y el mantenimiento de especies acuáticas, tanto marinas como de agua dulce, así como de los sistemas de control necesarios para llevar a cabo experimentos de “challenge”, en los que están implicados microorganismos patógenos, de manera segura. Debido a la naturaleza tóxica de las microalgas de interés para el proyecto, éstas se pueden gestionar como un agente patógeno, por lo que las exposiciones en laboratorio se pueden plantear a diferentes escalas: individuales, en acuarios (pequeña escala), o en tanques (gran escala). Antes de emprender esta última se está a la espera de los resultados de los ensayos con nuevos sistemas de desinfección y control de los efluentes del centro mediante el uso de ozono llevado a cabo por otro

grupo de investigación; en cuanto se considere satisfactorio el método de tratamiento de las aguas residuales se emprenderá el cultivo de microalgas tóxicas y la exposición de mejillones a las mismas a gran escala.

En el 2008 se cultivó una de las cepas de *A. minutum* del 2002 utilizando tres medios de cultivo (dos formulados y un fertilizante comercial), adicionalmente se comparó el efecto de autoclavar o no el fertilizante comercial y uno de los formulados sobre el crecimiento de la microalga. Todos los cultivos se mantuvieron a 20°C con un fotoperiodo D:L 12h:12h.

Estos resultados preliminares (Figura 17) permiten descartar el uso del fertilizante comercial, aconsejan no autoclavar el medio de cultivo y sitúan en torno a los 30 días el tiempo necesario para conseguir la fase exponencial en esta cepa; todos estos datos son de utilidad a la hora de planificar la exposición en laboratorio. Al cabo de 60 días desde la inoculación inicial se recogieron filtros de cada cultivo cuyo análisis permitirá estimar la capacidad de producción de toxinas PSP por esta cepa en distintas condiciones de cultivo.



**Figura 17.** Crecimiento de la misma cepa de *A. minutum* en función de la composición del medio y del tratamiento de autoclavado del mismo. Medio 1 y 3: medios formulados, Medio 2: fertilizante comercial.

## CATALUNYA 2009

Esta tarea es específica del grupo de Catalunya; no intervienen las demás CCAA aunque podrán disponer del material tóxico que se genere.

El centro del IRTA dispone de instalaciones para el cultivo y el mantenimiento de especies acuáticas, tanto marinas como de agua dulce, así como de los sistemas de control necesarios para llevar a cabo experimentos de “challenge”, en los que están implicados microorganismos patógenos, de manera segura.

Se realizaron dos tipos de exposición experimental, en las que se utilizó la misma cepa de *Alexandrium minutum* cultivada en el mismo tipo de medio y en las mismas condiciones lumínicas y de temperatura, que se describen a continuación.

### Exposición en tanque

Se utilizaron tanques de 100 L de la sala de “challenge” (Figura 18). Una semana antes de iniciar la exposición, se llenaron los tanques con agua filtrada y desinfectada con UV, y no se renovó hasta el final de la exposición, cuando, una vez retirados los mejillones, se añadió lejía y se dejó 24h antes de proceder a su vaciado y limpieza.



**Figura 18.** Sala de “challenge” en la que se realizó la primera exposición en laboratorio.

Se recogieron 12 – 13 kg de mejillón de la bahía de Fangar y se repartieron en tres tanques. Se añadió *Alexandrium minutum* a la mañana siguiente, a razón de unas 250.000 células por litro, en dos tomas al día, durante 3 días.

Se tomaron muestras de:

- Mejillón para análisis de toxinas PSP (inicial y final)
- *A. minutum*
- muestras para recuento
- de cada dosis
- de los tanques previo suministro de la dosis
- filtros para análisis de toxinas PSP de cada dosis
- datos de temperatura del agua de los tanques
- supervivencia final de los mejillones.

A pesar de la diferencia de temperaturas entre el agua de origen (bahía de Fangar; 25,5°C) y la de los tanques (22,3°C de promedio), la previsible degradación de su calidad debido a la no renovación de la misma, y el suministro constante de fitoplancton productor de toxinas PSP, no se detectó una merma importante en la supervivencia de los mejillones utilizados (supervivencia > 98%). Se obtuvieron 3,5 kg de homogenizado de mejillón, pero de baja o nula toxicidad (sólo uno de los ratones del análisis por MBA realizado en el LTASP mostró síntomas).

### Exposición en acuario

Teniendo en cuenta los resultados de las exposiciones en puertos y la exposición en laboratorio, se definió una exposición a menor escala con el fin de determinar cuál puede ser la densidad adecuada de *Alexandrium* para obtener material tóxico.

Se recogieron mejillones de la bahía de Alfacs, y se mantuvieron en uno de los tanques de la sala de "challenge" durante 4 días para aclimatarlos. Se definieron 4 grupos experimentales, con tres réplicas por grupo: control (se suministró *Tetraselmis chuii*), A30 (30.000 células por litro de *A. minutum*), A500 (500.000 células por litro de *A. minutum*) y A1000 (1.000.000 células por litro de *A. minutum*). En total, 12 acuarios con 6L de agua y 10 mejillones por acuario (Figura 19).



**Figura 19.** Acuarios utilizados en la exposición. Véase la diferencia entre el agua de los dos acuarios, debido a que en el acuario de la derecha los mejillones realizaron la puesta.

Se suministró el fitoplancton durante 3 días, dos dosis por día, y se tomaron los mismos datos y muestras que en la exposición en tanques. En estas condiciones, la mayoría de los mejillones realizaron la puesta, por lo que se tuvo que renovar el agua de todos los acuarios cada día.

Los resultados preliminares ya muestran diferencias en las supervivencias de los grupos (Tabla 12), pero se consideran más achacables a las diferencias entre las condiciones fisiológicas de los grupos que hayan puesto y los que no, que a diferencias en las densidades del fitoplancton tóxico presente en el acuario. Los

análisis no detectaron toxinas paralizantes a ninguna de las densidades de *Alexandrium* utilizadas.

Grupo	Réplica	Puesta?	Supervivencia (%)	Promedio supervivencias
Control	1	No	100	96,7
Control	2	No	100	
Control	3	Sí	90	
A30	1	No	100	83,3
A30	2	Sí	80	
A30	3	Sí	70	
A500	1	Sí	80	70,0
A500	2	Sí	50	
A500	3	Sí	80	
A1000	1	Sí	90	86,7
A1000	2	Sí	90	
A1000	3	Sí	80	

**Tabla 12.** Resultados de la supervivencia de los diferentes grupos experimentales.

## Purificación de extractos HPLC:

### CATALUNYA 2008

#### GT Conservación de muestras.

Se ha determinado un diseño para estudiar de manera sistemática las condiciones de conservación de las muestras; a ejecutar en cuanto se disponga de muestra fresca, ya sea por episodios naturales de intoxicación o por exposiciones en puertos o en condiciones de laboratorio. A grandes rasgos, se ha acordado el procesado inmediato (en fresco) de los bivalvos y la homogeneización previa al almacenaje a  $-20^{\circ}\text{C}$ , donde se mantendrán hasta su uso. Las variables a tener en cuenta están relacionadas con ciclos de congelación-descongelación en un intervalo de 2 – 3 días, simulando las condiciones de transporte que puede sufrir una muestra al ser mandada de una CA a otra, y con el tiempo transcurrido a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ANDALUCIA 2009

En años anteriores, y teniendo en cuenta la experiencia particular de cada grupo de trabajo, se optó por emplear la congelación como medio de conservación de las muestras. A pesar de eso se justificó en el L.C.C.RR.PP. la eficacia de la congelación como método de conservación de las muestras con un pequeño estudio.

Para realizar esta comprobación se analizó tres veces la misma muestra antes de ser congelada en abril de 2008. Desde abril a octubre de 2008 se realizaron análisis periódicos, siempre empleando el método biológico. Finalmente en septiembre de 2009 se volvió a realizar un análisis de esta muestra después de haber sido descongelada (24 horas) y recongelada hasta varios días después en el que fuese analizada. Se obtuvieron en total 12 datos.

Los datos fueron tratados y valorados mediante el cálculo de dos parámetros: Coeficiente de variación e Índice de compatibilidad. En ambos casos el resultado fue conforme, llegándose a la conclusión de que las muestras conservadas por congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) no veían significativamente modificada su concentración tóxica y confirmando lo que la experiencia en el laboratorio nos decía.

El resultado obtenido después de sufrir la descongelación y la recongelación tampoco supuso una diferencia significativa, manteniéndose la toxicidad esperada.

Por tanto cabe esperar que la conservación por congelación sea idónea para las muestras con toxicidad del tipo PSP.

Señalar que las muestras fueron congeladas como alícuotas en el peso exacto para realizar la extracción.

## **GALICIA 2009**

### **Purificación de extractos**

Durante el año 2009 se hizo una selección de matrices procedentes de distintas especies de moluscos negativas para PSP por Bioensayo de Ratón (Figura 20). La extracción se realizó siguiendo el método AOAC para Bioensayo de Ratón, utilizando HCl 0.1 N.

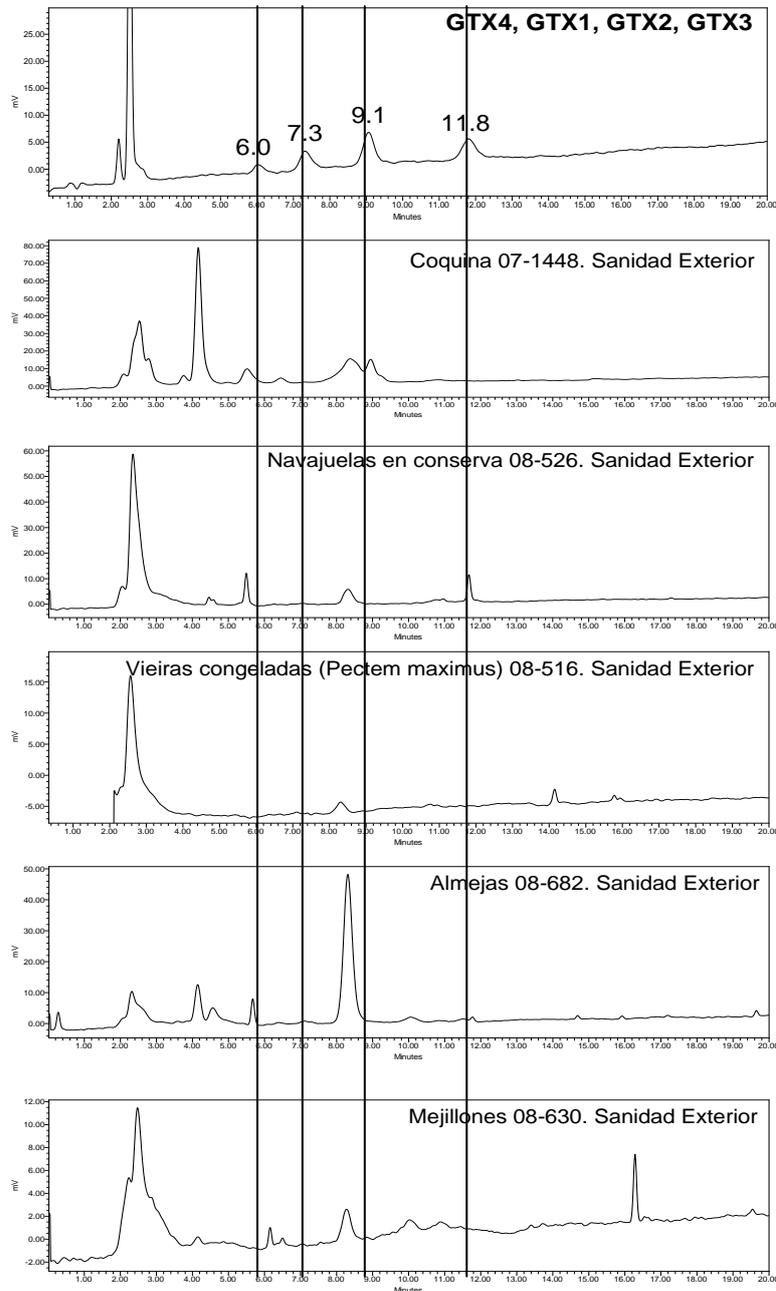
NÚMERO DE MUESTRA	PRODUCTO
07-1448	Coquina
08-516	Vieiras congeladas (Pecten Maximus)
08-526	Navajuelas en conserva
08-527	Navajuelas en conserva
08-531	Navajuelas en conserva
08-535	Navajuelas en conserva
08-630	Mejillones
08-657	Almejas 40/60
08-658	Almejas 60/80
08-659	Almejas 80/100
08-660	Navajuelas
08-682	Almejas
08-686	Mejillón
08-698	Mejillones

**Figura 20.** Matrices negativas para PSP por Bioensayo de Ratón utilizadas para el estudio de evaluación del efecto matriz.

La determinación de posibles interferentes se llevó a cabo por HPLC con derivatización Post-columna como se puede observar en los cromatogramas que se adjuntan a continuación.

Durante el 2010 se añadirán a esta lista 2 matrices más, Berberecho y Longueirón y se llevará a cabo una evaluación de la estabilidad de estas muestras en el tiempo antes de su utilización en estudios de reproducibilidad y recuperabilidad.

Asimismo, la purificación de las matrices que pueden dar lugar a interferencias en la determinación analítica de estas toxinas es una tarea que también se desarrollará durante el 2010.



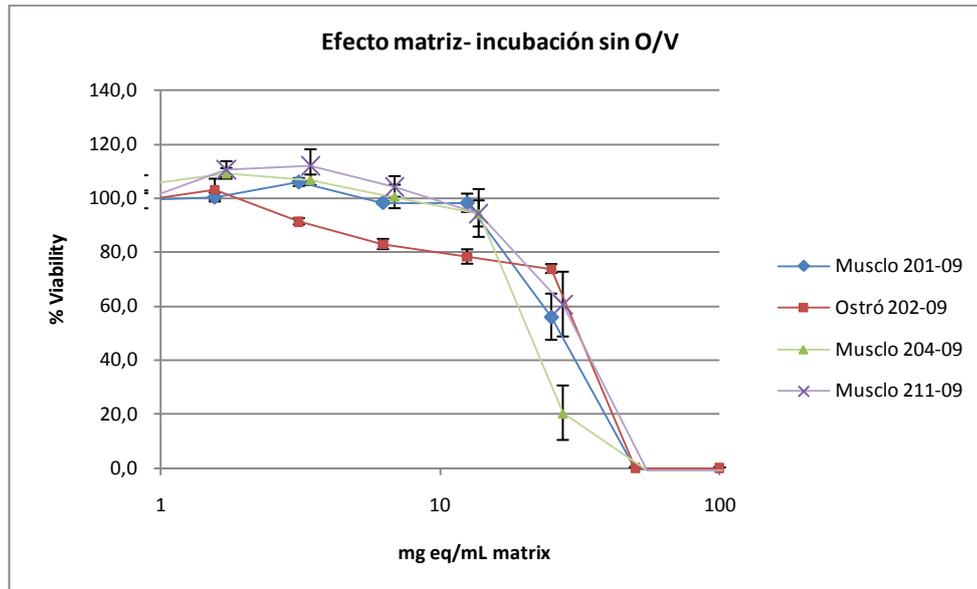
**Figura 21.**

Las muestras destinadas a HPLC post-columna fueron desproteinizadas según se describe en la publicación de Rourke et al. (2008); añadiendo 25 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 30% a 500  $\mu$ L de extracto HCl 0.1 N, neutralizando el pH de la muestra mediante la adición de 20  $\mu$ L de NaOH 1 M y filtrando a través de 0.2  $\mu$  antes de su análisis por HPLC.

Se verificó con las matrices blanco tratadas con TCA 30% que este compuesto daña considerablemente a los ratones, incluso con diluciones elevadas del mismo, por lo cual se concluye que las muestras que han seguido este procedimiento no son válidas para su determinación por Bioensayo de Ratón.

## CATALUNYA 2009

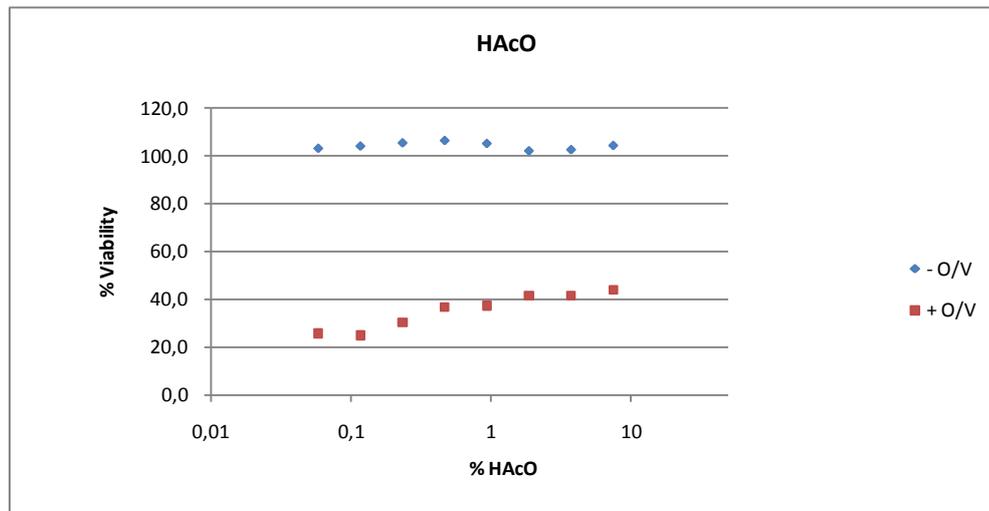
El IRTA ha seguido trabajando con el fin de reducir el efecto matriz sobre los resultados de citotoxicidad ya detectado en 2008 (Figura 22).



**Figura 22.** Estudio del efecto matriz en el ensayo de citotoxicidad con células N2a en presencia de ouabaina/veratridina, utilizando matrices “blanco” de diferentes bivalvos. Nótese la reducción de la viabilidad al aumentar la concentración de matriz en el extracto.

### Efecto del ácido acético sobre el ensayo de citotoxicidad en presencia de ouabaina/veratridina

Observaciones anteriores parecían indicar que el ácido acético (o un pH ácido en general) tiene una cierta influencia sobre los efectos de la ouabaina/veratridina. Para comprobar dicha influencia se prepararon diluciones de ácido acético iguales a las concentraciones normalmente presentes en las muestras de molusco analizadas y se testaron dichas diluciones con el ensayo de citotoxicidad (es decir, se analizó solamente acético, las muestras no contenían matriz de bivalvo). Como se observa en la (Figura 23), el acético, en ausencia de ouabaina/veratridina, no produce ningún efecto negativo sobre las células N2a, a las concentraciones testadas. En cambio, en presencia de los moduladores del canal de sodio, el ácido acético muestra una curva muy similar a la del estándar de STX. Cabe remarcar que, en la realización de la curva estándar de STX no hay acético presente en la muestra.



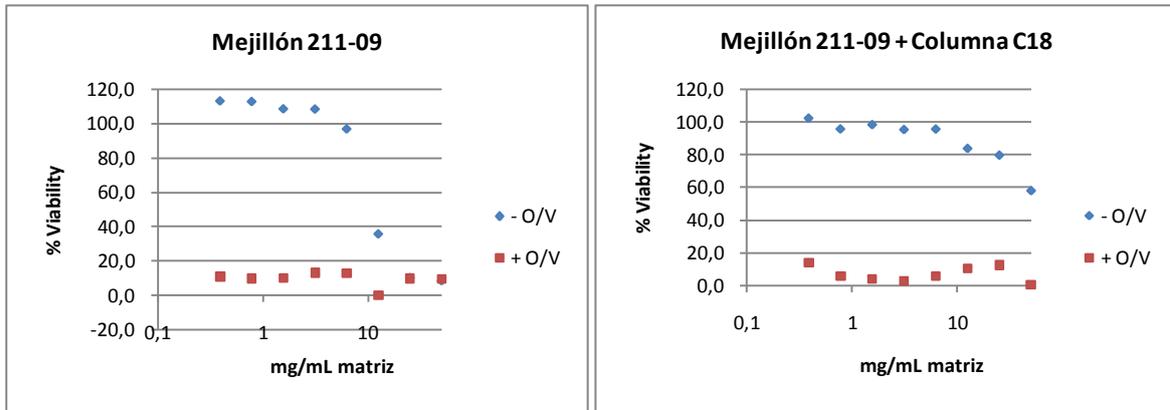
**Figura 23.** Análisis de los efectos del ácido acético sobre el ensayo de citotoxicidad con células N2a en presencia y ausencia de ouabaina/veratridina.

Estos resultados nos indican que la muestra debería purificarse en mayor grado hasta eliminar los restos de acético presentes, ya que de lo contrario se podría dar lugar a una interferencia que dificultase la interpretación de los resultados. De todas formas, si se observan resultados como los de la figura 29, cuando se analizan matrices negativas para STX, la curva obtenida con el acético no se observa. Cabe la posibilidad que los efectos del acético queden amortiguados en presencia de la matriz de mejillón.

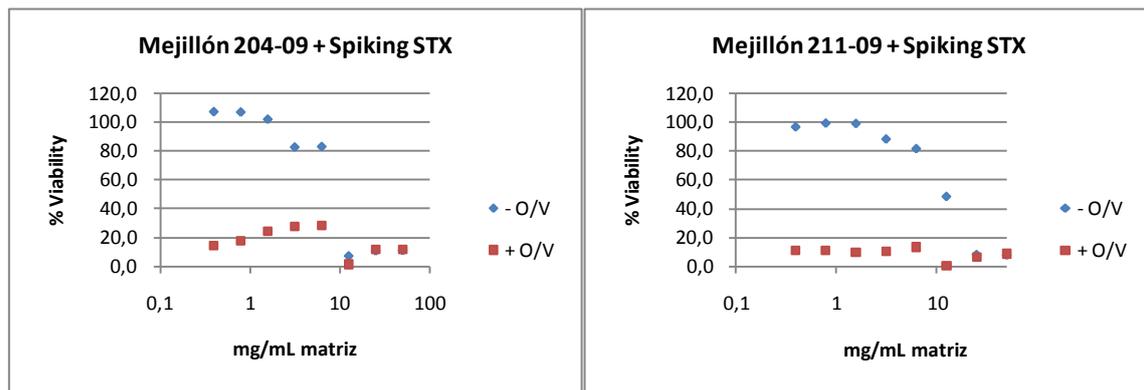
#### Optimización del proceso de extracción

Se quiso comprobar si podía mejorarse la extracción para disminuir el efecto matriz sin que mermara la extracción de STX con el nuevo protocolo. A dos homogeneizados diferentes de mejillón, negativos para STX, se les añadió una cantidad fija del estándar de STX y se procedió a realizar el protocolo de extracción con ácido acético al 1%. Se realizaron los controles correspondientes sin STX. Así mismo, con estos extractos se realizó un paso adicional de purificación por SPE a través de columnas C18 (con los correspondientes controles sin pasar por columna).

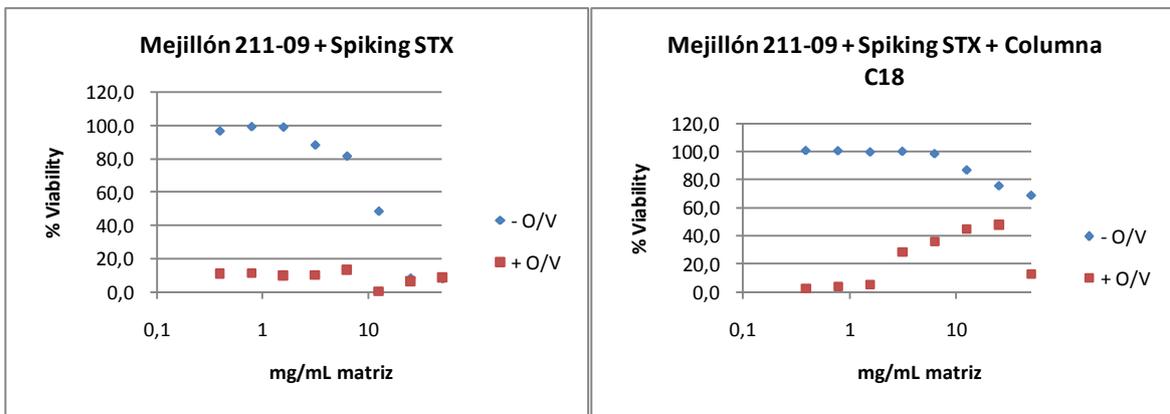
Como se observa en la figura 24, el paso de los extractos a través de una columna C18 disminuye el efecto matriz, esto es, aumenta la concentración máxima de matriz que se puede cargar en un ensayo de citotoxicidad. Los resultados de la figura 25 parecen mostrar que el proceso de extracción de la STX a partir de muestras de molusco (sin purificación por columna C18) no siempre es efectivo: mientras en la muestra 204 se observa el aumento de viabilidad provocado por la STX, lo mismo no aparece en la muestra 211. Estos resultados, de todas formas, deben acabarse de interpretar observando la figura 26. Se ve claramente como, tras el paso por columna C18, el efecto de la STX sobre la viabilidad celular es más fácilmente observable y cuantificable que sin esta purificación adicional.



**Figura 24.** Influencia de la purificación con columna C18 sobre el efecto matriz de extractos de mejillón en el ensayo de citotoxicidad con células N2a. Se muestran los resultados de una misma extracción con o sin paso adicional por columna C18 (no hay STX presente en la muestra). Límite de carga sin paso por columna= 6,125 mg/mL matriz  
 Límite de carga tras el paso por columna C18= 12,5 mg/mL matriz



**Figura 25.** Efectividad del proceso de extracción (sin paso adicional por columna C18) para recuperar la STX añadida a los homogenados de mejillón. Se muestran los resultados de dos homogenados diferentes analizados con el ensayo de citotoxicidad con células N2a.



**Figura 26.** Influencia de la purificación con columna C18 sobre la visualización de la STX en el ensayo de citotoxicidad con células N2a. Se muestran resultados de un mismo extracto dopado con STX y posteriormente purificado o no purificado a través de columna C18.

Se puede resumir que la purificación de los extractos de mejillón por SPE a través de una columna C18 permite disminuir el efecto negativo de la matriz sobre la viabilidad celular y permite mejorar la detección de la STX presente en la muestra.

## GALICIA 2010

Durante el 2009, como quedó reflejado en el correspondiente informe de seguimiento, se probaron distintas columnas, distintas concentraciones de apareador iónico y de acetonitrilo, diferentes flujos y temperatura de columna consiguiendo finalmente la optimización de las condiciones cromatográficas del método HPLC post-columna.

Uno de los principales inconvenientes en la aplicabilidad del método desarrollado era la limitada duración de la columna, por ello en 2010 el esfuerzo se centró en la purificación de las muestras. Para ello se trabajó con muestras de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) procedente de un episodio de *Gymnodinium catenatum* que tuvo lugar en la costa andaluza.

Se aplicaron 4 métodos de extracción diferentes obteniendo:

- Extracto HCL 0.1N hervido según el método PSP para bioensayo de ratón (AOAC 959.08)
- Extracto ácido acético 1% según el método de Lawrence (AOAC 2005.06)
- Extracto HCL 0.1N sin hervir (modificación AOAC 959.08)
- Extracto ácido acético 1% (modificación AOAC 2005.06). (Tabla 13)

µg STX 2.HCl eq/Kg	HCl 0.1 N		Ácido acético 1%	
	Sin hervir	Hervido	Sin hervir	Hervido
MBA		10773 (n=11, SD10%)		
HPLC pre-columna	6068 (n=9, SD 4%)			4785 (n=4, SD 8%)
HPLC post-columna	9443 (n=3, SD 6%)		No detectada	3130 (n=4, SD 20%)

**Tabla 13:** Se recogen los resultados del laboratorio de Sanidad Exterior (MBA), del INTECMAR (HPLC pre-columna) e IIM-CSIC (HPLC post-columna). Las concentraciones de toxina que se muestran en la tabla han sido calculadas mediante los datos de toxicidad de Oshima (1995) en el caso de resultados cromatográficos y según las tablas de Sommer's (AOAC 959.08) en el caso de resultados obtenidos mediante bioensayo de ratón (MBA).

A la vista de los resultados obtenidos se concluye:

- El ácido acético mata al ratón, por tanto estos extractos no pueden ser utilizados en el MBA. Mediante HPLC post-columna se confirma que con ácido acético 1% sin hervir no se extraen las toxinas PSP.
- Se demuestra que la extracción con HCl 0.1 N es más efectiva que con ácido acético 1%

- El extracto HCl 0.1 N puede ser utilizado en el MBA y en los análisis HPLC pre-columna, pudiendo considerarse un extracto universal para la determinación de este grupo de toxinas.

Se probaron los siguientes procedimientos de limpieza de muestras, seguidos siempre por filtración a través de 0.2  $\mu$  antes del análisis por HPLC:

- 30% ácido tricloracético (TCA) según (Rourke et al. 2008): se demuestra que el TCA mata al ratón y no elimina el color amarillo de la muestra.
- Reparto líquido-líquido con hexano y con acetato de etilo: no se elimina el color de la muestra.
- OSTRO, placas de preparación de muestras (Waters): se diluye la muestra y la recuperabilidad es muy baja.
- Extracción en fase sólida mediante cartuchos Sep pak light C18: buenos resultados pero la toxina se distribuye en 2 fracciones con lo cual se diluye la muestra.
- Dispersión en matriz con Lichroprep RP18 (40-63  $\mu$ m) (Merck): muy buenos resultados. Se reduce el color de la muestra en un 50 % y se tienen recuperabilidades del 80% para las toxinas principales que explican el 99% de la toxicidad de la muestra. Se trata además de un método rápido y sencillo, por tanto este es el método que se recomienda para preparación de muestras de PSP.

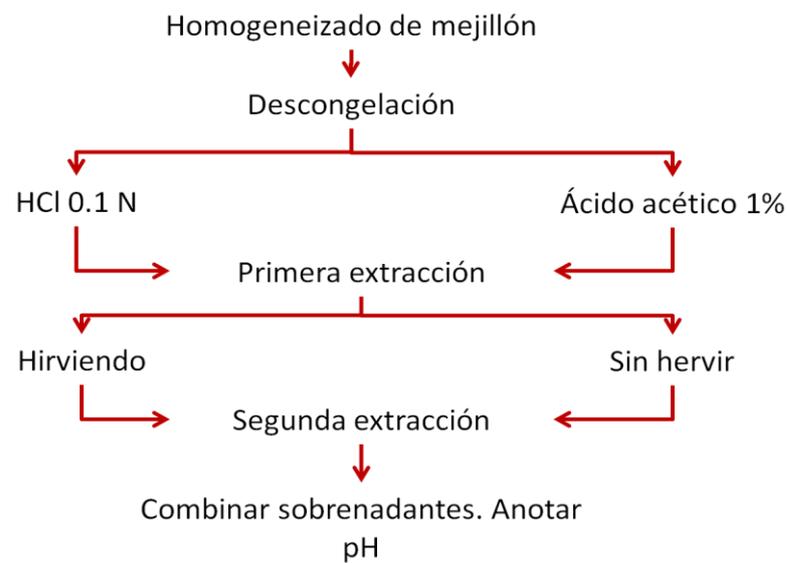
## GALICIA 2010

Se ha estudiado la posibilidad del uso de un medio de extracción universal para las diferentes técnicas reguladas para el control. Los disolventes empleados fueron ácido clorhídrico 0.1N (empleado en los ensayos de referencia biológicos) y ácido acético 1% (empleado en técnicas alternativas HPLC-FD, oxidación pre-columna y post-columna). Los resultados obtenidos para una muestra de mejillón naturalmente contaminada, procedente de Andalucía demuestran que la extracción con ácido clorhídrico (n=9) es más eficaz, obteniéndose resultados de toxicidad de hasta un 13% superiores a las realizadas con acético (n=4).

## GALICIA 2011

Comparación de la influencia de diferentes procedimientos de extracción y limpieza de muestra en la determinación de toxinas PSP

# PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN



**Figura 27.** Procedimientos de extracción y limpieza de muestras para la determinación de toxinas PSP.

µg STXeq/Kg				
	HCl 0,1N		ácido acético1%	
	sin hervir	hervido	sin hervir	hervido
Bioensayo de ratón		107733		
LC-Precolumna	6068(9; 4%)			4785(4;8%)
LC-Postcolumna	9443(9;6%)		ND	3130(4;20%)

**Tabla 14.** Resultados comparativos entre las cromatografías y el bioensayo de ratón usando los dos métodos de extracción del sistema postcolumna y precolumna, hirviendo y sin hervir ND= no detectado; entre paréntesis número de ensayos y desviación standard

Diferentes métodos ensayados en la limpieza de los extractos de mejillón con HCl 0.1N:

- Ácido tricloracético 30 %. (Rourke et al., 2008).
- Reparto líquido – líquido. Hexano y acetato de etilo.
- Placas OSTRO para preparación de muestras (Waters).
- SPE con cartuchos Sep pak light C18.
- Purificación por dispersión de matriz. Lichroprep RP18 (40-63 µm) Merck.

Disminución de color amarillento en cuatro alícuotas de extracto de mejillón después de su dispersión con Lichroprep RP18 (40- 63 µm) (Merck)

Extracto de mejillón	Absorbancia (490 nm)
Original	0.711
1	0.306
2	0.318
3	0.327
4	0.313

Por ello se concluye lo siguiente:

- Los extractos acéticos no se pueden utilizar en el bioensayo de ratón.
- Extracción HCl 0.1 N parece ser más efectiva que extracción con acético 1 %.
- Los extractos HCl 0.1 N pueden utilizarse en el bioensayo de ratón.
- Los extractos HCl 0.1 N pueden utilizarse para determinación por HPLC con oxidación pre-columna.
- El extracto HCl 0.1 N puede considerarse “extracto universal” dado que se puede utilizar con los 3 métodos.
- En la actualidad no disponemos de un sistema de purificación eficaz.

***Protocolo de de prepurificación para mejorar la detección de toxinas PSP mediante cromatografía líquida de alta eficacia con oxidación postcolumna (Galicia)***

Dos aspectos influyen de forma negativa en la determinación de toxinas PSP en mejillón por cromatografía líquida y detección fluorimétrica con reacción post-columna:

1.- Evaluación del **efecto matriz** sobre las columnas de separación que determina que su vida útil sea muy corta. Se establece que la media de muestras sin perder resolución se encuentra en el rango de 100 a 200. Por acción del efecto matriz se van a generar dobles picos y se incrementa la presión en cabeza de columna

llegando a sobrepasar el límite de seguridad del sistema provocando la parada de las bombas.

2.- Evaluación de **interferentes**. En concreto la co-elución de interferentes con las toxinas GTX4 y GTX1. Debido a la toxicidad elevada de estas dos toxinas, la interferencia a este nivel no sólo impide una correcta cuantificación de dichas toxinas sino que contribuye significativamente al cálculo de  $\mu\text{g}$  STX equivalentes.

Con el objetivo de dar una solución a los dos problemas anteriores, que están relacionados entre sí, se procedió a ensayar diferentes **sistemas de limpieza** del extracto de mejillón y que se resumen a continuación:

1.- **Desproteización** de una alícuota de homogeneizado de mejillón con ácido tricloroacético (**TCA**) según el protocolo descrito por (Rourke et al. 3008) y posterior filtrado a través de  $0,2\mu$  antes de inyectar.

Este tratamiento resulta insuficiente ya que el extracto mantiene una gran cantidad de compuestos coloreados, amarillo-anaranjados, en disolución que al entrar en la columna se fijan selectiva y permanente en la cabeza de la misma dando lugar a un aumento de presión y la consecuente pérdida de resolución.

2.- **Repartos con hexano, acetato de etilo y éter etílico.**

En contra del objetivo previsto con este procedimiento, el material amarillento no fue arrastrado por la capa orgánica. De este ensayo se deduce que el material coloreado es claramente hidrofílico al permanecer en la fase acuosa.

3.- **Extracción en fase sólida con cartuchos de C18** según el protocolo descrito en el método pre-columna (Lawrence et al. 2005).

El efecto real es una dilución ya que si la muestra está muy coloreada, puede pasar ese material al extracto. Y en muestras con niveles bajos de toxinas PSP tiene el mismo efecto que la dilución simple.

4.- **Extracción con Lichroprep RP18 (40-63  $\mu\text{m}$ ).**

El procedimiento consiste en pesar 300 mg de fase Lichroprep RP18 (40-63  $\mu$ ) que se acondicionan con 2mL de metanol y posteriormente con 8 mL de agua. Después de decantar el agua se añaden 2 mL de extracto, se agita y se centrifuga a una velocidad aproximada de 10000g durante 15 minutos recogiendo el sobrenadante al final. La eficacia del proceso se comprueba valorando el descenso de color del sobrenadante mediante las lecturas de absorbancia a 490 nm de la muestra original y cuatro réplicas de la muestra tratada con este procedimiento.

Se consigue una reducción promedio del color del 45 %.

Extracto	Absorbancia a 490nm
original	0,711
1	0,306
2	0,318
3	0,327
4	0,313

5.- Por último se ensayó la **purificación por dispersión de matriz** usando tres fases y/o adsorbentes diferentes y diferentes cantidades de las mismas.

Absorbancia a 490nm			
Extracto	150 mg RP18	100 mg OASIS HLB	100 mg Sepabeads SP70
original	0,700	0,746	0,667
1	0,310	0,318	0,268
2	0,322	0,406	0,306
3	0,330	0,385	0,291
4	0,305	0,368	0,287
%reducción	45,25	49,50	43,15

Se observa una reducción en el color importante. En nuestro caso, al trabajar con muestras que presentan un contenido elevado de toxinas, este tratamiento representa una mejora aunque continúa resultando insuficiente para optimizar la vida útil de la columna.

Con el objetivo de determinar las condiciones más adecuadas en las cuales se alcance una relación de compromiso óptima entre la reducción de color del extracto y la máxima recuperabilidad de toxinas se probó un **diseño factorial** ensayando la presencia-ausencia de TCA y tres cantidades diferentes de Sepabeads, 400-50 mg y 400-150 mg de fase reversa C18.

El análisis factorial refleja que en conjunto el Sepabeads junto con el TCA resulta más eficaz en la reducción del color, pero las recuperabilidades de toxina se encuentran por debajo del 80%.

Se estudió también la utilización de una técnica de SPE para purificar los extractos para su análisis por HPLC-MS/MS, que se describe en el epígrafe dedicado a esa técnica analítica.

## 1.2) Metodologías de determinación de toxinas:

# El bioensayo ratón para toxinas paralizantes de la AOAC:

## ANDALUCÍA Y GALICIA

Se realizaron bioensayos de ratón de todas las muestras para seguimiento de la presencia de PSP y de las de moluscos bivalvos recogidas para utilizar en los experimentos en intercalibraciones

El método empleado para la catalogación de todas las muestras se analizaron según el método AOAC Official Method 959.08. Paralytic Shellfish Poison. Biological Method. Final Action.

## CATALUNYA

Este análisis lo lleva a cabo el grupo del Laboratori a Tarragona de l'Agència de Salut Pública, anteriormente Laboratorio de Salud Pública de Tarragona (LSPT). Además del análisis de las muestras incluidas en el programa de seguimiento de la calidad de las aguas y zonas de marisqueo del litoral catalán, anualmente participan en un ejercicio de intercomparación organizado por el Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas (LCRBM) para asegurar la calidad de los resultados. Asimismo, se ha incorporado el uso de muestras adicionales por duplicado y se están llevando a cabo pruebas de congelación con la finalidad de evaluar la calidad del material almacenado usado para los controles de esta técnica.

Se ha identificado la necesidad de material de referencia (matriz de bivalvo intoxicada con PSP) para poder realizar los controles de calidad de las analíticas adecuadamente; esta necesidad se prevé continua y los resultados que se generen a lo largo de este proyecto en lo referente al GT de conservación de muestras serán de gran utilidad para este laboratorio y otros que ejecuten el MBA y que no dispongan regularmente de grandes cantidades de muestra natural contaminada. Este requerimiento ya se expresó en la reunión de coordinación de Corón, de la que se acordó un compromiso por parte de todos los participantes de solventar el problema de suministro de material de referencia.

## Desarrollo e implementación de metodologías cromatográficas, LC-FD, LC-MS-MS. Perfiles tóxicos.

### LC Precolumna:

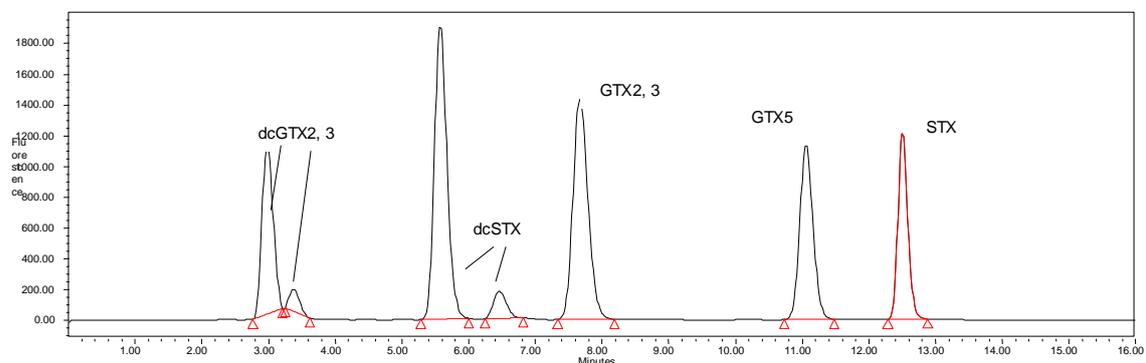
#### ANDALUCIA 2008

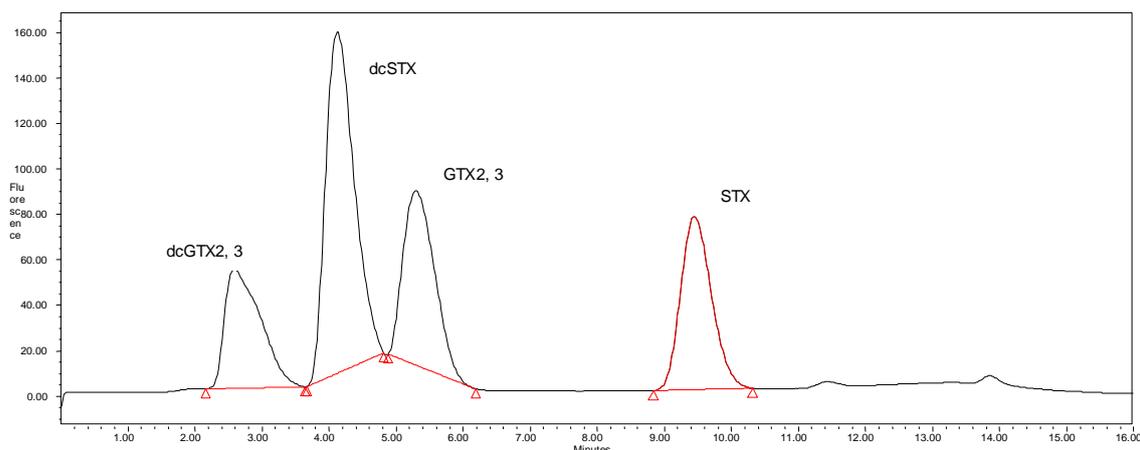
Adquisición de equipos y material fungible necesario para la puesta a punto de los protocolos de cromatografía con derivatización pre-columna y post-columna

A lo largo de 2008 se adquirieron los reactivos y patrones necesarios para el proyecto, así como el material fungible de uso rutinario en la realización de las pruebas con los protocolos en estudio.

#### CATALUNYA 2008

El protocolo de análisis por HPLC con derivatización pre-columna basado en Lawrence (2005) ya se había llevado a cabo en el laboratorio del IRTA en el 2007, pero no se ejecutaba rutinariamente desde entonces y además hubo cambios en el personal técnico implicado. Se propuso participar en el ejercicio interlaboratorio organizado por el LCRBM con el fin de cotejar la fiabilidad del laboratorio en la ejecución de esta técnica, pero a la luz de los cromatogramas obtenidos en esta ocasión (ver Figura 28), en los que se podía identificar los compuestos pero no cuantificar adecuadamente, se decidió no dar los resultados, quedando fuera del análisis de datos. A raíz de este ejercicio se detectaron problemas técnicos del equipo que afectan a los análisis.





**Figura 28.** Cromatogramas obtenidos en 2007 (superior) y 2008 (inferior) del mismo mix de estándares de toxinas PSP (dcGTX2,3 = decarbagonyautoxinas 2 y 3; dcSTX = decarbasaxitoxina; GTX2,3 = gonyautoxinas 2 y 3; GTX5 = gonyautoxina 5; STX = saxitoxina). Véase la diferencia en los tiempos de retención, en la separación entre picos y en el área de los mismos compuestos a pesar de mantener las mismas condiciones cromatográficas.

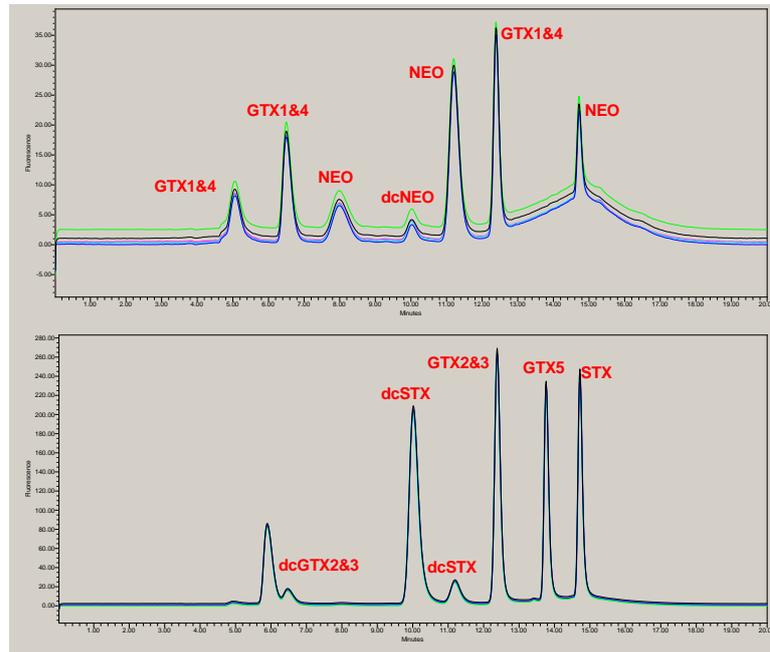
Actualmente estos problemas están solventados, se dispone de estándares y columna nuevos, y se iniciarán los análisis de las muestras almacenadas en cuanto se analice y contrasten los resultados del material suministrado en el interlaboratorio. Estos contratiempos también serán de utilidad a la hora de evaluar la técnica en el contexto de la rutina de un programa de vigilancia de las toxinas marinas.

## ANDALUCIA 2009

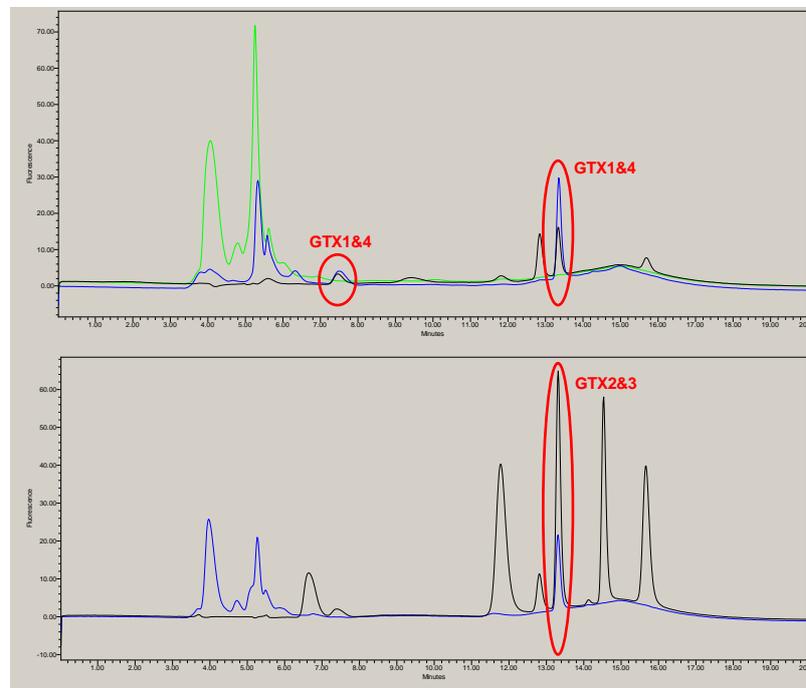
En principio se mantuvo el objetivo de la puesta a punto y el empleo en el estudio final del método de cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización pre-columna por parte del L.C.C.RR.PP. Sin embargo a lo largo de 2009 se ha visto la necesidad de completar los análisis previstos para el estudio final con el método post-columna y aplazar la implementación del método pre-columna hasta la finalización en la obtención de datos necesarios para el estudio final.

## CATALUNYA 2009

El protocolo de análisis por HPLC con derivatización pre-columna basado en Lawrence (2005) ya se había llevado a cabo en el laboratorio del IRTA en el 2007, pero se estaban teniendo serios problemas de implementación al combinar el mismo aparato para esta técnica y para el análisis en rutina de muestras del monitoring para ASP. Actualmente parece que se está solventando su implementación, al establecerse unas condiciones cromatográficas que permiten separar los diferentes estándares de toxinas PSP (Figura 29) y obtener cromatogramas con muestras reales bastante prometedores (Figura 30). Se prevé comparar los resultados de muestras ya analizadas con los obtenidos con esta técnica con el fin de confirmar la validez de su ejecución.



**Figura 29.** Cromatogramas de dos mix de estándares de toxinas PSP. Superior = MIX I derivatizado con periodato, con neosaxitoxina (NEO), gonyautoxina 1 y 4 (GTX1,4) y decarbaneosaxitoxina (dcNEO); inferior = MIX II derivatizado con peróxido, decarbagonautoxinas 2 y 3 (dcGTX2,3), decarbasaxitoxina (dcSTX), gonyautoxinas 2 y 3 (GTX2,3), gonyautoxina 5 (GTX5), saxitoxina (STX). Nótese la superposición de las 4 inyecciones del mismo mix.



**Figura 30.** Cromatogramas de los derivatizados I (junto con MIX I, superior) y II (junto con MIX II, inferior) de una misma muestra de ostión tóxico (cromatograma azul). Véase en los círculos rojos la coincidencia de alguno de los picos del derivatizado con los de los estándares correspondientes (cromatograma negro). En verde, cromatograma del extracto no derivatizado; véase la ausencia de sustancias con autofluorescencia naturales en la matriz que coincidan con los picos de los estándares.

## GALICIA 2010

Para la determinación de toxinas PSP el laboratorio usó el método de HPLC-FD con oxidación pre-columna, según el procedimiento AOAC Official Method 2005.06. Extension validation 2008.

Para la cuantificación de las toxinas presentes en las muestras estudiadas se implementó el método de HPLC-FD, procedimiento AOAC Official Method 2005.06 . Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. PreChromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. First Action 2005. and Extensión Validation. (SOP. EURLMB).

Se observa una clara diferencia en el tiempo empleado en el análisis de cada muestra, dependiente del perfil de toxinas, puesto que para las muestras procedentes de Catalunya, afectadas por episodios de *Alexandrium* spp, (C1,2, GTX2,3 y GTX1,4) dicho tiempo es casi un tercio del necesario que en el caso de las muestras procedentes de Andalucía, afectadas por episodios de *Gynodinium catenatum*, (C1,2, GTX2,3 y GTX1,4, dc-GTX2,3, dc-STX, GTX5, STX, GTX6, dc-NEO, C3,4).

Se analizaron varios pools de muestras de diferentes niveles suministradas por los laboratorios de Andalucía y Catalunya. Cada pool de muestras de un nivel está representado por un n=5.

MUESTRA	C1,2 MU/L	GTX2,3 MU/L	GTX1,4 MU/L	µg/Kg (MU/L)	µg equ. STX 2HCL/Kg (cálculo con TEFs)
ME CAT/C-009	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
ME CAT/C-011	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
ME CAT/C-013	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
ME CAT/C-015	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
ME CAT/C-017	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
ME CAT/C-037	<LQ	47,52	222,12	375,07	373,034
ME CAT/C-039	<LQ	47,52	214,7	364,75	362,649
ME CAT/C-041	<LQ	44,35	207,31	350,06	348,159
ME CAT/C-043	<LQ	44,35	143,14	260,8	258,352
ME CAT/C-045	<LQ	47,52	229,52	385,36	383,39
ME CAT/C-065	<LQ	68,11	261,61	458,64	455,239
ME CAT/C-067	<LQ	79,2	283,82	504,96	500,832
ME CAT/C-069	<LQ	77,62	303,56	530,22	526,392
ME CAT/C-071	<LQ	84,9	271,48	495,72	491,019
ME CAT/C-073	<LQ	91,87	301,09	546,61	541,579
ME CAT/C-093	<5.497	372,24	1406,8	2474,64	2455,861
ME CAT/C-095	<5.497	408,67	1416,63	2538,99	2517,281
ME CAT/C-097	<5.497	411,84	1559,78	2742,52	2721,77
ME CAT/C-099	<5.497	456,19	1552,37	2793,91	2769,425
ME CAT/C-101	<5.497	419,76	1510,42	2684,88	2663,052

**Tabla 15a.** Resultados de toxicidad PSP obtenidos en muestras de mejillón instalado en bateas de Catalunya durante un episodio de *Alexandrium minutum*, y posterior extracción periódica.

Resumen:

Para un total de 4 pools de muestras, se obtuvieron unos valores medios por nivel de <LQ, 345.12; 503.01 y 2625.27  $\mu\text{g}$  equ. STX 2HCL/Kg y CV para los tres últimos de 14.5; 6.64 y 5.10 respectivamente.

Las toxinas presentes son las mismas que las detectadas en Galicia en episodios originados por el mismo tipo de especies de fitoplancton y que fueron analizadas en el año 2009 en este proyecto.

MUESTRA	dc-GTX2,3	C1,2	dc-STX	GTX2,3	GTXV	STX	GTXVI	dc-NEO	* C3,4	µg/Kg	µg equ. STX 2HCL/Kg (cálculo con TEFs)
	MU/L	MU/L	MU/L	MU/L	MU/L	MU/L	MU/L	MU/L	MU/L	(MU/L)	
ME AND C-018	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LD	<LD
ME AND C-021	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LD	<LD
ME AND C-026	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LD	<LD
ME AND C-014	<21.50	<5.50	<24.21	nd	<3.2	nd	nd	nd	nd	<LD	<LD
ME AND C-009	<21.50	<5.50	<24.21	nd	<3.2	nd	nd	nd	nd	<LD	<LD
ME AND C-102	<21.50	33,7	64,3	80,2	18,5	<49.66	nd	nd	nd	273,6	367,896
ME AND C-098	<21.50	33,6	64,5	80,3	18,8	<49.66	nd	nd	nd	274,3	369,073
ME AND C-093	<21.50	37,6	67,2	89	19,6	<49.66	nd	nd	nd	296,8	395,283
ME AND C-110	nd	29,1	54,6	57,3	17,3	<49.66	nd	nd	nd	220,2	302,399
ME AND C-105	nd	29	51,1	55,5	18,7	<49.66	nd	nd	nd	214,6	293,432
ME AND C-065	nd	27,2	172,6	nd	87,9	nd	nd	nd	nd	400,2	697,01
ME AND C-070	nd	26,9	169,3	nd	86,4	nd	nd	nd	nd	393,1	684,392
ME AND C-074	nd	24,9	163,5	nd	84,3	nd	nd	nd	nd	379,3	661,243
ME AND C-077	25,8	33,9	167,3	nd	88,7	nd	nd	nd	nd	439,1	732,174
ME AND C-082	25,73	22,9	156,4	nd	88,6	nd	nd	nd	nd	400,1	686,406
ME AND C-042	69,9	358	226,2	<38.02	362,5	<49.66	113,1	78,98	detect	1681,3	2346,332
ME AND C-046	107,69	462	292,1	41,21	468,5	<49.66	118,7	76,44	detect	2176,2	3023,175
ME AND C-049	98,41	434,5	295,78	40,64	452,5	<49.66	129,6	73,89	detect	2124,4	2965,068
ME AND C-054	94,42	383,5	268,82	38,62	394,4	<49.66	128,8	76,44	detect	1926,5	2685,346
ME AND C-037	61,5	329,1	227,03	<52.9	421,7	nd	116,2	30,6	detect	1649,8	2376,299

**Tabla 15b.** Resultados de toxicidad PSP obtenidos en muestras de mejillón cultivados in vivo flotante procedentes de Andalucía e intoxicados de forma natural durante un episodio de *Gymnodinium catenatum*

\*C3,4 no se pueden cuantificar por ausencia de patrones comerciales.

#### Resumen:

Para un total de 4 pools de muestras, se obtuvieron unos valores medios por nivel de <LQ, 345.61; 692.24 y 2679.24 µg equ. STX 2HCL/Kg y CV para los tres últimos de 13.0; 3.73 y 11.8 respectivamente.

El perfil de toxinas presentes es característico de especies productoras de *Gymnodinium catenatum*, similar a los detectados en Galicia durante el otoño-invierno del 2005 en Intecmar.

La complejidad de este tipo de perfiles supone uno de los principales handicaps a la hora de evaluar los resultados con rapidez. Para aquellos laboratorios que emiten resultados que deriven en la toma de decisiones respecto a prohibiciones en zonas de producción, este método es lento y tiene como consecuencia un incremento del riesgo sanitario.

## CATALUNYA 2010

Se adquirió un equipo nuevo para realizar los análisis de toxinas PSP, puesto que los esfuerzos de compatibilizar éstos con los requeridos por el programa de vigilancia en el mismo equipo han resultado en vano.

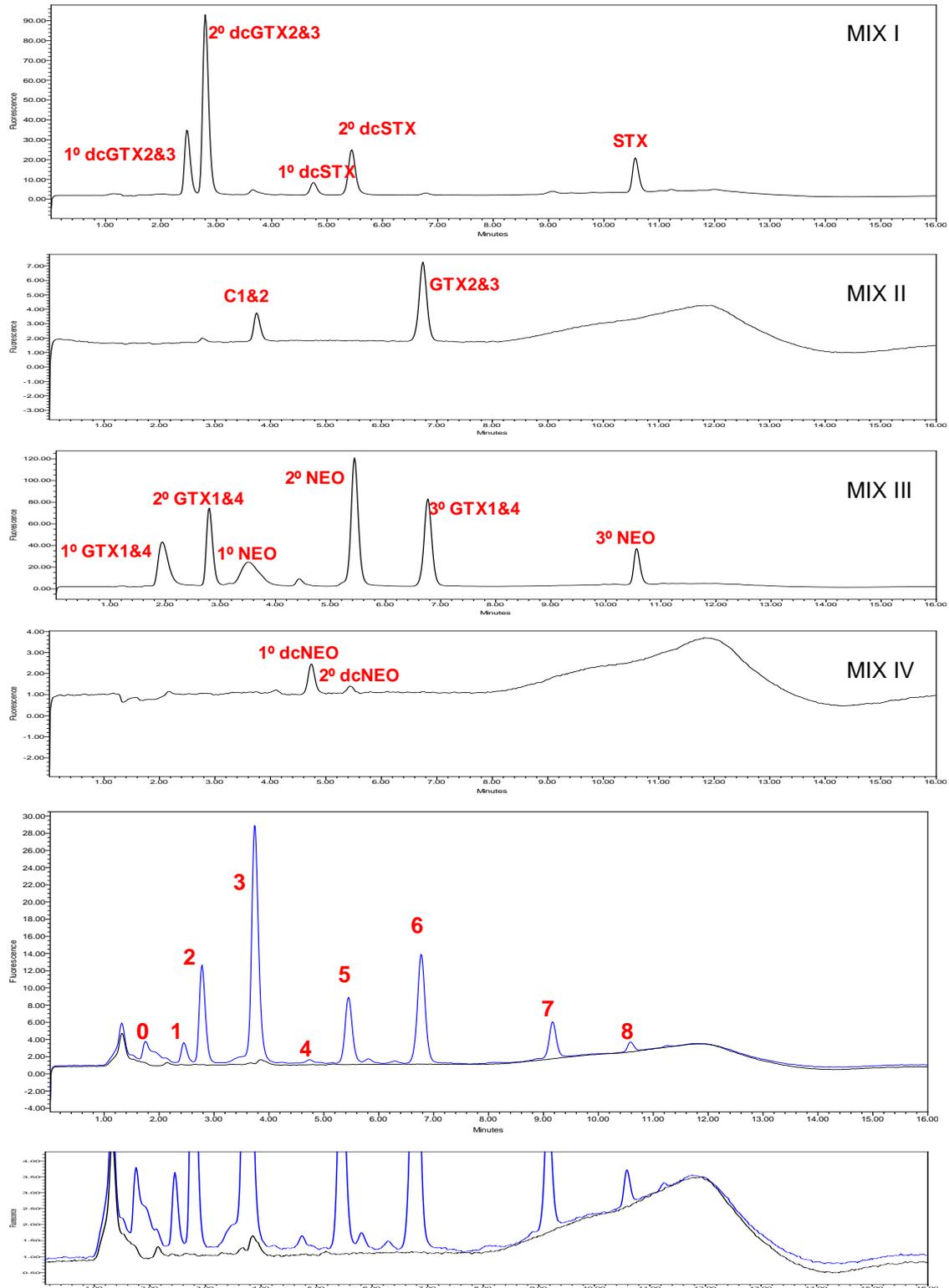
En julio se instaló un Acquity UPLC (Waters), y después de establecer las condiciones cromatográficas que permitieran separar adecuadamente los picos de los derivados de las toxinas PSP, se participó en el ejercicio intercomparativo organizado por el EURLMB en agosto, con resultado satisfactorio.

Se ha analizado gran parte de las muestras del comparativo, pero se prevé repetir algún análisis a la vista de sus resultados.

En la Tabla 16 se resumen las condiciones cromatográficas utilizadas, y se presenta un ejemplo de cómo se resuelve una muestra con perfil tóxico complejo, originado por *Gymnodinium catenatum* (Figuras 31, 32 y 33).

<b>Columna</b>	Kinetex (Phenomenex) 2,6 $\mu\text{m}$ ; C18; 100x2,10 mm		
<b>Fase A</b>	Formiato de amonio 1M pH ajustado a 6		
<b>Fase B</b>	Formiato de amonio 1M en acetonitrilo al 5% pH ajustado a 6		
<b>Flujo (<math>\text{mL min}^{-1}</math>)</b>	0,2		
<b>Gradiente</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
	0	100	0
	5	95	5
	9	30	70
	11	100	0
	16	100	0
<b>Temperatura horno (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	30		
<b>Temperatura muestras (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	4		
$\lambda_{\text{excitación}}$	340		
$\lambda_{\text{emisión}}$	395		

**Tabla 16.** Condiciones cromatográficas para el análisis de toxinas PSP en el Acquity UPLC.

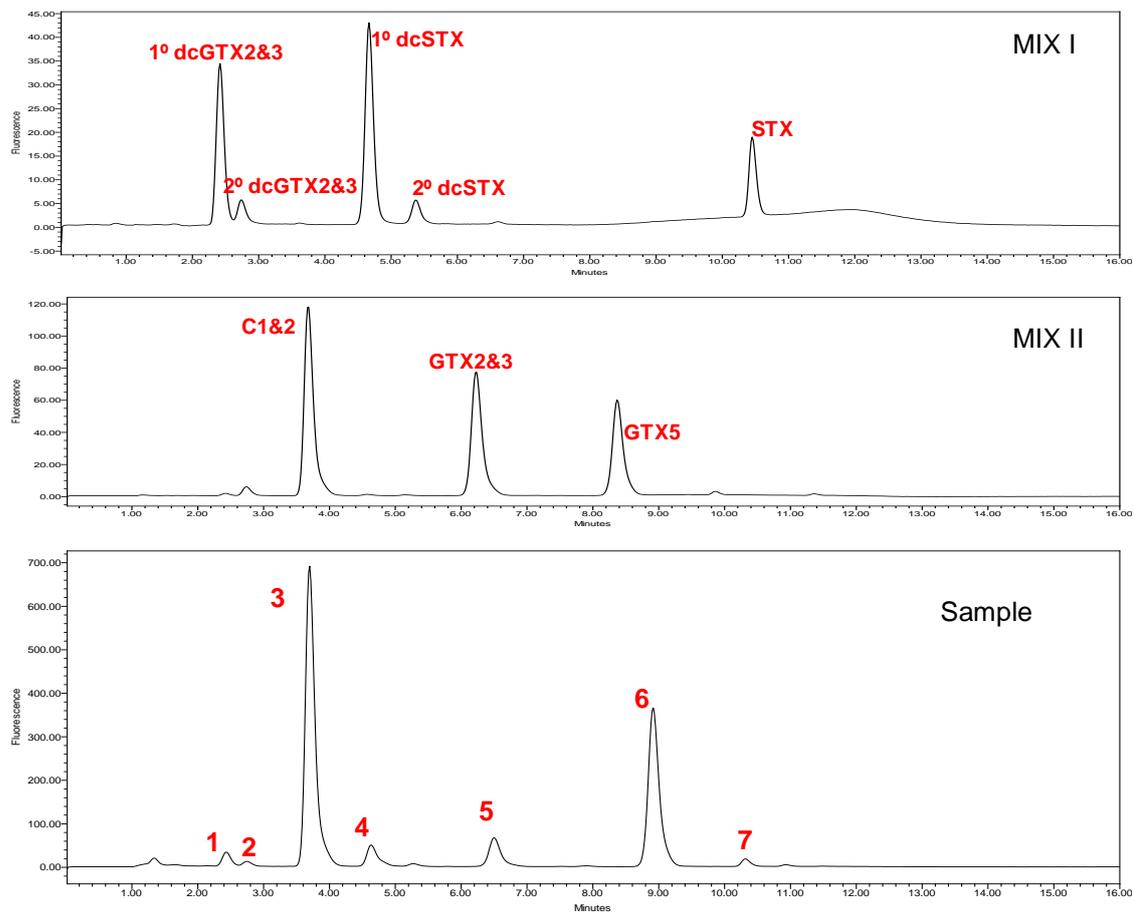


**Figura 31.** Resultados de inyectar el extracto C18 derivatizado con periodato, con el fin de detectar e identificar la presencia de toxinas PSP (screening). Los cuatro cromatogramas superiores corresponden a mezclas de estándares, en los dos inferiores se compara el extracto sin derivatizar (cromatograma negro) con el derivatizado (cromatograma azul).

A la vista de los resultados de la Figura 31, viendo el cromatograma resultante de la derivatización con periodato del extracto C18 de la muestra, se puede sospechar de la presencia de las siguientes toxinas, por correspondencia con los siguientes picos:

Toxina	MIX	Pico (nº)
dcGTX2&3	I	1,2
dcSTX	I	4,5
STX	I	8
C1&2	II	3
GTX2&3	II	6
GTX5	II (no incluida en el mix)	7
GTX1&4	III	0(?),2,6
NEO	III	3,5,8
dcNEO	IV	4,5
GTX6	No existe estándar	3, 5

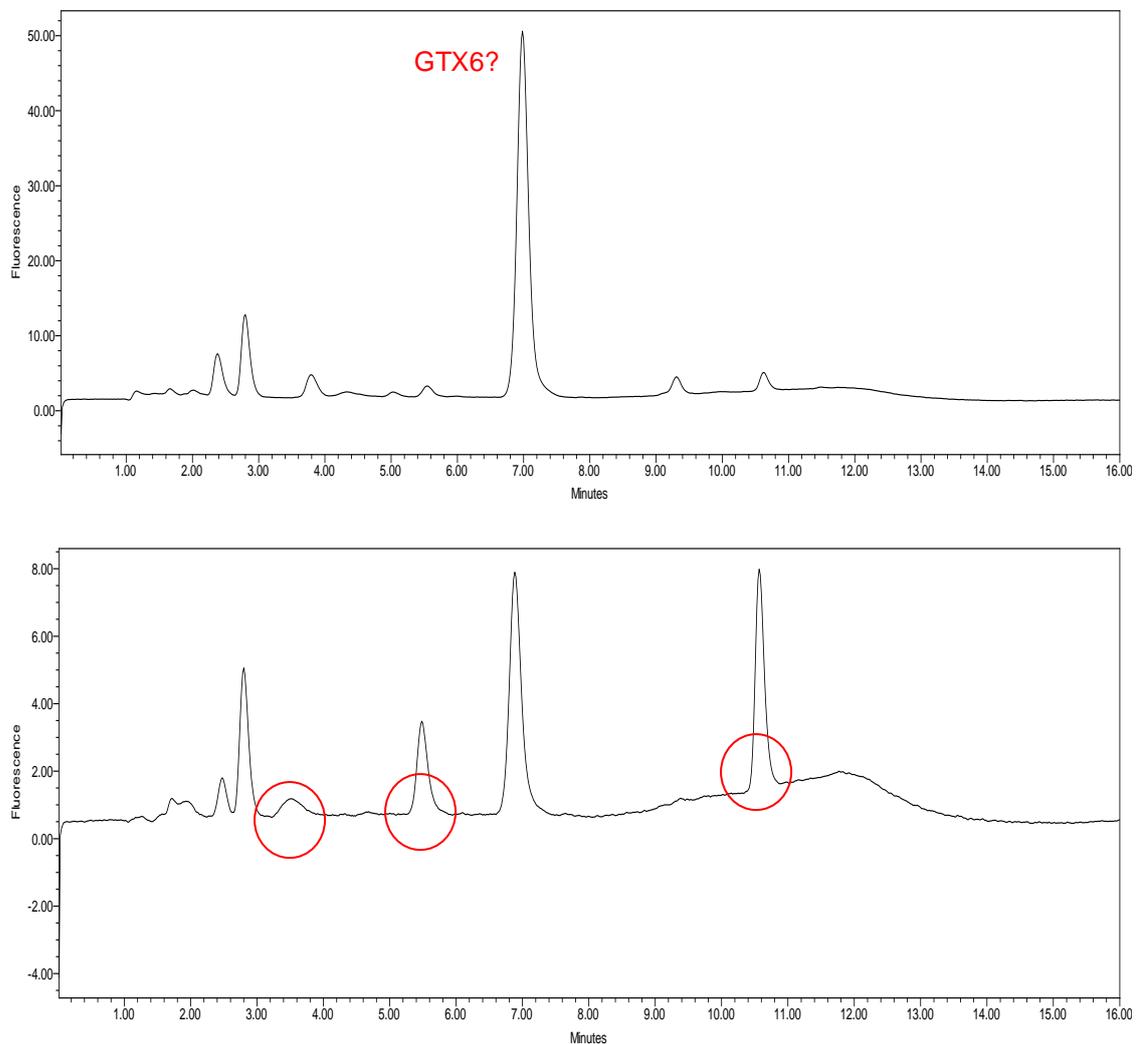
**Tabla 17.** Correspondencia entre los picos presentes en la muestra y los de los estándares. Como se ve, los picos 2, 3, 4, 5, 6 y 8 pueden ser originados por más de una toxina diferente.



**Figura 32.** Resultados del análisis del extracto C18 derivatizado con peróxido. El peróxido sólo derivatiza a las toxinas presentes en los MIX I y II (C1&2, dcGTX2&3, dcSTX, GTX2&3, GTX5 y STX).

Se confirma la presencia de las toxinas dcSTX (coincidente con dcNEO, si hubiera, por lo que se requiere un paso adicional para clarificarlo), STX, C1&2, GTX2&3 y GTX5.

Para elucidar la presencia de GTX6, se tiene que fraccionar el extracto purificado C18 por cartuchos COOH; este paso es útil para confirmar/descartar la presencia de otras toxinas PSP pero no suele usarse para el cálculo de las mismas por el grado de dilución y pérdida que sufren. Sin embargo, sigue sin permitir separar dcSTX de dcNEO, puesto que ambas aparecen en la misma fracción. En el caso de la GTX6, se requiere una hidrólisis de la fracción 2, de manera que la GTX6 se transforma en NEO (por lo que la fracción presentará los tres picos típicos de la NEO), y se utiliza el estándar de NEO para cuantificar la GTX6 hidrolizada, asumiendo una transformación de 1:1.



**Figura 33.** Análisis de la fracción 2 derivatizada con periodato antes de hidrolizar (cromatograma superior) y después de hidrolizar (cromatograma inferior). Los círculos marcan los tres picos de NEO, originada por GTX6.

## LC Post columna

### ANDALUCIA 2008

#### **Desarrollo del protocolo de cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna**

En 2008 se comenzó a trabajar con el método de detección de toxinas paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con derivatización post-columna (Franco, J.M. & P. Fernández-Villa. 1993. Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35: 613-620.)

Se han empleado diferentes tipos de columnas siguiendo siempre las pautas marcadas por el procedimiento, con la finalidad de buscar una detección eficaz de la toxicidad. Se valoran para ello: la separación de los picos en los cromatogramas y un tiempo adecuado de duración del análisis.

Como se mencionó con anterioridad, se diseñó un sistema de reacción post-columna termostático. Se realizó con un recipiente de cristal en el que se sumergieron unos 7 metros de tubo de peek de 0,5 mm de diámetro interno. Se incluyó en este sistema la recirculación por circuito cerrado de agua con temperatura controlada a 50° C.

En el reactor se provocó la oxidación, mediante la adición de un oxidante en medio básico, que incrementa la señal de las toxinas separadas. Posteriormente, una vez finalizado el paso de la muestra por el reactor, se debe estabilizar la misma añadiéndole un ácido, previo al detector fluorimétrico.

El amplio grupo de toxinas que responde a la denominación de paralizantes, deben agruparse para poder realizar una separación adecuada. Existen distintas formas de agruparlas atendiendo a su estructura química, como por ejemplo separar el grupo de los derivados de la saxitoxina de las del grupo de la gonyatoxina o de las del grupo de las sulfocarbamoil.

Para poder detectarlas este método hace uso de tres tipos de fases móviles, aunque en las modificaciones actuales están encaminadas al empleo de dos de ellas:

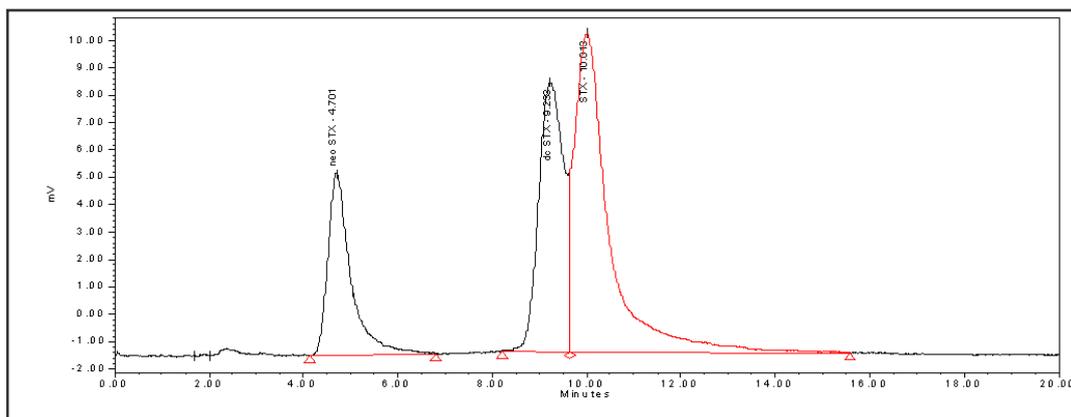
- Primer eluyente: formado por un 95% de ácido octalsufónico 0.5 mM, en 10 mM de fosfato amónico (pH 7.2) y 5 % Acetonitrilo. Con esta fase móvil se determinan las toxinas del grupo de la saxitoxinas (STX).
- Segundo eluyente: 1.5 mM de ácido octalsufónico en 10 mM de fosfato amónico (pH 7). Con esta fase móvil se determinan las toxinas del grupo de la Gonyautoxinas (GTX).

Dentro del grupo de las saxitoxina, que emplea el primer eluyente para su determinación nos encontramos entre otras con:

- Neosaxitoxina (neoSTX).

- Decarbamoil-neosaxitoxina (dcneoSTX).
- Decarbamoil-saxitoxina (dcSTX).
- Saxitoxina (STX).
- 

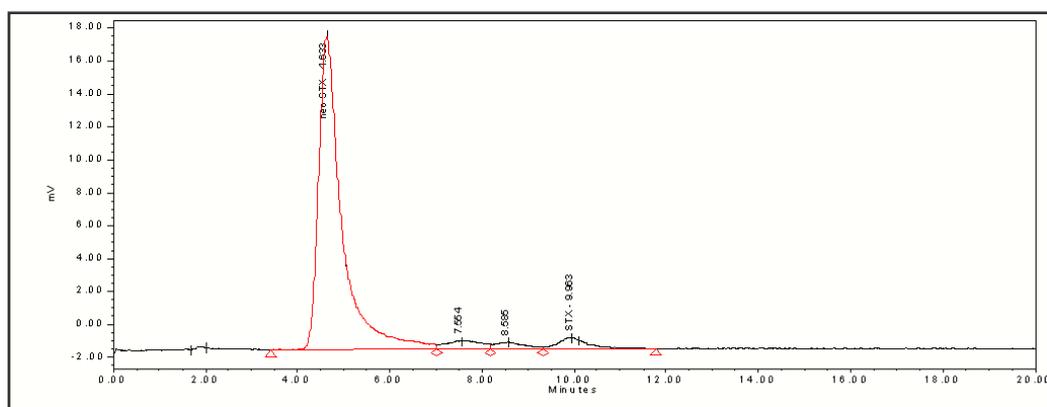
En este grupo ha existido la dificultad de no poder hacer una separación adecuada entre las toxinas neoSTX y dcneoSTX, al eluir en un tiempo de retención muy cercano o coeluir. Además la dcSTX y la STX presentan picos muy cercanos que dificultan la correcta separación de los mismos.



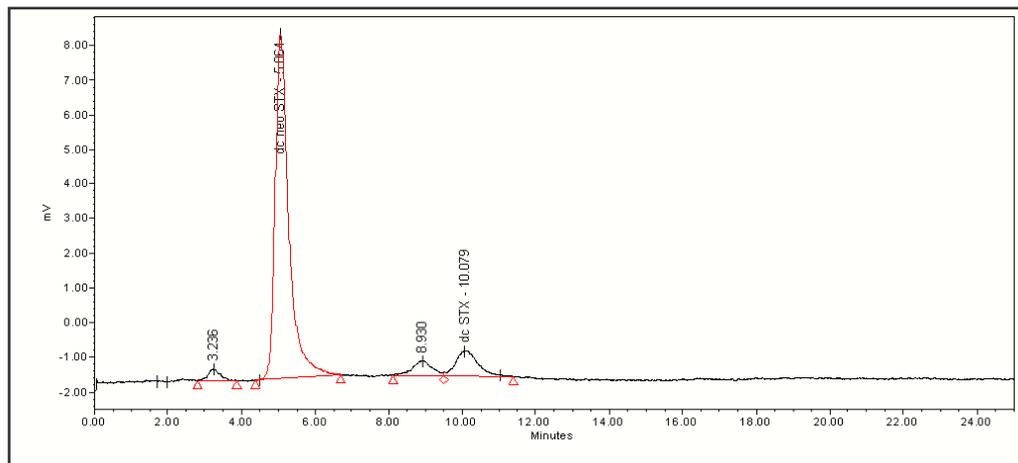
**Figura 34:** neoSTX / dcneoSTX / dcSTX / STX

Podemos destacar de este cromatograma unos tiempos de retención apropiados. Se muestra además la incapacidad de separar neoSTX de dcneoSTX.

En los siguientes cromatogramas se observan las toxinas neoSTX y dcneoSTX analizadas de forma independiente:



**Figura 35:** neoSTX. Se detecta STX, coincidiendo con la presencia de impureza de esta toxina indicada por el proveedor del material de referencia.

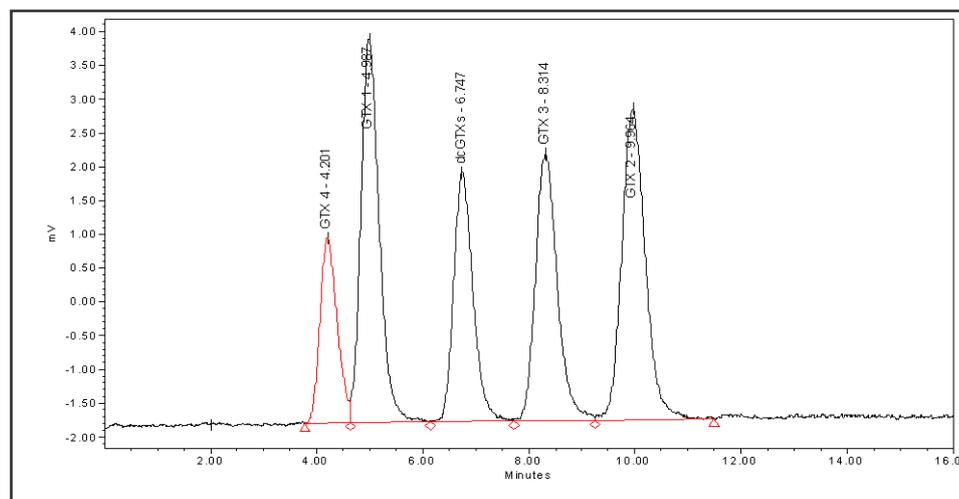


**Figura 36:** dcneoSTX. Se detecta dcSTX, coincidiendo con la presencia de impureza de esta toxina indicada por el proveedor del material de referencia.

Dentro del grupo de las gonyautoxinas, que emplea el **segundo eluyente** para su determinación nos encontramos entre otras con:

- Gonyautoxina-1 (GTX-1).
- Gonyautoxina-2 (GTX-2).
- Gonyautoxina-3 (GTX-3).
- Gonyautoxina-4 (GTX-4).
- Gonyautoxina-5 (GTX-5).
- Gonyautoxina-6 (GTX-6).
- Decarbamoil- gonyautoxina 2-3(dcGTX 2-3).

En este grupo se observa un cromatograma con los picos bien separados y definidos. También podemos hacer una valoración positiva de los tiempos de retención.



**Figura 37:** GTX-4 / GTX-1 / dcGTX 2-3 / GTX-3 / GTX-2

En ambos casos la columna empleada con mejores resultados, a falta de nuevas pruebas, y con la que se obtuvieron estos cromatogramas ha sido: Xterra MS C18 Column 5 $\mu$ m, 3.0x100 mm.

Se han obtenido cromatogramas empleando materiales de referencia, muestras expuestas a episodios tóxicos naturales, con valores conocidos de toxicidad mediante bioensayo de ratón, y extractos tóxicos obtenidos a partir de cultivos de fitoplancton realizados y mantenidos en el L.C.C.RR.PP.

A grandes rasgos podemos decir que la mayor dificultad ha sido la ocasionada por el funcionamiento del equipo en sí, dadas las características de un sistema con 7 metros adicionales de recorrido, que influye en la limpieza de los conductos y por lo tanto en la presión del conjunto.

Por esta razón se han probado diferentes formas de limpieza y mantenimiento de los conductos del equipo de cromatografía así como el tratamiento de los reactivos en uso: filtrados, caducidad etc, buscando optimizar el uso del sistema.

Los resultados que fundamentalmente marcan el trabajo realizado durante el primer año del presente proyecto JACUMAR son los referidos a la puesta a punto del método de detección de toxinas paralizantes por HPLC con derivatización post-columna (Franco, J.M. & P. Fernández-Villa. 1993. Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35: 613-620.)

Sin llegar a obtener un perfil definido de las toxinas presentes en las diversas especies de moluscos bivalvos y fitoplancton analizadas, sí se han obtenido modelos de cromatogramas que se repiten en extracciones realizadas de la misma muestra, siendo muy estables los tiempos de retención.

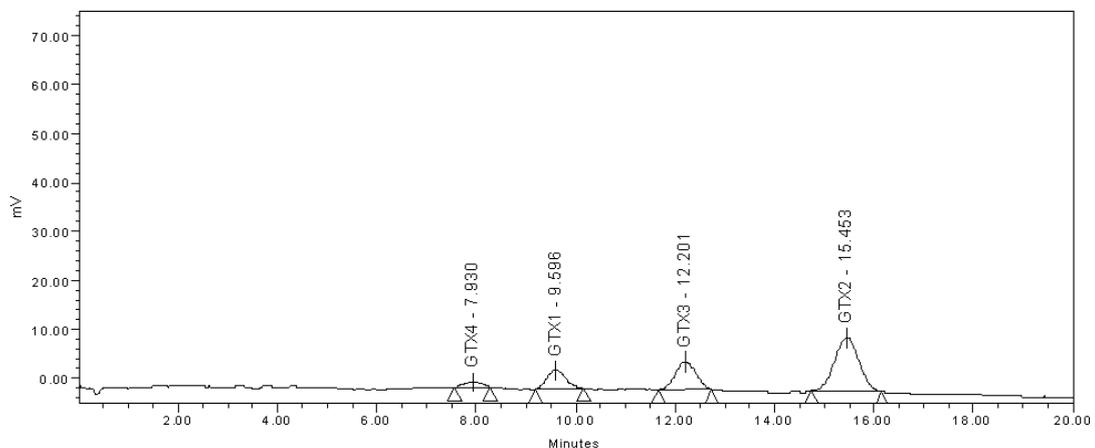
A continuación se presenta algunos resultados obtenidos para muestras tanto de moluscos bivalvos como en extracciones realizadas a partir de cultivos de fitoplancton del L.C.C.RR.PP.

## **GALICIA 2008**

Se procedió a la determinación de los perfiles de toxinas de diferentes cultivos de *Alexandrium* con el objeto de producir suficiente cantidad de biomasa para generar extractos, susceptibles de ser suministrados a los otros laboratorios para sus correspondientes ensayos, estudios de reproducibilidad, sensibilidad y rango de linealidad.

Cepas/Toxinas	C1	C2	GTX4	GTX1	GTX3	GTX2	neoSTX	STX
<i>A. fundyense</i> (CCMP1719)	+	++++	++	+	++	+	++	+
<i>A. minutum</i>								
(AL1V) Vigo			++		+			
(AL2V) Vigo			++		++	+		
(AL3V) Vigo			+					
(VGO650) Vigo	+	+			+++	+		
(VGO651) Vigo	+	+			+++	+		
(AMP4) Mallorca			+++	+	+	+		
(AL18A) Portugal			+++		+++	++		
(AMITA) Italia			+		+	+		
(AMAD021) Australia			+++	+	+++	+		

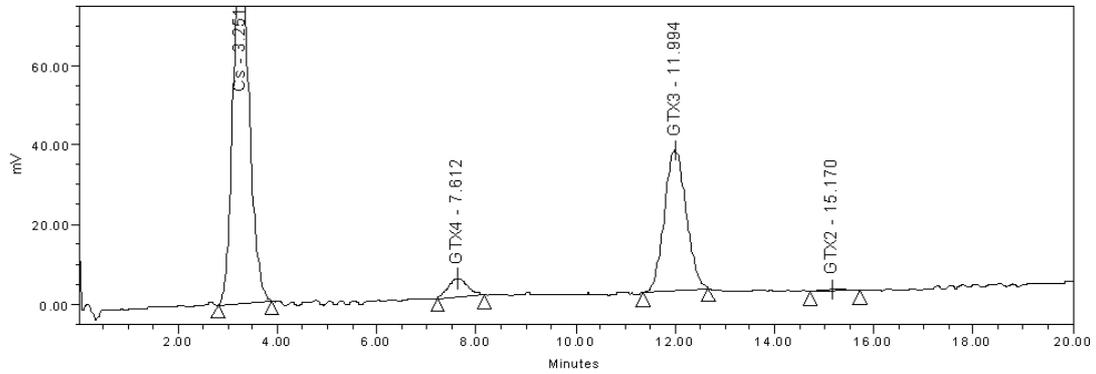
**Tabla 18.** Perfiles de toxinas en diferentes cepas de *Alexandrium* spp. El símbolo + indica cantidad relativa de toxinas.



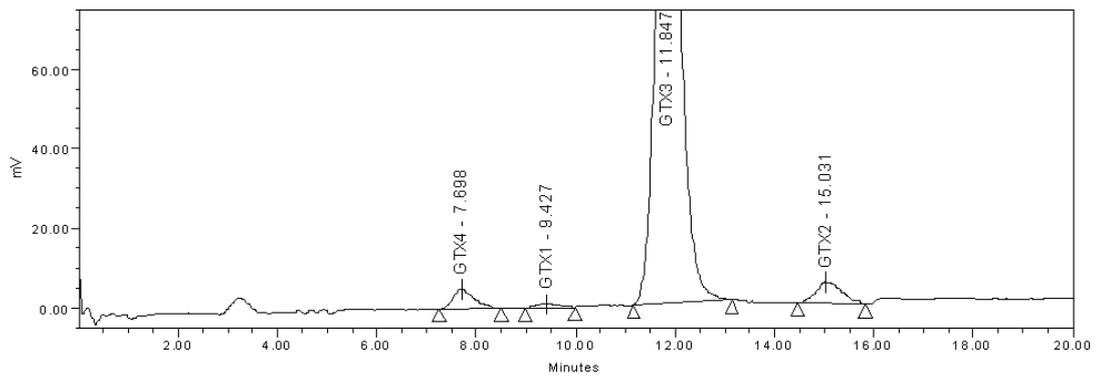
**Figura 38.** 15µL GTXs

Cepas <i>Alexandrium</i>	C1	C2	C3	GTX 4	GTX 1	GTX 3	GTX 2	neoST X	dcST X	STX
<b>AMAD06</b>				0,415						
<b>VGO650</b>	0.02	tr			0,032	1,099	0,195			
<b>AMAD01</b>				0,497	0,161	0,007	0,008			
<b>AMP4</b>				1,115	0,054	0,152	0,03			
<b>A.fundy1719</b>	0.11	1.1	0.15							0,94
<b>AMAD21</b>		0	9	2,609		0,839	0,03	8,97		4
<b>AMAD21</b>				1,296	0,06	0,004	0,008			
<b>Molusco</b>										
<b>AlmejaINTECMAR40</b>										
<b>0</b>						0,189	0,2			
<b>AlmejaINTECMAR95</b>										
<b>0</b>				0,034	0,536	0,445				

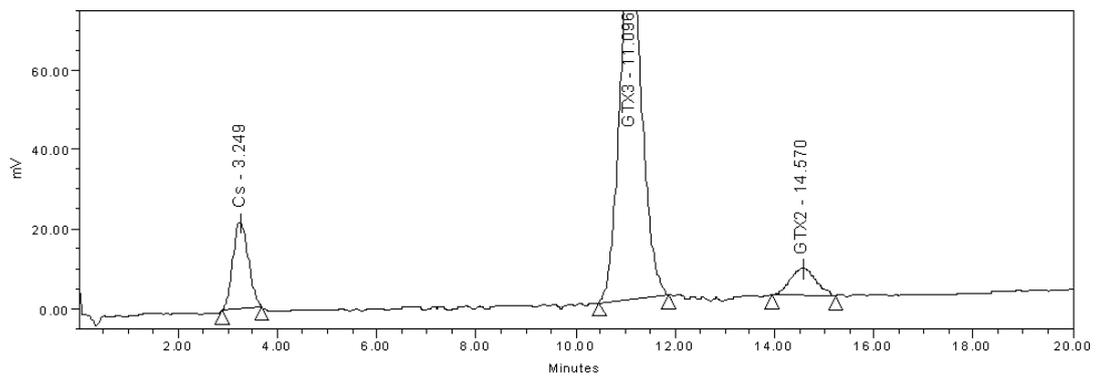
**Tabla 19.** Perfiles de toxinas en diferentes cepas de *Alexandrium* spp.



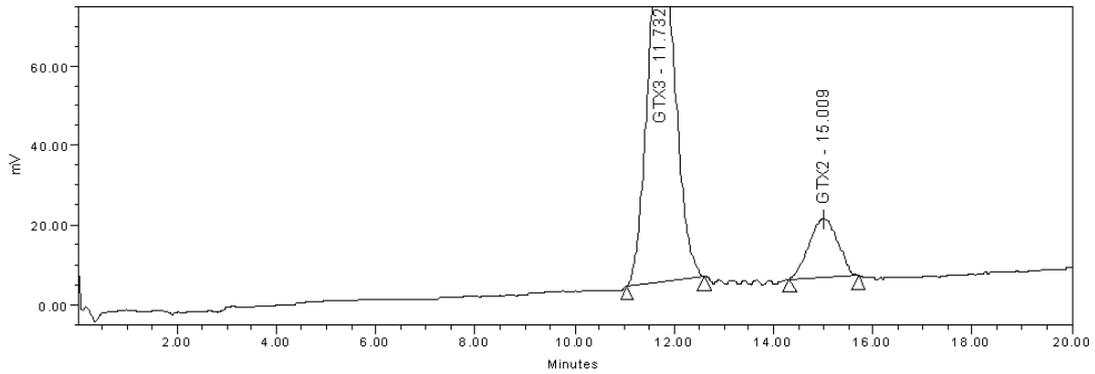
**Figura 39.** 39.5µL *A. fundyense* (CCMP 1719)



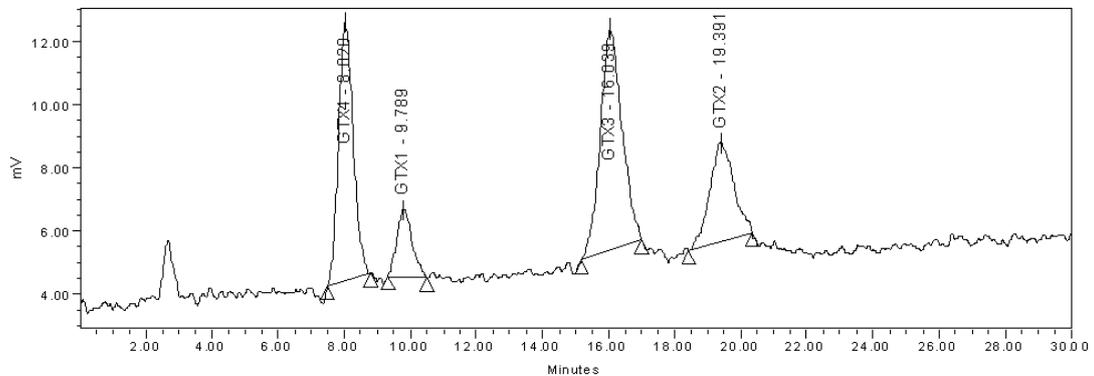
**Figura 40.** 40.10µL *A. fundyense* (CCMP 1719) hidrolizado



**Figura 41.** 10µL VGO650

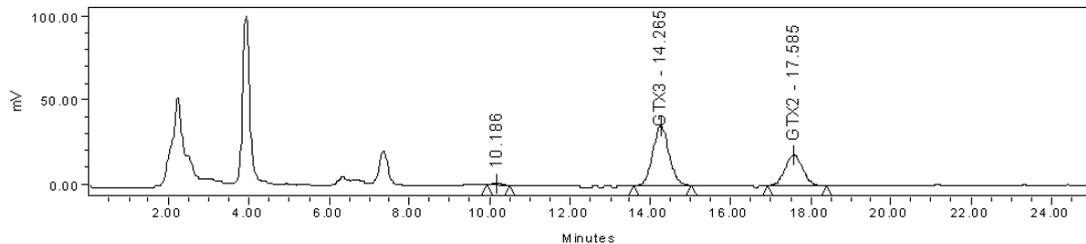


**Figura 42.** 20µL VGO650 hidrolizado



**Figura 43.** AL18A

En la almeja aparece un interferente de la GTX4 aproximadamente en el minuto 7.5. En el próximo año del proyecto se trabajará sobre la eliminación de dicho interferente mediante técnicas de extracción de fase sólida siguiendo la bibliografía al respecto.



**Figura 44.** Almeja INTECMAR 400

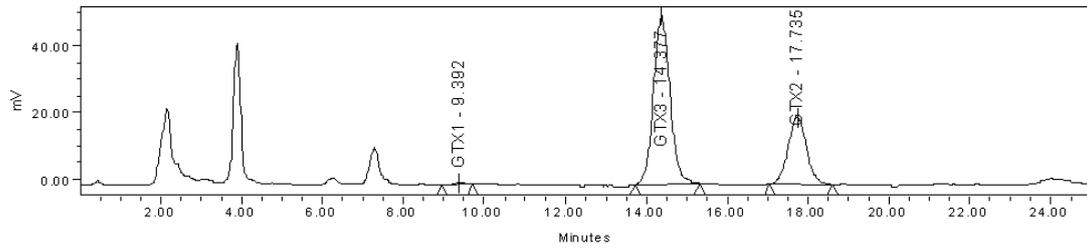


Figura 45. Almeja INTECMAR 950

**Moluscos bivalvos:**

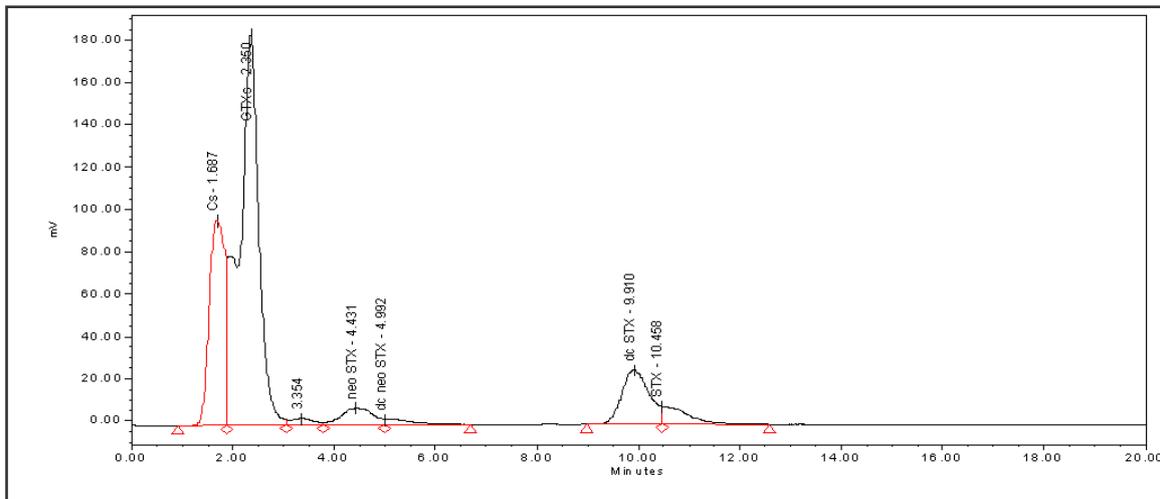


Figura 46: Muestra de mejillón. Extracción sin diluir. Eluyente primero.

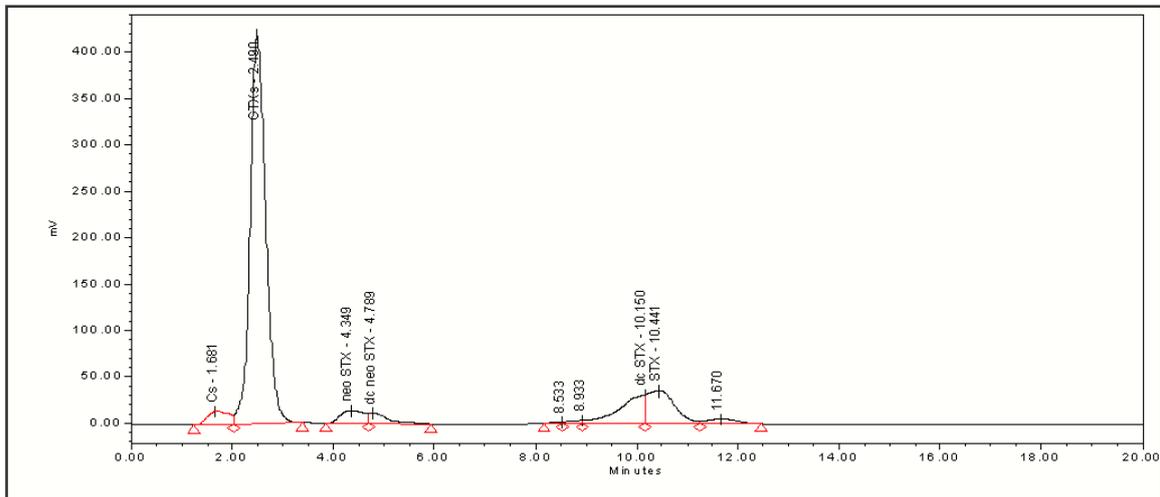
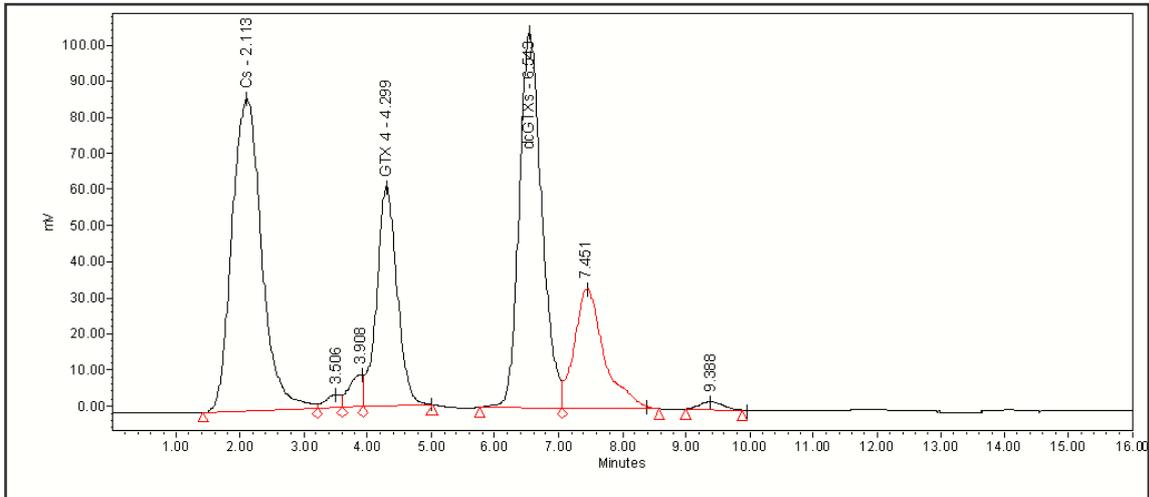
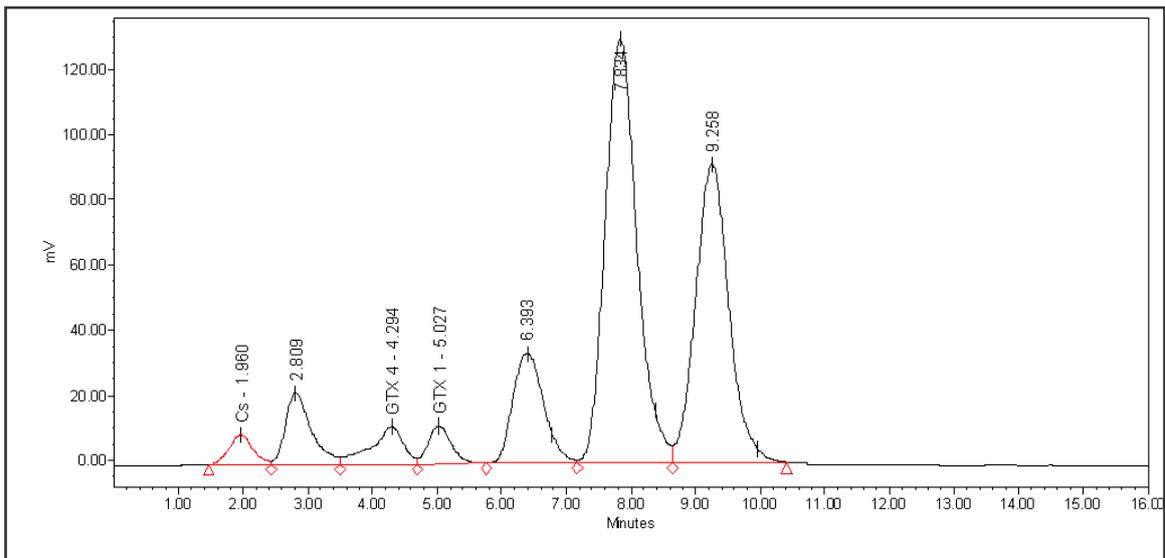


Figura 47: Muestra de mejillón. Extracción hidrolizada. Dilución 1/2. Eluyente primero.

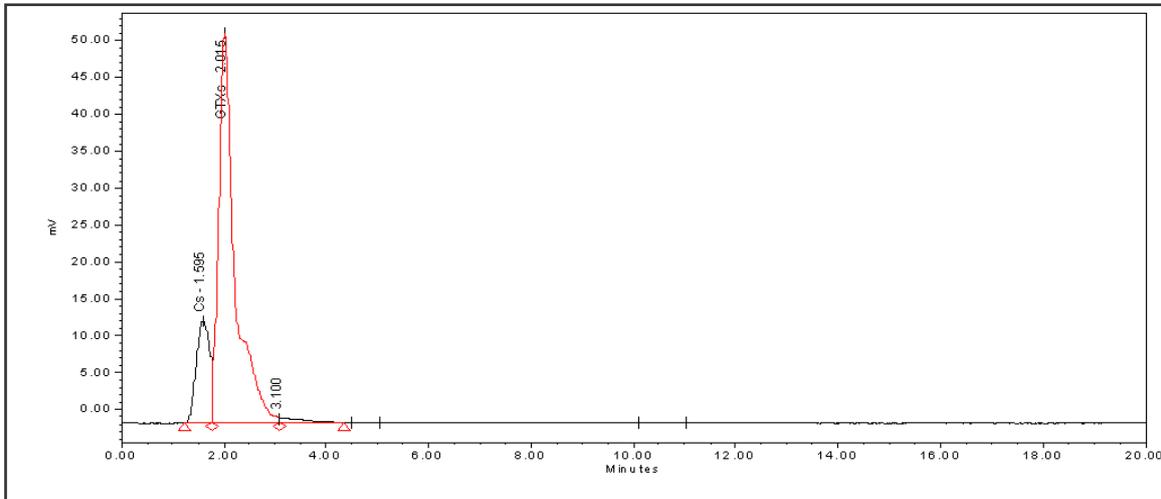


**Figura 48:** Muestra de mejillón. Extracción sin diluir. Eluyente segundo

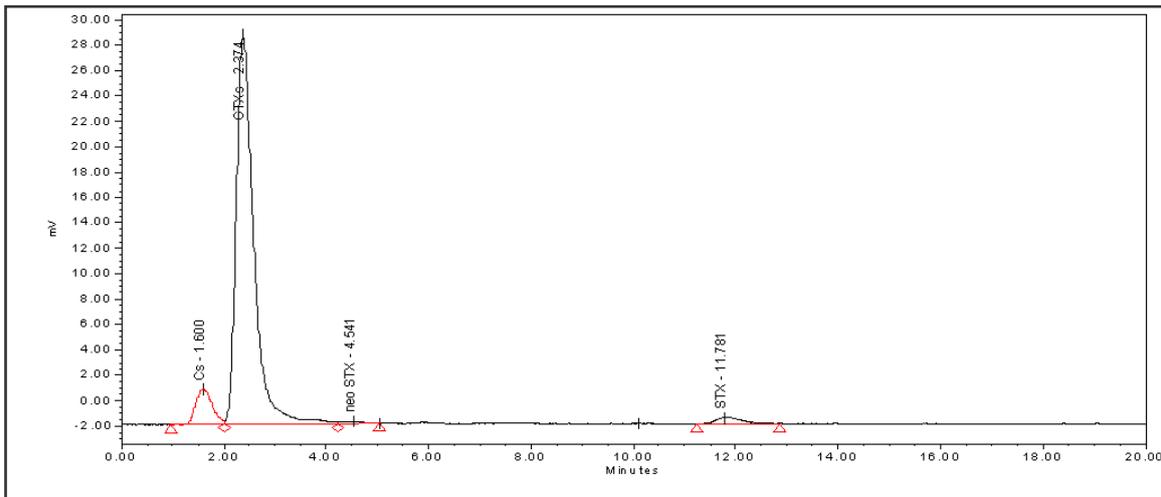


**Figura 49:** Muestra de mejillón. Extracción hidrolizada. Dilución 1/2. Eluyente segundo.

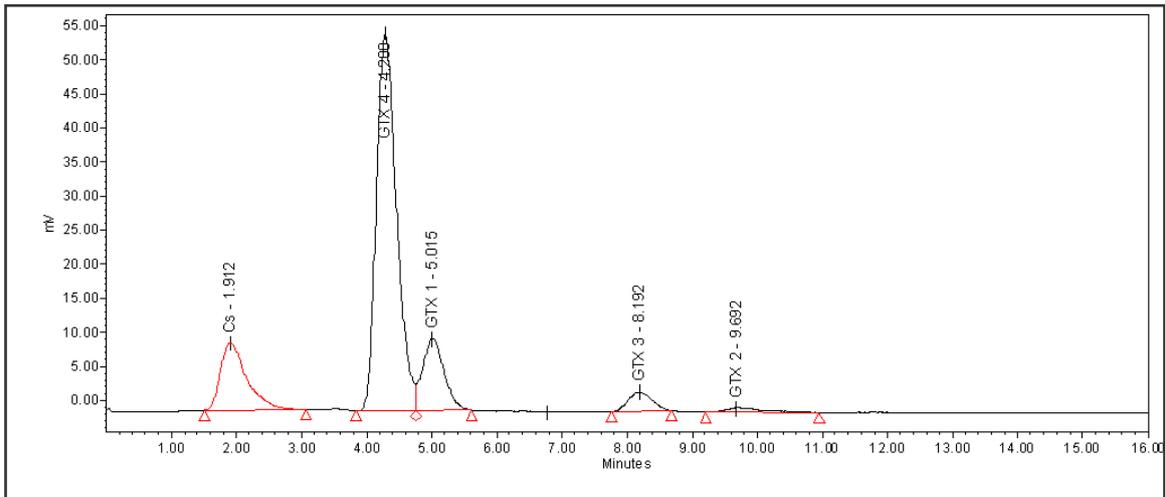
**Fitoplancton:**



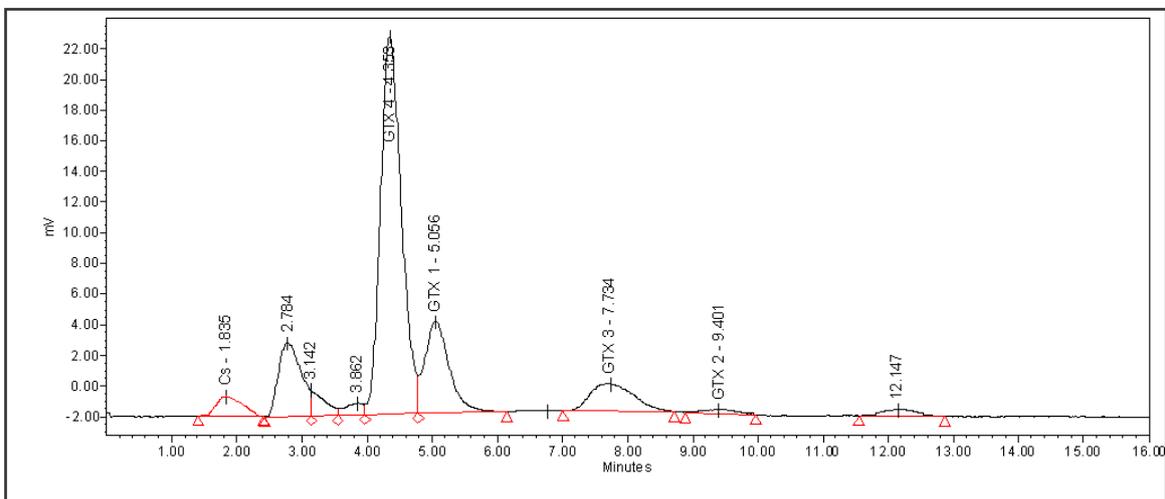
**Figura 50:** Muestra de *Alexandrium minutum*. Extracción sin diluir. Eluyente primero.



**Figura 51:** Muestra de *Alexandrium minutum*. Extracción hidrolizada. Dilucción 1/2. Eluyente primero



**Figura 52:** Muestra de *Alexandrium minutum*. Extracción sin diluir. Eluyente segundo.



**Figura 53:** Muestra de *Alexandrium minutum*. Extracción hidrolizada. Dilucción  $\frac{1}{2}$ . Eluyente segundo.

## CATALUNYA 2008

Esta técnica está puesta a punto y lista para ser utilizada en los ejercicios intercomparativos que se quieran emprender por parte del grupo del Institut de Ciències del Mar (ICM) del CSIC. Adicionalmente, el IRTA ya dispone del equipamiento necesario para ejecutarla, pero su puesta a punto será posterior a la del método de derivatización pre-columna; está prevista una estancia de formación del personal implicado en el IEO de Vigo, con el grupo del Dr. Franco.

## ANDALUCIA 2009

A lo largo de 2009 y como continuación de lo que ya se consiguió en 2008 en el que se comenzó a implementar el método, se ha finalizado la puesta a punto del protocolo de cromatografía con derivatización post-columna: preparación de muestras, reactivos y fases móviles, funcionamiento y manejo del equipo, etc

Durante 2009 se emplearon diferentes tipos de columnas, siguiendo siempre las pautas marcadas por el procedimiento, con la finalidad de buscar una detección eficaz de la toxicidad y continuando así lo que se había comenzado en 2008. Se valoraron para ello: la separación de los picos en los cromatogramas y un tiempo adecuado de duración del análisis.

Finalmente y antes de comenzar con la sistemática de análisis para el estudio final del Proyecto se ha optado por el empleo de la columna de Agilent Technologies, "Bonus-RP, 5 $\mu$ , 4.6x150mm, HPLC column", por ser en esta donde se obtienen mejores resultados, fundamentalmente en la separación de picos del grupo de las GTXs.

A continuación se presentan unos cromatogramas en los que aprecian las diferencias que aparecen entre los diferentes tipos de columnas empleadas:

Las Figuras 54 y 55 muestran los cromatogramas de cada grupo de toxinas utilizando la columna: Xterra MS C18 Column 5 $\mu$ m, 3.0x100 mm.

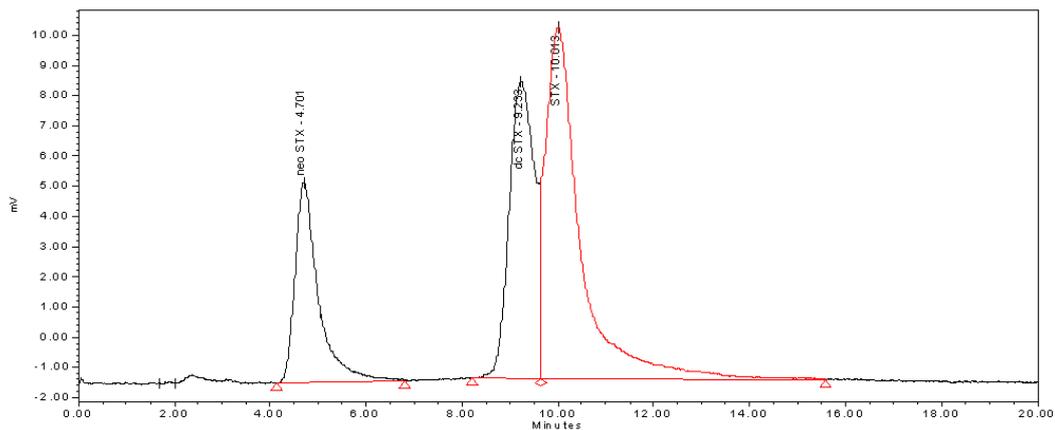
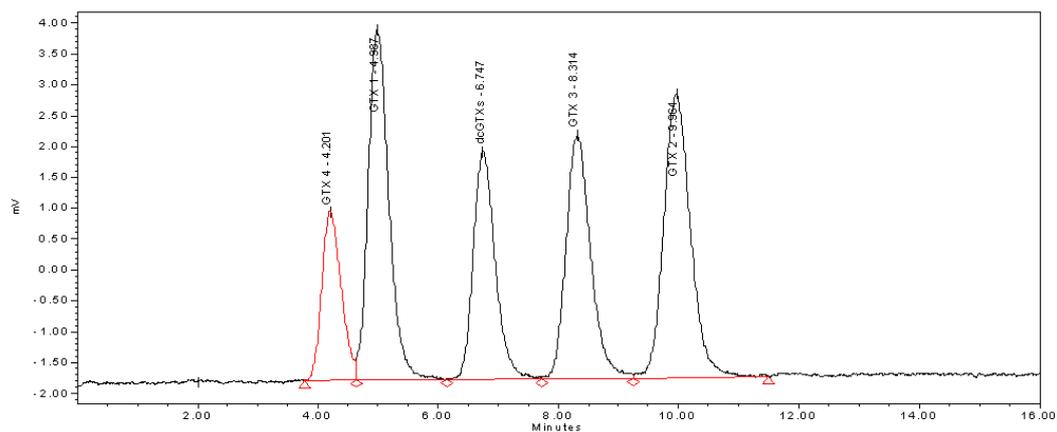
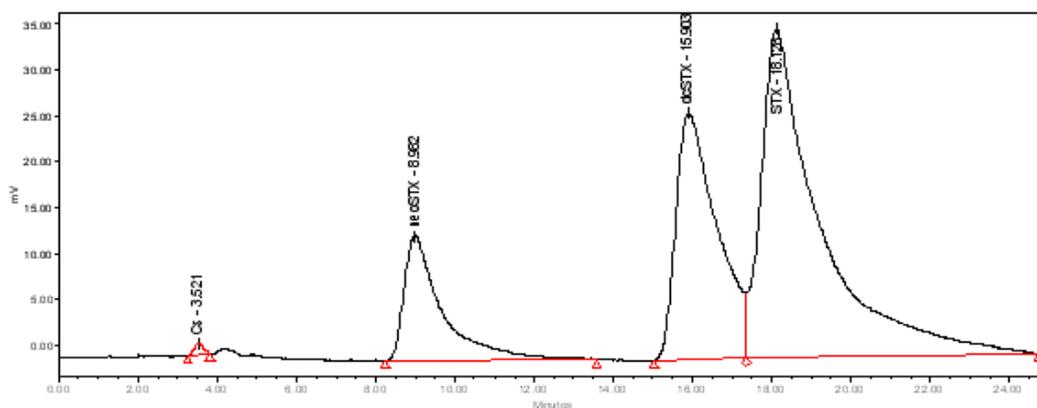


Figura 54: neoSTX / dcneoSTX / dcSTX / STX

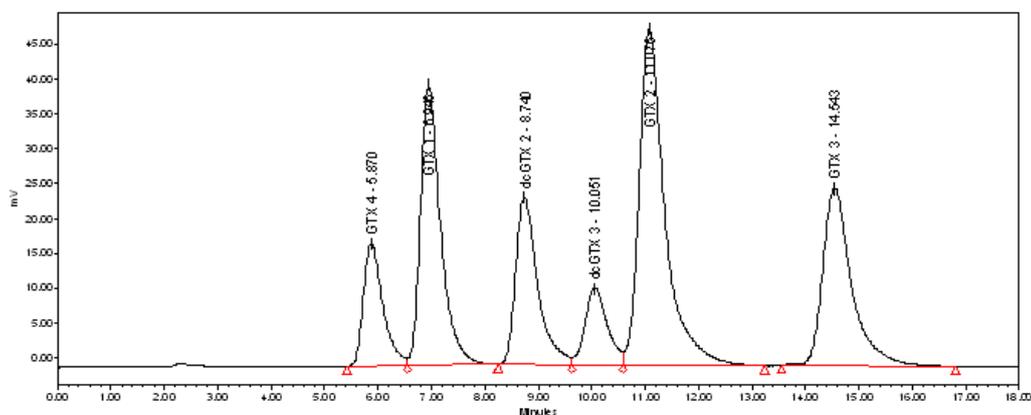


**Figura 55:** GTX-4 / GTX-1 / dcGTX 2-3 / GTX-3 / GTX-2

Las Figuras 56 y 57 muestran los cromatogramas de cada grupo de toxinas utilizando la columna: Bonus-RP, 5 $\mu$ , 4.6x150mm, HPLC column.



**Figura 56:** neoSTX / dcneoSTX / dcSTX / STX



**Figura 57:** GTX-4 / GTX-1 / dcGTX 2/ dcGTX 3 / GTX-3 / GTX-2

Entre las diferencias destacables en el empleo de ambas columnas está una mejor separación de los picos en ambos grupos, especialmente detectable en la dcGTX2-3 que coeluyen en el primer tipo de columna (Figura 55) apareciendo separadas en el segundo (Figura 57).

Sin embargo los tiempos de retención son mayores en el caso de la columna Bonus frente a la Xterra en ambos casos.

### **Creación de un procedimiento interno de cálculo de toxicidad en las muestras**

El hecho de que las toxinas paralizantes sean tan numerosas y presenten diferentes grados de toxicidad ha sido un obstáculo a la hora de cuantificar la toxicidad de una muestra.

El cálculo de la toxicidad total de una muestra, se ha sistematizado con la creación de unas hojas de cálculo que ayudan a realizar la cuantificación de la toxicidad en equivalentes de saxitoxina a partir de las concentraciones de cada una de ellas detectadas por cromatografía. De esta forma se facilita el trabajo a la hora de procesar un número mayor de muestras, a la vez que resulta una herramienta útil para determinar el perfil tóxico de las diferentes matrices en estudio, así como de las diferentes especies de fitoplancton causantes de la toxicidad PSP en los moluscos, como las diferentes cepas de *G.catenatum* o *A. minutum*.

En la figura 58 se muestra un ejemplo de determinación de toxicidad PSP empleando las hojas de cálculo mencionadas:

MUESTRA: Mejillón ( <i>G. Catenatum</i> )		RESULTADO MBA: 10773												
TOXINAS	ISO I		ISO II		DILUCIONES EMPLEADAS		Resultados totales		DATOS DE CALIBRACIÓN		µg tox/Unidad de área	Resultados totales µg de Tox	Vol. Pinchado	µg/mL
	Datos mtra original	Datos mtra hidroliz	Datos mtra original	Datos mtra hidroliz	Original	Hidroliz	en el vol. en µL pinchados	ÁREA	µg tox en el vol. Pinchado	área en Vol. Pinchado				
neoSTX	756171	2496702			ISO I		neoSTX	756171	0,0137	617358	2,22E-08	0,01678	10	1,67805
dcSTX	25808				Original	Hidroliz	dcSTX	25808	0,0053	2626366	2,02E-09	5,21E-05	10	0,00521
STX	0	3E+07			1	1	STX	0	0,0065	2712478	2,4E-09	0	10	0
GTX6		1740531					GTX6	2E+06	0,0137	617358	2,22E-08	0,038625	10	3,86247
GTX4			2603617	256224			GTX4	3E+06	0,0048	356195	1,35E-08	0,035086	10	3,50858
GTX1			621950	966392			GTX1	621950	0,01454	874387	1,66E-08	0,010342	10	1,03423
dcGTX2			5040225				dcGTX2	5E+06	0,00122	380541	3,21E-09	0,016159	10	1,61588
dcGTX3			1,6E+07				dcGTX3	2E+07	0,00034	397166	8,56E-10	0,013474	10	1,34737
GTX5		3E+07					GTX5	3E+07	0,0065	2712478	2,4E-09	0,070769	10	7,07689
GTX3			1201241	3E+07			GTX3	1E+06	0,00103	884247	1,16E-09	0,001399	10	0,13992
GTX2			1390418	4E+07	ISO II		GTX2	1E+06	0,00311	998569	3,11E-09	0,00433	10	0,43304
C1				4E+07	Original	Hidroliz	C1	4E+07	0,00311	998569	3,11E-09	0,116533	10	11,6533
C2				3E+07	1	1	C2	3E+07	0,00103	884247	1,16E-09	0,030915	10	3,09149
C3				344442			C3	344442	0,01454	874387	1,66E-08	0,005728	10	0,57277
C4				-2E+06			C4	-2E+06	0,0048	356195	1,35E-08	-0,031633	10	0

µg/mL	11,653	3,0915	0,5728	0	3,5086	1,0342	1,6159	1,3474	7,0769	0,1399	0,433	0,0052	0	3,8625	1,678
PMbl	475,4	475,4	491,4	491,4	411,4	411,4	352,3	352,3	379,4	395,4	395,4	356,3	299,3	395,4	315,3
µM	24,513	6,5029	1,1656	0	8,5284	2,5139	4,5866	3,8245	18,653	0,3539	1,0952	0,0146	0	9,7685	5,3221
UR/µM	15	239	33	143	1803	2468	935	935	160	1584	892	1274	2483	160	2295
C x T	367,69	1554,2	38,464	0	15377	6204,4	4288,5	3575,9	2984,5	560,55	976,91	18,622	0	1563	12214
calibración con patrones NRC	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Constante	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
C x T x F x 0,03	11,031	46,626	1,1539	0	461,3	186,13	128,66	107,28	89,534	16,816	29,307	0,5587	0	46,889	366,42
Σ C x T x F x 0,03	1363														
														µg eq STX.2HCL/Kg	13630

Figura 58: Ejemplo de cuantificación en toxicidad PSP en muestra de mejillón empleando hojas de

cálculos para muestras.

El cálculo se basa en:

$$\mu\text{gSTXdiHCl} / 100\text{g} = \sum_{i=1}^n C_i * T_i * F * 0,03$$

Según "Supplemental information for PSP toxin CRMs" de NRC-CNRC Institute for marine biosciences.

Donde:

$C_i$  es la concentración de la toxina  $i$  en micromoles por litro, ( $\mu\text{M}$ );

$T_i$  es la toxicidad específica de la toxina en Unidad Ratón por micromol, ( $\text{UR}/\mu\text{M}$ );

$F = 1,00$  (para el bioensayo en ratón con datos calibrados con la solución de calibración de la NRC)

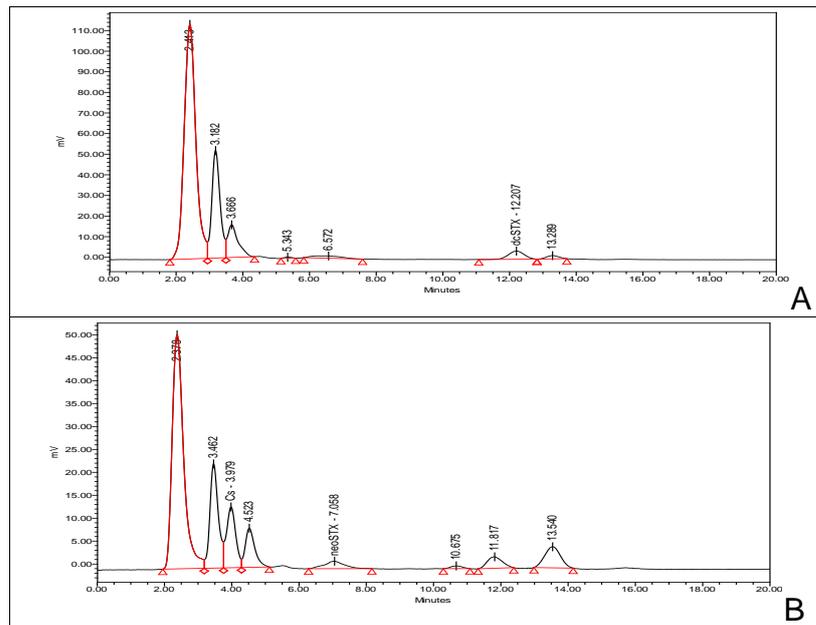
Para expresar los datos como equivalentes de dihidrocloruro de saxitoxina, tenemos que tener en cuenta el valor de toxicidad específica de la saxitoxina, 2483  $\text{UR}/\mu\text{M}$ , y su peso molecular, así como el volumen final de la extracción y el peso de la muestra. Al ser valores fijos obtenemos un valor constante: 0.03.

Se ha conseguido cumplir con los objetivos marcados en relación al método para la detección de toxinas paralizantes por cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna: puesta a punto completa del método, con pruebas y elección de la columna más adecuada a nuestro sistema actual además de la sistematización del cálculo de toxicidad en las muestras a partir de los valores de área obtenidos por cromatografía.

Se analizaron muestras de diferentes especies cuyo valor se obtuvo previamente empleando el bioensayo de ratón. Estas muestras fueron más tarde valoradas empleando las hojas de cálculo, obteniendo resultados coherentes por cromatografía.

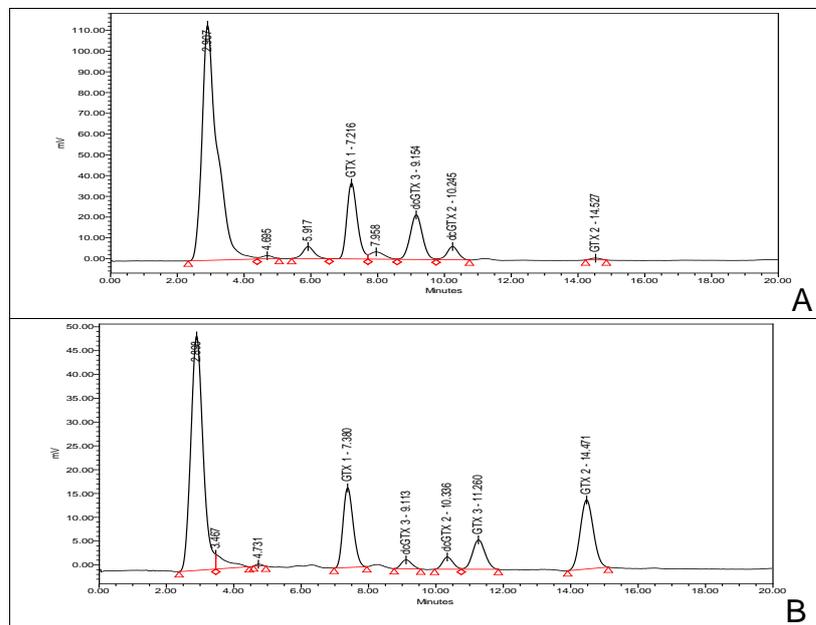
También se analizaron tres muestras de un Ejercicio Intercomparativo en el que participó el laboratorio con el fin de comprobar el funcionamiento de las hojas de cálculo con datos externos al propio laboratorio, obteniéndose un valor de  $z$ -score aceptable.

A continuación se presenta algunos cromatogramas obtenidos para muestras de diferentes especies



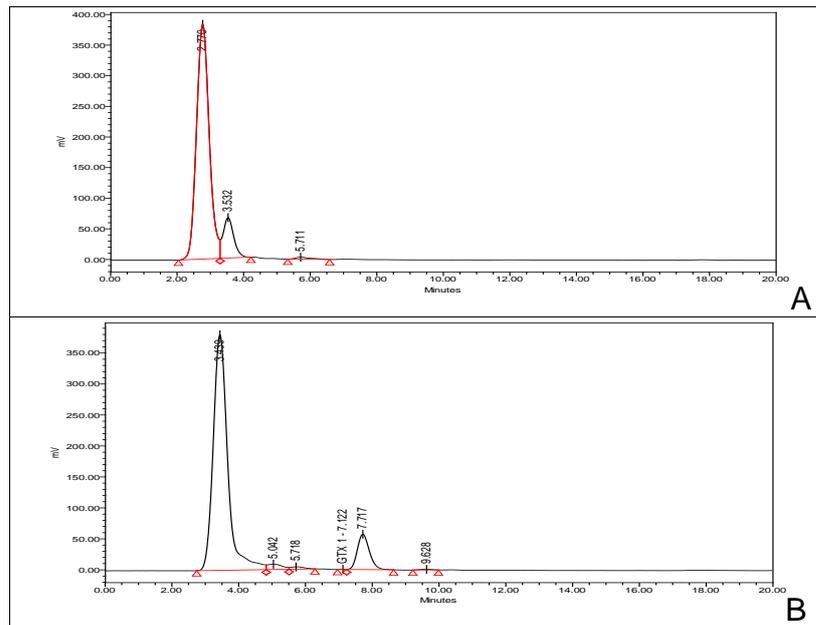
**Figura 59:** Cromatogramas obtenidos de una muestra de mejillón empleando el eluyente primero

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada.



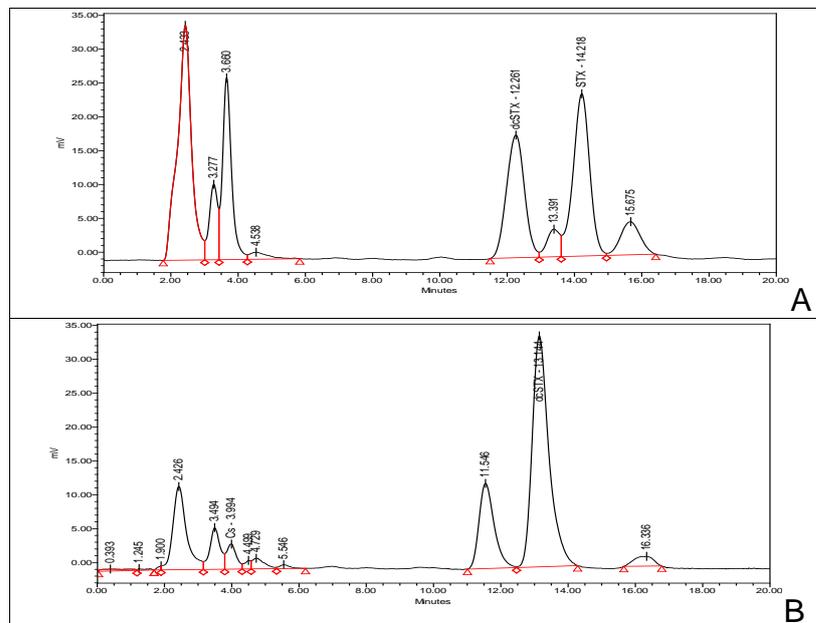
**Figura 60:** Cromatogramas obtenidos de una muestra de mejillón empleando el eluyente segundo.

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada.



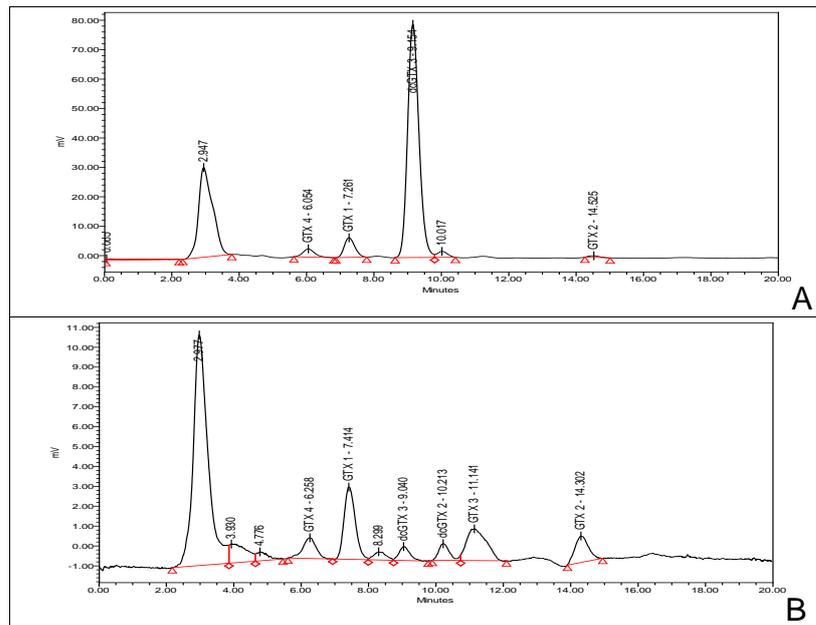
**Figura 61:** Cromatogramas obtenidos de una muestra de mejillón sin post columna

**A:** Eluyente primero. **B:** Eluyente segundo.



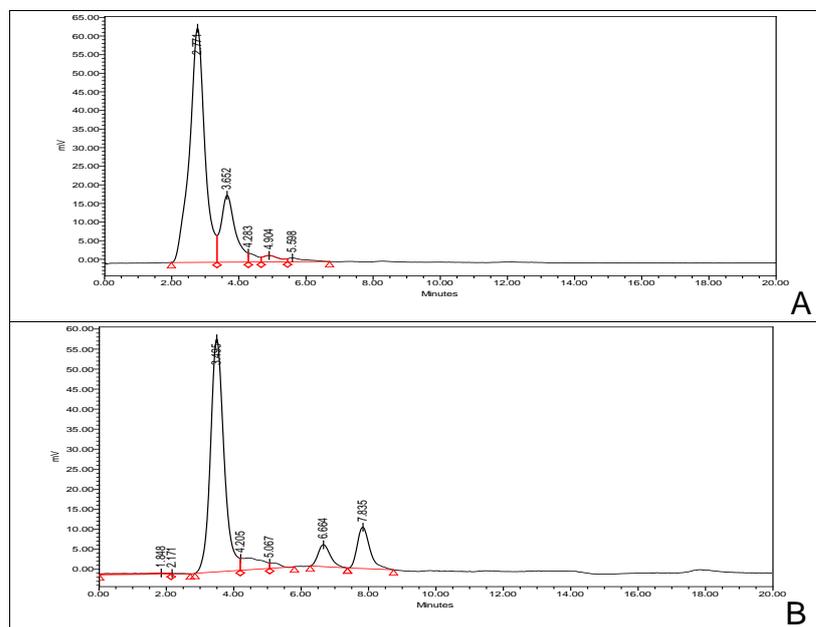
**Figura 62:** Cromatogramas obtenidos de una muestra de corruco empleando el eluyente primero

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada



**Figura 63:** Cromatogramas obtenidos de una muestra de corruco empleando el eluyente segundo.

**A:** muestra sin diluir. **B:** muestra hidrolizada.



**Figura 64:** Cromatogramas obtenidos de una muestra de corruco sin post columna

**A:** Eluyente primero. **B:** Eluyente segundo.

En las figuras 59, 60 y 61 se muestran los cromatogramas de una muestra de mejillón, procedente del litoral andaluz y expuesta de forma natural a G.

*catenatum*. Mediante bioensayo de ratón se obtuvo un resultado próximo al nivel de cuantificación (400 µg eq STX.2HCL/Kg).

Las siguientes figuras, 62, 63 y 64 muestran los resultados de una muestra de corruco, también procedente del litoral andaluz y expuesta naturalmente a *G. catenatum*. Al realizarse el análisis para la detección de toxinas paralizantes se obtuvo un resultado entre los 400 y 800 µg eq STX.2HCL/Kg.

## GALICIA 2009

Se ha trabajado en la optimización de esta técnica a nivel de separación y de cuantificación utilizando las columnas que se enumeran a continuación:

Xbridge	C18	150x 2.1 mm	5µ.
Sunfire	C18	100 y 150 x 2.1 mm	3,5µ.
Kinetex	C18	50 y 100 x 3 mm	2.6µ
Acquity BEH		100x 2.1 mm	1,7 µ

Las faseS móviles empleadas fueron las mismas para todas ellas y consistieron en:

A: 1,5mM Octansulfónico en 10 mM Fosfato Amónico a pH 7,1

B: 94%A: 6% Acetonitrilo

Se ha trabajado a temperaturas entre 30 y 40°C utilizando un sistema de isocráticos encadenados.

Se concluye que solamente las columnas Kinetex parecen adecuarse al objetivo de separación y cuantificación de forma razonable. Las otras columnas no separan tan bien. Las de partículas más pequeñas tienden a ensuciarse muy rápidamente perdiendo eficacia con mucha facilidad.

El siguiente paso será adquirir columnas Kinetex de 5µ y 150 mm y compararlas con las actuales de 50 y 100 mm y 2.6µ.

## CATALUNYA 2009

El IRTA ya dispone del equipamiento necesario para ejecutarla, pero su puesta a punto será posterior a la del método de derivatización pre-columna; está prevista una estancia de formación del personal implicado en el IEO de Vigo, con el grupo del Dr. Franco. De no poder implementarse la técnica dentro del plazo de ejecución del proyecto, se plantean alternativas como mandar las muestras a analizar en los comparativos a grupos de las otras dos CCAA, o desplazarse a los laboratorios para su análisis.

## ANDALUCIA 2011

De los análisis realizados con el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con derivatización post-columna (C.L.A.E. post-columna) se presentan resultados obtenidos realizando los cálculos tanto con los valores de equivalencia de Oshima como con los aceptados por la EFSA.

Además de los cálculos de las toxinas presentes en las diferentes muestras, los resultados se completaron determinando los límites de cuantificación para cada una de las toxinas a partir de la concentración mínima de las diferentes diluciones del material de referencia existente. Los límites empleados son los que se presentan en la tabla 20.

Toxinas	Límite de cuantificación (MU/L)	
	Toxicidad Relativa Oshima	Toxicity Equivalency Factors TEF
C1	0,049	0,049
C2	0,258	0,268
C3	0,976	0,735
C4	1,397	2,425
GTX 4	21,037	20,279
GTX 1	87,226	87,756
dcGTX 2	1,323	1,720
dcGTX 3	0,902	0,959
GTX 5	0,273	0,424
GTX 3	2,055	1,933
GTX 2	3,520	3,919
dcSTX	2,632	2,810
STX	5,380	5,380
GTX 6	0,553	0,829
neoSTX	9,943	5,892

**Tabla 20.** Límite de Cuantificación de las toxinas para la determinación de toxinas paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con derivatización post-columna en el L.C.C.RR.PP.

## *Protocolo de Detección de toxinas Paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Derivatización Post-Columna (LCCRRPP Andalucía)*

### **INTRODUCCIÓN**

El método de referencia establecido en la determinación de las toxinas denominadas paralizantes es el análisis biológico, siendo el Reglamento 2074/2005 el que regula el empleo del método añadiendo que, además de los métodos de análisis biológicos, deben aceptarse métodos de detección alternativos si se demuestra que son tan eficaces como el método biológico y su aplicación proporciona un nivel equivalente de protección de la salud pública.

La posibilidad de emplear métodos alternativos ratifica lo publicado en la Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE). En esta Directiva y en otras normativas comunitarias y españolas posteriores se expone el criterio de no realizar un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio, razonable y factible para obtener el resultado perseguido, y que no implique la utilización de un animal.

Dentro de los métodos alternativos al análisis biológico se encuentra entre otros la determinación de toxinas paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con oxidación post-columna, que ha sido implementado en el desarrollo del proyecto y empleado en la determinación de toxinas paralizantes de las muestras del estudio comparativo.

Es importante resaltar que recientemente ha sido aprobado por la AOAC un nuevo método oficial, OMA 2011.02, de detección de toxinas paralizantes con derivatización post-columna desarrollado por la Canadian Food Inspection Agency (CFIA) y National Research Council (NRC).

### **DESCRIPCIÓN DE LA IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA**

Para implementar el método en el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros se comenzó a trabajar a partir de los datos del método de detección de toxinas paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con derivatización post-columna desarrollado por J. M. Franco y P. Fernández-Villa [1].

Se diseñó un sistema de reacción post-columna termostático, en el que se sumergieron 7 metros de tubo de peek de 0,5 mm de diámetro interno. Se incluyó en este sistema la recirculación por circuito cerrado de agua con temperatura controlada a 50° C.

En el reactor se provoca la oxidación mediante la adición de un oxidante en medio básico, que incrementa la señal de las toxinas separadas. Una vez finalizado el paso de la muestra por el reactor, se le añade ácido para estabilizarla previo al detector fluorimétrico.

Se emplearon diferentes tipos de columnas siguiendo siempre las pautas marcadas por el procedimiento, con la finalidad de buscar una detección eficaz de la toxicidad, valorándose fundamentalmente la separación de los picos en los cromatogramas y el tiempo de duración del análisis:

- Xterra MS C18, 5µm, 3.0x100 mm
- Xterra RP18, 5µm, 4,6 x150 mm
- Ascentis C18, 3µm, 4,6 x150 mm
- Nova-Pack C18, 4µm, 9,9 x150 mm
- Lichrocart RP18, 5µm, 4.0x120 mm
- Bischoff, 5µm, 4,6 x150 mm
- ZORBAS Bonus-RP, 5µ, 4,6x150mm

El grupo de toxinas que responde a la denominación de paralizantes es muy amplio por lo que atendiendo a su estructura química se agruparon para ser detectadas con dos eluyentes diferentes trabajando en sistemas isocráticos independientes:

1. *Primer eluyente:* para determinar las toxinas del grupo de la saxitoxinas (STX), con pH 7.2
2. *Segundo eluyente:* para determinar las toxinas del grupo de la Gonyautoxinas (GTX), con pH 7,0

Dentro del grupo de las saxitoxinas, que emplea el primer eluyente para su determinación nos encontramos con:

- Neosaxitoxina (neoSTX).
- Decarbamoil-neosaxitoxina (dcneoSTX).
- Decarbamoil-saxitoxina (dcSTX).
- Saxitoxina (STX).

El grupo de las gonyautoxinas, que emplea el segundo eluyente para su determinación está formado entre otras por:

- Gonyautoxina-1 (GTX-1).
- Gonyautoxina-2 (GTX-2).
- Gonyautoxina-3 (GTX-3).
- Gonyautoxina-4 (GTX-4).
- Gonyautoxina-5 (GTX-5).
- Gonyautoxina-6 (GTX-6).
- Decarbamoil- gonyautoxina 2-3 (dcGTX 2-3).

## PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

El extracto empleado para la detección de las toxinas paralizantes por el método implementado es el mismo que el empleado para el ensayo biológico, que es en la actualidad el método oficial de referencia de la AOAC establecido en la determinación de toxinas paralizantes [2],

Según éste método las biotoxinas hidrosolubles paralizantes se extraen en caliente en medio ácido de un macerado acuoso de la vianda o carne.

Con el fin de detectar de forma indirecta las toxinas tipo B (gonyaulotoxinas 5 y 6 o B1 y B2 respectivamente) y las tipo C (N-sulfocarbamoil gonyaulotoxinas 2,3,1 y 4 o C1, C2, C3 y C4 respectivamente), se hidroliza el extracto previamente obtenido, en caliente con ácido clorhídrico. Esto permite la transformación de las anteriores toxinas en otras de las que tenemos patrones, y se cuantifican por diferencia entre el extracto inicial y el hidrolizado.

## EQUIPO Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

### *Equipo:*

- Detector fluorescencia Waters 474. lex 330, lem 390
- Autoinyector Waters 717 con temperatura controlada (10° C).
- Bombas fases móviles: 2 Waters 515
- Bombas reacción post-columna: 2 Waters Reagent manager

### *Columna:*

- Columna Bonus-RP, 5 $\mu$ , 4,6x150mm, HPLC column
- Temperatura columna 30°C

### *Fases móviles/ Reacción Post-columna:*

#### **Isocrático 1:**

- 95% de ácido octalsufónico 0.5 mM, en 10 mM de fosfato amónico (pH 7.2) y 5 % Acetonitrilo
- Flujo: 1 mL/min.

#### **Isocrático 2:**

- 1.5 mM de ácido octalsufónico en 10 mM de fosfato amónico (pH 7)

- Flujo: 1 mL/min.

### Reactivos oxidante y acidificantes

- Oxidante: 7 mM ácido peryódico en 50 mM fosfato potásico a pH 9 y a 0.4 m/min.
- Acidificante: ácido acético 0.5M a 0.4 mL/min.

### Reacción post- columna

- Coil Reactor de Peek a 50°C.
- Flujo reactivo oxidante: 0,4 mL/min.
- Flujo reactivo acidificante: 0,4 mL/min.

### *Material de referencia empleado:*

El material de referencia para las toxinas paralizantes se obtuvieron del NRC-CNRC Institute for Marine Biosciences:

- NRC CRM-SXT-d
- NRC CRM-dcSTX
- NRC CRM-NEO-b
- NCR CRM-dcNEO
- NRC CRM-GTX1&4-b
- NRC CRM- GTX2&3-b
- NRC CRM -dcGTX2&3

*Límites de cuantificación obtenidos:*

Se han determinado los límites de cuantificación para cada una de las toxinas a partir de la concentración mínima de las diferentes diluciones del material de referencia existente, obteniéndose los siguientes valores atendiendo al valor de toxicidad relativa empleado:

Toxinas	Límite de cuantificación (MU/L)	
	Toxicidad Relativa Oshima	Toxicity Equivalency Factor TEF
C1	0,049	0,049
C2	0,258	0,268
C3	0,976	0,735
C4	1,397	2,425
GTX 4	21,037	20,279
GTX 1	87,226	87,756
dcGTX 2	1,323	1,720
dcGTX 3	0,902	0,959
GTX 5	0,273	0,424
GTX 3	2,055	1,933
GTX 2	3,520	3,919
dcSTX	2,632	2,810
STX	5,380	5,380
GTX 6	0,553	0,829
neoSTX	9,943	5,892

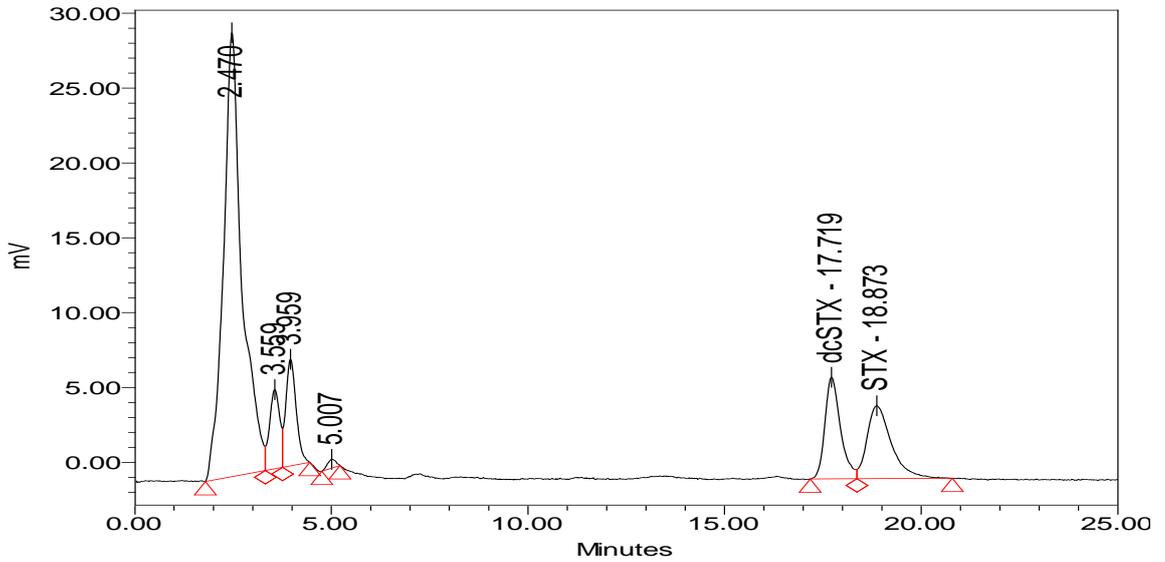


Fig 65: Matriz Corruco: Isocrático 1 (Grupo STX)

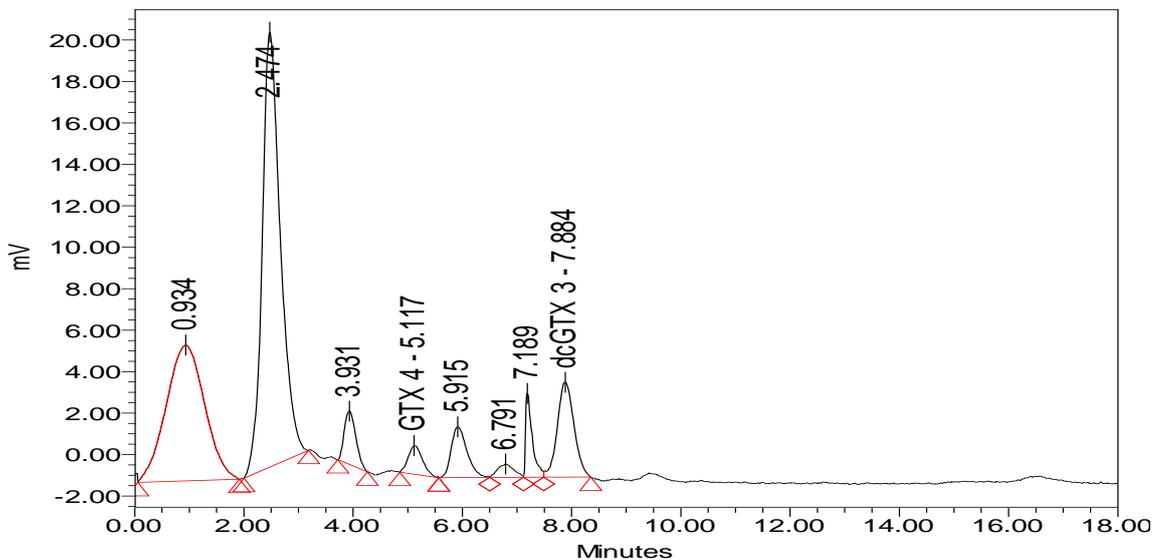


Fig 66: Matriz Corruco: Isocrático 2 (grupo GTXs)

## PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

Para realizar los análisis el L.C.C.RR.PP se planteó implementar un protocolo de evaluación de la calidad consistente en establecer de forma rutinaria las siguientes pautas de actuación:

- Calibración en ambos grupos de patrones cada 6 muestras aproximadamente.

- Inyección de patrón al inicio y al fin del análisis de la muestra, y una intermedia cada dos si se analizan más de una de forma simultánea
- Doble inyección de la muestra en cada análisis.
- Análisis de cada muestra anulando la oxidación para determinar la presencia de picos naturalmente fluorescentes en cada matriz.

Además uno de los obstáculos encontrados fue el tiempo de duración de la columna por lo que se probaron diferentes formas de limpieza y mantenimiento de los conductos del equipo de cromatografía así como el tratamiento de los reactivos y fases móviles con el fin de optimizar el uso del sistema.

Después de probar varias fases de limpieza realizadas con diferentes proporciones de disolvente orgánico, se optó por la limpieza con agua MilliQ sin añadir disolvente, siendo esta la forma que resultó más eficaz. Se incorporó como rutina la limpieza del sistema al finalizar los análisis dejando el equipo de cromatografía con flujo lento hasta su siguiente uso.

## CÁLCULO DE TOXICIDAD

Los cálculos de la toxicidad una vez determinadas las toxinas presentes en una muestra son complejos. Se ha trabajado con hojas de cálculos preparadas obtener la toxicidad en equivalentes de saxitoxinas basándonos en la información presentada por el NRC-CNRC Institute for marine biosciences [3].

$$\mu\text{gSTXdiHCl} / 100\text{g} = \sum_{i=1}^n C_i * T_i * F * 0,03$$

Siendo:

$C_i$  es la concentración de la toxina  $i$  en micromoles por litro, ( $\mu\text{M}$ );

$T_i$  es la toxicidad específica de la toxina en Unidad Ratón por micromol, (UR/ $\mu\text{M}$ );

$F = 1,00$  (con datos calibrados con la solución de calibración de la NRC)

Para expresar los datos como equivalentes de dihidrocloruro de saxitoxina, tenemos que tener en cuenta el valor de toxicidad específica de la saxitoxina y su peso molecular, así como el volumen final de la extracción y el peso de la muestra. Los cálculos están basados en la tabla de equivalencia de Oshima

Durante el desarrollo del proyecto la EFSA (*European Food Safety Authority*) publicó nuevos datos de factores de equivalencia, TEF (*toxicity equivalency factors*) [4], con diferencias con respecto a los de Oshima, por lo que los cálculos se realizaron con ambas tablas de valores.

## REFERENCIAS

- [1] Franco, J. M & P. Fernández Villa. (1993). Separation of paralytic shellfish toxins by reverse phase highperformance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorometric detection. *Chromatographia* 35:613-620
- [2] AOAC (1990). Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists., sec 959.08
- [3] Quilliam M.A. (2004) in *Supplemental Information for PSP toxin CRMs* , NRC Certified Reference Material Program, National Research Council, Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canada, pp 1-5
- [4] European Food Safety Authority (2009) “Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group”, *The EFSA Journal* 1019: 49 – 76.

### Protocolo de Detección de toxinas Paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Derivatización Post-Columna (IIM Galicia)

#### Extracción:

5 g de homogeneizado de molusco se extraen con 4.0 mL de HCl 0.1N, en un tubo Falcon de 15 mL, agitando con una sonda de ultrasonidos durante un minuto, posteriormente se centrifuga a 7500 rpm durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante, se efectúa una segunda extracción del residuo sólido con 1.5 a 2 mL de HCl, agitando y centrifugando como antes y se reúne el sobrenadante con el anterior, midiendo el pH y ajustando a 2,5-3. Finalmente se enrasa con agua a 10 mL.

#### Limpieza del extracto:

Una alícuota de 0.5 mL del extracto se desproteíniza con 25 µL de TCA (30%) y posterior centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos, el extracto se neutraliza con 20 µL de NaOH 1M, volviendo a centrifugar.

Una alícuota de unos 150 µL del extracto se filtra con un filtro de jeringa de 0.2 µm antes de inyectar.

Se utiliza un cromatografo UHPLC Acquity de Waters con detección fluorimétrica

Columna Zorbax Bonus RP 3.5µ (150 · 4.6 mm) a 30°C.

A: 11 mM Heptansulfonato en 5,5 mM Fosfato amónico y llevar a pH 7,1

B: 88,5% de 11 mM Heptansulfonato en 16,5 mM Fosfato amónico y llevar a pH 7,1:11,5% MeCN

Flujo 0.8 mL/min.

Gradiente: los 8 primeros minutos al 100% de A; subiendo al 100% de B en los siguientes 8 minutos manteniéndose hasta el minuto 25 y en el 25,01 vuelve al 100% de A y se mantiene 5 minutos para equilibrar antes de la siguiente inyección.

Reactor con un coil de teflón de 0.5mm d.i. · 7 m a 65°C

Oxidante: 7 mM ácido peryódico en 50 mM fosfato potásico a pH 9 y a 0.4 mL/min.

Acidificante: ácido acético 0.5M a 0.4 mL/min.

Fluorescencia a 330 nm de excitación y 390nm de emisión.

El método cromatográfico es el de Rourke et al. (2008) modificado el gradiente.

Rourke, W.A., Murphy C.J., Pitcher G., Van De Riet J. M, Burn B. G.; Thomas K.M.; Quilliam M. A. 2008. Rapid Postcolumn Methodology for Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish Tissue. Journal of AOAC International. 91: 589-597

## Protocolo de Detección de toxinas Paralizantes por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Derivatización Post-Columna (CIMA Galicia)

### **Desarrollo de una técnica de cromatografía líquida de alta eficacia con oxidación post-columna y detección de fluorescencia para la cuantificación de las principales toxinas de tipo PSP.**

En una primera aproximación se probaron diferentes columnas de fase reversa, sin conseguir una separación definida y definitiva de algunos pares de toxinas como dcGTX3 de GTX5, dcGTX2 y GTX3 o dcSTX y STX..

Xbridge	C18	150x 2.1 mm	5 $\mu$ .
Sunfire	C18	100 y 150 x 2.1 mm	3,5 $\mu$ .
Kinetex	C18	50 y 100 x 3 mm	2.6 $\mu$
Acquity BEH		100x 2.1 mm	1,7 $\mu$

Las fases móviles empleadas fueron las mismas para todas ellas y consistieron en:

A: 1,5mM Octansulfónico en 10 mM Fosfato amónico a pH 7,1

B: 94%A : 6% Acetonitrilo

Trabajando a temperaturas entre 30 y 40°C utilizando un sistema de isocráticos encadenados

Aprovechando un equipo de UHPLC del que se dispone se intentó también con columnas de 1,7 $\mu$ , consiguiéndose mejores resultados iniciales con patrones pero al aplicar los extractos de mejillón se colapsan muy rápidamente llegando a sobrepasar los límites de presión

Por lo que las determinaciones postcolumna se basaron en el método propuesto por Rourke et al (2008).

Inicialmente se aplicó el mismo método descrito en el dicho trabajo y posteriormente se modificó el gradiente y que en este caso mejora la separación de las nueve toxinas básicas (Fig 67 y 68) y es el siguiente:

Columna Zorbax Bonus RP 3.5 $\mu$  (150x4.6 mm) a 30°C

A: 5,5 mM Fosfato amónico 11 mM HSA; pH 7,1

B: 88,5% 16,5 mM Fosfato amónico; 11 mM HSA; pH 7,1:11,5%MeCN

Flujo 0.8 mL/min.

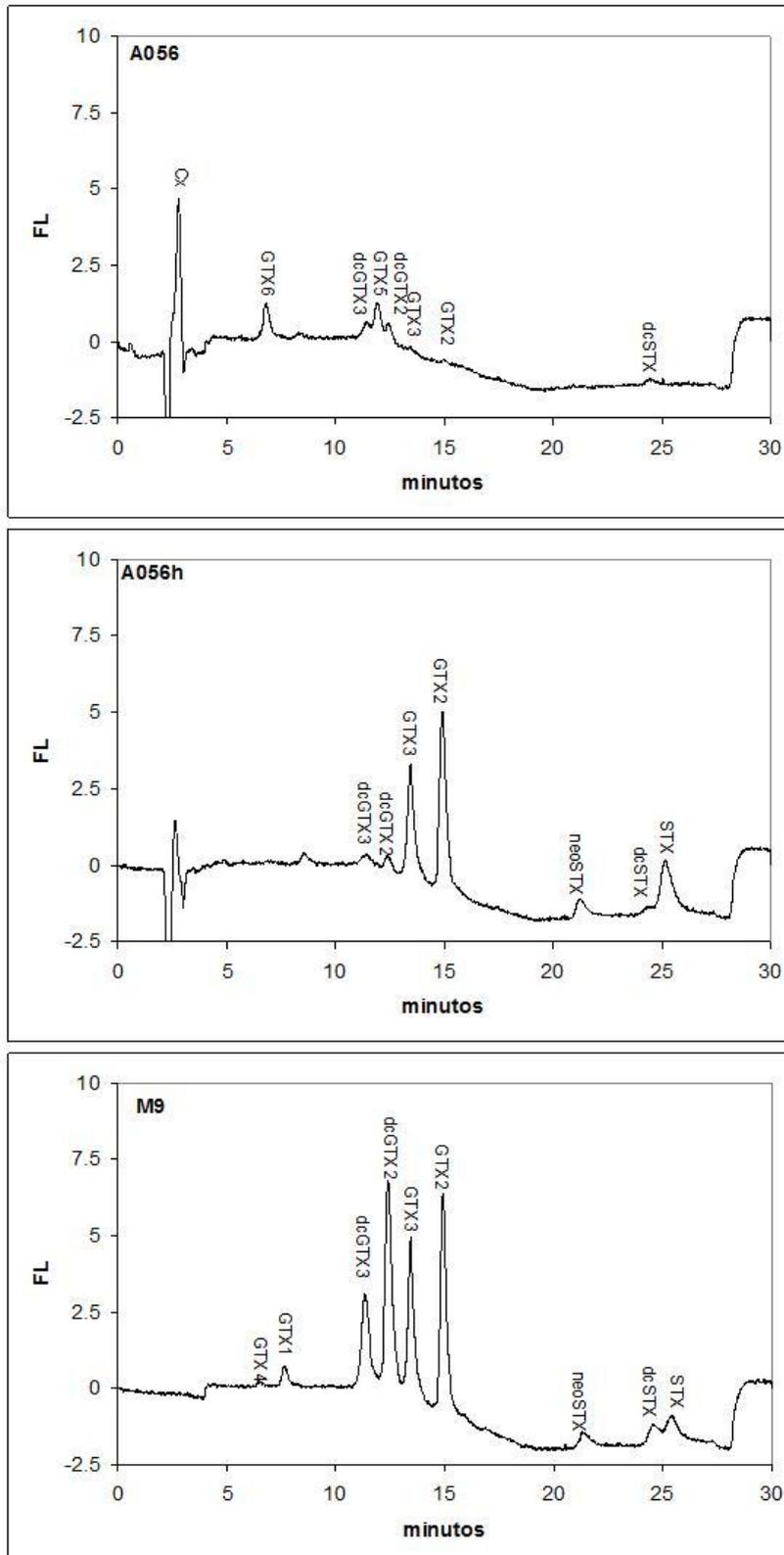
Gradiente: los 8 primeros minutos al 100% de A subiendo al 100% de B en los siguientes 8 minutos manteniéndose hasta el minuto 25 y en el 25,01 vuelve al 100% de A y se mantiene 5 minutos para equilibrar antes de la siguiente inyección. (Se puede poner una tabla en vez de las tras líneas anteriores)

Reactor con un coil de teflón de 0.5mm d.i.x7 m a 65°C

Oxidante: 7 mM ácido peryódico en 50 mM fosfato potásico a pH 9 y a 0.4 m/min.

Acidificante: ácido acético 0.5M a 0.4 mL/min

El sistema anterior es el que ha aplicado a la determinación del estudio intercomparativo de tres niveles de mejillón de Andalucía y Catalunya, mediante derivatización postcolumna.



**Fig 67: Extracto de mejillón de Andalucía A056, e hidrolizado A056h, M9 patrón**

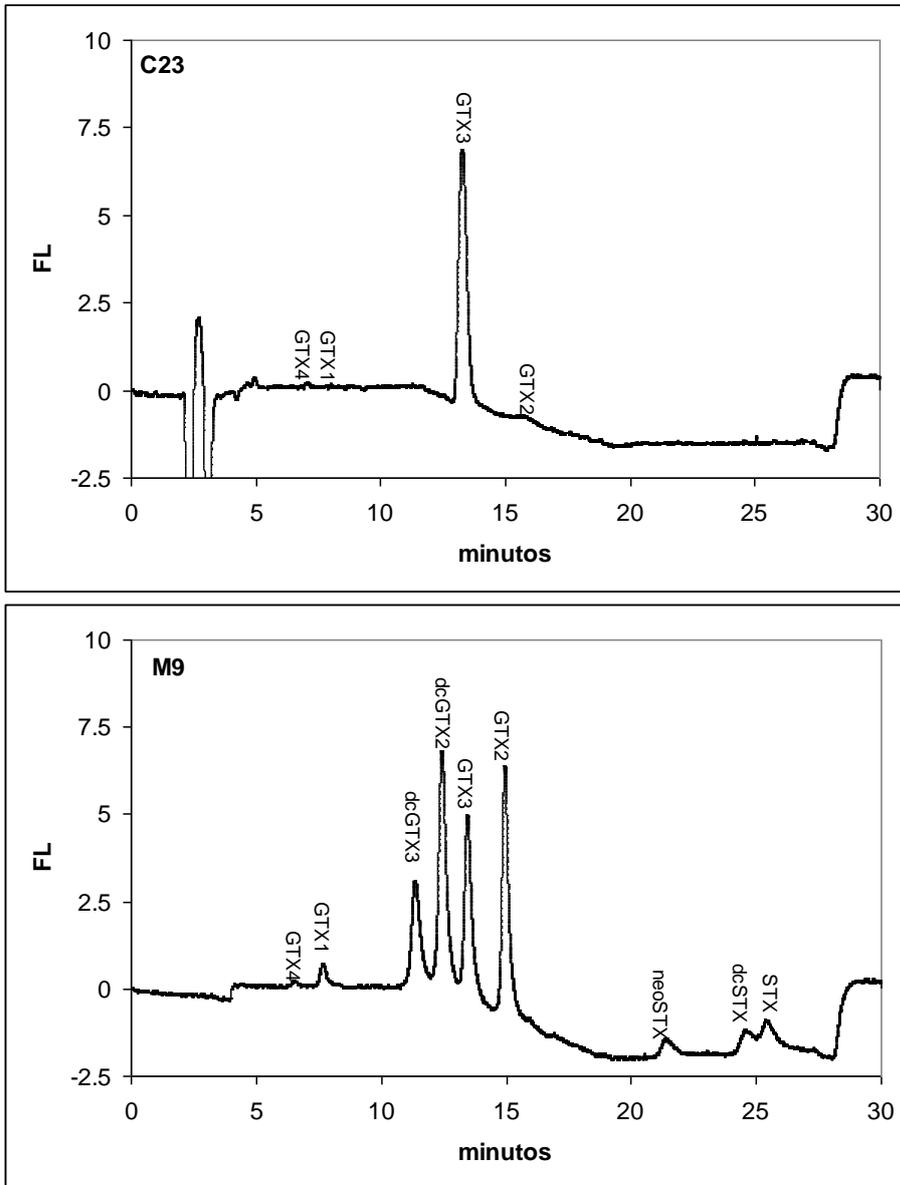


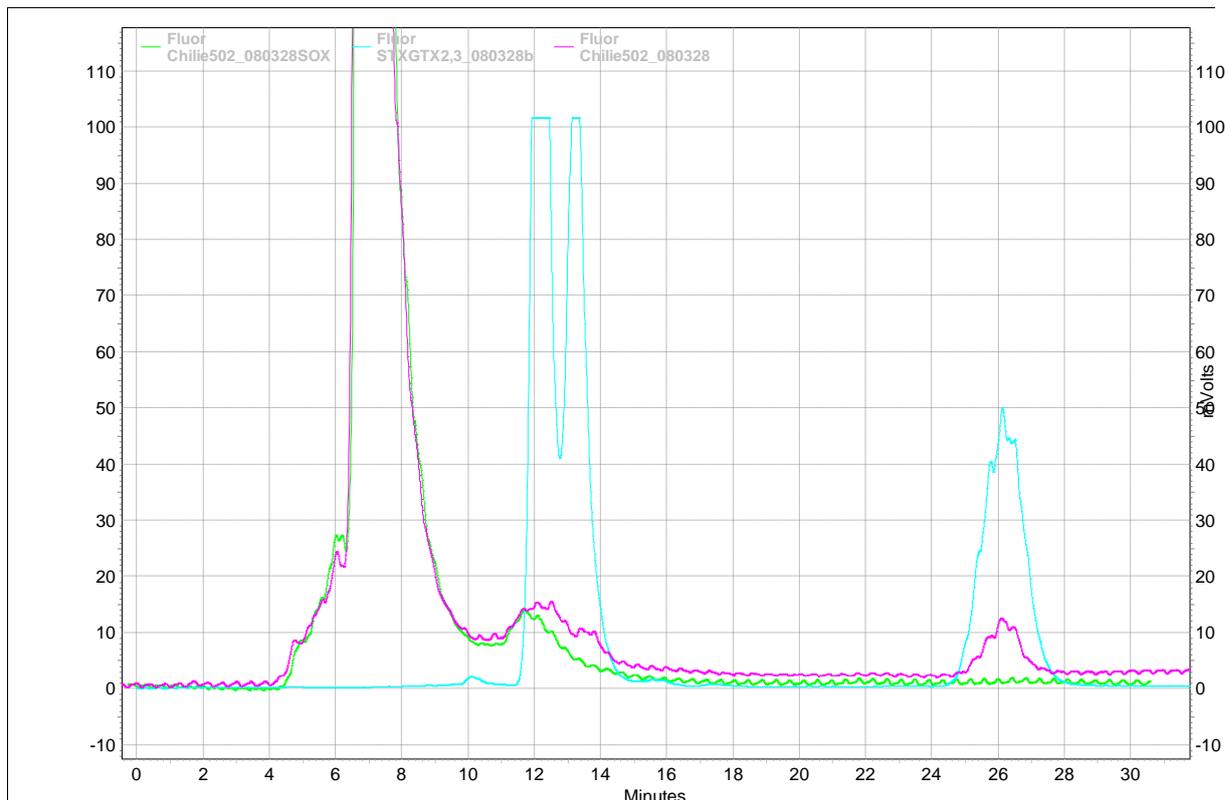
Fig 68: Muestra C23 de mejillón de Catalunya, M9 patrón

## LC-MS/MS

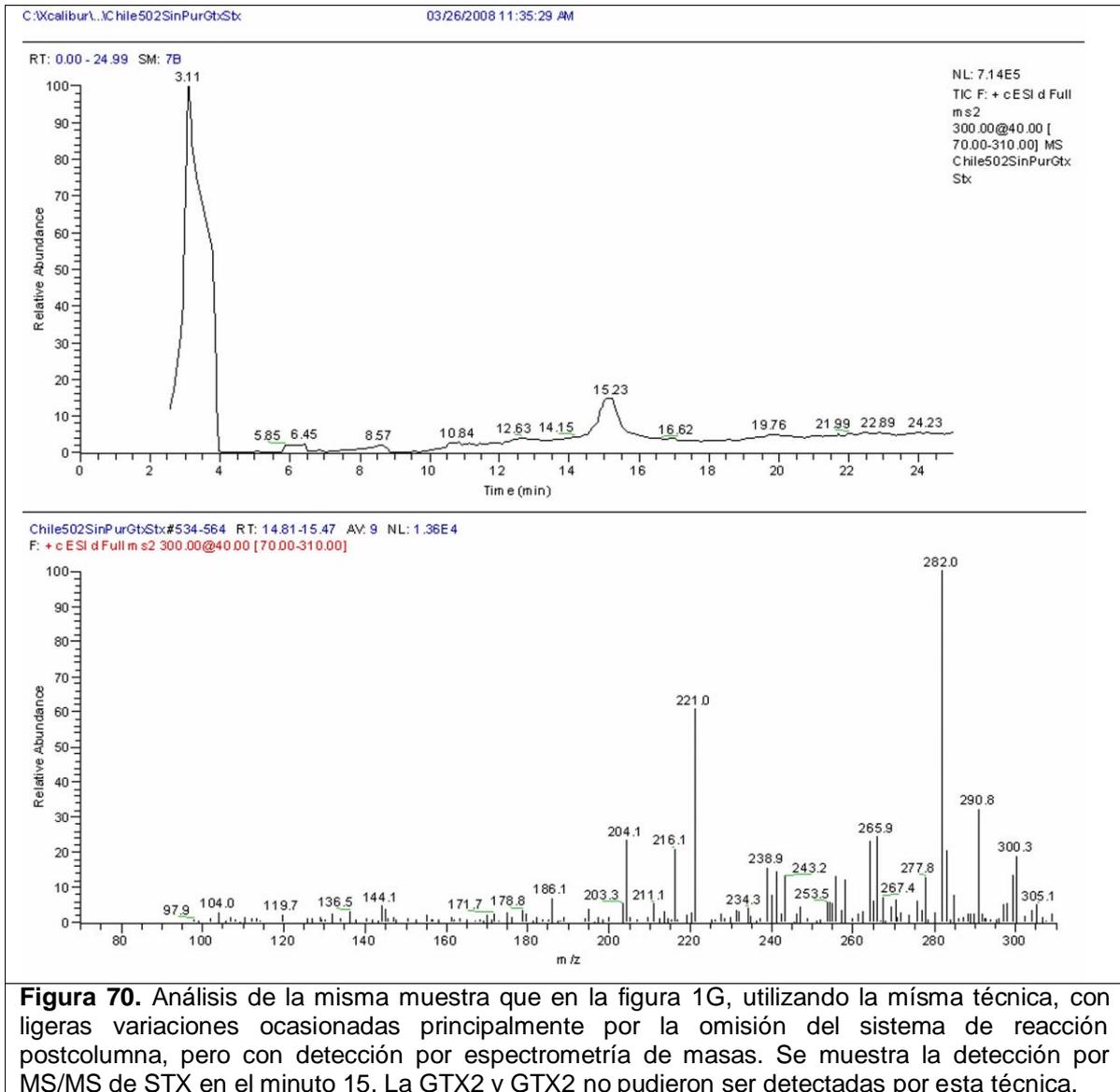
### GALICIA 2008

Se comprobó la posibilidad de utilización de la espectrometría de masas para su utilización de las toxinas PSP. Se utilizaron dos equipos: un Thermo Deca XPplus, y un Thermo Advantage, ambos de trampa iónica y se realizaron las pruebas con dos interfases: electrospray y APCI.

Con el Thermo DecaXPplus se utilizaron las dos interfases para comprobar la sensibilidad por medio de la infusión de soluciones de toxinas puras. Con los dos equipos se realizaron comparaciones de análisis mediante reacción postcolumna y detección fluorimétrica y por cromatografía y detección MS con interfase electrospray (Dell'Aversano et al., 2005), concluyendo que esta última técnica no es por ahora lo suficientemente adecuada para su recomendación como método fiable, ya que la sensibilidad encontrada fue en todos los casos muy baja, en especial para algunas toxinas como la GTX3, por lo que desde el punto de vista práctico no resulta posible en control de concentraciones que no sean extremadamente altas con detectores de este tipo.



**Figura 69.** Análisis de una muestra de *Argopecten purpuratus* conteniendo STX, GTX2 y GTX3, por el método cromatográfico de Dell'Aversano y con detección por fluorescencia después de una oxidación post-columna con ácido periódico. El trazo verde es la fluorescencia de base (fluorescencia sin oxidación postcolumna), y el cian es una mezcla de soluciones de referencia de GTX2, GTX3 y STX. Se detectas GTX2 y GTX3 en los minutos 12 y 13.5 respectivamente y STX en el minuto 26.



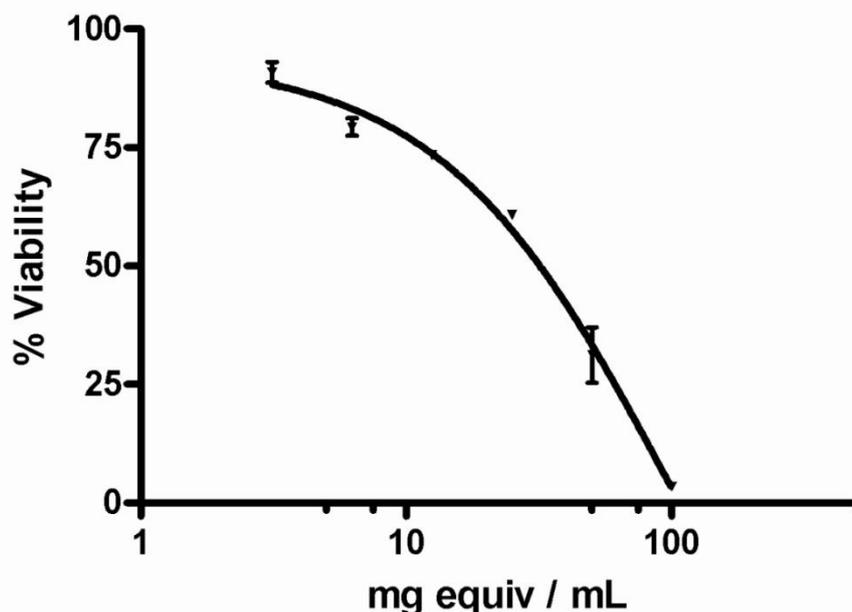
## Evaluación de la citotoxicidad de toxinas y extractos

### CATALUNYA 2008

Esta técnica es específica del grupo del IRTA de Catalunya; ningún otro grupo o CCAA la llevará a cabo en este proyecto. Como tal, no se encuentra en el mismo estado que otras técnicas como el MBA o la detección por cromatografía (HPLC pre- y post-columna); sin embargo se van consiguiendo grandes avances tanto en los protocolos de cultivo, mantenimiento y exposición celular, como en la interpretación de los resultados obtenidos.

En el 2008 se abordó el efecto matriz sobre células NG108-15. Efectivamente, se ha detectado un efecto tóxico de muestras exentas de toxinas a determinadas concentraciones de muestra, por lo que se plantea el fraccionamiento de los extractos para eliminar dicha interferencia. La matriz de bivalvo, en extracciones basadas en el método oficial del AOAC (AOAC; Official Method 2005.06) descrito por Lawrence (2005), es claramente tóxica (Figura 71). Presenta el 50% de mortalidad a una concentración equivalente a 32 mg/mL y exposiciones a una concentración de 3.13 mg/ml ya presentan toxicidades en torno al 10% de mortalidad celular. Por el contrario, las muestras de fitoplancton no presentan un efecto tan acusado.

Se sigue trabajando para eliminar o al menos minimizar el efecto matriz sobre los resultados de citotoxicidad en muestras de bivalvo ya que para una cuantificación de toxicidad en torno al límite legal (800 µg/kg) necesitaríamos poder exponer las células a una concentración de 50 mg/ ml sin efecto matriz.



**Figura 71.** Curva dosis-respuesta del efecto tóxico del extracto crudo de mejillón en células NG108-15. Toxicidad evaluada por el método MTT (Manger, 1993).

## CATALUNYA 2009

Esta técnica es específica del grupo del IRTA de Catalunya; ningún otro grupo o CCAA la llevará a cabo en este proyecto. Como tal, no se encuentra en el mismo estado que otras técnicas como el MBA o la detección por cromatografía (HPLC pre- y post-columna); sin embargo se van consiguiendo grandes avances tanto en los protocolos de cultivo, mantenimiento y exposición celular, en la interpretación de los resultados obtenidos y en la reducción del efecto matriz (véase punto Purificación de extractos).

Siguiendo con esta actividad, se propone:

- Comprobar el efecto del ácido acético, y comprobar que las muestras negativas no muestran este efecto tan marcado. Así podemos descartar que todo sea debido a artefactos experimentales. La viabilidad celular inicial baja (menor del 20%) puede ser debida al estado de la línea celular, que puede ir variando a medida que el cultivo “envejece”. Por ello será interesante repetir los experimentos con cultivos más frescos. Así evaluamos también la influencia de la edad de los cultivos sobre la robustez del modelo.
- Realizar un control pasando ácido acético 1% por la columna C18.
- Probar la extracción substituyendo el ácido acético por ácido clorhídrico.
- Cuantificar el proceso de extracción midiendo el peso seco, para tener una idea real de la efectividad de la extracción.
- Tras el proceso de extracción, es complicado filtrar la muestra a través de un poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , ya que la elevada cantidad de residuo sólido presente colmata el filtro (incluso después de centrifugar). Se debe idear un sistema de pre-filtración de la muestra para eliminar este residuo sólido que no suponga pérdida de material ni de toxina.

Se considera interesante ampliar el espectro de matrices a evaluar, a parte del mejillón y el ostión.

## CATALUNYA 2010

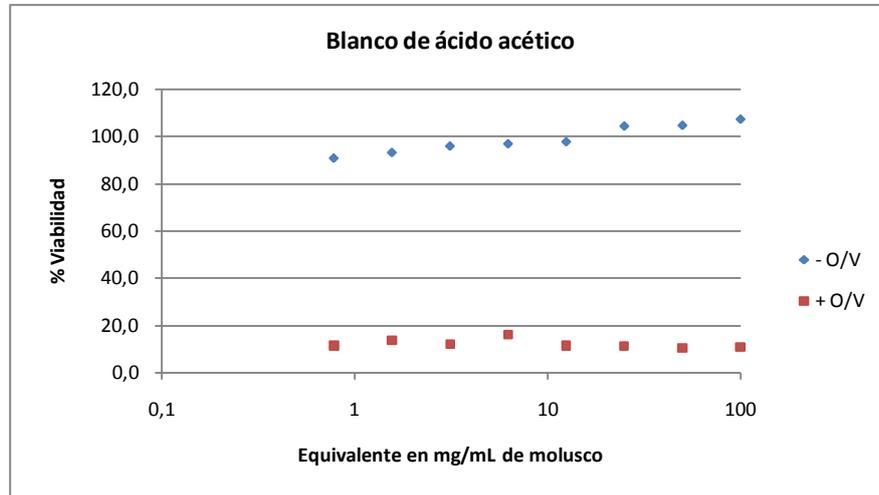
Dentro de las etapas de mejora del método de citotoxicidad para determinación de toxinas paralizantes, se abordó específicamente su aplicación a muestras de bivalvos.

### Influencia del ácido acético

Se estudió la posible interferencia del ácido acético sobre la viabilidad de las células.

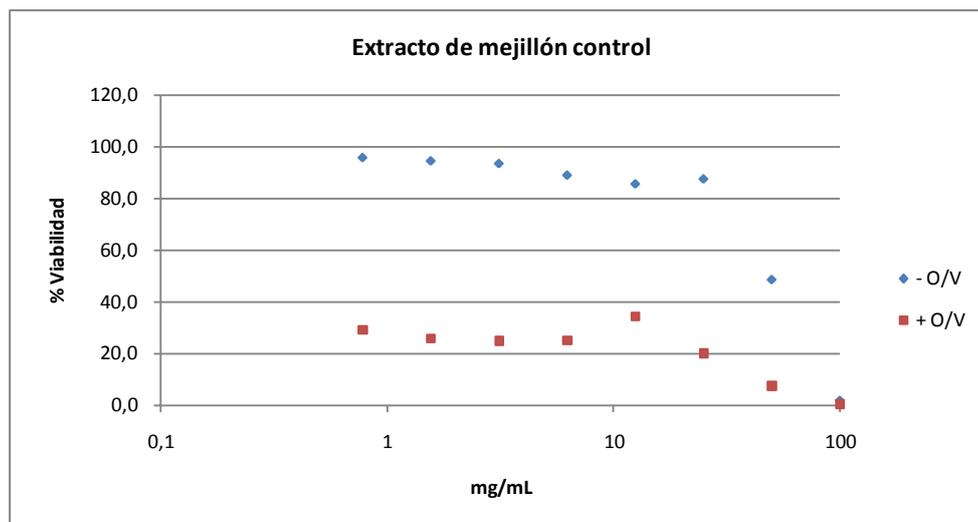
En exposiciones de las células a ácido acético, en el rango de concentraciones elegido de acuerdo con el protocolo experimental (sin matriz de muestras, pero

con el procedimiento equivalente al ensayo de muestras) se observó que el efecto es despreciable (Figura 72). A la concentración máxima de ácido acético de 0.2% en el pocillo de ensayo no se observa efecto negativo sobre la viabilidad celular.



**Figura 72.** Efecto del ácido acético sobre la viabilidad celular. El blanco se obtuvo realizando el protocolo de extracción en paralelo con una muestra de molusco, pero sin adición de vianda; por ello se expresa el eje de abscisas en cantidades equivalentes de matriz. En el punto de mayor concentración, la cantidad de acético en el pocillo de reacción corresponde al 0.2%.

Cuando se realiza el mismo ensayo celular en presencia de ácido acético a la concentración descrita anteriormente (sin efecto negativo sobre las células), conteniendo esta vez matriz de mejillón control (sin presencia de toxina), se observa un efecto negativo de la matriz sobre la viabilidad celular a concentraciones elevadas (Figura 73). La cuantificación de este efecto intrínseco de la matriz y la valoración del límite de carga se describen posteriormente.



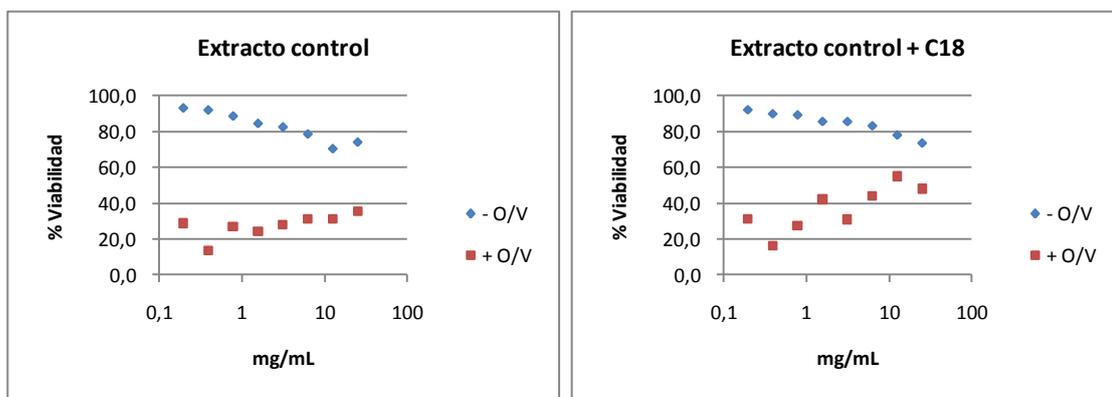
**Figura 73.** Efecto de diferentes concentraciones de extractos acéticos de mejillón control (sin contenido de toxina) sobre la viabilidad celular.

Debemos comentar que respecto a la viabilidad celular en los tratamientos con ouabaina y veratridina (O/V), en ocasiones ésta no supera el 20% en los controles negativos (sin toxina). Es importante determinar las concentraciones de O/V correctas para superar este 20%, ya que valores menores comprometen el correcto desarrollo del ensayo.

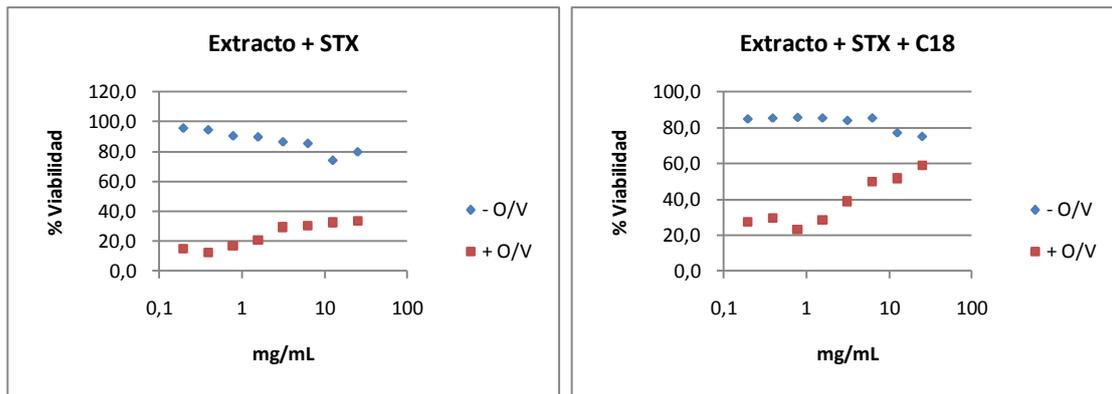
### Influencia de la purificación por columna cromatográfica C18

Se estudió la respuesta celular a extractos a los que se añadió un paso extra de purificación mediante columna cromatográfica C18. Se evaluó el efecto de la purificación por C18 sin dopaje de STX (figuras 2.5-3. y 2.5-4.) y con dopaje de STX (figuras 74 y 75)

Como se ve en las figuras 2.5-3. y 2.5-4., la toxicidad intrínseca de la matriz (sin presencia de toxina) disminuye sólo levemente tras el paso por columna C18. En cambio, como se aprecia en las figuras 2.5-5. y 2.5-6. (dopaje con STX), la purificación por C18 mejora la sensibilidad del ensayo para la detección de STX. Por ello, se decidió añadir éste paso de purificación por C18 al protocolo de extracción.



**Figura 74.** (Izquierda). Efecto sobre la viabilidad celular de un extracto control de mejillón (sin contenido de toxina). (Derecha). Efecto sobre la viabilidad celular de un extracto control de mejillón (sin contenido de toxina) con paso adicional de purificación por columna C18.

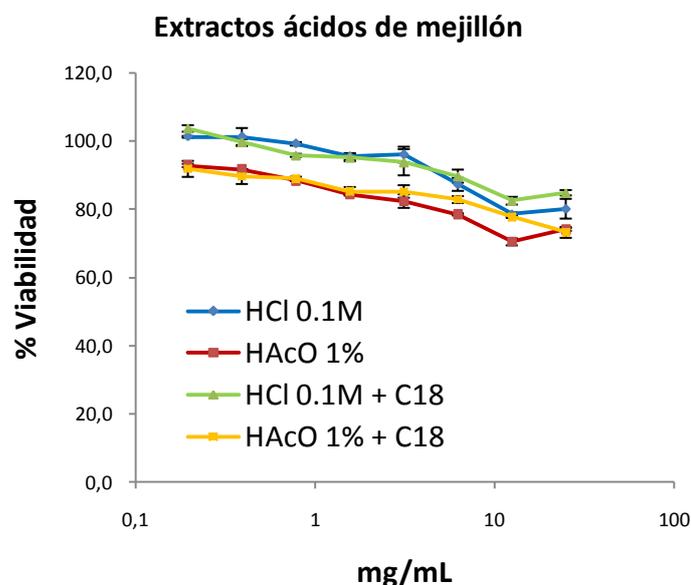


**Figura 75.** (Izquierda). Efecto sobre la viabilidad celular de un extracto de mejillón con dopaje de STX. (Derecha). Efecto sobre la viabilidad celular de un extracto de mejillón con dopaje de STX con paso adicional de purificación por columna C18.

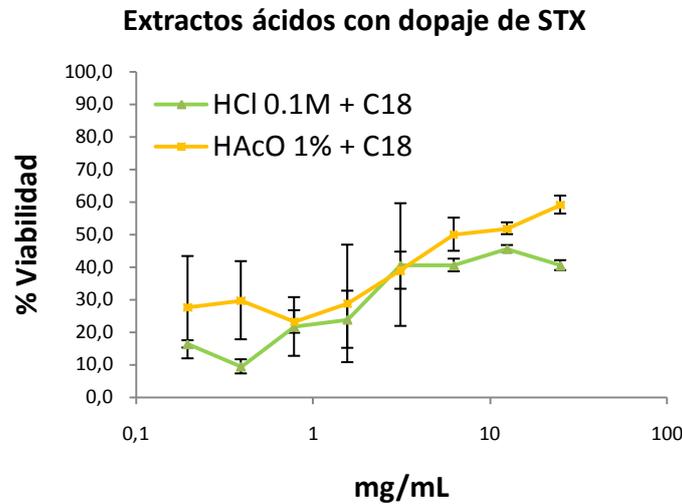
### Influencia del ácido clorhídrico

Se probó el ácido clorhídrico como reactivo alternativo al acético durante las extracciones de marisco.

Si bien se demuestra que en ausencia de O/V el ácido clorhídrico puede mejorar la viabilidad celular obtenida en comparación con el ácido acético (Figura 76), en presencia de O/V los extractos preparados con ácido clorhídrico muestran menor fiabilidad (mayor incidencia de cuantificaciones fallidas; no se muestran los resultados) y una sensibilidad a la STX ligeramente menor que los preparados con ácido acético (Figura 77).



**Figura 76.** Efecto intrínseco de extractos negativos de mejillón (sin contenido de STX) sobre la viabilidad celular (efecto matriz). Comparación de extractos preparados con ácido acético 1% y ácido clorhídrico 0.1 M. Ensayo en ausencia de O/V.



**Figura 77.** Efecto del ácido sobre la sensibilidad a STX de los ensayos celulares.

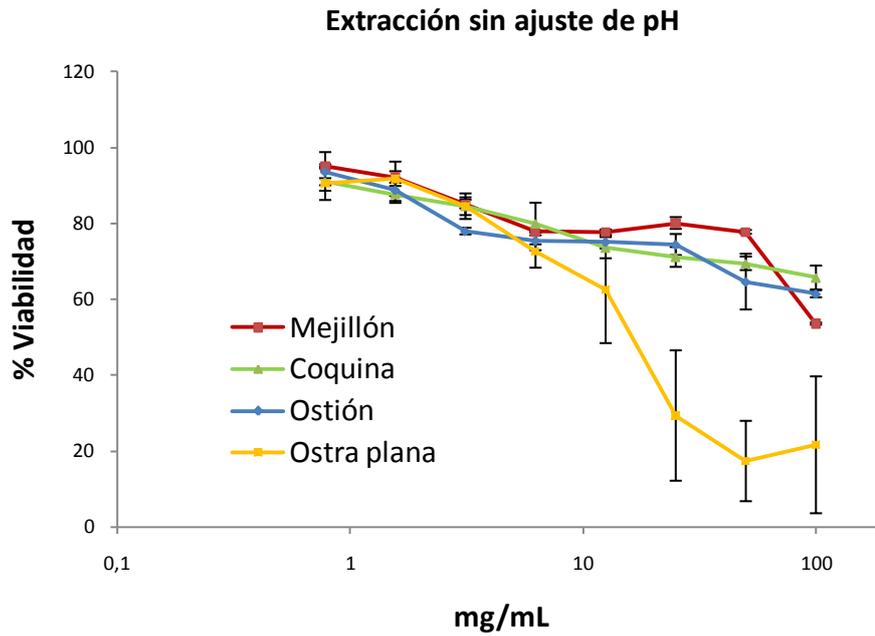
De esta manera se priorizó el uso del ácido acético respecto al ácido clorhídrico para la extracción de moluscos y posterior determinación de la toxicidad paralizante mediante cultivos celulares.

#### Determinación del límite de carga

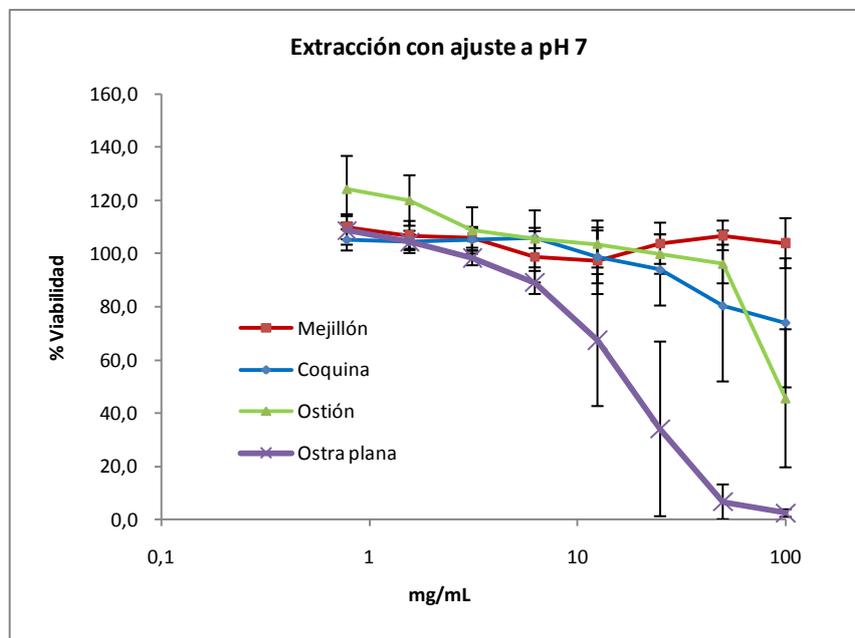
Para poder aplicar el ensayo celular a diferentes matrices (diferentes especies de molusco), se estudió el límite de carga del ensayo para mejillón, ostión, coquina y ostra plana. Se define éste límite como la cantidad equivalente de extracto, en mg/mL, por debajo de la cual no hay efecto sobre la viabilidad celular, considerándose efecto más de un 20% en la reducción de la viabilidad.

Los resultados muestran que mejillón, ostión y coquina tienen un límite de carga superior a ostra plana (Figuras 78 y 79).

Se realizó el estudio con extracción acética en dos condiciones: sin ajustar pH después de la extracción (Figura 78) y ajustándolo a un valor de 7 (Figura 79). Se pudo demostrar que el ajuste del pH mejoraba el ensayo, aumentando el límite de carga en todos los casos (Tabla 21).



**Figura 78.** Determinación del límite de carga de varias matrices de moluscos, con extractos preparados en ácido acético más purificación en columna C18, sin ajuste posterior del pH.



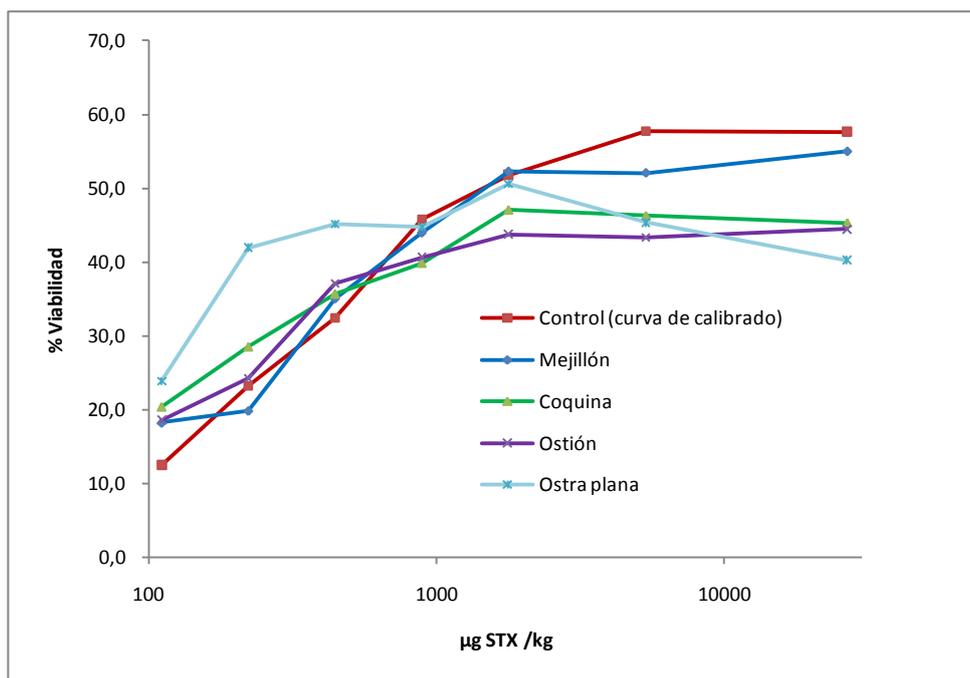
**Figura 79.** Determinación del límite de carga de varias matrices de moluscos, con extractos preparados en ácido acético más purificación en columna C18, con ajuste posterior a pH 7.

	Sin ajuste de pH	Con ajuste a pH 7
Mejillón	3	100
Coquina	3	25
Ostión	1,5	50
Ostra plana	3	6,25

**Tabla 21.** Comparación de los límites de carga (en mg/mL) obtenidos mediante la extracción en ácido acético más purificación en columna C18, con o sin ajuste posterior del pH.

### Límite de detección

Una vez establecidos los límites de carga para cada matriz, se estudió la sensibilidad del método a la STX mediante el dopaje de diferentes matrices con toxina (previo a la extracción). Se puede comprobar a partir de las curvas obtenidas que el método permite detectar, para todas las especies de molusco testadas, concentraciones de STX por debajo del límite legal de 800  $\mu\text{g STX/kg}$  (Figura 80).



**Figura 80.** Determinación del límite de detección de la STX mediante el ensayo de citotoxicidad celular para diferentes especies de molusco.

En el futuro se espera poder comparar los resultados obtenidos mediante ensayos celulares con las cuantificaciones obtenidas mediante otros métodos (cromatográficos y bioensayo).

## Protocolo de Aplicación del Bioensayo Celular para Toxinas Paralizantes

### **Aplicación del bioensayo celular (CBA) para la detección de toxinas paralizantes**

La detección de toxinas que alteran canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) se realiza mediante el ensayo de exposición de células de la línea tumoral de neuroblastoma de ratón (N2a) en presencia de ouabaína (O) y veratridina (v). La veratridina es un activador de canales de sodio dependiente de voltaje en tanto que la ouabaina inhibe la bomba de sodio-potasio, evitando que la célula contrarreste el efecto tóxico de la veratridina. En el caso de toxinas paralizantes de tipo saxitoxina (STX) y derivados, que actúan bloqueando VGSC, el efecto sinérgico de los tres componentes resultará en una mayor viabilidad del cultivo celular.

El protocolo a seguir incluye tres fases que implican, en primer lugar la siembra del cultivo celular en placas de 96 pocillos, el ensayo celular y la lectura de la viabilidad. El tiempo estimado de obtención de resultados es de tres días contados desde el día de preparación de las placas, siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

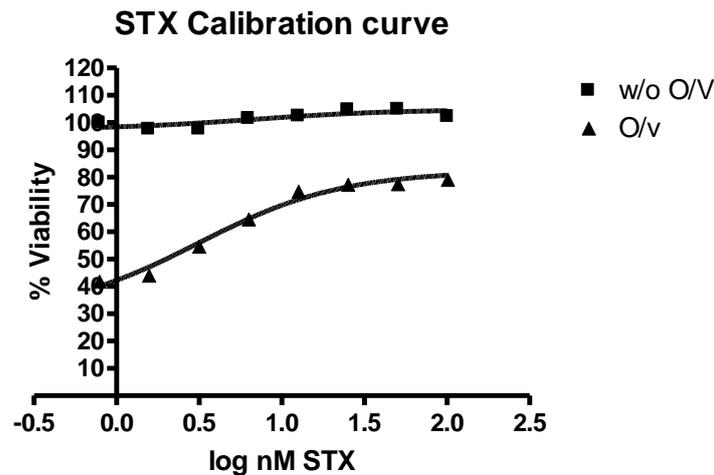
**Siembra:** A partir del cultivo celular estable se preparan las placas de ensayo a una densidad de 35000 células por pocillo y se mantienen durante 24 horas en incubador a 37°C y un nivel de CO<sub>2</sub> del 5%.

**Exposición:** El ensayo se realiza por triplicado añadiendo a cada pocillo diluciones seriadas de la solución estándar o extractos de muestras contaminadas en cada caso. En parte de la placa se habrá añadido anteriormente una solución de ouabaína y de veratridina (O/V+) a una concentración final de 0,3 y 0,03 mM correspondientemente, mientras que la otra parte es utilizada como control sin ouabaina ni veratridina (O/V-).

**Lectura:** La lectura de las placas se realiza 24 horas después de la exposición a toxinas o extractos muestra mediante el test con MTT que mide la viabilidad celular basándose en la actividad mitocondrial de las células. Para ello, el medio es eliminado y reemplazado por una solución de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) y seguidamente DMSO (Dimethyl sulfoxide), que colorea específicamente las células vivas. La absorbancia es medida por espectrofotometría con un lector de placas a una longitud de onda de 540 Nm siendo esta directamente proporcional a la viabilidad celular.

La viabilidad es estimada mediante una curva dosis respuesta tomando como 100% de viabilidad los valores de los pocillos control sin muestra o estándar y sin ouabaína ni veratridina. La concentración y tipo de toxina puede ser evaluada en función de la curva dosis-respuesta obtenida con el estándar tóxico.

En el caso de toxinas bloqueadoras de canales de sodio, de tipo saxitoxina obtendremos una curva dosis-respuesta de este tipo.



**Figura 81.** Curva dosis –respuesta

En este gráfico correspondiente a una dilución seriada  $\frac{1}{2}$  de estándar de STX se representa el porcentaje de viabilidad de las células en los pocillos sin O/V (cuadrados) y con O/V (triángulos). La primera curva muestra un 100% de viabilidad, independientemente de la concentración de toxina, lo que nos indica que sus efectos sobre los canales de sodio están siendo paliados por el propio mecanismo celular, como la bomba sodio-potasio.

La segunda curva muestra que a medida que aumenta la concentración aumenta también la viabilidad, ya que, una vez bloqueada la bomba sodio-potasio por la ouabaina, la veratridina y la saxitoxina actúan como antagonistas, la primera abriendo canales de sodio y la segunda bloqueándolos, por lo que al eliminar los efectos de la veratridina la supervivencia de las células aumenta proporcionalmente al aumento de STX en el medio.

Este método nos permite detectar específicamente y cuantificar de forma rápida y sencilla toxinas VGSC en matrices de extractos de microalgas y alimentos, lo que lo hace muy apropiado para ser aplicado como screening previo a los análisis instrumentales. Además, el CBA puede ser utilizado para detectar toxicidad no específica, reduciendo el uso de animales de experimentación en laboratorios de monitoreo y control.

## Utilización y evaluación del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™

### CATALUNYA 2008

Durante el 2008 se recabó información sobre otros kits comerciales disponibles en el mercado, puesto que en la reunión de coordinación se consideró de interés abordar una comparativa entre ellos y además varios participantes constataron la dificultad de comunicación con los distribuidores de Jellett. Los resultados de la búsqueda así como los criterios que se tuvieron en cuenta para la valoración *a priori* de los kits disponibles se presentan en la Tabla 22.

Kit	Distribuidor	Precio ud.	Oferta	Contacto	Importación
MIST Alert	Jellett	90 €/5 u.	2250 €/125 u.	Casi imposible	Canadá
Saxitoxin (PSP) ELISA Kit	EAMonitor	500 \$		Responden al e-mail	USA
Saxitoxin (PSP) ELISA Kit	Abraxis	500 \$	>20 ud.	Responden y muestran interés	USA
Ridascreen FAST PSP SC	r-Biopharm	554 €		Visita y llamadas del comercial	Alemania

**Tabla 22.** Características de los kits comerciales disponibles.

### ANDALUCIA 2009

Uno de los objetivos no cumplidos de 2008 fue la adquisición de los kits *PSP MIST Alert™ JELLETT* por la dificultad de contactar con los proveedores. A lo largo de 2009 se pudieron adquirir en número suficiente para realizar las pruebas planificadas en los grupos participantes.

En el laboratorio se comenzó estudiando la forma de empleo de los kits para la realización de los análisis y la cualificación del personal implicado en la realización de los mismos: preparación de la muestra y lectura de las placas.

Es muy pronto para obtener conclusiones del empleo de los Jellett en las analíticas debido al escaso número de muestras analizadas hasta el momento en nuestro laboratorio. Sin embargo sí parece repetirse el hecho de que las placas presentan lectura positiva en un nivel cercano al límite de cuantificación del método biológico, y habrá que estudiar la incidencia de falsos positivos cuando se cuente con el número de muestras analizadas suficientes, fundamentalmente en resultados que van entre el límite de cuantificación del bioensayo de ratón hasta el límite legal, es decir en muestras con concentraciones de 400 a 800 µg eq STX.2HCL/Kg.



**Figura 82:** Resultados obtenidos con los kits *PSP MIST Alert™ JELLETT*.

En la figura 82 se muestran los resultados obtenidos en una matriz analizada en los cuatro rangos establecidos de toxicidad: blanco (placa A), 400 (placa B), 800 (placa C) y 2000 (placa D). Se aprecia que sólo en la placa A el resultado es negativo. En la placa B estaríamos ante un falso positivo, pues la concentración de esa muestra está por debajo del límite legal. Los positivos de las placas C y D coinciden con resultados positivos obtenidos por bioensayo de ratón.

Una vez se obtengan datos concluyentes resultará de interés el estudio de la aplicabilidad de este método en el seguimiento sanitario de las zonas de producción de moluscos bivalvos.

## CATALUNYA 2009

El análisis por MBA lo lleva a cabo el grupo del LTASP. Además del análisis de las muestras incluidas en el programa de seguimiento de la calidad de las aguas y zonas de marisqueo del litoral catalán, anualmente participan en un ejercicio de intercomparación organizado por el Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas (LCRBM) para asegurar la calidad de los resultados.

En el IRTA se prepararon muestras a partir de matriz intoxicada con *A. minutum* en la exposición del puerto de Vilanova i la Geltrú en 2008, mezcladas con matriz “blanca” (sin toxinas) para conseguir diferentes niveles de toxicidad, y se mandaron codificadas al LTASP para su análisis por MBA y kits MIST Alert™ Jelllett. El INTECMAR de Galicia proporcionó las muestras de almeja.

Los resultados (Tabla 23) indican que, a pesar del bajo número de muestras, hay un elevado número de falsos positivos al utilizar los kits, incluso en el caso de muestras “blanco”, sin toxinas. Se replantea la evaluación de estos kits sobre muestras “blanco” de otras matrices de bivalvos.

Matriz	MBA	Kit
Mejillón	536	+
Mejillón	454	No válido
Mejillón	570	+
Mejillón	<360	No válido
Ostión	375	+
Ostión	371	+
Ostión	444	+
Ostión	<360	+
Almeja	415	+
Almeja	1.160	+

**Tabla 23.** Resultados del comparativo entre los resultados del MBA y los kits MIST Alert™ Jellett sobre las mismas muestras. En rojo están marcados los resultados para la muestras “blanco”. Nótese que el límite de detección del MBA es de 360  $\mu\text{g eqSTX kg}^{-1}$ .

## CATALUNYA 2010

Se han analizado muestras por kits MIST Alert, principalmente muestras con toxinas producidas por *A. minutum* a niveles por debajo del límite legal de 800  $\mu\text{g eqSTX kg}^{-1}$ . Se ha confirmado que los kits detectan niveles de 400, pero niveles inferiores pero cercanos a 400 dan resultado negativo.

## **Correlación y concordancia entre los resultados obtenidos de determinación de las toxinas paralizantes mediante los diferentes métodos: el bioensayo ratón, las determinaciones por cromatografía, LC-MS-MS como indicadores de toxicidad.**

### **GALICIA 2008**

Aunque el inicio de esta actividad no estaba contemplada hasta la mitad del segundo año de proyecto, se ha diseñado e iniciado, conjuntamente con los otros equipos participantes en el proyecto un experimento en el que las distintas técnicas contempladas en el proyecto serán evaluadas con distintos niveles y perfiles de toxinas y en las distintas matrices biológicas que constituyen las principales especies de bivalvos explotados en España.

Se ha iniciado también la evaluación del efecto matriz de muy diversas especies de bivalvos, pero especialmente enfocadas a los problemas que pudieran presentar en el análisis de las toxinas por medio de HPLC con oxidación postcolumna.

Para la evaluación del efecto matriz se han recopilado matrices de diferentes moluscos suministradas por el laboratorio de Sanidad Exterior (Vigo) y el INTECMAR (Xunta de Galicia); Se trata de matrices que inicialmente no presentan toxicidad por bioensayo de ratón (mejillón, almeja, berberecho, navaja, coquina corruco y vieiras) para efectuar su extracción según el método de bioensayo de ratón con HCl 0.1N y definir los cromatogramas que se obtienen y los posibles picos que puedan interferir con las diferentes toxinas PSP cuando estén presentes en muestras positivas. Los homogeneizados de moluscos se tratarán en dos alícuotas, una siguiendo el método estricto del bioensayo y la otra sin el calentamiento preceptivo.

Esos dos extractos serán tratados según describe Rourke et al.(2008) con tricloroacético para precipitar proteínas, neutralizando posteriormente con NaOH y filtrados por 0,2  $\mu$  antes de inyectar en la columna.

Con la información obtenida se seleccionarán matrices para hacer añadidos de distintos perfiles de toxinas conseguidos con las mezclas de extractos de Alexandrium antes citadas, que serán cuantificados por cromatografía con reacción postcolumna y su posterior comparación con los otros métodos (este material es susceptible de utilizarse en estudios de reproducibilidad).

El método de HPLC-MS, en vista de los resultados obtenidos, se ha eliminado de las restantes comparativas, a falta de pruebas con otros equipos que pudieran solventar el problema de la escasa sensibilidad.

### **CATALUNYA 2008**

Se ha participado activamente en los GT que han discutido la intercomparación entre técnicas, grupos, etc. llegando a un diseño consensuado que se ejecutará en el 2009. Dentro de este planteamiento, en Catalunya se analizarán tres matrices de bivalvo (mejillón, ostrón y almeja) con diferentes niveles de toxinas PSP originadas por *A. minutum* en condiciones naturales.

El mejillón y el ostrón provienen de la exposición en el puerto de Vilanova i la Geltrú de 2008, mientras que la almeja ha sido suministrada por el INTECMAR de Galicia. La Tabla 24 presenta la matriz de muestras, niveles y técnicas que se pretende completar.

Niveles ( $\mu\text{g STX eq/Kg}$ )	Mejillón			Ostrón			Almeja		
	0	400	800	0	400	800	0	400	800
MBA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Citotoxicidad	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HPLC pre-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HPLC post- (ICM)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HPLC post- (IRTA)	¿	¿	¿	¿	¿	¿	¿	¿	¿
Jellett (Sanidad TGN)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Jellett (IRTA)	X		X	X		X	X		X
Otro kit	X	X	X	X	X	X	X	X	X

**Tabla 24.** Previsión de análisis del primer intercomparativo. “¿” indica que la realización del análisis estará condicionado al estado de puesta a punto del mismo y/o la disponibilidad de muestra.

## ANDALUCIA 2009

Con el fin de realizar el estudio final que tiene que abordarse a lo largo de 2010, se ha planteado un esquema de trabajo común a todos los grupos. En él se detallan los análisis que llevará a cabo cada Comunidad, matrices que serán empleadas, rangos de toxicidad y métodos con los que cada grupo de investigación obtendrá los resultados. Se especificó al mismo tiempo las muestras que tendrán que ser intercambiadas, el método y tiempo de conservación para cada una de ellas.

Se busca la planificación con una ruta de trabajo conjunto que permita obtener los resultados necesarios para la consecución del objetivo general del proyecto, esto es la comparación de los métodos existentes para la determinación de toxinas paralizantes y la aplicabilidad en los sistemas de control sanitario existentes en cada Comunidad Autónoma participante.

De las cuatro matrices elegidas por cada comunidad, dos de ellas son comunes y serán analizadas por todos los grupos. En ambos casos la especie elegida ha

sido el mejillón aunque diferenciadas por el origen de su toxicidad, causado en un caso por *A minutum*, y en el otro por *G. catenatum*. Las dos matrices restantes serán opción particular de cada grupo de trabajo que las elegirá en función de las características de producción de su litoral y de la disponibilidad de matrices tóxicas para poder realizar el estudio.

De cada matriz se analizarán cuatro rangos diferentes:

- **Rango blanco:** resultado de toxicidad  $<400 \mu\text{g eq STX.2HCL/Kg}$ .
- **Rango 400:** resultado de toxicidad cercano a  $400 \mu\text{g eq STX.2HCL/Kg}$ , límite de cuantificación del MBA.
- **Rango 800:** resultado de toxicidad cercano a  $800 \mu\text{g eq STX.2HCL/Kg}$ , límite legal establecido.
- **Rango 2000** (denominación genérica): resultado de toxicidad elevado, según disponibilidad.

Cada muestra sería analizada por 4 métodos diferentes: bioensayo de ratón, cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna, cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización pre-columna y con los *Kit PSP MIST Alert™ JELLETT*.

El número de análisis que se realizaría por cada rango (de cada matriz) sería el que se presenta en la tabla 25.

ANDALUCÍA					TOTAL POR RANGO
	Matriz 1-común	Matriz 2-común	Matriz 3-AND	Matriz 4- AND	
MBA	4	4	4	4	16
POST-COLUMNNA	5	5	5	5	20
PRE-COLUMNNA	0	0	0	0	0
KIT JELLETT	5	5	5	5	20

CATALUNYA					
	Matriz 1-común	Matriz 2-común	Matriz 3-CAT	Matriz 4-CAT	
MBA	4	4	4	4	16
POST-COLUMNNA	0	0	0	0	0
PRE-COLUMNNA	5	5	5	5	20
KIT JELLETT	5	5	5	5	20

GALICIA					
	Matriz 1-común	Matriz 2-común	Matriz 3-GAL	Matriz 4-GAL	
MBA	4	4	4	4	16
POST-COLUMNNA	5	5	5	5	20
PRE-COLUMNNA	5	5	5	5	20
KIT JELLETT	0	0	0	0	0

TOTAL MATRICES COMUNES					
MBA	12	12			
POST-COLUMNNA	10	10			
PRE-COLUMNNA	10	10			
KIT JELLETT	10	10			

**Tabla 25:** Análisis previstos realizar para cada rango de cada matriz.

Después de optar por la congelación como método de conservación se decidió clasificar las muestras atendiendo a su proceso de conservación de la siguiente forma:

- **Tipo A:** analizadas en el momento “cero”, en el que se prepara el homogeneizado de la muestra, por tanto sin congelación.
- **Tipo B:** analizadas después de al menos 15 días de congelación.
- **Tipo C:** analizadas después de al menos 15 días de congelación y de haber sido transportadas.

## GALICIA 2009

Los moluscos recogidos durante el año 2008 con diferentes niveles y matrices se analizaron en el año 2009 por los siguientes métodos y laboratorios:

- HPLC-FD según el procedimiento AOAC Oficial Method 2005.06 Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish. Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Extension validation 2008. Realizado en INTECMAR.
- HPLC-FD con reacción de oxidación post-columna. Realizado por UA Fitoplancton Tóxico CSIC-IEO Vigo.
- Bioensayo de Ratón. Realizado por INTECMAR y Laboratorio de Sanidad Exterior Vigo.

Para el estudio de precisión se empleó un n=2 en condiciones de repetitividad y un n=3 para reproducibilidad.

En la tabla 26 se muestran los resultados de toxinas PSP obtenidos con diferentes muestras de moluscos de Galicia naturalmente contaminadas por episodios de *Alexandrium minutum* con las 3 técnicas señaladas.

Las diferencias observadas a nivel de  $\mu\text{g}$  STX equivalentes / Kg con las 2 técnicas cromatográficas radican fundamentalmente en que el HPLC post-columna nos permite dar un perfil detallado de las 9 toxinas responsables del 90% de toxicidad de la muestra, mientras el HPLC pre-columna no distingue entre isómeros que poseen, sin embargo, toxicidad muy diferente.

MOLUSCO	MUESTRA	HPLC Pre-columna					HPLC Post-columna										Bioensayo de Ratón	
		dc-GTX 2,3	GTX 2,3	GTX 1,4	NEO STX	ug STXequiv/Kg	dc-GTX3	dc-GTX2	GTX3	GTX2	GTX4	GTX1	Neo	dc-STX	STX	STXequiv/Kg	Sanidad Exterior	INTECMAR
MEJILLON	PSP 390 <i>alexandrium</i>	ND	SI	ND	ND < LQ	108.5	SI	SI	SI	SI	ND	SI	ND	ND	ND	580	390	
MEJILLON	PSP 2070 <i>alexandrium</i>	ND	SI	SI	ND < LQ	1470.55	SI	SI	SI	SI	SI	SI	ND	ND	ND	2937.7	2070	
ALMEJA	400 <i>alexandrium</i>	ND	SI	< LQ	< LQ < LQ	301.61	NO	NO	SI	SI	SI	SI	ND	ND	ND	409.13	456	420
ALMEJA	950 <i>alexandrium</i>	ND	SI	SI	< LQ	SI	940.98	NO	NO	SI	SI	SI	SI	ND	SI	1142.13	1055	950
BERBERECHO	5085/07 <i>alexandrium</i>	ND	SI	SI	< LQ	SI	438.21	SI	SI	SI	SI	SI	SI	ND	ND	366.6	410	455
BERBERECHO	1270 <i>alexandrium</i>	ND	SI	SI	SI	SI	1194.21	NO	NO	SI	SI	SI	SI	ND	ND	782.6	980	1270

**Tabla 26.** Resultados de toxinas PSP obtenidos con diferentes muestras de moluscos de Galicia naturalmente contaminadas por episodios de *Alexandrium minutum*.

## ANDALUCIA 2010

La realización de los análisis para el estudio comparativo ha sido el objetivo fundamental durante 2010 en el L.C.C.RR.PP.

Estos análisis se han llevado a cabo según los siguientes puntos:

1. En el L.C.C.RR.PP. se han realizado las analíticas aplicando los métodos:
  - Bioensayo de ratón, MBA.
  - Detección de toxinas paralizantes por cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna.
  - kits *PSP MIST Alert™ JELLETT*.

El MBA es el método oficial y por tanto el método de referencia.

Los análisis por cromatografía con derivatización pre-columna de las muestras compartidas y de las propias fueron enviadas para ser analizadas entre los centros de INTECMAR (Galicia) e IRTA (Catalunya).

Los análisis realizados por cromatografía con derivatización post-columna se realizaron bajo las siguientes condiciones cromatográficas y en un equipo con las siguientes características:

### *Equipo:*

- Detector fluorescencia Waters 474. lex 330, lem 390
- Autoinyector Waters 717 con temperatura controlada (10° C).
- Bombas fases móviles: 2 Waters 515
- Bombas reacción post-columna: 2 Waters Reagent manager

### *Columna:*

- Columna Bonus-RP, 5µ, 4,6x150mm, HPLC column
- Temperatura columna 30°C

### *Fases móviles/ Reacción Post-columna:*

#### Isocrático 1:

- 100 mL de 1 mM ac. octansulfónico en 10 mM fosfato amónico, pH 7,2: 6,4 mL de Acetonitrilo
- Flujo: 1 mL/min.

#### Isocrático 2:

- 1,5 mM ac. octansulfónico en 10 mM fosfato amónico, pH 7
- Flujo: 1 mL/min.

#### Reacción post- columna:

- Coil Reactor de Peek a 50°C.
- Flujo reactivo oxidante: 0,4 mL/min.
- Flujo reactivo acidificante: 0,4 mL/min.

#### 2. Se han estudiado cuatro niveles de toxicidad:

- Sin toxicidad (o muestra blanca). Por debajo del límite de detección del MBA.
- Toxicidad cercana al límite de cuantificación: 400 µg eq STX.2HCL/Kg.
- Toxicidad cercana al límite legal: 800 µg eq STX.2HCL/Kg
- Toxicidad elevada, el máximo que se tuvo disponible para cada matriz.

#### 3. Se ha empleado la congelación como método de conservación de las alícuotas clasificándolas atendiendo a su proceso de congelación en:

- Tipo A: analizadas en el momento en el que se prepara el homogeneizado de la muestra.
- Tipo B: analizadas después de al menos 15 días de congelación.
- Tipo C: analizadas después de al menos 15 días de congelación y de haber sido transportadas.

#### 4. En Andalucía, el L.C.C.RR.PP. optó por 3 matrices: corruco (*Acanthocardia tuberculata*), chirla (*Chamelea gallina*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*).

No se obtuvo matriz de chirla suficiente para preparar el homogeneizado con rango de toxicidad cercana al límite legal por lo que se decidió sustituirlo por matriz a ese rango de almeja chocha (*Venerupis rhomboides*), especie de comportamiento similar a la anterior en cuanto a la acumulación-desintoxicación de estas toxinas.

Las muestras compartidas, analizadas por todos los participantes, fueron dos y ambas de mejillón. Una de ellas contaminada naturalmente con *G. catenatum*, originario de Andalucía, de las que se necesitaron mayores cantidades para preparar las alícuotas que más tarde se enviarían a Galicia y Catalunya. La segunda matriz para el intercomparativo fue mejillón contaminado con *A. minutum*, originario de Catalunya.

El envío de muestras desde Andalucía se realizó en dos fases: marzo y agosto. Del mismo modo fueron recepcionadas las muestras de mejillón procedentes de Catalunya para ser analizadas en el L.C.C.RR.PP. en abril y agosto.

5. Los análisis por MBA se han realizado con 25 g de muestra según se decidió en la reunión de coordinación celebrada en Vigo en enero de 2010. Esta modificación se admitió por entender que la representatividad de la muestra estaba asegurada al realizarse homogeneizados de más de 0,5 Kg. y ante la dificultad de obtener la cantidad de muestra tóxica necesaria en algunas especies.

6. Las alícuotas de cada matriz homogeneizada se prepararon en origen antes de ser congeladas y/o distribuidas, según el esquema de trabajo planificado, analizando de forma inmediata las denominadas de tipo A.

En el L.C.C.RR.PP. a grandes rasgos se han realizado de las matrices compartidas: 4 muestras para MBA, (25 g); 5 muestras para HPLC post-columna (5 g) y de 3 a 5 muestras con los kits Jellets según prioridades establecidas, por cada matriz y rango de toxicidad. En el resto de matrices: 4 muestras para MBA, (25 g); 4 muestras para HPLC post-columna (5 g); 4 muestras con los kits Jellets, por cada matriz y rango de toxicidad.

En la tabla 27 se presenta un esquema de los análisis realizados en Andalucía

	Sin Toxicidad		Tox. cercana al lím. de detección		Toxicidad cercana al lím. Legal		Toxicidad alta	
	<b>Corruco</b> ( <i>Acanthocardia tuberculata</i> )	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A	MBA Post-columna	2 tipo A
	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett
	Sin Toxicidad (chirla)		Tox.cercana al lím. de detección (chirla)		Tox. cercana al lím. Legal (almeja chocha)		Toxicidad alta (chirla)	
	<b>Chirla</b> ( <i>Chamelea gallina</i> ) <b>Almeja chocha</b> ( <i>Venerupis rhomboides</i> )	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A	MBA Post-columna	2 tipo A
	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna	2 tipo B	MBA Post-columna
	Sin Toxicidad		Toxicidad cercana al lím. de detección		Toxicidad cercana al lím. Legal		Toxicidad alta	
	<b>Mejillón</b> ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) Expuesto a <i>G.catenatum</i>	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A	MBA Post-columna Jellett	2 tipo A
	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett	2 tipo B	MBA Post-columna Jellett
	3 tipo B	MBA Post-columna Jellett	3 tipo B	MBA Post-columna Jellett	3 tipo B	MBA Post-columna Jellett	3 tipo B	MBA Post-columna Jellett
	Sin Toxicidad		Toxicidad cercana al lím. de detección		Toxicidad cercana al lím. Legal		Toxicidad alta	
	<b>Mejillón</b> ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) Expuesto a <i>A.minutum</i>	4 tipo C	MBA Post-columna Jellett	4 tipo C	MBA Post-columna Jellett	4 tipo C	MBA Post-columna Jellett	4 tipo C
	5 tipo C	MBA Post-columna Jellett	5 tipo C	MBA Post-columna Jellett	5 tipo C	MBA Post-columna Jellett	5 tipo C	MBA Post-columna

**Tabla 27:** Análisis realizados de cada matriz para cada rango de toxicidad. Se especifican los tipos de muestras atendiendo a su conservación.

7. Para realizar los análisis el L.C.C.RR.PP se planteó implementar un protocolo de evaluación de la calidad consistente en establecer de forma rutinaria las siguientes pautas de actuación:

- Calibración en ambos grupos de patrones cada 6 muestras aproximadamente.
- Inyección de patrón al inicio y al fin del análisis de la muestra, y una intermedia cada dos si se analizan más de una de forma simultánea
- Doble inyección de la muestra en cada análisis.
- Análisis de cada muestra anulando la oxidación para determinar la presencia de picos naturalmente fluorescentes en cada matriz.

Además se ha procedido a la limpieza de la columna cada día después realizar los análisis dejando el equipo de cromatografía con fase de limpieza con un flujo lento hasta su siguiente uso. Después de probar varias fases de limpieza realizadas con diferentes proporciones de disolvente orgánico, se optó por la limpieza con agua MilliQ sin añadir disolvente, siendo esta la forma que resultó más eficaz.

8. No se han podido concluir los cálculos de toxicidad de todas las muestras analizadas en 2010 por el método de detección de toxinas paralizantes por cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna.

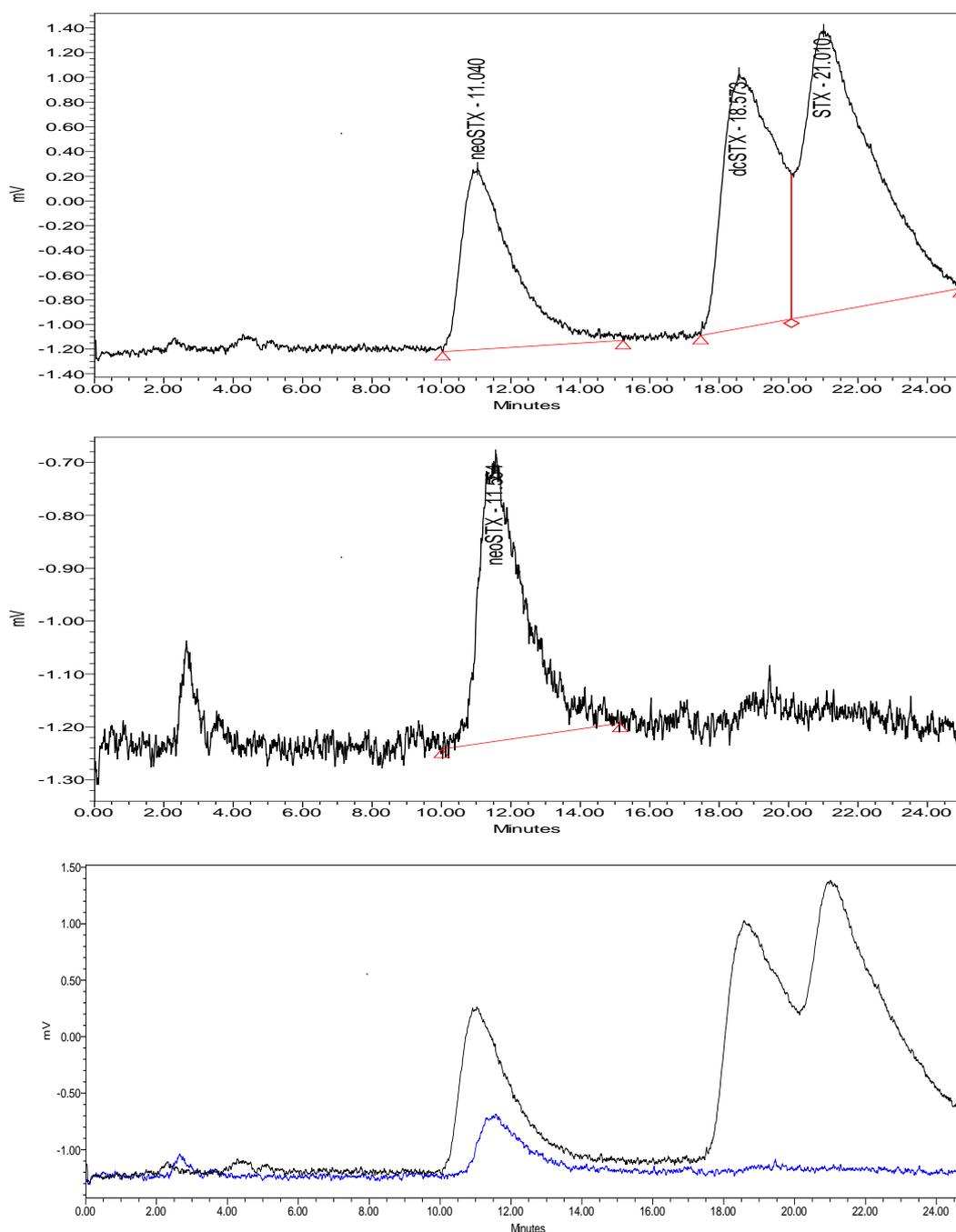
9. La valoración de la toxicidad de una muestra se ve dificultada por la aparición de numerosos picos coincidentes en el tiempo de retención con el de las toxinas, sobre todo en el grupo de las GTXs. Tiene interés mencionar las pruebas realizadas para determinar la aparición de picos naturalmente fluorescentes en los cromatogramas obtenidos sin oxidación.

En los análisis rutinarios las inyecciones efectuadas sin oxidación se han realizado después de varias inyecciones de “blancos” (agua acidulada con ácido acético a pH 4) anulando el flujo de oxidante y acidificante.

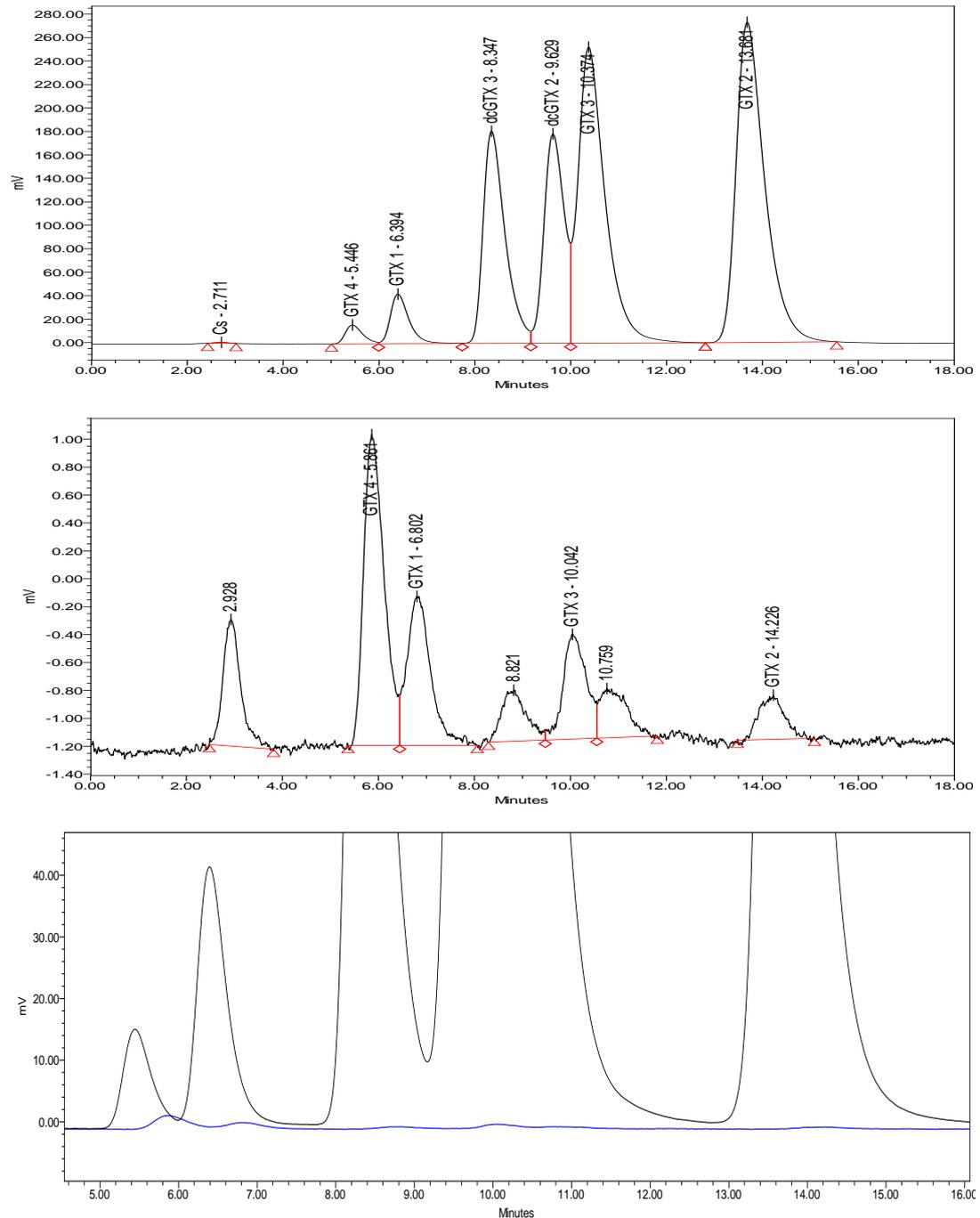
Se analizaron volúmenes diferentes de patrones de cada grupo de toxinas con y sin oxidación. Los resultados muestran trazas de toxinas en las inyecciones que se han realizado sin oxidación.

Se observa que la toxicidad que presentan los diferentes volúmenes no resulta como cabría esperar, obteniéndose resultados incoherentes a pesar de que la concentración de toxina fue la misma. Esto podría explicarse si tenemos en cuenta el orden de inyección. A medida que se aleja del momento de anulación del reactor la concentración de toxina es menor. Esto nos hace sospechar de la presencia de oxidante en el reactor, aun cuando el flujo ha sido anulado.

En las siguientes gráficas se muestran los cromatogramas obtenidos en las pruebas realizadas para comprobar la presencia de restos de toxinas una vez anulado el flujo del reactor.



**Figura 84:** De arriba a abajo se muestran los cromatogramas de una mezcla de neoSTX, dcSTX y STX. El primero de ellos aplicando el procedimiento habitual, con oxidación. El segundo anulando los flujos de oxidante y acidificante. En el tercer cromatograma se superponen los dos anteriores para que se aprecie mejor la presencia de neoSTX en la inyección sin oxidación.



**Figura 85:** De arriba a abajo se muestran los cromatogramas de un patrón mezcla de GTX 1-4, dcGTX 2-3 y GTX 2-3. El primero de ellos aplicando el procedimiento habitual, con oxidación. El segundo anulando los flujos de oxidante y acidificante. En el tercer cromatograma se superponen los dos anteriores. Se aprecian trazas de algunas de las toxinas.

## Revisión y envío a todos los grupos de trabajo de hoja de cálculo de toxicidad

A lo largo de 2009 se diseñó una hoja de cálculo para la obtención de resultados. En la reunión de coordinación realizada en Vigo en enero de 2010 se vio la utilidad de que se reenviase a todos los grupos de trabajo para su uso.

Los cálculos están basados en la tabla de equivalencia de Oshima, según los cálculos presentados en la “Supplemental information for PSP toxin CRMs” de National Research Council de Canadá (NRC).

Las hojas de cálculo facilitan la realización de la cuantificación de la toxicidad en equivalentes de saxitoxina a partir de las concentraciones de cada una de ellas detectadas por cromatografía. De esta forma se facilita el trabajo a la hora de procesar un gran número de muestras, a la vez que resulta una herramienta útil para determinar el perfil tóxico de las diferentes matrices en estudio, así como de las diferentes especies de fitoplancton causantes de la toxicidad PSP en los moluscos, como las diferentes cepas de *G.catenatum* o *A. minutum*. También resulta útil para valorar la toxicidad de las muestras sin tener en cuenta la aportación a los resultados de las inyecciones de muestra hidrolizada (toxinas producto de metabolizaciones a pH ácido). Con ello quizás puedan sacarse conclusiones que clarifiquen la necesidad de realizarlas en los análisis rutinarios.

En la reunión de coordinación que se realizó en Vigo en el mes de mayo se reiteró el empleo de las tablas de Oshima para la obtención de los cálculos de toxicidad, planteándose en el último encuentro de coordinación en noviembre en Huelva, la necesidad de adaptar las tablas de cálculo para el empleo de los TEF (toxicity equivalency factors) aceptados por la EFSA (*European Food Safety Authority*). Por tanto se realizaron nuevas hojas de cálculo empleando los dichos valores y se enviaron a los grupos para su empleo.

Los valores utilizados en cada caso se muestran en la tabla 28.

Toxina	Toxicidad relativa (Oshima)	Toxicity Equivalency Factors. TEFs (EFSA)	Toxina	Toxicidad relativa (Oshima)	Toxicity Equivalency Factors. TEFs (EFSA)
neoSTX	0,9243	1	GTX5	0,0644	0,1
dcSTX	0,5131	1	GTX3	0,6379	0,6
STX	1	1	GTX2	0,3592	0,4
GTX6	0,0644	0,1	C1	0,006	-
GTX4	0,7261	0,7	C2	0,0963	0,1
GTX1	0,994	1	C3	0,0133	-
dcGTX2	0,1538	0,2	C4	0,0576	0,1
dcGTX3	0,3766	0,4	dc neoSTX	-	0,4

**Tabla 28:** Factores de toxicidad relativa empleados en las hojas de cálculo para la determinación de la toxicidad.

La valoración de resultados obtenidos empleando los valores dados por Oshima y EFSA pueden ser interesante para evaluar la idoneidad de unos u otros factores de corrección para el cálculo final según la región de origen de las muestras, y por tanto del perfil toxínico.

Los cálculos tanto en un caso como en otro se han realizado en base a:

$$\mu\text{gSTXdiHCl.equiv} / \text{Kg} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i \times T_i}{2483} \times \frac{V}{W} \times 372.2 \times F$$

Sustituyendo los valores de la toxicidad relativa proporcionados en la tabla 28 en cada caso.

El objetivo fundamental de 2010 ha tenido un alto grado de consecución: analizar las muestras para el estudio de metodologías por los métodos de bioensayo de ratón, cromatografía líquida de alta eficacia con derivatización post-columna, y con la utilización de los kits comerciales Jelletts.

Como se recoge en este anexo el L.C.C.RR.PP. ha realizado los análisis, con resultados de toxicidad tanto de bioensayo como de los kits Jelletts, y una gran parte de los realizados por cromatografía, faltando aún por cuantificar algunas de las muestras ya analizadas al finalizar el año.

No es posible aún ofrecer conclusiones en la valoración de los resultados, aunque parece constatarse que los kits Jelletts detectan la presencia de la toxinas a partir del límite de detección, con resultados positivos en el rango de toxicidad entre 400 - 800  $\mu\text{g eq STX.2HCL/Kg.}$ , por lo que podría valorarse la posibilidad del uso de esta técnica como screening

## ANDALUCIA 2011

La realización de los análisis para el estudio comparativo fue el objetivo fundamental llevado a cabo a lo largo de 2010. Las hojas de cálculo diseñadas para el cálculo de toxicidad de las muestras se realizaron basándose en las tablas de equivalencia de Oshima atendiendo a los cálculos presentados en la "Supplemental information for PSP toxin CRMs" de National Research Council of Canadá (NRC). En la reunión de evaluación celebrada en Huelva en noviembre de 2010 se vio la necesidad de adaptar las hojas de cálculo para obtener resultados basándose en los valores de los TEF (toxicity equivalency factors) aceptados por la EFSA (European Food Safety Authority). Por tanto se realizaron nuevas hojas de cálculo empleando dichos valores y se enviaron a los grupos para su empleo.

El número total de análisis realizados en el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros son los que se muestran en la tabla 29.

Método	Número de muestras analizadas
Bioensayo de ratón	64
Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con derivatización post-columna	79
Kit PSP MIST Alert™ JELLETT	57

**Tabla 29:** Análisis realizados en el L.C.C.RR.PP

## GALICIA, ANDALUCÍA, CATALUNYA 2011

(ver ANEXO A que incluye las figuras y tablas asociadas)

**Resultados experimento intercompartivo de técnicas (las figuras y los análisis estadísticos a los que se hace referencia se encuentran expuestos en su totalidad en el anexo A**

### Bioensayo de ratón

#### Mejillón con toxinas de *Gymnodinium catenatum*

##### Andalucía

Los niveles de toxicidad estimados fueron algo superiores a los elegidos *a priori*. La dispersión fue reducida salvo en el nivel más alto, en el que estuvo en torno a un 15%.

Aún así, como puede apreciarse en la tabla siguiente, los intervalos de confianza del 95% de los dos niveles intermedios se solapan considerablemente, lo cual indica que en un porcentaje considerable valores inferiores a 800 se asignarán a este nivel y viceversa. No sucede así con el nivel muy tóxico, ya que intervalo de confianza no se solapa en absoluto con ninguno de los otros.

##### Catalunya

Las toxicidades estimadas fueron, en general, menores que las estimadas *a priori* y fueron también inferiores a las estimadas inicialmente en Andalucía. Probablemente por la presencia de tres observaciones, una en 800 y otra en 400 que no dieron positivo en el bioensayo, y una tercera en el nivel de 2500-5000, que aunque dio negativo, su valor estimado fue de la mitad que el obtenido en las otras muestras del mismo nivel. Los tres ensayos fueron realizados por el mismo operador. La dispersión igualmente fue mayor, siendo superior al 30%.

En este caso, al ser los intervalos de confianza más amplios, los niveles de 400 y 800 no solo se solapan entre sí, sino que también lo hacen con el nivel 0, lo cual indica que son estadísticamente indistinguibles de este y, por tanto, deberán darse gran número de falsos negativos.

Cuando se excluyen las tres observaciones consideradas incorrectas, las toxicidades estimadas son más elevadas y las dispersiones disminuyen, en algún nivel considerablemente, pero en promedio siguen siendo altas.

Tras esta corrección los intervalos de los niveles extremos no se solapan con los medios, aunque estos siguen solapándose entre sí. Es esperable, por tanto que se den tanto falsos negativos como falsos positivos pero de niveles de toxicidad próximos.

## Galicia

Los valores son notablemente más bajos que los estimados en Andalucía pero las dispersiones son del mismo orden y por tanto también lo son tamaños de los intervalos de confianza y los porcentajes esperables de falsos negativos y positivos.

## Comparación entre laboratorios. Bioensayos mejillón con perfil de *Gymnodinium catenatum*

Cuando se comparan los resultados de los bioensayos de ratón de mejillón con PSP proveniente de *Gymnodinium catenatum* en términos de resultados de toxicidad positiva y negativa (utilizando 800 como umbral), la consistencia de los resultados dentro de cada laboratorio es muy buena. Sin embargo entre laboratorios la concordancia es peor, y aunque es significativa, está en torno a un 75% cuando se consideran los tres laboratorios simultáneamente.

Se encuentran diferencias entre las estimaciones de los distintos laboratorios. En parte, aunque no completamente, debido a varios outliers que aparecen en los el laboratorio de Catalunya (resultados negativos del bioensayo en muestras positivas en otros laboratorios, o excesivamente bajos. Cuando se eliminan los outliers, las diferencias siguen siendo significativas aunque son notablemente menores.

El bioensayo, por tanto, con este tipo de toxicidad y matriz, no da resultados perfectamente comparables entre laboratorios. El hecho de haber elegido un nivel próximo al nivel de cierre, hace que las pruebas realizadas sean especialmente sensibles a diferencias de respuesta cuando se categorizan en tóxicos o no tóxicos. Con las dispersiones estimadas para el nivel aproximado de 800, en el ANOVA, el intervalo de confianza del 95% para una muestra de 800 va desde 640- 960 en los ensayos de Andalucía a 420-1180 para los ensayos de Catalunya (una vez descartados 3 outliers), con los resultados de Galicia próximos a los de Andalucía. Hay por tanto un rango relativamente amplio de muestras que pueden dar valores de toxicidad positivos o negativos dependiendo del error del procedimiento.

Resulta, por tanto, prácticamente imposible utilizar el bioensayo de ratón como método de referencia para la determinación de positivos y negativos, ya que los resultados obtenidos son excesivamente variables entre laboratorios.

## Cálculo de valores medios de bioensayos de mejillón con toxinas de *Gymnodinium catenatum*

Se calcularon los valores medios de los bioensayos en los distintos niveles de toxicidad elegidos, después de eliminar los 3 valores extrañamente bajos de Catalunya.

Aunque la intención inicial era utilizar estos resultados con referencia para el resto de las técnicas empleadas, la variabilidad observada hace necesaria su utilización en este sentido con mucha cautela.

Los valores obtenidos son:

Least Squares Means for  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$

Nivel Teor	Mean	SE Mean
<400	-0.00	169.2
2000-5000	6264.56	178.4
400	462.61	178.4
800	719.78	178.4

Las medias obtenidas para los diferentes laboratorios son las siguientes:

Labor	Mean	SE Mean
AND	1965.00	146.6
CAT	1754.83	163.9
GAL	1865.37	146.6

## Mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum*

### Catalunya

Los niveles dan algo más bajos que los teóricos y la dispersión es moderada-baja, pero en el nivel de 400 hay un punto con muy poca respuesta. A juzgar por los intervalos de confianza del 95%, todos los niveles son distinguibles entre sí, no habiendo solapamiento entre ellos a este nivel. Las variables accesorias monitorizadas, como el pH del extracto no tienen efecto alguno.

### Galicia

Las estimaciones de los niveles teóricos de 400 y 800 salen muy próximos por lo cual deben poder distinguirse adecuadamente, incluso cuando los datos se transforman logarítmicamente para homogeneizar la varianza y minimizar los efectos de los valores extremos. Para el nivel teórico de 2600 este laboratorio estima toxicidades de más del doble y además con una considerable dispersión.

### Andalucía

Las estimaciones obtenidas por Andalucía para las muestras de mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum* presentan una dispersión relativamente baja. Por esta razón, y aunque la diferencia entre los niveles medios es menor que la

esperable, es posible distinguir bien el nivel de 400 del de 800 (los otros dos niveles se distinguen mejor en todos los casos), ya que sus correspondientes intervalos de confianza del 95%, no se solapan. Esto puede apreciarse tanto con los datos sin procesar (no distribuidos normalmente) como en los transformados logarítmicamente.

Ninguna de las variables accesorias (tiempo conservación, pH extracto antes de ajustar, pH ajustado, tiempo entre extracción y análisis) tuvo un efecto significativo en las estimaciones de toxicidad por esta técnica, por lo que a ese respecto puede considerarse robusta.

### Comparación entre laboratorios Bioensayos mejillon con perfil de Alexandrium

Un ANOVA de dos vías muestra diferencias significativas con el nivel teórico, entre laboratorios e interacción entre niveles y laboratorios.

En general, los intervalos de confianza del 95% estimados para estos bioensayos son más estrechos que los encontrados para los mejillones que contenían toxinas de *Gymnodinium catenatum*, de forma que, en el caso más adverso, va de aproximadamente 700 a 800, reduciéndose, por tanto considerablemente las posibles muestras que pueden oscilar fácilmente entre resultados positivos y negativos.

### Cálculo de valores medios Bioensayos mejillon Alexandrium

Los promedios de toxicidad estimados por los bioensayos son los siguientes:

Least Squares Means for STXeq ratón

Nivel

Teor	Mean	SE	Mean
0	-0.00	120.51	
400	452.97	123.48	
800	632.17	120.51	
2600	4098.28	120.51	

Sin embargo, en los niveles altos, las diferencias son demasiado grandes como para que el valor medio sea asumido como sólido y, por tanto, no puede utilizarse como referencia.

labor

AND	1135.62	110.69
CAT	886.56	92.61
GAL	1865.37	110.69

## Almeja con perfil de *Gymnodinium catenatum*

En el único nivel estudiado para esta especie, la dispersión de las observaciones fue moderada.

### PSP precolumna

## Mejillón con toxinas de *Gymnodinium catenatum*

### Catalunya

Ni el tiempo de conservación ni el reactivo de extracción (ácido acético o ácido clorhídrico) ni el pH de extracción, ni el pH ajustado tienen un efecto significativo en los valores de toxicidad estimados por esta técnica.

No se encuentran prácticamente diferencias entre los niveles de 400 y de 800, pero estos sí se distinguen de los blancos. Esto sucede tanto cuando se utilizan para el análisis los datos originales como cuando se usan los datos transformados logarítmicamente y sucede fundamentalmente porque las medias de toxicidad estimadas para los dos niveles son muy próximas entre ellas y no porque la dispersión sea elevada.

### Galicia

Los resultados son básicamente similares a los obtenidos en Catalunya. Hay dificultad para distinguir correctamente los niveles de 400 y 800, aunque las diferencias entre estos dos son, en este caso, significativas cuando se transforman los datos logarítmicamente.

### Comparativa Galicia-Andalucía con muestras de Mejillón con *Gymnodinium catenatum*

Hay diferencias significativas en los resultados obtenidos con la misma técnica en los dos laboratorios. En general Galicia estimó valores más bajos de toxicidad en las muestras. En promedio aproximadamente un 20%, pero este hecho resultó más evidente en el nivel de 400 (como indica la significación de la interacción entre niveles y laboratorios, y como se aprecia en la recta de regresión).

## Mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum*

### Catalunya

Los valores estimados se aproximaron a los teóricos. No se encontraron efectos de ninguno de los dos pHs del extracto, ni antes ni después de la purificación por SPE C18, ni ninguna otra variable accesoria.

## Galicia

Las estimaciones obtenidas son próximas a los niveles teóricos. En este caso no se dispone de medidas de pH de los extractos por lo que no se puede evaluar su efecto. Es posible diferenciar correctamente todos los niveles dado que existen diferencias notables en las medias estimadas de cada uno de ellos y además las dispersiones no son elevadas.

## Comparación entre laboratorios con mejillón con perfil de Alexandrium

Los dos laboratorios dieron resultados similares aunque significativamente diferentes, como se puede observar de los ANOVAs de datos transformados (más preciso) y sin transformar. Aunque la media de las observaciones fue de 922 y 875, para Catalunya y Galicia, respectivamente, se aprecia interacción entre laboratorio y nivel tóxico teórico, de forma que en niveles intermedios los resultados obtenidos por Catalunya son superiores a los obtenidos por Galicia, pero en el nivel más alto sucede lo contrario.

Puede observarse que por esta razón, algunas de las muestras analizadas serían consideradas tóxicas por el laboratorio de Catalunya pero no por el de Galicia, por lo cual en caso de utilizarse esta técnica sería necesario realizar frecuentes intercalibraciones.

## Comparación métodos mejillón con Alexandrium (precolumna y MBA)

Cuando se analizan todos los datos en conjunto de los bioensayos de ratón y los análisis mediante HPLC con oxidación precolumna, no se encuentran diferencias significativas entre laboratorios, pero sí entre métodos. Aunque no se constataron diferencias en el nivel medio estimado por los diferentes laboratorios, se observaron considerables diferencias en las estimaciones dependientes de las combinaciones laboratorio-método-nivel de toxicidad, como muestra la significación de las interacciones.

En promedio, el método precolumna da estimaciones ligeramente más bajas que el bioensayo de ratón.

Cuando se estudian únicamente los niveles intermedios, que son los más importantes para el control, no se encuentran diferencias significativas entre métodos, aunque sí entre laboratorios y de la interacción nivel-laboratorio. Es decir los laboratorios varían entre sí en la cuantificación de forma diferente en cada nivel. Los dos laboratorios difieren también en la dispersión de los resultados, siendo mayor en el laboratorio de Catalunya.

## PostColumna

### Mejillón con perfil *Gymnodinium catenatum*

#### Andalucía

Los niveles más bajos coinciden razonablemente bien con la toxicidad esperable. La toxicidad estimada para el nivel más alto, sin embargo, resultó considerablemente alta y fuera del rango esperable “a priori”. Los intervalos de confianza del 95% en los niveles intermedios se solapan considerablemente, no siendo su diferencia significativa, de forma que es esperable una aparición de falsos negativos y falsos positivos, aunque con toxicidades que se apartan poco del nivel permisible, ya que las diferencias de ambos con el nivel de 0 y con el nivel alto son altamente significativas.

Se observan 4 puntos con valores notablemente inferiores a los restantes. Estos puntos corresponden a muestras que fueron almacenadas antes de su extracción por un período de más de 150 días. El análisis de la covarianza con los niveles teóricos como factor principal y con el tiempo de conservación como covariante, muestran que el tiempo de conservación de las muestras, antes de su extracción, lleva a la reducción de la toxicidad estimada por este método. Dado que en el bioensayo de ratón no se aprecia este efecto, su origen muy probablemente debe ser la desaparición de interferentes que coeluyen con las toxinas y que por tanto, cuando existen, llevan a la sobreestimación de la cantidad de toxina real. En muestras analizadas un tiempo relativamente largo después de su extracción, suelen obtenerse cromatogramas más limpios (y por tanto con menos interferentes) que en las recién extraídas. No se mantuvieron muestras después de la extracción un tiempo suficientemente largo y de forma sistemática, como para poder cuantificar este efecto, pero es posible que sea el mismo que se aprecia con la conservación prolongada.

#### Galicia

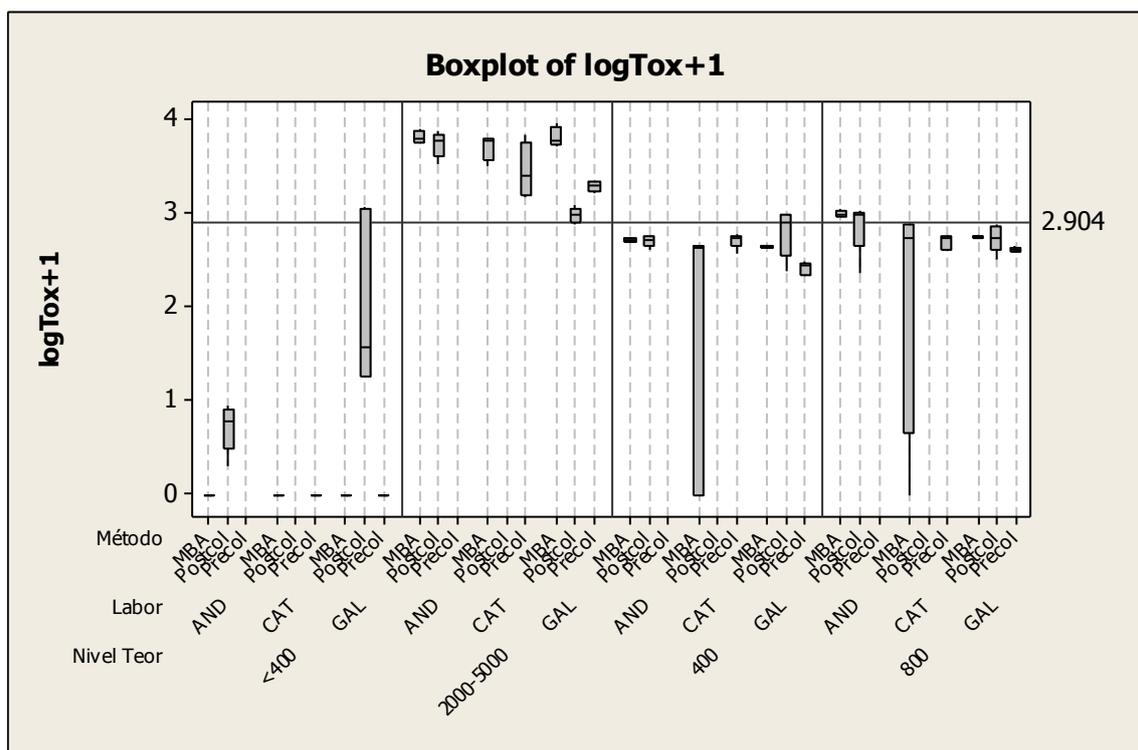
La técnica utilizada en este caso es similar a la postcolumna recientemente validada por AOAC y utiliza un gradiente discontinuo como método de elución, y es diferente de la utilizada en Andalucía, que emplea 2 eluciones isocráticas.

Esta técnica se mostró incapaz de cuantificar adecuadamente la toxicidad de las muestras de *Gymnodinium catenatum*, a pesar de que había cuantificado de forma razonable muestras con toxinas procedentes de *Alexandrium minutum*. Los niveles teóricos de toxinas se distinguen muy difícilmente debido principalmente a la gran dispersión de las medidas y por tanto las diferencias encontradas son escasamente significativas estadísticamente (y sólo cuando los datos se transforman logarítmicamente). Además, los intervalos de confianza del 95% de los tres niveles más altos se solapan completamente indicando que esta técnica es incapaz de distinguir para esta especie muestras tóxicas de no tóxicas incluso si la toxicidad es alta.

Desconocemos las razones de esta falta de eficacia para la cuantificación de la toxicidad de muestras con toxinas de *Gymnodinium catenatum*, pero esto indica claramente que este tipo de técnicas de cuantificación han de ser evaluadas en las matrices concretas en las que se vayan a utilizar y no es posible extrapolar su viabilidad.

### Comparación HPLC-Postcolumna con bioensayo y HPLC-Precolumna con mejillón con perfil de *Gymnodinium catenatum*

Los distintos métodos de cuantificación dieron resultados diferentes, aunque normalmente el nivel alto y el blanco son distinguibles de los niveles medios (400 y 800). El postcolumna utilizado en Galicia resultó el método que más se aparta de los otros.



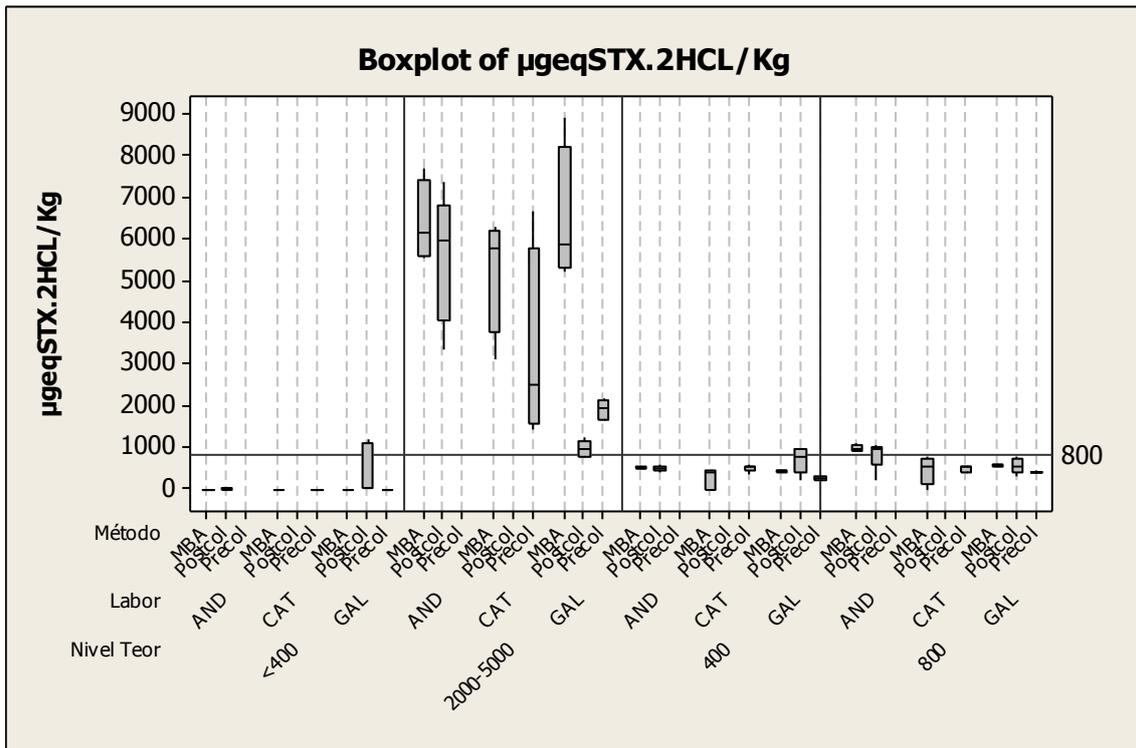
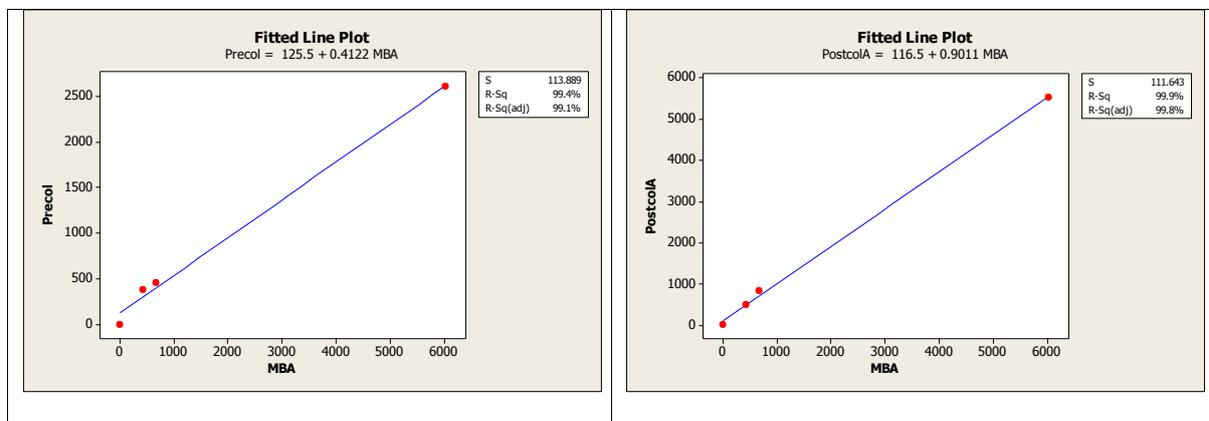
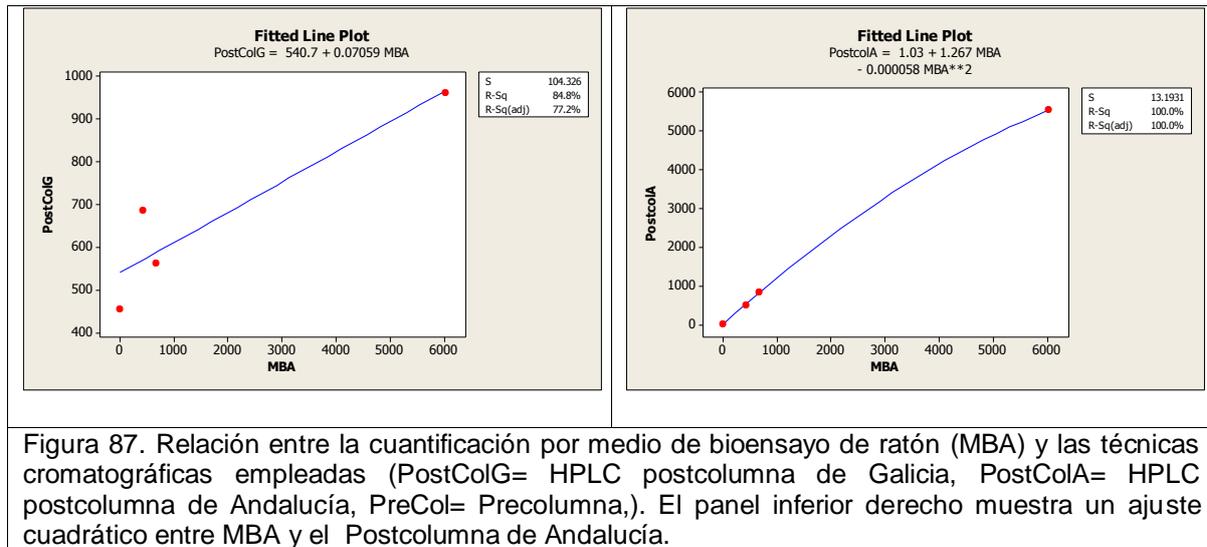


Figura 86.

La técnica que mejor relación tiene, desde el punto de vista cuantitativo, con la media de los bioensayos de ratón es el método postcolumna utilizado en Andalucía. Puede apreciarse en las regresiones con el bioensayo de ratón que la pendiente es próxima a 1 y el corte con el eje de la abscisas es relativamente bajo. Un ajuste cuadrático resulta mejor que una línea recta, sugiriendo una cierta falta de linealidad de alguno de los dos métodos (bioensayo y postcolumna de eluciones isocráticas) El método precolumna da resultados considerablemente más pobres, con una pendiente de 0.41, es decir, con una subestimación considerable de la toxicidad medida por el bioensayo. En los niveles intermedios este efecto es menos acusado y la pendiente sube a 0.7 cuando se excluye el nivel de mayor concentración, pero este coeficiente, de todas formas sigue quedando lejos del 1 ideal.





## Mejillón con perfil de Alexandrium

### Andalucía

Los resultados obtenidos por esta técnica están significativamente afectados por el método de conservación del extracto, de forma que las muestras que después de su extracción se mantuvieron en nevera a 4°C durante un día dieron valores de toxicidad significativamente inferiores (prácticamente la mitad) a las que se mantuvieron en congelador a -20°C durante 5 días.

Aunque podría pensarse en una degradación de las toxinas en las muestras conservadas en nevera, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras conservadas en esas condiciones durante 1, 2 y 3 días, por lo cual o dicha degradación se produce antes durante el primer día de conservación y luego se estabiliza o algún otro proceso está involucrado, como podría ser la insolubilización con el congelado de compuestos que capaces de retener toxinas.

Aparte de las consideraciones sobre las condiciones de almacenamiento, la técnica tiene una buena resolución, siendo capaz de distinguir los niveles intermedios de toxicidad, entre los cuales no hay solapamiento de los intervalos de confianza de 95%, lo que indica que en ese tramo de toxicidad no habrá números elevados de falsos positivos y/o negativos y, en todo caso estos no se apartarán significativamente del nivel permisible.

### Galicia

En los análisis de las muestras de los niveles de Catalunya, con toxinas originadas por *Alexandrium minutum*, se hicieron inicialmente en julio de 2011 con el método de Rourke et al (2008) sin modificar el gradiente, y posteriormente en marzo de 2012 se volvieron a realizar con el método modificado que tiene una separación de la zona dcGTX3-dcGTX2 –GTX3 y GTX2 más clara sin menoscabo del resto de las toxinas. Esto se observa comparando los dos patrones M9. Otro de los motivos fue confirmar la presencia del interferente que observamos en julio

en la zona de la GTX4-1 tal como se ve en la muestra C21 y que al inyectarla en marzo ese pico parece que mueve y se sitúa en la zona de la GTX3, lo que hizo que las cuantificaciones de marzo generaron unos resultados caóticos. Viendo los cromatogramas de las muestras C79 y C107 en los de julio encontramos la interferencia pero en los de marzo se mueve también hacia la zona de la GTX3 y en la C107 el perfil de julio mantiene un perfil más concordante con que cabe esperar de la toxificación por *A. minutum*.

No tenemos una explicación razonable para este fenómeno, salvo suponer que en el periodo entre julio 2011 y marzo 2012 en lo que los extractos se mantuvieron a  $-18^{\circ}\text{C}$  se haya producido algún cambio sustancial en el pico interferente de la zona GTX4-1 de forma que eluye en marzo en la zona de GTX3.

### **Corruco con perfil *Gymnodinium catenatum* (Andalucía)**

Esta técnica de cuantificación presenta en esta especie una dispersión considerable, especialmente en el nivel más elevado. En niveles intermedios es, sin embargo, moderada. En las muestras estudiadas resulta imposible distinguir los dos niveles intermedios (no hay diferencias significativas ya que se solapan los intervalos de confianza de sus medias). No obstante no es esperable que los falsos negativos que puedan darse tengan un nivel de toxicidad real alto y no deberían pasar los  $950 \mu\text{g eq STX}\cdot 2\text{HCl}/\text{kg}$ , en más de un 5% de las ocasiones.

En su explotación para la conserva, para la que el máximo nivel permisible es 3000, el lugar de 800, teniendo en cuenta que la dispersión se amplía, tanto los falsos negativos como los positivos serían más importantes.

### **Corruco. Comparación HPLC-Postcolumna- MBA (Andalucía)**

Los dos métodos cuantifican la toxicidad de forma similar el no niveles medio. Sin embargo, a medida que la toxicidad aumenta, el bioensayo da respuestas más elevadas. La interacción método – nivel tóxico es claramente significativa, tanto cuando se utilizan los datos sin transformar como los transformados, lo cual se debe a dos razones. La primera de ellas es la ya comentada de la mayor respuesta del bioensayo en los niveles altos de toxicidad. La segunda es la estimación, por el método de HPLC-postcolumna de una toxicidad moderada en el nivel de toxicidad teórica más bajo que el bioensayo no puede detectar por estar por debajo de su límite de detección.

La dispersión de las estimaciones en los niveles intermedios no es sustancialmente mayor en ninguna de las técnicas y por tanto ninguna de ellas contribuye de mayor manera a la existencia de falsos positivos o negativos.

A diferencia de lo observado en el caso del mejillón, sin embargo, la subestimación, que como indica el coeficiente de regresión, es de aproximadamente el 37% ( $1-0.63 = 0.37$ ) tiene lugar de forma proporcional a lo largo de todas las concentraciones, ya que la relación es claramente lineal.

## Chirla con perfil *Gymnodinium catenatum* (Andalucía)

Las estimaciones de toxicidad de la Chirla por este método presentaron una dispersión muy considerable, lo que la hace notablemente insegura para el control. Incluso utilizando la dispersión estimada para el nivel teórico de 400, existe una probabilidad aproximada del 5% de que muestras para las que se estima el nivel de cierre (800) tengan en realidad una toxicidad superior a 2200. En número de falsos positivos y negativos sería además importante.

### Chirla. Comparación Postcolumna- MBA (Andalucía)

El método postcolumna, en la chirla, dió valores de toxicidad más bajos que el bioensayo de ratón, especialmente en el nivel más alto, en el que la toxicidad estimada por el postcolumna es la mitad que por el bioensayo. Esto, da como resultado que muestras con una toxicidad considerable por bioensayo puedan considerarse seguras con el método postcolumna. Estas diferencias son estadísticamente significativas, como puede apreciarse de los ANOVAs de los datos sin procesar y de los transformados logarítmicamente. En el segundo caso especialmente, se observa que existe interacción entre el nivel teórico de toxicidad y el método empleado que se deriva fundamentalmente de la respuesta mucho mayor del bioensayo a los niveles altos de toxicidad.

La relación es aproximadamente lineal aunque disponemos de únicamente tres puntos (medias) para la estimación, por lo cual no es posible comprobar si existe un componente cuadrático. Asumiendo que la relación entre las medidas de las dos técnicas es lineal el HPLC-postcolumna subestima las medidas del bioensayo en aproximadamente un 59% ( $1-0.41=0.59$ ). En caso de que en realidad la relación sea cuadrática la subestimación será ligeramente, pero solo ligeramente, menor que la citada a niveles intermedios, que corresponderían al nivel de cierre por bioensayo, y sería superior a niveles más altos.

### Almeja con perfil *Gymnodinium catenatum* y comparación con MBA (Andalucía)

En el caso de la almeja, en el que únicamente fue posible trabajar con un nivel de toxicidad. La dispersión de las estimaciones fue moderada, aunque algo mayor que en bioensayo de ratón. La estimación por esta técnica es ligeramente más baja que por bioensayo (530 contra 555) pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

## Tests Jellett

En todos los casos estudiados tanto en Andalucía como en Catalunya, los test Jellett dieron resultados positivos en todas las muestras con toxicidades de aproximadamente 400 en adelante, y negativos en las muestras que no tenían toxicidad o que la tenían extremadamente baja ( $<10 \mu\text{eqSTX.2HCL/Kg}$ ) y

etiquetadas con nivel teórico <400. Únicamente se registraron dos excepciones. Un resultado positivo en una muestra teóricamente negativa y uno negativo en una muestra de alta toxicidad. Ambos se dieron en una tanda de determinaciones realizadas en Andalucía con muestras de mejillón con perfil de *Alexandrium minutum* procedente de Catalunya. Adicionalmente la repetición de las determinaciones en Andalucía, con algo más de cantidad de muestra extraída y con una extracción algo más enérgica (hervido) dio igualmente los resultados esperables, por lo que se ha de concluir que la discrepancia detectada no se debe al test en sí si no a una insuficiente extracción o a un fallo en la manipulación de las muestras.

Los resultados obtenidos suponen que, con los perfiles estudiados, los tests Jellett son seguros para detectar positivos de toxicidad pero dan un gran número de falsos positivos, ya que todas las muestras estudiadas que tienen niveles detectables por bioensayo de ratón incluso estando por debajo de los 800 µgeqSTX.2HCL/Kg, dan resultados positivos.

## Conservación de las muestras

Con el fin de presentar la valoración del efecto de la conservación de las muestras sobre el resultado final, se han comprobado las posibles diferencias de toxicidad entre muestras analizadas inmediatamente después de realizada la mezcla/homogeneización del material tóxico y muestras congeladas (a -20° C) un mínimo de 15 días. No se han encontrado diferencias ni por el bioensayo de ratón, ni HPLC-postcolumna debidas a la conservación de la muestra en congelación a -20°C. Si bien un número reducido de muestras mantenidas en estas condiciones durante más de 150 días dieron estimaciones de toxicidad, *por el método postcolumna*, considerablemente menores que las procesadas sin congelar o que las mantenidas en congelación menos de 40 días. La observación del efecto en la evaluación de toxicidad por el método de postcolumna de la conservación en congelado tras 150 días, está basada en un número reducido de muestras y debe ser evaluada adicionalmente.

## Conclusiones

### Bioensayo

Se detectan diferencias significativas entre laboratorios, aunque éstas son moderadas en los niveles próximos al cierre. La dispersión de los datos es, en general, mayor en los dos laboratorios que no realizan de forma intensa y continuada las determinaciones de toxicidad PSP por este método, por lo cual, es posible que, en la realidad, un uso óptimo del bioensayo requiera más formación, entrenamiento o práctica del personal encargado, que lo que habitualmente se asume.

La reproducibilidad ( y por tanto el porcentaje de falsos negativos y positivos) de los bioensayos varió con las especies , siendo en el corruco y el mejillón, por ejemplo, del mismo orden, pero existiendo 7 veces más variabilidad en los resultados de toxicidad en la chirla.

El perfil tóxico, sin embargo, no parece tener un efecto importante en la variabilidad de los resultados obtenidos por el bioensayo.

## HPLC con oxidación precolumna

Esta técnica, en promedio subestimó los valores de bioensayo de ratón en los dos laboratorios que la utilizaron. En promedio, la dispersión de las observaciones fue similar a la del bioensayo de ratón, aunque existieron diferencias significativas tanto en las estimaciones medias de toxicidad como en la dispersión entre los dos laboratorios que la utilizaron.

No parece existir un efecto significativo del perfil tóxico.

La utilización de esta técnica requeriría un calibrado detallado contra el bioensayo o con materiales tóxicos específicamente diseñados para esta calibración.

## HPLC con oxidación postcolumna

El método postcolumna utilizado por Andalucía (consistente en dos eluciones en modo isocrático) dió en mejillón resultados muy similares a los del bioensayo de ratón, sólo que con una subestimación relativa de la toxicidad mayor cuanto más alto fue el nivel tóxico (relación cuadrática, no lineal). La concordancia entre las dos técnicas fue buena en los niveles próximos al nivel de cierre.

La eficacia del método en relación al bioensayo depende considerablemente de la matriz biológica en la que se hallen las toxinas, ya que en el caso de la almeja la subestimación es similar a la que se da en el mejillón, pero en corruco y chirla las subestimaciones son considerablemente mayores, rayando en el primer caso el 40% y en el segundo el 60.

Las dispersiones son, en general similares a las obtenidas con bioensayo.

El método postcolumna utilizado en Galicia, que prácticamente es el mismo que ha sido validado por AOAC, dió resultados francamente pobres con cualquiera de los dos perfiles de toxinas probados, pero especialmente con el de Alexandrium minutum. Los malos resultados obtenidos y la casi nula consistencia de los resultados obtenidos en los reanálisis de las mismas muestras después de unos meses parecen justificarse, al menos en parte por la presencia y aparición de contaminantes que interfieren con la estimación de la concentración de las toxinas, especialmente de la GTX1, y hacen que esta técnica sea en la actualidad inutilizable para el control de los bivalvos en España.

## Jellett Rapid Tests

Los kits de Jellett Rapid Tests detectaron toxicidad casi sin excepción en todas aquellas muestras probadas con respuesta detectable por bioensayo de ratón, es decir, con niveles aproximados de toxicidad de 400.

Igualmente, con una única excepción, las muestras que se consideraba que no contenían toxinas en cantidades apreciables, dieron resultados negativos. Adicionalmente, las muestras discordantes una vez re-extraídas y vueltas a probar, dieron los resultados correctos, lo que indica que, con casi absoluta seguridad, los tests funcionan correctamente y detecta toxicidades iguales o incluso menores que 400 con los perfiles tóxicos habituales en Alexandrium del Mediterráneo y Gymnodinium catenatum.

Esta sensibilidad supone que con estos perfiles el número de falsos positivos debe ser muy elevado y por tanto que su uso en un sistema de control debe restringirse a el cribado de muestras, dejando a otras técnicas la obtención de resultados definitivos.

## Efecto de la conservación de las muestras

No se han encontrado diferencias ni por bioensayo de ratón ni por HPLC-precolumna ni HPLC-postcolumna debidas a la conservación de la muestra en congelación a -20°C. Si bien un número reducido de muestras mantenidas en esas condiciones durante más de 150 días dieron estimaciones de toxicidad considerablemente menores que las procesadas sin congelar o que las mantenidas en congelación menos de 40 días.

## OBJETIVO 2 Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento

La metodología utilizada para contrastar la aplicabilidad de los métodos a los programas de seguimiento se realizará a dos niveles:

2.3) Estudio continuo de factores asociados a la implementación de las metodologías y

2.4) Evaluación del potencial técnico y de infraestructuras en cada una de las comunidades autónomas

**2.1) Estudio continuo de factores asociados a la implementación de las metodologías. Para cada metodología, se procederá a una evaluación, cuando pueda ser objetiva, de los siguientes parámetros:**

- Listado de los equipos y las infraestructuras necesarias
- Coste aproximado de los equipamientos (adquisición y mantenimiento)
- Tiempo de ejecución del ensayo
- Costes del material fungible
- Coste por muestra
- Requerimientos de personal
- Horas/persona/muestra
- Puntos débiles
- Puntos fuertes

(no se excluyen otros parámetros)

### CATALUNYA 2010

Aplicación de los métodos de análisis a los programas de control del medio.

Se estableció un grupo de trabajo al respecto en la reunión de coordinación de enero de 2010 en Vigo, con el fin de dar un empuje al tema (ver acta de la reunión). Se ha consensado una hoja de recogida de datos referentes a la muestra y a la ejecución del protocolo analítico que se deberá cumplimentar durante el ejercicio comparativo planteado para 2010.

El grupo sobre evaluación de la aplicabilidad de los métodos propuso una plantilla para cuantificar costes y tiempo de ejecución; esta plantilla ha sido discutida en la reunión y está actualmente desarrollándose para recoger las aportaciones de los diferentes participantes. Estas tablas permiten evaluar el tiempo de ejecución en función de diferentes escenarios, y calcular costes relacionados con los diferentes elementos de ejecución de los diferentes ensayos. Se dispondrá de una tabla por cada tipo de ensayo.

Como ejemplos, mostramos las tablas empleadas para la valoración del bioensayo ratón:

COSTE (Euros)			
	COSTE ANUAL amort 5 años	coste/muestra	horas/muestra
			n muestras/año
			3500
<b>BIOTERIO</b>			
Instalación/equipos	40000		
Espacio	3000		
Personal mantenim.	30000		
Personal ensayo	65333,33	18,67	0,53
Personal fijo			
Fungible	10000		
Calidad	5000		
Administrativo	1300		
Residuos	15000		
Otros	700		
<b>TOTAL</b>	<b>170333,33</b>	<b>48,67</b>	
<b>COMPRA RATONES</b>			
Espacio	3000		
Personal mantenim.	2000		
Personal ensayo	65333,33	18,67	0,53
Personal fijo			
Fungible	7000		
Ratones	46200,00	4	
Calidad	4000		
Administrativo	500		
Residuos	11000		
Otros	700		
<b>TOTAL</b>	<b>139733,33</b>	<b>39,92</b>	
			coste persona/hora
			35

TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)	Personas para 10 muestras						
	1	4	10	2	4	8	
MUESTRAS (n)	1	4	10	2	4	8	
RECEPCION DE LA MUESTRA	2	8	20	10	5	2,5	
LIMPIEZA	5	20	50	25	12,5	6,25	
ABERTURA	4	16	40	20	10	5	
PROCESADO	10	40	100	50	25	12,5	
TIEMPO espera	120	120	120	120	120	120	
TIEMPO DE ENSAYO	10	40	100	50	25	12,5	
INTERPRETACIÓN RESULTADOS	1	4	10	5	2,5	1,25	
<b>TOTAL (min)</b>	<b>152</b>	<b>248</b>	<b>440</b>	<b>280</b>	<b>200</b>	<b>160</b>	
<b>TOTAL (horas)</b>	<b>2,5</b>	<b>4,1</b>	<b>7,3</b>	<b>4,7</b>	<b>3,3</b>	<b>2,7</b>	
						272,5	TOTAL ADAPTADO
						4,5	ejemplo
Minutos/persona/muestra	32						
Horas/persona/muestra	0,53						

Tabla 30: Ejemplo de posible cuadro recopilativo de la información respecto al tiempo y coste de ejecución de los análisis/ensayo.

## CATALUNYA, ANDALUCÍA Y GALICIA 2011

A partir de encuestas enviadas a los diferentes participantes, se recopilan a continuación las valoraciones hechas por los diferentes laboratorios en cuanto a tiempo de ejecución del análisis o ensayo y coste por muestra, teniendo en cuenta los criterios propios de cada institución relacionados con la ejecución del ensayo.

Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

### Tablas comparativas del tiempo de ejecución del ensayo /análisis por muestra y coste por muestra entre los diferentes laboratorios

	Tiempo de muestra (h)			
	MBA	HPLC-Pre	HPLC-Pos *	Jellet
Andalucía: Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros	3,7	-	12,3	2,2
Galicia: Intecmar	1,5	3,5	-	
Galicia: Centro de Investigaciones Mariñas	-	-	2,1	-
Cataluña: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries	-	1,0	-	0,5
Cataluña: Laboratori Salut Pública de Tarragona	2,2	-	-	1,4

**Tabla 31:** Tiempo de ejecución del ensayo /análisis por muestra.

\*: en el caso del uso del HPLC con derivatización Post Columna, los laboratorios de Andalucía y de Galicia emplearon dos protocolos diferentes. Andalucía adoptó un método sin gradientes aplicando solventes isocráticos que alarga el procedimiento.

	Coste muestra (euros)			
	MBA	HPLC-Pre	HPLC-Pos*	Jellet
Andalucía: Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros	105,8	-	392,7	96,6
Galicia: Intecmar	25,66/ 40,83**	59,35	-	-
Galicia: Centro de Investigaciones Mariñas	-	-	144,2	-
Cataluña: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries	-	116,6	-	47,5
Cataluña: Laboratori Salut Pública de Tarragona	249,6	-	-	118,6

**Tabla 32:** Coste de ejecución del ensayo /análisis por muestra.

\*: en el caso del uso del HPLC con derivatización Post Columna, los laboratorios de Andalucía y de Galicia emplearon dos protocolos diferentes. Andalucía adoptó un método sin gradientes aplicando solventes isocráticos que alarga el procedimiento.

\* \* En este caso los costes varían en función de si se usa el animalario de la institución (25,66 euros) o si se compran los ratones (40,83 euros)

En relación a los resultados, se observan discrepancias entre laboratorios en principio debidas a la propia organización del laboratorio en cuanto a personal, coordinación con otras actividades, espacios, determinación de costes. No obstante, se han podido obtener valoraciones en cuanto a coste y tiempo de ejecución que entran dentro del mismo orden de magnitud. Cabe señalar que en el laboratorio de INTECMAR, debido al gran número de muestras procesadas (5200 anualmente), los costes disminuyen significativamente respecto a otros laboratorios.

Presentamos a continuación los resultados detallados para cada laboratorio:

## ANDALUCIA: LCCRPP / Bioensayo ratón

n muestras/año **525**

**COSTE GLOBAL(Euros)**

COSTE ANUAL      coste/muestra      horas/muestra  
(amort 5 años)

### ANIMALARIO

Instalación/equipos	5182		
Espacio	5661		
Personal mantenim.	2000		
Personal proceso	21043,75	40,08	3,08
Personal análisis	7043,75	13,42	0,58
Personal fijo			
Fungible	5376		
Calidad	6868		
Administrativo	1860		
Residuos	500		
Otros			
<b>TOTAL</b>	<b>55534,50</b>	<b>105,78</b>	

### TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)

coste persona/hora <b>13</b>	<b>PROCESO</b>	1 persona	
	MUESTRAS (n)	1	4
	RECEPCION DE LA MUESTRA	10	40
	LIMPIEZA	60	240
	ABERTURA	25	100
	PROCESADO	90	360
	TIEMPO espera		
	TOTAL (min)	185	740
	TOTAL (horas)	3,1	12,3
	Minutos/persona/muestra	185	
	Horas/persona/muestra	3,08	

coste persona/hora **23**

### ANALISIS

TIEMPO DE ENSAYO	30	120
INTERPRETACIÓN RESULTADOS	5	20
TOTAL (min)	35	140
TOTAL (horas)	0,6	2,3
Minutos/persona/muestra	35	
Horas/persona/muestra	0,58	

## ANDALUCIA: LCCRRPP / HPLC-PostColumn

n muestras/año **525**

**COSTE (Euros)**

COSTE ANUAL      coste/muestra      horas/muestra  
(amort 5 años)

### LAB QUIM

Instalación/equipos	13042		
Espacio	3770		
Contrat mantenim.	11368		
Personal proceso	15925,00	30,33	2,33
Personal análisis	120347,50	229,23	9,97
Personal fijo			
Fungible	32897		
Columnas			
Calidad	6468		
Administrativo	1860		
Residuos	500		
Otros			
<b>TOTAL</b>	<b>206177,50</b>	<b>392,72</b>	

		TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)	
coste persona/hora	<b>13</b>	<b>PROCESO</b>	
		1 persona	
		MUESTRAS (n)	
		1	4
		RECEPCION DE LA MUESTRA	10      40
		LIMPIEZA	15      60
		ABERTURA	25      100
		PROCESADO	90      360
		TIEMPO espera	0      0
		TOTAL (min)	140      560
		TOTAL (horas)	2,3      9,3
		Minutos/persona/muestra	140
		Horas/persona/muestra	2,33

coste persona/hora	<b>23</b>	<b>ANALISIS</b>	
		TIEMPO DE ENSAYO	553      2212
		TIEMPO espera	
		INTERPRETACIÓN RESULTADOS	45      180
		TOTAL (min)	598      2392
		TOTAL (horas)	10,0      39,9
		Minutos/persona/muestra	598
		Horas/persona/muestra	9,97

## ANDALUCIA: LCCRPP / Jellet

n muestras/año	525
<b>COSTE GLOBAL(Euros)</b>	

COSTE ANUAL (amort 5 años)      coste/muestra      horas/muestra

ANIMALARIO			
Instalación/equipos	1361		
Espacio	3770		
Personal mantenim.	2000		
Personal proceso	15925,00	17,33	1,33
Personal análisis	10062,50	19,17	0,83
Personal fijo			
Fungible	1927		
Kits	13650	26	
Calidad	6468		
Administrativo	1860		
Residuos	500		
Otros			
<b>TOTAL</b>	<b>57523,50</b>	<b>96,57</b>	

TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)			
coste persona/hora	13	<b>PROCESO</b>	1 persona
		MUESTRAS (n)	1      4
		RECEPCION DE LA MUESTRA	10      40
		LIMPIEZA	15      60
		ABERTURA	25      100
		PROCESADO	30      360
		TIEMPO espera	
		TOTAL (min)	80      560
		TOTAL (horas)	1,3      9,3
		Minutos/persona/muestra	80
		Horas/persona/muestra	1,33

coste persona/hora	23	<b>ANALISIS</b>	
		TIEMPO DE ENSAYO	45      180
		INTERPRETACIÓN RESULTADOS	5      20
		TOTAL (min)	50      200
		TOTAL (horas)	0,8      3,3
		Minutos/persona/muestra	50
		Horas/persona/muestra	0,83

## GALICIA: Intecmar / Bioensayo Ratón

n muestras/año 5200

COSTE GLOBAL(Euros)

COSTE ANUAL (amort 5 años)    coste/muestra    horas/muestra

1 ANIMALARIO			
Instalación/equipos	2325,6		
Espacio			
Personal mantenim.	4279,2		
Personal proceso	96096,00	18,48	1,28
Personal análisis	20273,07	3,90	0,23
Personal fijo	393,60		
Fungible	7999,2		
Calidad	1200		
Administrativo	264		
Residuos	427,2		
Otros	153,6		
<b>TOTAL</b>	<b>133411,47</b>	<b>25,66</b>	

2 COMPRA RATONES			
Espacio			
Personal mantenim.	2481,6		
Personal proceso	96096,00	18,48	1,28
Personal análisis	20273,07	3,90	0,23
Personal fijo	393,60		
Fungible	2445,6		
Ratones	88556,00	17,03	
Calidad	1200		
Administrativo	264		
Residuos	427,2		
Otros	153,6		
<b>TOTAL</b>	<b>212290,67</b>	<b>40,83</b>	

		TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)	
coste persona/hora	14,4	<b>PROCESO</b>	
		1 persona	
		MUESTRAS (n)	
		RECEPCION DE LA MUESTRA	
		LIMPIEZA	
		ABERTURA	
		PROCESADO	
		TIEMPO espera	
		TOTAL (min)	
		TOTAL (horas)	
		Minutos/persona/muestra	
		Horas/persona/muestra	

coste persona/hora	17,2	<b>ANALISIS</b>	
		TIEMPO DE ENSAYO	
		INTERPRETACIÓN RESULTADOS	
		TOTAL (min)	
		TOTAL (horas)	
		Minutos/persona/muestra	
		Horas/persona/muestra	

## GALICIA: Intecmar / HPLC-PreColumna

n muestras/año **5200**

**COSTE (Euros)**

COSTE ANUAL      coste/muestra      horas/muestra  
(amort 5 años)

### LAB QUIM

Instalación/equipos	3566,4		
Espacio			
Contrat mantenim.	2404,8		
Personal proceso	122428,80	23,54	1,64
Personal análisis	171158,00	32,92	1,89
Personal fijo	1180,80		
Fungible	3621,6		
Columnas	2308,8		
Calidad	1200		
Administrativo	264		
Residuos	360		
Otros	148,8		
<b>TOTAL</b>	<b>308642,00</b>	<b>59,35</b>	

### TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)

coste persona/hora	<b>14,4</b>	<b>PROCESO</b>	1 persona	
		MUESTRAS (n)	1	4
		RECEPCION DE LA MUESTRA	3	12
		LIMPIEZA	9	36
		ABERTURA	18	72
		PROCESADO	68,1	272,4
		TIEMPO espera	36	144
		TOTAL (min)	134,1	536,4
		TOTAL (horas)	2,2	8,9
		Minutos/persona/muestra	98,1	
		Horas/persona/muestra	1,64	

coste persona/hora	<b>17,4</b>	<b>ANALISIS</b>		
		TIEMPO DE ENSAYO	38,5	154
		TIEMPO espera	105	
		INTERPRETACIÓN RESULTADOS	75	300
		TOTAL (min)	113,5	454
		TOTAL (horas)	1,9	7,6
		Minutos/persona/muestra	113,5	
		Horas/persona/muestra	1,89	

## GALICIA: Centro de Investigaciones Mariñas / HPLC-PostColumna

n muestras/año **500**

**COSTE (Euros)**

COSTE ANUAL      coste/muestra      horas/muestra  
(amort 5 años)

### LAB QUIM

Instalación/equipos	6000		
Espacio			
Contrat mantenim.	600		
Personal proceso	22500,00	45,00	0,75
Personal análisis	40000,00	80,00	1,33
Personal fijo	1500,00		
Fungible	1500		
Columnas			
Calidad			
Administrativo			
Residuos			
Otros			
<b>TOTAL</b>	<b>72100,00</b>	<b>144,20</b>	

### TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)

coste persona/hora <b>60</b>	<b>PROCESO</b>	1 persona	
	MUESTRAS (n)	1	4
	RECEPCION DE LA MUESTRA	5	20
	LIMPIEZA	10	40
	ABERTURA	10	40
	PROCESADO	20	80
	TIEMPO espera		
	TOTAL (min)	45	180
	TOTAL (horas)	0,8	3,0
	Minutos/persona/muestra	45	
	Horas/persona/muestra	0,75	

coste persona/hora <b>60</b>	<b>ANALISIS</b>		
	TIEMPO DE ENSAYO	60	240
	TIEMPO espera		
	INTERPRETACIÓN RESULTADOS	20	80
	TOTAL (min)	80	320
	TOTAL (horas)	1,3	5,3
	Minutos/persona/muestra	80	
	Horas/persona/muestra	1,33	

## CATALUNYA: IRTA / HPLC-PreColumna

n muestras/año **151**

**COSTE (Euros)**

COSTE ANUAL      coste/muestra      horas/muestra  
(amort 5 años)

### LAB QUIM

Instalación/equipos	5270		
Espacio	6500		
Contrat mantenim.			
Personal proceso	1239,41	8,21	0,45
Personal análisis	1411,85	9,35	0,50
Personal fijo			
Fungible	1985		
Columnas	902		
Calidad			
Administrativo			
Residuos	300		
Otros			
<b>TOTAL</b>	<b>17608,26</b>	<b>116,61</b>	

### TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)

coste persona/hora <b>18,24</b>	<b>PROCESO</b>	1 persona	
	MUESTRAS (n)	1	4
	RECEPCION DE LA MUESTRA	2	8
	LIMPIEZA	5	20
	ABERTURA	15	60
	PROCESADO	5	20
	TIEMPO espera	25	100
	TOTAL (min)	52	208
	TOTAL (horas)	0,9	3,5
	Minutos/persona/muestra	27	
	Horas/persona/muestra	0,45	

coste persona/hora <b>18,7</b>	<b>ANALISIS</b>		
	TIEMPO DE ENSAYO	15	60
	TIEMPO espera	0	
	INTERPRETACIÓN RESULTADOS	15	60
	TOTAL (min)	30	120
	TOTAL (horas)	0,5	2,0
	Minutos/persona/muestra	30	
	Horas/persona/muestra	0,50	

## CATALUNYA: IRTA/ Jellet

n muestras/año **40**

**COSTE GLOBAL(Euros)**

	COSTE ANUAL (amort 5 años)	coste/muestra	horas/muestra
<b>ANIMALARIO</b>			
Instalación/equipos	0		
Espacio	0		
Personal mantenim.	0		
Personal proceso	328,32	8,21	0,45
Personal análisis	24,93	0,62	0,03
Personal fijo			
Fungible			
Kits	896	22,4	
Calidad	0		
Administrativo	0		
Residuos	0		
Otros	0		
<b>TOTAL</b>	<b>1249,25</b>	<b>31,23</b>	

		<b>TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)</b>	
coste persona/hora	<b>18,24</b>	<b>PROCESO</b>	
		1 persona	
		MUESTRAS (n)	
		1	4
		RECEPCION DE LA MUESTRA	2 8
		LIMPIEZA	5 20
		ABERTURA	15 60
		PROCESADO	5 20
		TIEMPO espera	10 40
		TOTAL (min)	37 148
		TOTAL (horas)	0,6 2,5
		Minutos/persona/muestra	27
		Horas/persona/muestra	0,45

coste persona/hora	<b>18,7</b>	<b>ANALISIS</b>	
		TIEMPO DE ENSAYO	0 0
		INTERPRETACIÓN RESULTADOS	2 8
		TOTAL (min)	2 8
		TOTAL (horas)	0,0 0,1
		Minutos/persona/muestra	2
		Horas/persona/muestra	0,03

## CATALUNYA: Laboratori Salut Pública de Tarragona / Bioensayo ratón

n muestras/año **132**

**COSTE GLOBAL(Euros)**

COSTE ANUAL      coste/muestra      horas/muestra  
(amort 5 años)

COMPRA RATONES			
Instalación/equipos	381,6		
Espacio	102		
Personal mantenim.	751,74		
Personal proceso	2308,90	17,49	0,83
Personal análisis	4452,80	33,73	1,33
Personal fijo	7639,50		
Fungible	1000		
Ratones	14256,00	108	
Calidad	1006		
Administrativo	749,76		
Residuos	300		
Otros	0		
<b>TOTAL</b>	<b>32948,30</b>	<b>249,61</b>	

coste persona/hora		TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)	
<b>20,99</b>	<b>PROCESO</b>	1 persona	
	MUESTRAS (n)	1	4
	RECEPCION DE LA MUESTRA	5	20
	LIMPIEZA	20	80
	ABERTURA	10	40
	PROCESADO	15	60
	TIEMPO espera		
	TOTAL (min)	50	200
	TOTAL (horas)	0,8	3,3
	Minutos/persona/muestra	50	
	Horas/persona/muestra	0,83	

coste persona/hora		ANALISIS	
<b>25,3</b>	<b>ANALISIS</b>		
	TIEMPO DE ENSAYO	70	280
	INTERPRETACIÓN RESULTADOS	10	40
	TOTAL (min)	80	320
	TOTAL (horas)	1,3	5,3
	Minutos/persona/muestra	80	
	Horas/persona/muestra	1,33	

### CATALUNYA: Laboratori Salut Pública de Tarragona / Jellet

n muestras/año **132**

#### COSTE GLOBAL(Euros)

	COSTE ANUAL (amort 5 años)	coste/muestra	horas/muestra
<b>ANIMALARIO</b>			
Instalación/equipos	0		
Espacio	2		
Personal mantenim.	375,87		
Personal proceso	2308,90	17,49	0,83
Personal análisis	1948,10	14,76	0,58
Personal fijo	6111,60		
Fungible	800		
Kits	2956,8	22,4	
Calidad	406,8		
Administrativo	749,76		
Residuos	0		
Otros	0		
<b>TOTAL</b>	<b>15659,83</b>	<b>118,64</b>	

#### TIEMPO DE EJECUCIÓN (min)

coste persona/hora	<b>20,99</b>	<b>PROCESO</b>	
		1 persona	
		MUESTRAS (n)	
		1	4
		RECEPCION DE LA MUESTRA	5 20
		LIMPIEZA	20 80
		ABERTURA	10 40
		PROCESADO	15 60
		TIEMPO espera	
		TOTAL (min)	50 200
		TOTAL (horas)	0,8 3,3
		Minutos/persona/muestra	50
		Horas/persona/muestra	0,83

coste persona/hora	<b>25,3</b>	<b>ANALISIS</b>	
		TIEMPO DE ENSAYO	30 120
		INTERPRETACIÓN RESULTADOS	5 20
		TOTAL (min)	35 140
		TOTAL (horas)	0,6 2,3
		Minutos/persona/muestra	35
		Horas/persona/muestra	0,58

## **2.2) Una evaluación del potencial técnico y de infraestructuras en cada una de las comunidades autónomas.**

### **ANDALUCIA – Potencial y Perspectivas de futuro**

#### **Programa de vigilancia en Andalucía:**

La Comunidad Autónoma tiene competencia exclusiva en materia de marisqueo y acuicultura y en consecuencia le corresponde efectuarel Programa de Control y Seguimiento de las Condiciones Sanitarias en las Zonas de Producción de moluscos bivalvos, gasterópodos y equinodermos marinos del litoral andaluz. Mediante la Orden de la Consejería de Agricultura y Pesca de 15 de julio de 1993, se declararon las zonas de producción de moluscos bivalvos, moluscos gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos de la Comunidad Autónoma de Andalucía, la cual ha sido modificada en varias ocasiones, la última mediante la Orden de 18 de noviembre de 2.008 (BOJA núm.18, de 5 de diciembre), en lo relativo a la relación de zonas de producción.

En Andalucía, el establecimiento del sistema de control sanitario se lleva a cabo sobre las 56 zonas declaradas e incluye por un lado muestreos sobre el agua para vigilar la variación de fitoplancton tóxico en la zona, y por otro sobre los moluscos, en los que se controla fundamentalmente la posible contaminación bacteriana (E. coli, como indicador de contaminación fecal y Salmonella spp), contaminación toxicológica (biotoxinas marinas paralizantes, amnésicas y lipofílicas) y contaminación química (metales pesados, compuestos organohalogenados, radionúclidos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, dioxinas y furanos).

Los diferentes controles analíticos se realizan en el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros de la Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía, acreditado según la norma europea UNE-EN-ISO 17025 para el procedimiento de detección de toxinas paralizantes, entre otros.

#### **Evaluación del potencial técnico y de infraestructuras**

En la actualidad, el Laboratorio de Control de Calidad de Recursos Pesqueros es el único en la Comunidad Autónoma que tiene la consideración de Centro Especializado Pesquero; es decir, se trata de un Centro Periférico que presta una función de apoyo técnico especializado en las actividades que desarrolla la Consejería de Agricultura y Pesca en el ámbito pesquero.

Se encuentra ubicado en el Paraje “Agua del Pino”, frente a la flecha litoral de la Desembocadura del Río Piedras, en la provincia de Huelva.

Las características y dimensiones del centro, construido en 2003 y con una superficie de 1150 m<sup>2</sup>, permiten la incorporación de técnicas analíticas avanzadas destinadas a garantizar la calidad de los productos pesqueros. Distribuido en diferentes estancias especializadas en análisis de contaminantes químicos, microbiológicos, toxicológicos, fitoplancton marino y oceanografía.

Para la ejecución de los ensayos el laboratorio dispone de equipos instrumentales entre los que se incluyen:

- Cromatografía de gases con detección ECD y MS
- Cromatografía líquida de alta eficacia con DAD
- Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrómetro de masas (LC/MS/MS)
- Espectrometría de absorción atómica (FAAS, ETAAS y CVAAS)
- Análisis automático por flujo continuo segmentado
- Sistema automatizado para detección de bacterias
- Microscopía óptica con análisis digital de imagen
- Equipos oceanográficos para registro en continuo de magnitudes físico-químicas (CTDs)
- Cámara visitable para cultivo de microalgas
- Unidad de producción animal

La plantilla cuenta con ocho titulados superiores de diferentes disciplinas entre los que se incluyen: Química, Biología, Veterinaria y Ciencias del mar. El resto de personal tiene la categoría de oficial de laboratorio, con una amplia formación y experiencia en análisis de recursos pesqueros. Dos administrativos forman parte de la plantilla del laboratorio.

El Programa de control y vigilancia de las zonas de producción de moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos del litoral andaluz se realiza de forma continuada durante el año en un total de 56 zonas de producción y cuenta con 4 titulados superiores para la toma de muestras.

Todo ello permite una gran capacidad en la gestión de toma de muestras y respuesta en análisis.

Un avanzado sistema informático permite que los resultados de los análisis puedan ser consultados en tiempo real por las Delegaciones Provinciales, lo que permite la intervención inmediata en los cierres y aperturas de los caladeros. La información del estado de las zonas de producción se actualiza en la página web de la Consejería de Agricultura y Pesca y puede ser consultada por cualquier ciudadano.

El laboratorio colabora con empresas privadas de la industria conservera, empresas acuícolas, laboratorios alimentarios del sector privado, empresas públicas de Medio Ambiente y Centros Públicos de Investigación autonómicos y nacionales.

Se coopera con instituciones como el Laboratorio Europeo de Referencia en Biotoxinas Marinas, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (Ministerio de Sanidad y Consumo) y participa en convocatorias de investigación como los Planes de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia y Planes Nacionales de cultivos marinos JACUMAR, organismo dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

### **Aplicabilidad:**

Actualmente en el L.C.C.RR.PP se emplea el método biológico para la detección de toxinas paralizantes, método oficial para este tipo de toxinas (AOAC (1990). Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists., sec 959.08).

Para llevar a cabo este ensayo con utilización de animales de experimentación el laboratorio cuenta con la Unidad de Producción Animal, con un manejo productivo adaptado a las necesidades de reactivo biológico según el sistema de control sanitario que se lleva a cabo en Andalucía.

Con el empleo del método oficial el tiempo en presentar resultados de muestras recepcionadas en el laboratorio, salvo situaciones excepcionales, no sobrepasa el de la jornada laboral, teniendo en cuenta el personal con el que se cuenta en la actualidad.

Tal y como ha sido aplicado el método C.L.A.E. post-columna para el estudio comparativo del proyecto el tiempo en obtener resultados se incrementa significativamente llegando a una media de 3 muestras completas en una semana si se aplica el protocolo de evaluación de la calidad y considerando la jornada laboral de 8 a 18 horas.

La ventaja de poder definir el perfil tóxico de las muestras que ofrece el método C.L.A.E. post-columna, pues existe una determinación de cada una de las toxinas buscadas, supone al mismo tiempo la desventaja de obtener los resultados en un plazo mucho más largo, con el consecuente perjuicio para el sector productor.

En el caso del Kit PSP MIST Alert™ JELLETT el tiempo necesario es equiparable al del bioensayo de ratón, aunque se necesitaría otro método complementario para obtener resultados cuantitativos. Además si contrastamos estos resultados con los obtenidos con el método biológico, existe un rango de toxicidad, entre el límite de detección y el límite legal (400-800 µg eq STX.2HCL/Kg) en el que los resultados detectan la presencia de toxinas, por lo que se obtendrían falsos positivos. Este rango se amplía comparando los resultados con el método C.L.A.E. post-columna, en el que se obtendrían resultados positivos con valores por debajo de los 400 µg eq STX.2HCL/Kg.

La aplicabilidad de los métodos resulta de interés en los sistemas de control sanitario pues determina la capacidad para obtener resultados y por tanto afecta de forma directa la gestión sanitaria de las zonas de producción.

En el L.C.C.RR.PP. se ha valorado la aplicación de los tres métodos empleados en el estudio comparativo del presente proyecto: bioensayo de ratón, C.L.A.E. post-columna y Kit PSP MIST Alert™ JELLETT.

Para el estudio de la aplicabilidad de cada método se comenzó recopilando información sobre equipos e instrumental empleados en cada método, así como las unidades de material fungible necesarias para llevar a cabo cada procedimiento, el tiempo estimado en llevarlos a cabo hasta la obtención del resultado y el personal de diferente cualificación que lo desarrolla. Los costes se han valorado en base a los últimos presupuestos recibidos en el momento de la realización del estudio

En el caso de los equipos y del instrumental se han tenido en cuenta los importes por mantenimiento tales como los servicios técnicos y las calibraciones si son realizadas por entidades externas. Además se ha considerado si los equipos son empleados en varias analíticas compartiendo entre ellas el coste del mismo. De igual forma se ha procedido con los gastos generales, estimando el valor de los mismos teniendo en cuenta la globalidad de las determinaciones que se realizan en el L.C.C.RR.PP.

Tiene interés señalar que para la realización de los análisis con el método C.L.A.E. post-columna, el L.C.C.RR.PP implementó un protocolo de evaluación de la calidad consistente en establecer de forma rutinaria las siguientes pautas de actuación:

- Calibración en ambos grupos de patrones cada 6 muestras aproximadamente.
- Una Inyección de patrón al inicio y al fin del análisis de la muestra, y una intermedia cada dos si se analizan más de una de forma simultánea.
- Doble inyección de la muestra en cada análisis.
- Análisis de cada muestra anulando la oxidación para determinar la presencia de picos naturalmente fluorescentes en cada matriz.

Esto incrementa significativamente el número de análisis necesarios para la obtención de resultados por este método y por tanto también el tiempo necesario para ello.

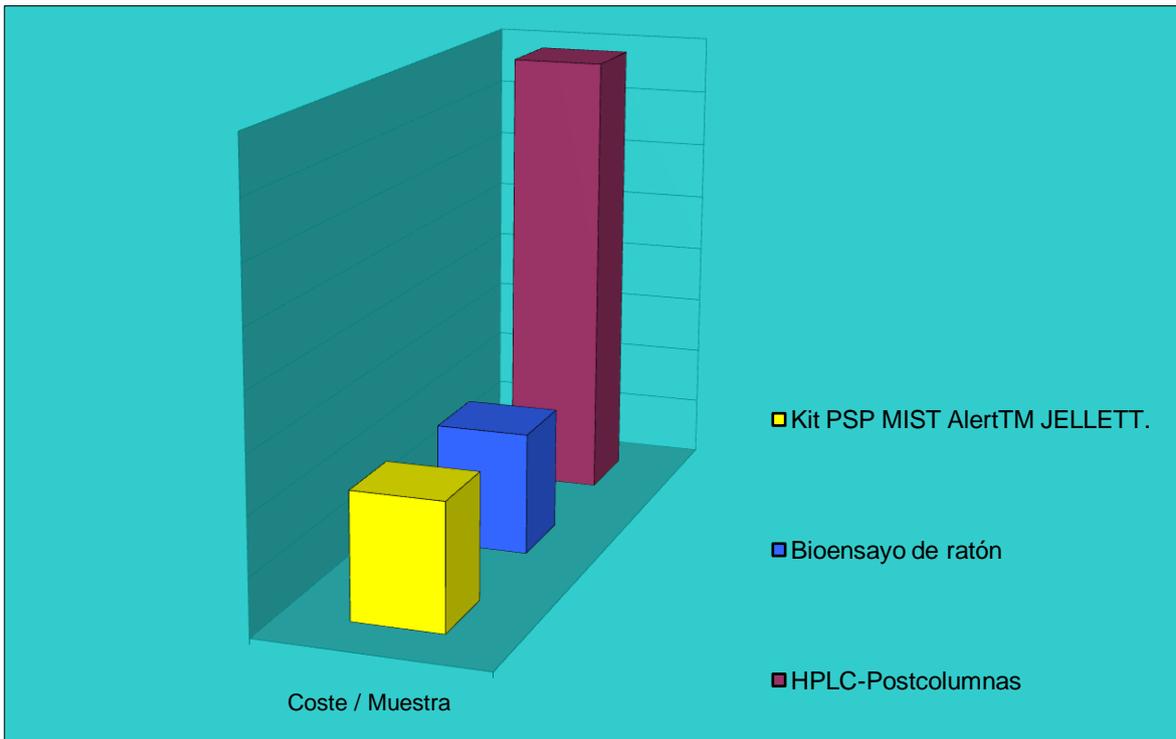
Además de incrementar el precio por análisis, el tiempo en obtener resultados es determinante para su implementación como método de control. No se puede llevar a cabo el Control y Seguimiento de las Condiciones Sanitarias en la Zonas de Producción con las necesidades actuales de muestreo si consideramos el tiempo de obtención de resultado en las condiciones de trabajo llevadas a cabo durante el desarrollo del actual proyecto.

Del estudio de aplicabilidad resulta interesante comparar el coste de la aplicación de los diferentes métodos en la detección de toxinas paralizantes dentro del mismo sistema de control sanitario de las zonas de producción. En este contexto, en el L.C.C.RR.PP podemos hacer una valoración de los costes totales de los tres métodos aplicados tal y como se muestra en la gráfica 1.

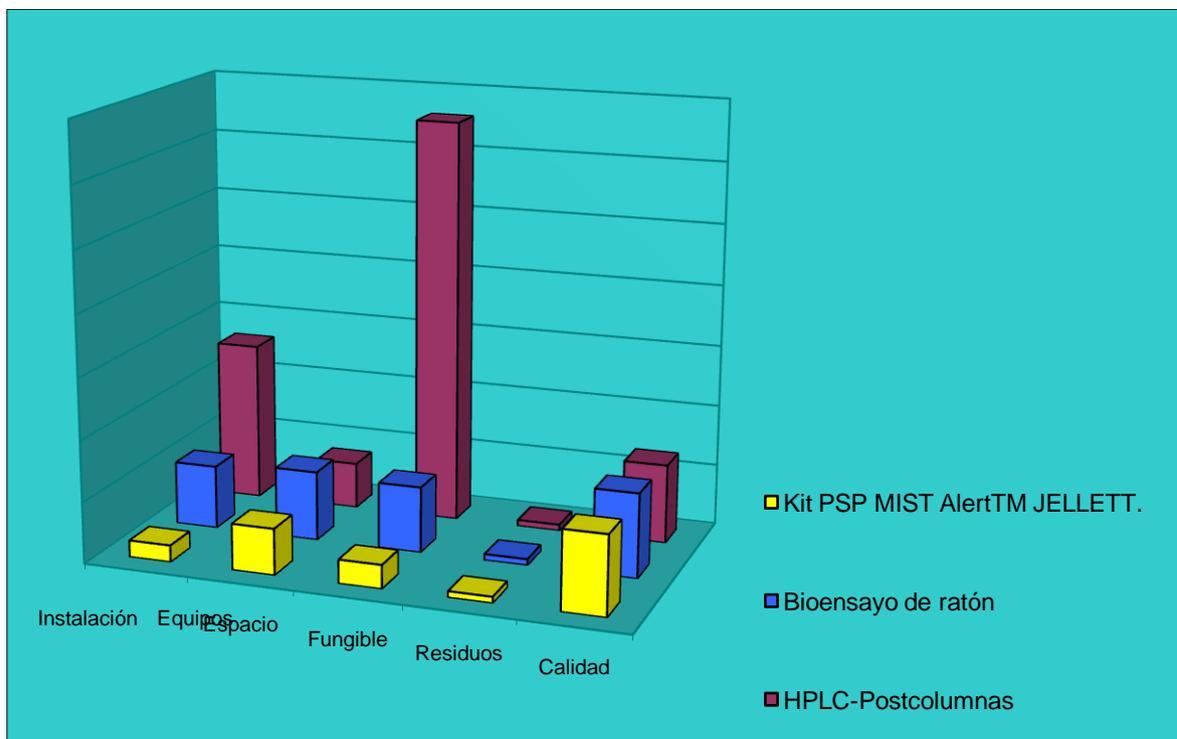
Los valores obtenidos suponen que el menor coste corresponde a la obtención de resultados empleando el bioensayo de ratón, en instalaciones con producción propia del reactivo biológico. Prácticamente el mismo coste supone la utilización del Kit PSP MIST Alert™ JELLETT, siendo un 3,8% más elevado en relación al bioensayo. La mayor diferencia se obtiene en el empleo del método de C.L.A.E. post-columna: 370% por encima del bioensayo de ratón.

Si desglosamos los valores podemos ver que los gastos que elevan el coste del método de detección de toxinas paralizantes por C.L.A.E. post-columna en relación a los estudiados son los derivados del equipo y los fungibles empleados (gráfica 2), así como del coste del personal que lleva a cabo el análisis (gráfica 3).

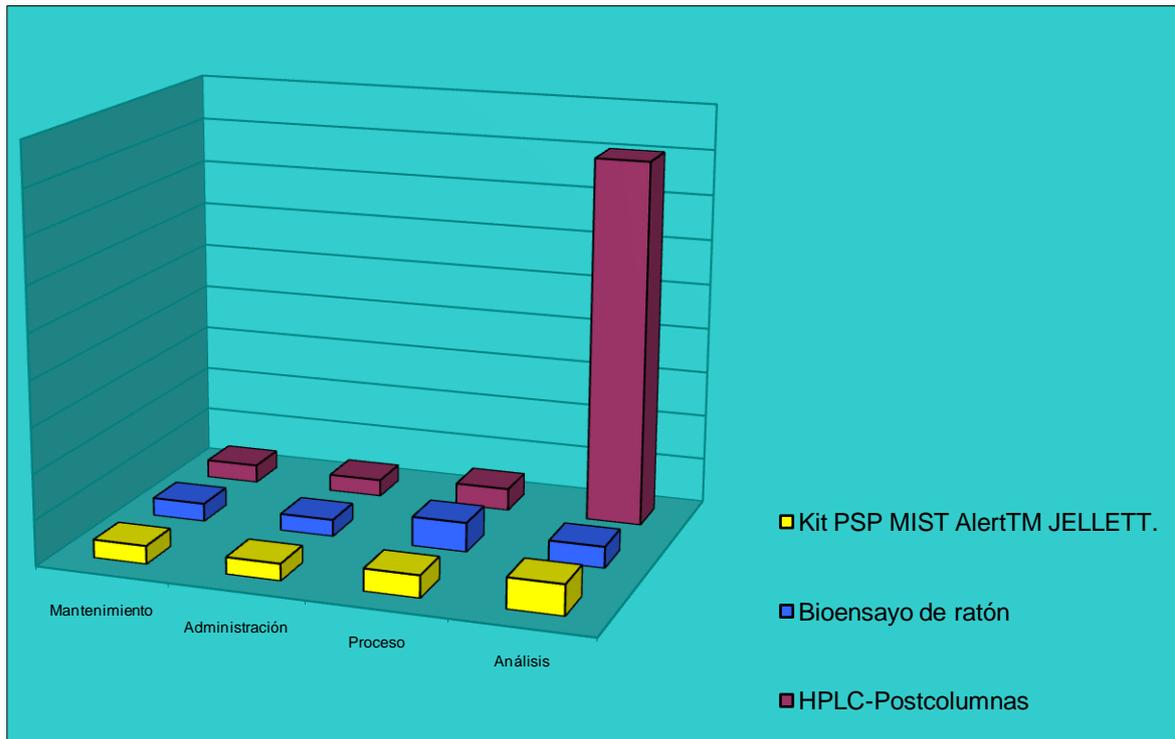
La causa de estos elevados valores en el método indicado es sin duda el tiempo que se tarda en obtener un resultado de análisis y que supone un coste muy elevado, fundamentalmente de personal. Además de incrementar el precio por análisis, el tiempo en obtener resultados es determinante para su implementación como método de control. No se puede llevar a cabo el Control y Seguimiento de las Condiciones Sanitarias en la Zonas de Producción con las necesidades actuales de muestreo si consideramos el tiempo de obtención de resultado en las condiciones de trabajo llevadas a cabo durante el desarrollo del actual proyecto.



**Gráfica 1:** Comparativa del coste total necesario para obtener resultados en la detección de toxinas paralizantes empleando diferentes métodos.



**Gráfica 2:** Comparativa del coste desglosado en los diferentes métodos empleados.



**Gráfica 3:** Comparativa del coste del personal desglosado en los diferentes métodos empleados.

Para implementar el método de C.L.A.E. post-columna en el L.C.C.RR.PP, y llevar a cabo el control sanitario con los requerimientos actuales se tendría que estudiar la posibilidad de:

- Trabajar con dos equipos de C.L.A.E. post-columna. analizando en cada uno de ellos uno de los grupos de toxinas analizados que emplean fases móviles diferentes: derivados de la saxitoxina por un lado y grupo de la gonyatoxina por otro.
- Si esto no fuese posible, adaptar los equipos de C.L.A.E. post-columna para el trabajo con gradientes introduciendo protocolos de limpieza sistematizados del equipo.
- Estudiar la posibilidad de establecer un *screening* en rutina con una única fase móvil, y emplear la segunda en el caso de detectar la presencia de toxinas, o grupo de toxinas.

De esta forma se reduciría el tiempo de obtención de resultados, y haría viable el empleo de este método en el control sanitario, tanto por acortar los plazos de entrega de resultados como por abaratar costes de personal.

En cuanto a los resultados obtenidos empleando los Kit PSP MIST Alert™ JELLETT, y contrastándolos con el bioensayo de ratón, existe un rango de toxicidad, entre el límite de detección del bioensayo de ratón y el límite legal (400-800 µg eq STX.2HCL/Kg) en el que los resultados detectan la presencia de toxinas, por lo que se obtendrían falsos positivos. Este rango se amplía comparando los resultados con el método C.L.A.E. post-columna, en el que se

obtendrían resultados positivos con valores por debajo de los 400  $\mu\text{g}$  eq STX.2HCL/Kg.

Por tanto el empleo de los Kit PSP MIST Alert™ JELLETT necesitarían otro método complementario para obtener resultados cuantitativos y descartar falsos positivos, pudiéndose emplear como método de screening.

## GALICIA– Potencial y Perspectivas de futuro

Galicia utiliza actualmente el método biológico (AOAC Oficial Method 959.08) para la cuantificación de biotoxinas PSP en el desarrollo del programa de control de acuerdo a los reglamentos (CE) 853/2004, 854/2004 y 2074/2005.

Todos los ensayos tanto los de las zonas de producción como las inspecciones de los servicios veterinarios y pesqueros se realizan en el INTECMAR- Consellería del Medio Rural y Mar , y es el laboratorio oficial de la Xunta de Galicia

El número medio de muestras analizadas al año está en torno a las 5.500, lo cual supone una media diaria de 25 muestras/día.

El personal y los medios disponibles están adecuados a la aplicación de los análisis programados anualmente con el método biológico. Se dispone además de un cromatógrafo para la realización de análisis por técnicas alternativas que se ha usado para el desarrollo de este proyecto.

De la aplicación del método biológico en simultáneo con la técnica alternativa de HPLC-FD con oxidación pre-columna (AOAC OMA 2005.06), se extraen una serie conclusiones respecto a aspectos considerados de gran importancia en los laboratorios de control, que afectan a la aplicabilidad de las técnicas:

### 1) Hora de obtención de los últimos de resultados asumiendo una jornada laboral estándar

Técnica de HPLC-precolumna: Es prácticamente imposible calcular la hora de obtención de los últimos resultados con la determinación por medio de HPLC con oxidación precolumna, ya que dependiendo del perfil tóxico hay que llevar a cabo distinto número de oxidaciones, purificaciones y análisis. Tal como se utilizó el método en nuestro estudio, con purificaciones y oxidaciones llevadas a cabo manualmente, su aplicación es completamente imposible en un programa de control, ya que no resulta realista analizar más de 7-8 muestras/día y se requeriría analizar 25. Con un método de purificación online (Turner et al 2009), pueden realizarse hasta 25 muestras/día, en cuyo caso, utilizando dos equipos HPLC completos y asumiendo la llegada de las muestras al laboratorio a las 12 de la mañana, la duración de los procesos de oxidación haría que la mayor parte de las inyecciones cromatográficas tuviesen que realizarse a lo largo de la noche y, por tanto, que el procesado de los datos obtenidos tuviese que comenzarse al inicio de la jornada laboral del día siguiente. Teniendo en cuenta el tiempo empleado para la interpretación y supervisión de los resultados y la preparación del informe de ensayo, llos resultados estarían disponibles aproximadamente a las 18:15h del día siguiente a la recepción de las muestras.

En principio, en función del perfil tóxico de la muestra, en muchos casos, no se requeriría llevar a cabo todas las determinaciones para las que acabamos de calcular el tiempo necesario. Sin embargo, en la dinámica de un programa de control en el que las inyecciones cromatográficas comienzan por la tarde o por la noche, es operativamente imposible llevar a cabo el proceso de selección de los procedimientos a realizar mediante el examen de los resultados que se van

obteniendo. Por esta razón deben realizarse todos los procedimientos necesarios para obtener la cuantificación de las muestras asumiendo que el perfil tóxico es el más complejo. Si bien no es posible reducir el tiempo en el número de muestras analizadas sí se pueden excluir en el proceso de interpretación de los resultados, ya que dependiendo del perfil tóxico podría no ser necesario procesar un buen número de cromatogramas.

**Método biológico:** En un escenario de un programa de control, con 25 determinaciones diarias, asumiendo que las muestras llegan al laboratorio a las 12 de la mañana y que el tiempo de procesamiento es de 1,8 horas por muestra o por 5 muestras, ya que se realizan paralelamente. En aproximadamente 5 horas se preparan 25 muestras. La inyección de 60 ratones supone 40 minutos y el período de observación, que es de 60 minutos, prolongaría el final del ensayo a ese mismo tiempo a partir de la inyección del último ratón, suponiendo todo el proceso conjuntamente 100 minutos. La preparación del informe de ensayo requiere 60 minutos adicionales, por lo que los resultados oficiales se obtendrían sobre las 18:00 horas. La aparición de un número elevado de resultados positivos podría retrasar esta hora hasta unos 45 min adicionales.

## 2) Problemas/inconvenientes detectados en el uso de las técnicas.

**Técnica de HPLC-precolumna.** Los problemas principales del uso de esta técnica surgen de dos hechos: a) que requiere varios tratamientos (hidrólisis y oxidaciones) y varias purificaciones con diferentes cartuchos de extracción en fase sólida; y b) que no se separan directamente las toxinas sino sus productos de oxidación de los cuales algunas toxinas producen varios, que además se comparten (total o parcialmente) con otras toxinas.

El primero de estos aspectos hace que la técnica resulte cara, que requiera mucho tiempo cuando todos los tratamientos se realizan y que requiera la interactividad con el desarrollo de los análisis si se quiere optimizar el número de tratamientos realizados al perfil tóxico de las muestras.

El segundo de los aspectos, hace que el tiempo requerido para procesar las muestras sea alto, ya que habitualmente para obtener los resultados de una muestra hay que examinar varios cromatogramas y utilizar varios picos cromatográficos y sus proporciones para poder determinar la concentración de cada toxina. Algunas toxinas además son prácticamente indistinguibles lo que hace que haya de usarse para el cálculo de toxicidad la potencia de la más tóxica, con la consiguiente sobreestimación de la misma.

Otros problemas son comunes al resto de las técnicas cromatográficas, siendo el principal la imposibilidad de llevar a cabo un buen número de determinaciones en paralelo, ya que el número de muestras que se pueden hacer simultáneamente está limitado al número de equipos disponibles y al personal técnico preparado.

El grado de preparación de los técnicos es notablemente superior al requerido para el bioensayo de ratón o la técnica de Jellett, lo que complica considerablemente la operativa y/o multiplica el coste de los programas de control.

Método biológico: El principal problema para el uso del bioensayo de ratón es la necesidad de sacrificar y producir sufrimiento a los ratones sobre los que se efectúa el bioensayo. El rechazo social del uso de animales en la experimentación es alto, lo que conlleva una notable presión para la eliminación de este tipo de ensayos, que a su vez han desembocado en recomendaciones de la Unión Europea sobre bienestar animal (Commission Recommendations 2007/526/EC de 18 de junio).

Resulta necesario disponer de personal entrenado para realizar la inyección intraperitoneal de los extractos, aunque la dificultad del entrenamiento no es alta y puede prepararse personal para desarrollar esta función en un período de tiempo breve, una semana a lo sumo.

Los resultados de los ensayos tienen una variabilidad relativamente alta, derivada principalmente de las diferencias interindividuales de sensibilidad de los ratones a las toxinas, aunque se conoce que otros aspectos, como la hora de inyección, por ejemplo, pueden afectar a la respuesta del ratón y, por tanto, contribuir a incrementar la variabilidad citada.

La respuesta es inespecífica en caso de que no se dedique tiempo a la observación de los síntomas que presenta el ratón y que permiten distinguir entre actividades de diferentes grupos de toxinas.

### **Resumen:**

Un cambio en la técnica oficial, implicaría que para mantener el programa de control acorde con la reglamentación en vigor, sería necesario un incremento en el coste por infraestructuras para adquirir más instrumental y un incremento en potencial técnico al ser necesario entrenamiento del personal existente sin que esto redunde en una mejora en la operatividad del actual sistema ni en la seguridad del producto bajo control.

## CATALUNYA – Potencial y Perspectivas de futuro

### Potencial

En Catalunya son principalmente dos los laboratorios que ejecutan análisis y ensayos para la evaluación de toxinas paralizantes, el Laboratori de Salut Pública de Tarragona y el IRTA, ambos implicados en este proyecto. Un tercer laboratorio, el ICM del CSIC en Barcelona, si bien inicialmente en el proyecto ejecutaba análisis de toxinas paralizantes por cromatografía, ya no efectúa estos análisis en la actualidad.

De esta manera, como se ha demostrado en la ejecución del presente proyecto, el Laboratori de Salut Pública de Tarragona dispone del potencial de ejecución del bioensayo ratón de la AOAC bajo acreditación para el seguimiento de toxinas PSP en moluscos. Este laboratorio en la actualidad tiene limitaciones en cuanto a estructuras y personal para cubrir la totalidad de las muestras que anualmente se recogen a lo largo de todo el litoral catalán. Ello constituye una limitación, en particular en situaciones de cierre con incremento de muestras. De forma a cubrir la totalidad de los ensayos, la Generalitat de Catalunya cuenta con la participación de un laboratorio externo (ANFACO en Galicia) para ejecutar bioensayos adicionales. En situaciones de alertas y de cierres por toxinas, cuando el número de bioensayos se incrementa, la participación del laboratorio externo es fundamental.

En Catalunya existe igualmente el potencial de uso de la cromatografía para el análisis de toxinas PSP. En este caso, el IRTA dispone del potencial técnico (recursos humanos e infraestructuras) necesario para la ejecución de análisis cromatográficos mediante derivatización pre-columna y post-columna. El IRTA en esta etapa de ejecución del proyecto ha priorizado el uso del análisis pre-columna, análisis que en la actualidad puede ejecutar fuera de acreditación. Teniendo en cuenta los perfiles de toxinas existentes en Catalunya, este método puede considerarse adecuado para el seguimiento de toxinas paralizantes. Por ello, y fruto de los buenos resultados en la implementación de esta metodología, está en curso la propuesta de uso de un método abreviado de cromatografía con derivatización pre-columna como utensilio de cribado para identificar la presencia de toxinas PSP. Esta estrategia no se desmarca del uso del bioensayo en ratón ya que en el caso de identificar toxinas paralizantes, se propone cuantificar las toxinas paralizantes mediante el bioensayo ratón para aquellas muestras que por cromatografía han presentado presencia de toxinas. Esta estrategia permitiría reducir el número de bioensayos utilizados en el control de toxinas en respuesta a la actual legislación de la UE (“El cuidado y el uso de animales vivos para fines científicos se rige por los principios establecidos internacionalmente de reemplazo, reducción y refinamiento”, DIR 2010/63/UE). En principio, debido a la flexibilidad y rápida respuesta en la ejecución de bioensayos la propuesta se apoyaría en la intervención del laboratorio de ANFACO para la ejecución de los bioensayos.

## Perspectivas de futuro

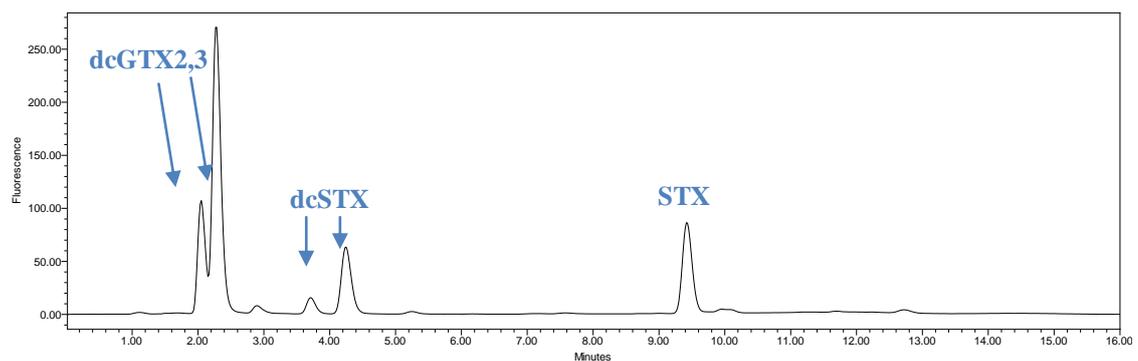
Describimos y justificamos a continuación el potencial y futuras actuaciones en la propuesta de implementación del método de HPLC Pre-Columna como sistema de cribado:

### 1. Resultados JACUMAR HPLC pre-columna.

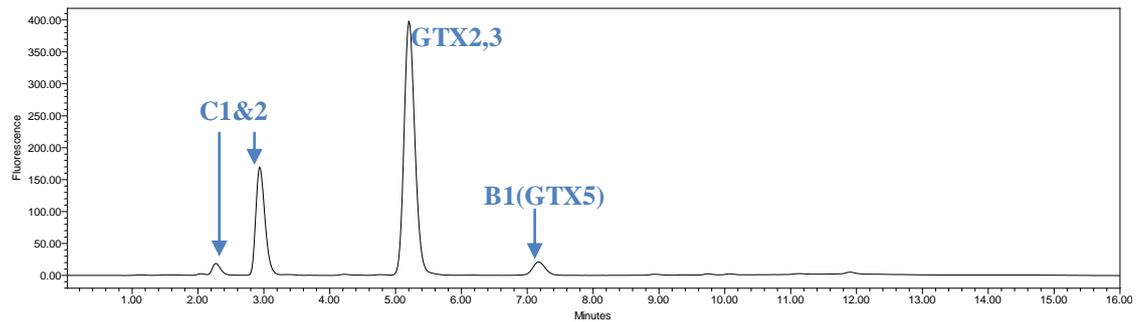
Los resultados obtenidos en el IRTA por el método de HPLC pre-columna indican que el método de Lawrence requiere de un extenso tratamiento previo de la muestra antes de la inyección, hecho que repercute negativamente en la rapidez en que se tienen que obtener los resultados en los laboratorios de monitoring.

Así para una muestra compleja se tendrían que realizar los pasos de homogeneización, extracción, purificación por cartuchos y derivatización con periodato o peróxido. Esto incluiría dos análisis de la misma muestra y el blanco y hasta tres fracciones en caso de que se encontraran toxinas N-hidroxiladas, con las consecuentes replicas de los análisis. Con todo, una misma muestra compleja podría llegar a ser pinchada hasta 14 veces antes de dar un resultado cualitativo de eq STX/kg de muestra.

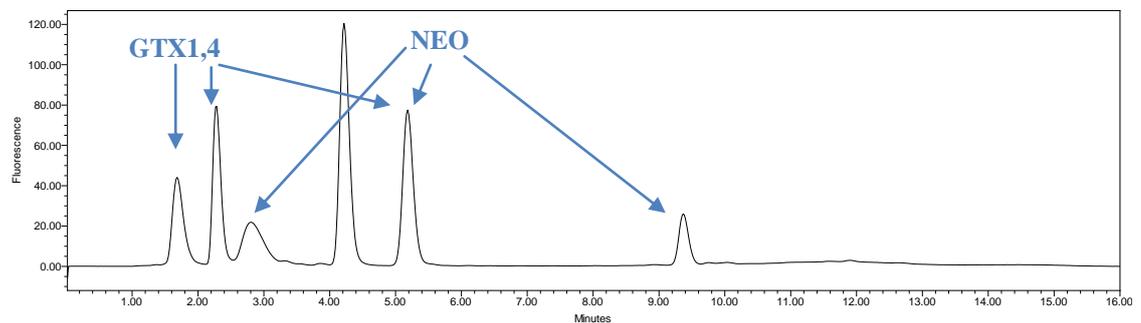
Por ejemplo en una muestra con perfil de toxinas de la microalga *A. catenatum* tendríamos que analizar la muestra oxidada con periodato, con lo que obtendríamos un perfil cromatográfico parecido a:



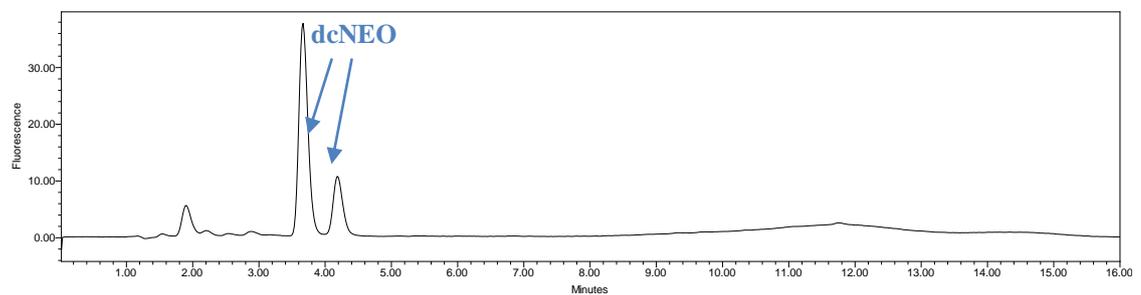
**Figura 88.** Cromatograma del estándar de calibración con dcGTX2,3, dcSTX i STX.



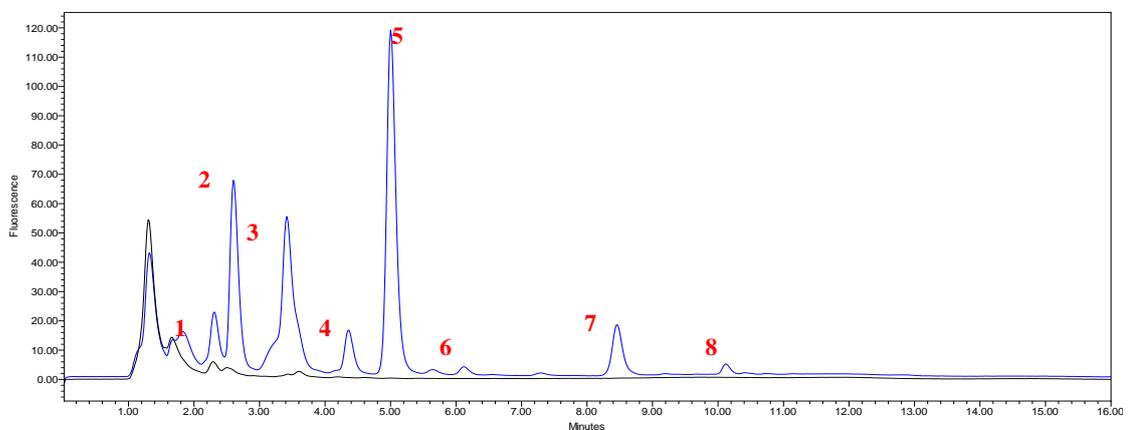
**Figura 89.** Cromatograma del estándar de calibración con C1&2, GTX2,3 i B1(GTX5).



**Figura 90.** Cromatograma del estándar de calibración con GTX1,4 y NEO.

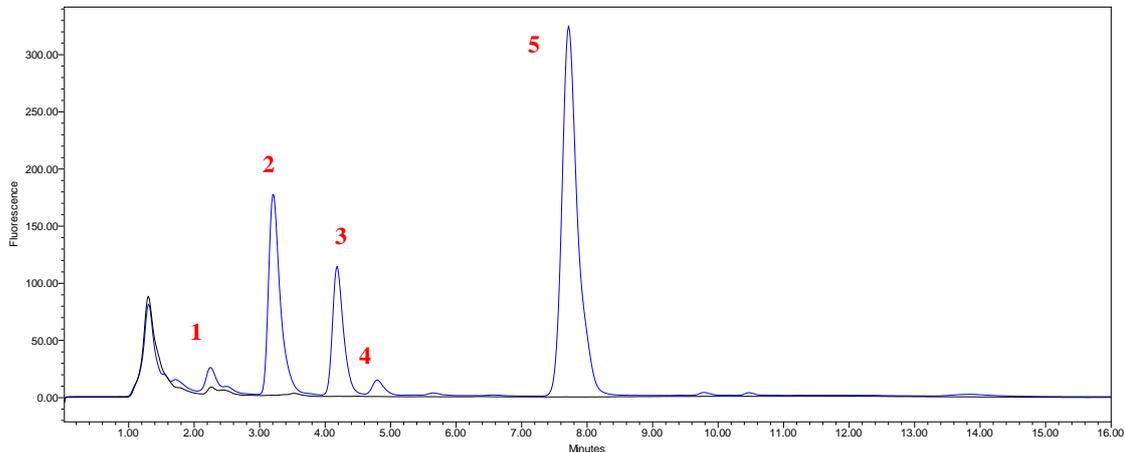


**Figura 91.** Cromatograma del estándar de calibración con dcNEO.



**Figura 92.** Resultados de inyectar el extracto purificado C18 de una muestra con perfil A. *Catenatum* derivatizado con periodato. En los dos cromatogramas inferiores se compara el extracto sin derivatizar (cromatograma en negro) con el oxidado con periodato (cromatograma en azul).

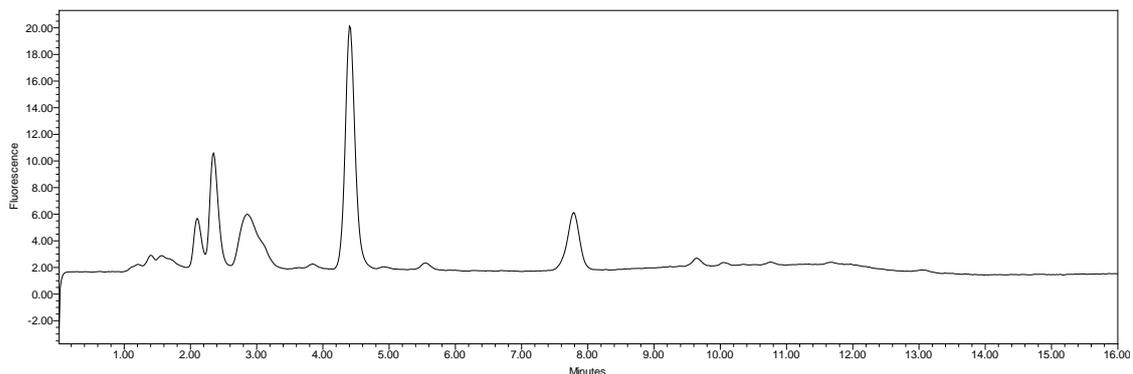
Esta misma muestra se volvería a analizar oxidada con peróxido para poder cuantificar e identificar las toxinas dcGTX2,3, dcSTX, STX, C1&2, GTX2,3 i B1(GTX5). En la muestra ejemplo el cromatograma obtenido sería el siguiente:



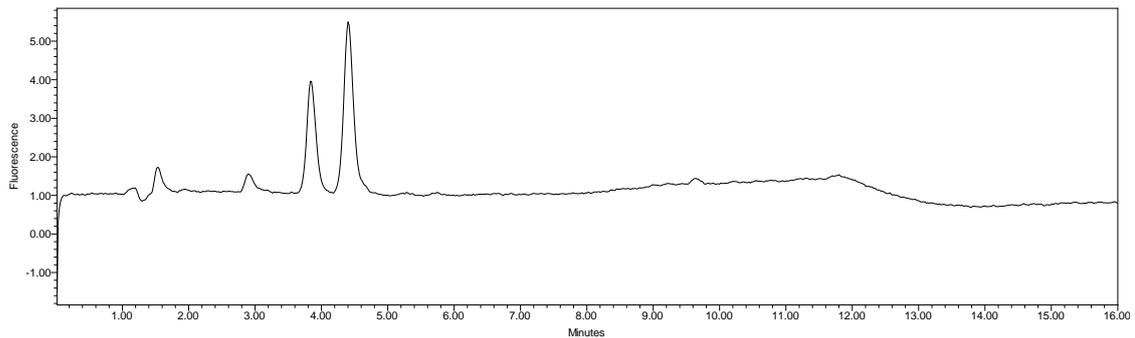
**Figura 93.** Resultados de inyectar el extracto purificado C18 de una muestra con perfil A. *Catenatum* derivatizado con peróxido. Los dos cromatogramas inferiores comparan el extracto sin derivatizar (cromatograma en negro) con el derivatizado con peróxido (cromatograma en azul).

La presencia de dcSTX en la muestra indicaría la necesidad de hacer una recta de calibrado con dcSTX derivatizada con periodato para poder dilucidar la concentración de dcNEO existente en la muestra.

A parte se tendría que hacer una etapa de purificación siguiendo lo descrito en el método oficial de la AOAC 2005.06. Con la purificación con cartucho SPE-COOH obtendríamos tres fracciones, que nos permitirían resolver las toxinas que coeluyen, como por ejemplo la NEO y la GTX6.



**Figura 94.** Resultados de inyectar la fracción 2 del extracto purificado por SPE-COOH de una muestra con perfil A. *Catenatum* con toxina GTX6. Procedimiento descrito en el método oficial AOAC 2005.06.

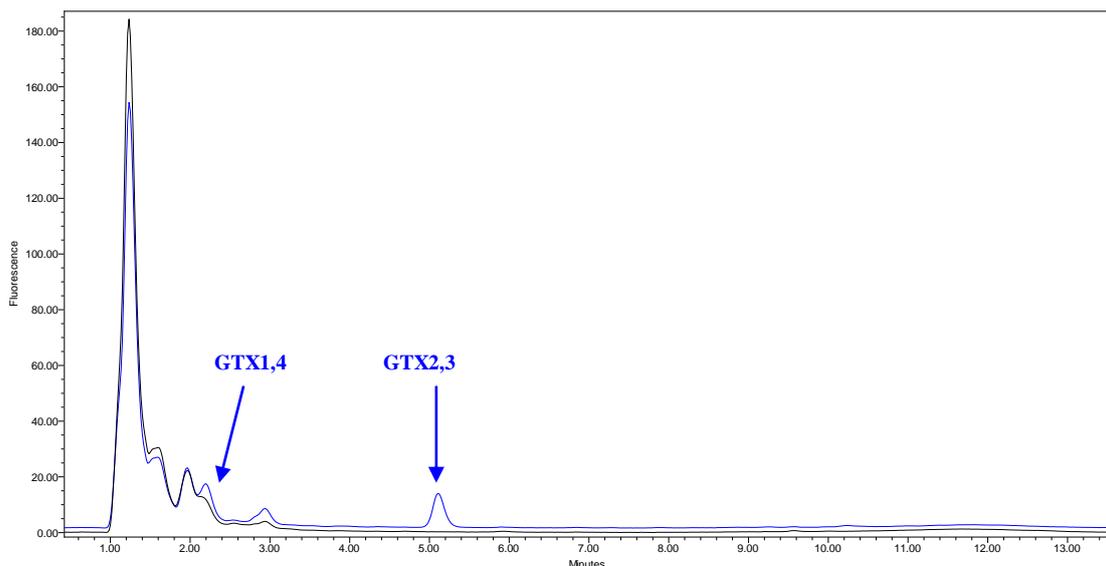


**Figura 95.** Resultados de inyectar la fracción 3 del extracto purificado por SPE-COOH de una muestra con perfil *A. Catenatum* sin neoSTX. Procedimiento descrito en el método oficial AOAC 2005.06.

Con toda la información recogida en las diferentes calibraciones y etapas el perfil de toxinas de la muestra quedaría perfectamente definido, pero habrían pasado dos o tres días de análisis desde la extracción de la muestra.

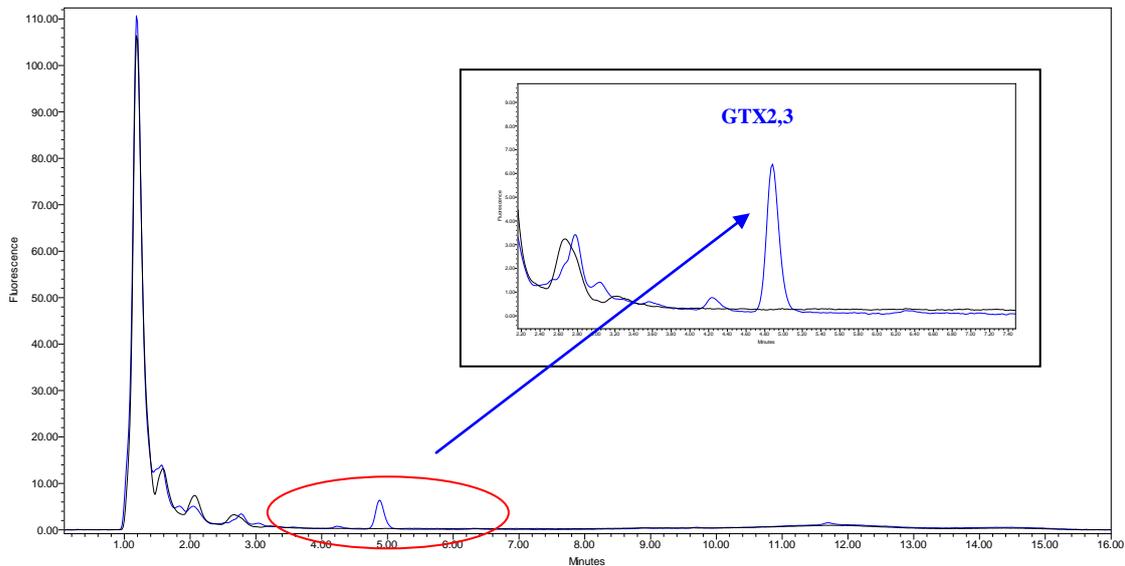
En el caso concreto de la aplicación del método de Lawrence en el litoral catalán, con un perfil claro de *A. minutum*, el método HPLC pre-columna podría dar buenos resultados en los análisis de monitoring. Se sabe que el *A. minutum* produce perfiles de toxinas GTX1,4 y GTX 2,3. Por lo tanto el laboratorio se ahorra la etapa de purificación con SPE-COOH y las inyecciones de las diferentes fracciones para la resolución de las toxinas N-hidroxiladas. Esto acorta significativamente el análisis cromatográfico, ya que se simplifica mucho el perfil cromatográfico obtenido y por tanto también el procedimiento de ensayo.

En el caso concreto de una muestra de mejillón del litoral catalán contaminada en un episodio natural de proliferación de *A. minutum* encontramos el siguiente cromatograma:



**Figura 96.** Cromatograma de una muestra de mejillón de litoral catalan oxidada con periodato. El perfil es característico de *A. minutum*, donde se aprecian los picos de GTX 1,4 i GTX2,3. En la figura se aprecian 2 cromatogramas, el negro sería la inyección de matriz sin derivatizar y el azul la muestra después de la etapa de oxidación con periodato.

Con la etapa de oxidación con periodato podemos cuantificar las toxinas GTX1,4 conjuntamente. El pico con  $t_R$  de 5 minutos podría ser debido al tercer pico de la GTX 1,4, pero también podría ser GTX2,3, ya que estos dos picos coeluyen. Por lo tanto se tendría que hacer otro análisis con oxidación con peróxido. Se obtendría el siguiente cromatograma para la muestra problema.



**Figura 97.** Cromatograma de una muestra de mejillón de litoral catalán oxidada con peróxido. El perfil es característico de *A. minutum*, donde se aprecian los picos de la GTX2,3. En la figura se aprecian 2 cromatogramas, el negro sería la inyección de matriz sin derivatizar y el azul la muestra después de la etapa de oxidación con peróxido.

Si ampliamos la zona de interés se aprecia perfectamente que en la muestra también hay toxinas GTX2,3.

Con este perfil se reduce significativamente el tiempo de preparación de la muestra, ya que se elimina una etapa de purificación, así como el tiempo de análisis, ya que no se tienen que analizar por duplicado las diferentes fracciones obtenidas en la etapa de purificación por SPE-COOH.

Por lo tanto, el tiempo de obtención de resultados analíticos y de las consiguientes decisiones a tomar en base a ellos se reduce en un día, y se asemeja más al tiempo de análisis por bio-ensayo ratón.

En el laboratorio del IRTA en Catalunya después de implementar el método pre-columna, o de Lawrence, se pueden obtener resultados de toxinas paralizantes con perfil *A. minutum* en un plazo de 2 días.

## 2. Aplicación del método de Lawrence al laboratorio del IRTA.

El laboratorio del IRTA ha implantado el método pre-columna, o de Lawrence, a una instrucción de trabajo interna (IT-2001-L-52). En el laboratorio se han probado diferentes columnas cromatográficas y diferentes condiciones de análisis para la correcta separación de los picos, conseguir picos estrechos y unos tiempos de análisis razonables.

Las condiciones cromatográficas establecidas en la aplicación del método HPLC pre-columna son las siguientes:

- Columna cromatográfica Phenomenex Kinetex 2,6 $\mu$ , 100x2.10 mm, 2,6 $\mu$ m de tamaño de partícula.
- Flujo: 0,2ml/min
- T<sup>o</sup> columna: 30°C
- Fase móvil A (NH<sub>4</sub>For 0.1M pH 6)
- Fase móvil B (NH<sub>4</sub>For 0.1 M 5% ACN pH6)

El gradiente usado para la correcta separación de los picos se describe en la tabla 33.

Temps (min)	Flux (ml/min)	% A	%B
0	0.2	100	0
5	0.2	95	5
9	0.2	30	70
11	0.2	100	0
16	0.2	100	0

**Tabla 33.** Gradiente usado en la determinación de toxinas paralizantes.

Para la cuantificación se usan cuatro mezclas de las diferentes toxinas. De este modo tenemos:

**Mix1: 100 $\mu$ L dcGTX 2,3, 100  $\mu$ L dcSTX, 100  $\mu$ L STX + 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O Milli-Q (oxidación peróxido y periodato)**

**Mix2: 100 $\mu$ L C1&2, 100 $\mu$ L GTX2,3, 100 $\mu$ L B-1 + 250 $\mu$ L H<sub>2</sub>O Milli-Q (oxidación peróxido y periodato)**

**Mix3: 100 $\mu$ L NEO, 100 $\mu$ L GTX1,4 +250 $\mu$ L H<sub>2</sub>O Milli-Q (oxidación periodato)**

**Mix4: 100 $\mu$ L dcNEO + 250 $\mu$ L H<sub>2</sub>O Milli-Q (oxidación periodato)**

Con la inyección de los diferentes estándares y con la integración de los picos se obtienen los siguientes cromatogramas para los diferentes mix.

En el siguiente cromatograma se muestran los diferentes estándares usados en la calibración del MIX 1, que incluyen la dcGTX 2,3, dcSTX y STX.

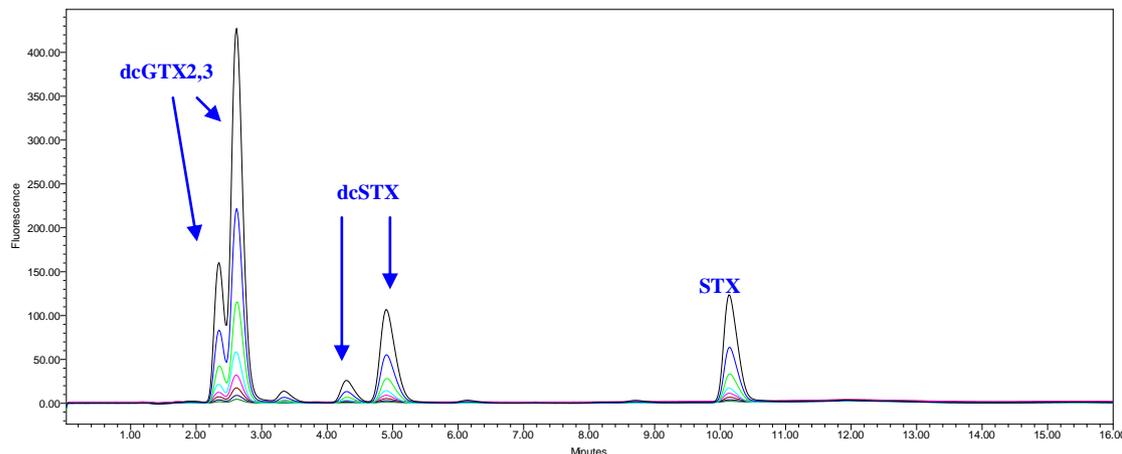


Figura 98. MIX 1 de estándares de calibración oxidados con peróxido.

En el siguiente cromatograma se muestran los diferentes estándares usados en la calibración del MIX 2, que incluye la C1,2, GTX 2,3 y B1(GTX 5).

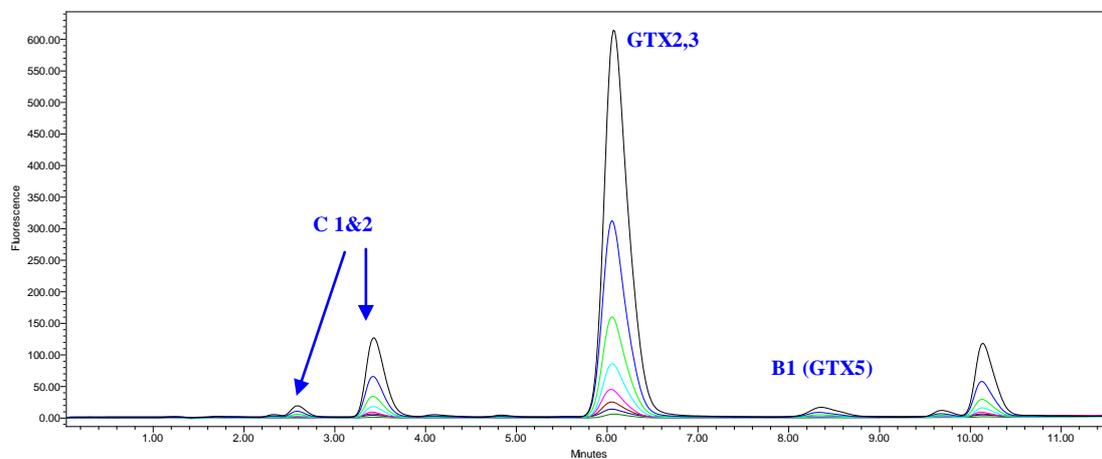
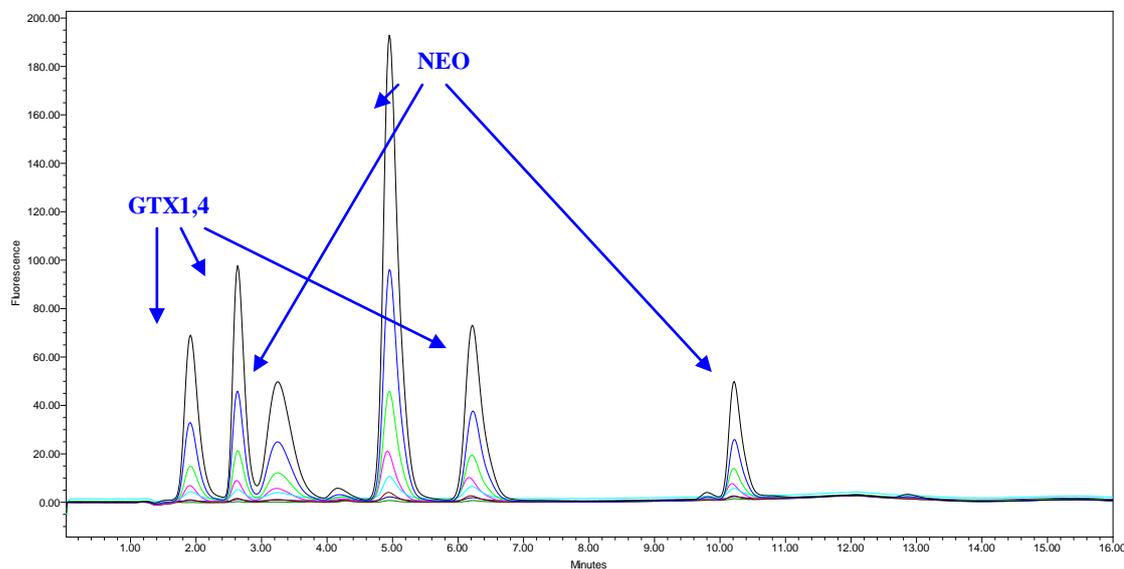


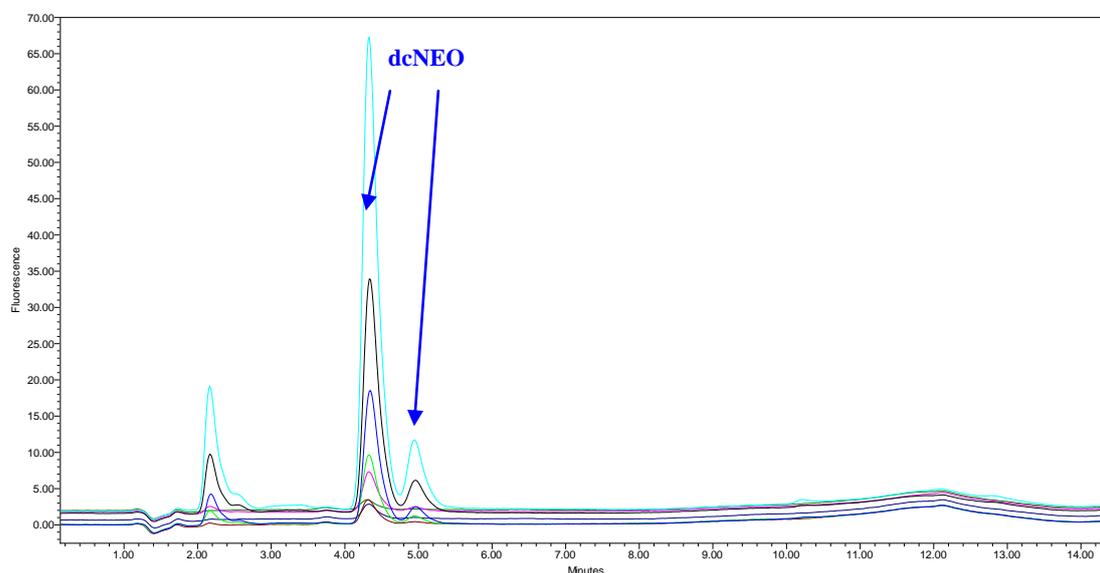
Figura 99. MIX 2 de estándares de calibración oxidados con peróxido.

En el siguiente cromatograma se muestran los diferentes estándares usados en la calibración del MIX 3, que incluye GTX1,4 i NEO.



**Figura 100.** MIX 3 de estándares de calibración oxidados con periodato.

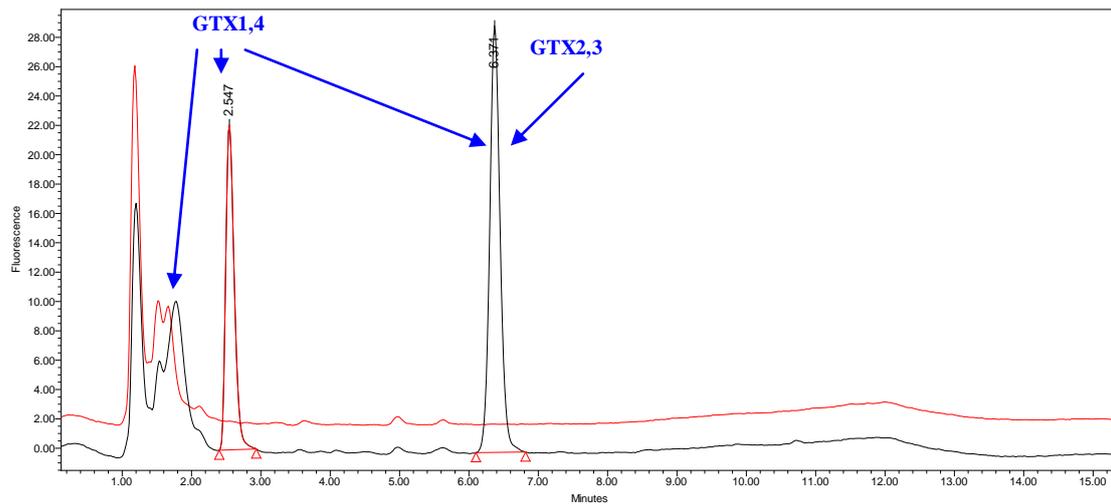
En el siguiente cromatograma se muestran los diferentes estándares usados en la calibración del MIX 4, que incluye la dcNEO.



**Figura 101.** MIX 4 de estándares de calibración oxidados con periodato.

Con la integración del área de los picos se obtienen las diferentes rectas de calibración para cada una de las toxinas. Por tanto, con la integración de los picos de muestras solo se tiene que interpolar el área del pico en la recta y obtenemos la concentración de toxinas/kg de carne de bivalvo.

En una muestra de ostión de litoral catalán (código de muestra OST CAT A032) contaminada por toxicidad paralizante se obtiene el siguiente cromatograma después de la oxidación con periodato:



**Figura 102.** Cromatograma oxidación con periodato de la muestra de ostión del litoral catalán OST CAT 032. Se observa un cromatograma en rojo perteneciente a la muestra sin derivatizar y uno en negro perteneciente a la muestra oxidada con periodato.

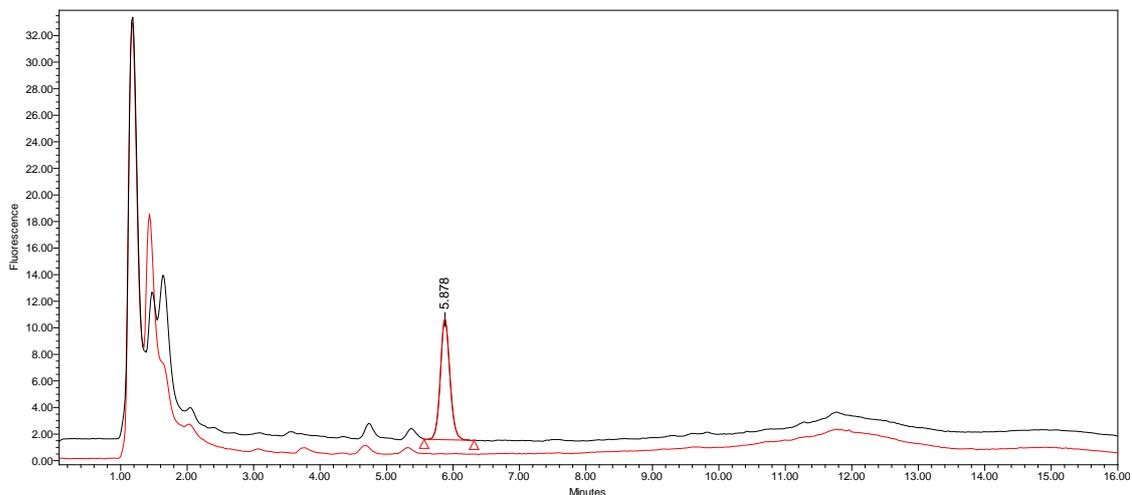
Con un  $t_R$  de 2,547min tenemos el pico de cuantificación de las GTX 1,4, toxinas que coeluyen. Con un  $t_R$  de 6,731min tenemos un pico que podría ser el tercer pico de la GTX 1,4 o el pico de las GTX 2,3. Por lo tanto, solo se integra el pico de las GTX 1,4 para obtener el área y así poder obtener la concentración de toxinas en  $\mu\text{mol GTX 1,4/kg carne}$ .

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1	GTX1,4	2.547	189340	100.00	22132	bb			Unknown	

**Tabla 34.** Resultado de integración del pico de GTX1,4.

Después se hace una oxidación con periodato. Esto nos permite saber si el pico con  $t_R$  de 6,731min es el tercer pico de las GTX 1,4 o también hay una contribución de GTX 2,3, que coeluyen. También podremos detectar la presencia de toxinas que con la oxidación con periodato dan una señal muy débil, como la B1 (GTX 5).

Si oxidamos con peróxido la muestra de ostión de litoral catalán (código de muestra OST CAT A032) obtenemos el siguiente cromatograma.



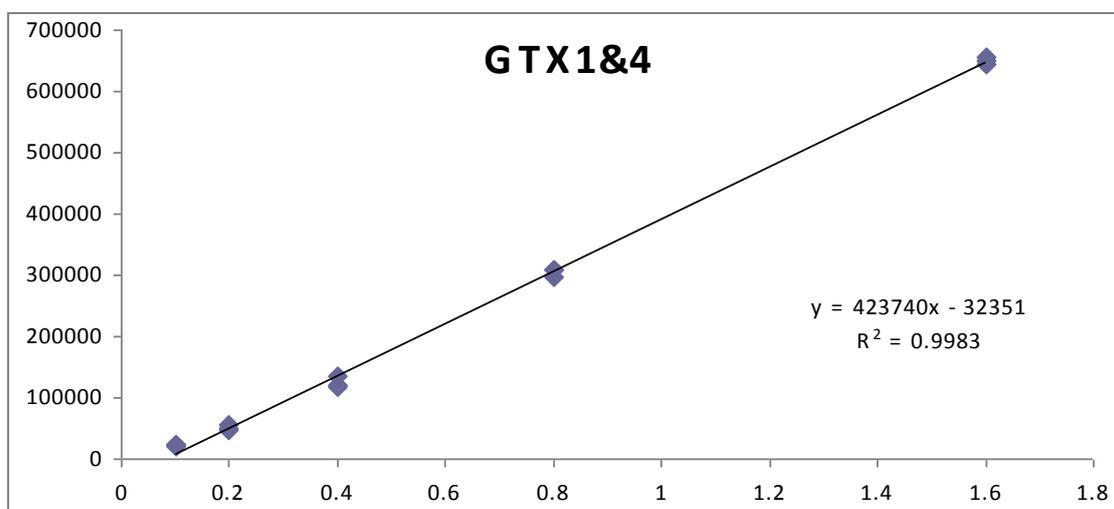
**Figura 103.** Cromatograma ox. peróxido de la muestra de ostión del litoral catalán OST CAT 032. Se observa un cromatograma en rojo perteneciente al extracto de muestra sin derivatizar y uno en negro perteneciente a la muestra oxidada con peróxido.

Con un  $t_R$  de 5,878min tenemos el pico de cuantificación de la GTX 2,3. Por lo tanto, solo se integra el pico de la GTX 2,3 para obtener el área y así poder obtener la concentración de toxina en  $\mu\text{mol GTX 2,3/kg carne}$ .

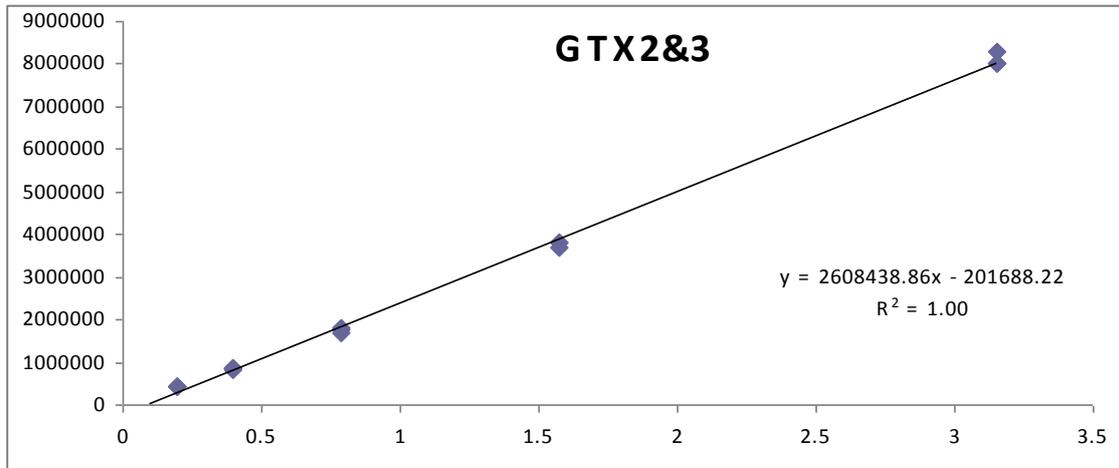
	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1	GTX2,3	5.878	90764	100.00	9103	bb			Unknown	

**Tabla 35.** Resultado de integración del pico de GTX1,4.

Con la interpolación de las áreas de las toxinas GTX 1,4 y GTX 2,3 en las rectas de calibración que se muestran a continuación podremos obtener la concentración de las dos en la muestra.



**Figura 104.** Recta de calibrado para GTX1,4 obtenida el día 29/04/2011 en el set de muestras PSP\_290411. En el mismo set de muestras se encontraba la muestra OST CAT 032.



**Figura 105.** Recta de calibrado para GTX2,3 obtenida el día 29/04/2011 en el set de muestras PSP\_290411. En el mismo set se encontraba la muestra OST CAT 032.

Con esto obtenemos la siguiente tabla;

CODE SAMPLE	$\mu\text{g eqSTX diHCl/ kg sample}$	$\mu\text{mol eq STX diHCl/L}$		$\mu\text{mol /L}$		Area de pico ( $\mu\text{V}^*\text{seg}$ )	
		GTX1&4	GTX2&3	GTX1&4	GTX2&3	GTX1&4	GTX2&3
OST CAT A032 800	<b>1745</b>	0.513	0.073	0.513	0.122	189340	90764

**Tabla 36.** Tabla de resultados para la muestra OST CAT 032.

Con el método desarrollado en el IRTA de Sant Carles de el laboratorio de química analítica del Subprograma de Seguiment del Medi Marí participo en el ejercicio interlaboratorio organizado por el Laboratorio Europeo de Referencia de Biotoxinas Marinas (EU-RL-MB) para la determinación de toxinas causantes de la intoxicación paralizante por consumo de marisco (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) en carne de molusco.

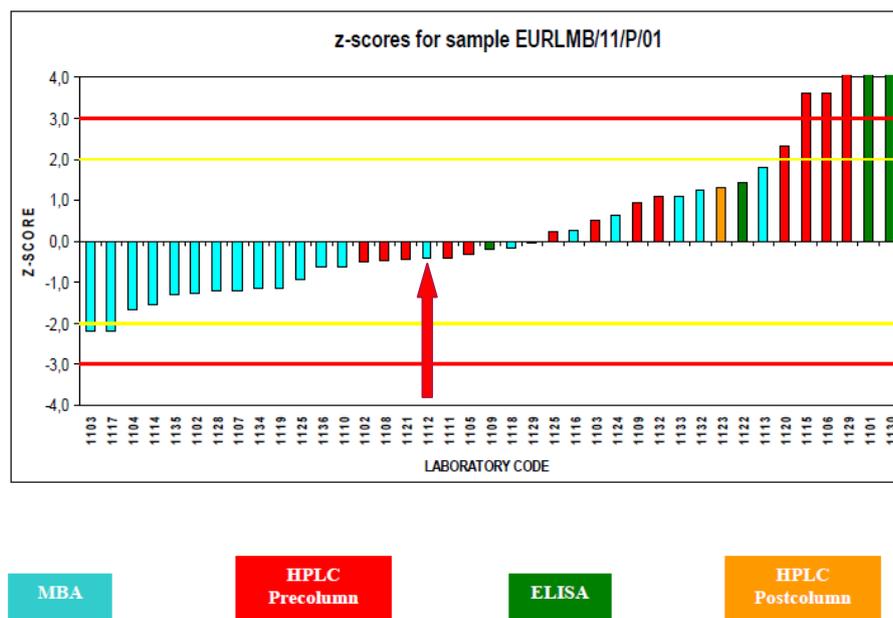
Considerando que el valor promedio de los participantes no descartados (por dar resultados no válidos o outliers) es el “valor verdadero” o valor asignado, y el valor emitido por el laboratorio el “dato”.

	<b>EURLMB/10/P/01</b> $\mu\text{g eqSTX kg}^{-1}$	<b>EURLMB/10/P/02</b> $\mu\text{g eqSTX kg}^{-1}$
<b>Valor asignado</b>	1514	1460
<b>SD (n=36)</b>	537 $\mu\text{g/kg}$	452 $\mu\text{g/kg}$
<b>Resultado IRTA (1111)</b>	1361	1049
<b>Z-score</b>	-0,4	-1,19

**Tabla 37.** Resultados obtenidos por el laboratorio IRTA en el ejercicio interlaboratorio organizado por el EU-RL-MB en 2011, utilizando el método químico oficial (HPLC-FD con derivatización pre-columna) per a la determinación de toxinas PSP.

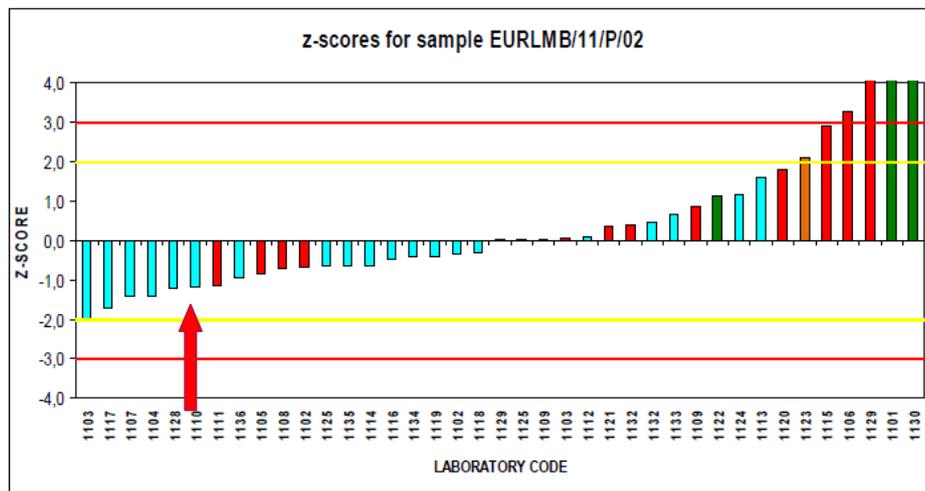
Los dos resultados, con Z-scores  $\leq 2$ , se pueden considerar satisfactorios teniendo en cuenta los criterios usados (ver figura 106 y figura 107 para la muestra EURLMB/10/P/01 i EURLMB/10/P/02, respectivamente). El laboratorio del IRTA tiene asignado el código 1111 en la participación en este ejercicio.

**FIGURE 1. Z-SCORES OBTAINED BY PARTICIPANTS IN THE EURLMB 2011 PROFICIENCY TESTING ON SAXITOXIN GROUP (PSP TOXINS) DETERMINATION FOR SAMPLE EURLMB/11/P/01 (TOTAL TOXICITY)**



**Figura 106.** Z-score de los diferentes participantes en el ejercicio para la muestra EURLMB/10/P/01. El laboratorio de química analítica del IRTA Sant Carles de la Ràpita corresponde al código 1111 (flecha roja). Resultados presentados en el informe emitido por el organizador.

**FIGURE 2. Z-SCORES OBTAINED BY PARTICIPANTS IN THE EURLMB 2010 PROFICIENCY TESTING ON SAXITOXIN GROUP (PSP TOXINS) DETERMINATION FOR SAMPLE EURLMB/11/P/02 (TOTAL TOXICITY)**



MBA

HPLC  
Precolumn

ELISA

HPLC  
Postcolumn

**Figura 107.** Z-score de los diferentes participantes en el ejercicio para la muestra EURLMB/10/P/02. El laboratorio de química analítica del IRTA Sant Carles de la Ràpita corresponde al código 1111 (flecha roja). Resultados presentados en el informe emitido por el organizador.

### 3. Protocolo de aplicación del método de cribado (*screening*) de toxinas PSP en el laboratorio del IRTA.

El laboratorio del IRTA se ha empezado la validación de un método de cribado de toxinas paralizantes y la redacción de una instrucción de trabajo interna (IT-2001-L-37).

Las condiciones cromatográficas establecidas en la aplicación del método HPLC, descritas en el apartado 3, servirían para el método de cribado de toxinas paralizantes.

El interés de disponer de un protocolo cromatográfico de cribado, en este caso adoptando un método abreviado del método cromatográfico de Lawrence es disponer de una metodología analítica que siendo más específica permita reducir el número de bioensayos en animales, manteniendo el principio fundamental de asegurar la misma protección del consumidor. Por ello, la implantación de este protocolo de cribado permitirá dar respuesta a los tres principios establecidos por la comunidad europea, las 3R (Replacement, Refinement, Reduction). Nuestra propuesta consiste en validar el método cromatográfico de cribado de toxinas paralizantes siguiendo un paralelismo con los procedimientos implantados en el laboratorio CEFAS del Reino Unido, donde se ha descrito que se analizan 3500

muestras/año, lo que equivale a >40 muestras/día por el método de barrido por HPLC con oxidación pre-columna y detección de fluorescencia.

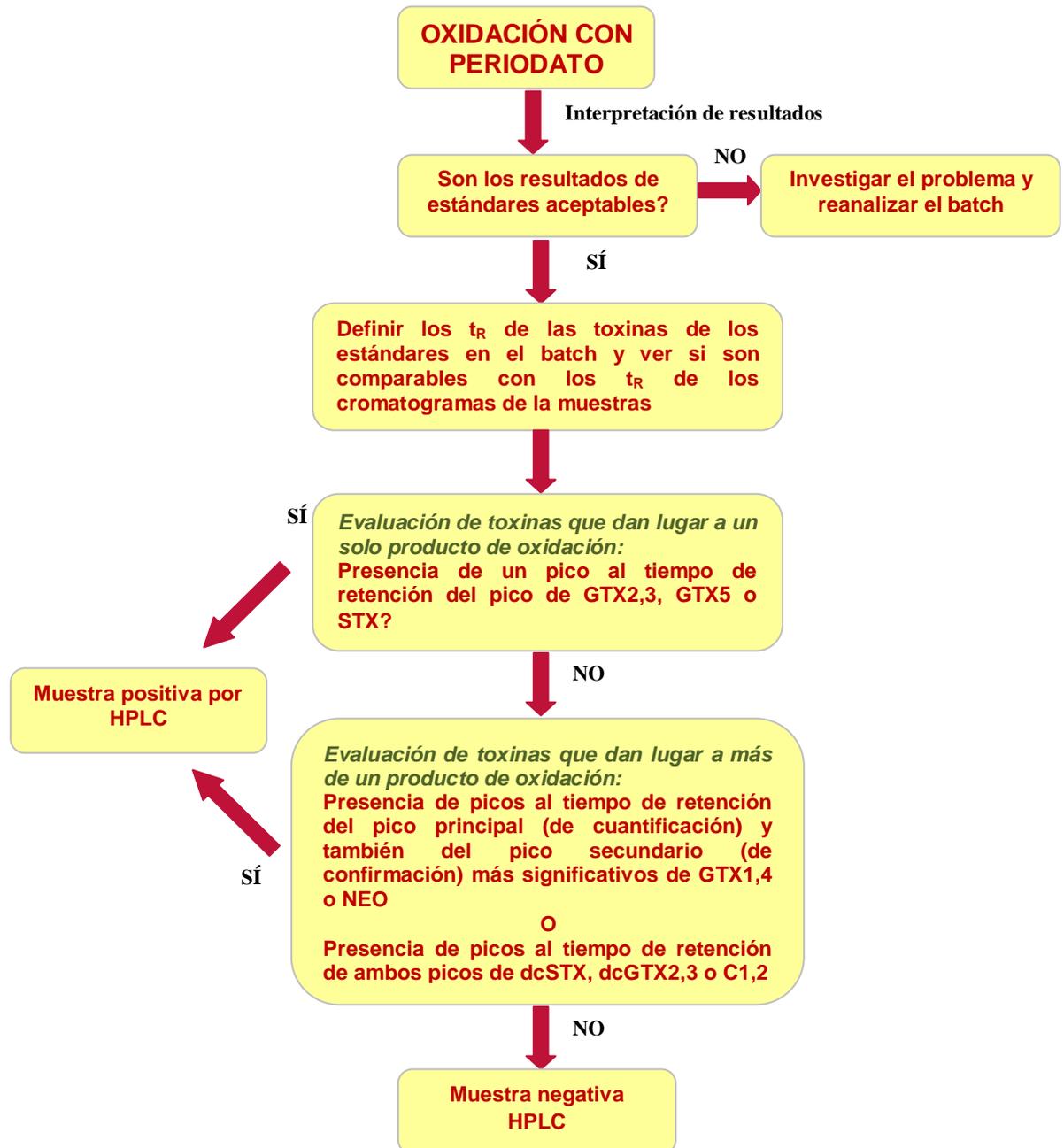
El método cromatográfico utilizado y de decisión sería una abreviación del método AOAC HPLC method 2005.06.



Figura 108. Esquema de trabajo abreviado

En lo que respecta al tratamiento de la muestra, proceso de extracción y oxidación serían los utilizados en el método AOAC HPLC 2005.06, hasta la etapa de oxidación con periodato. Una vez obtenidos los cromatogramas se procedería siguiendo el protocolo descrito abajo.

El protocolo de toma de decisiones sería el descrito a continuación:



**Figura 109.** Esquema del protocolo de toma de decisiones según los resultados cromatográficos. En el caso de detectar muestras positivas, éstas serían analizadas por bioensayo ratón.

Son varios los argumentos que favorecen la implantación en Catalunya del método de cribado propuesto. En primer lugar tenemos en consideración el perfil toxicológico del *A. minutum* que es la especie responsable, junto con *A. catenatum*, de los episodios de PSP en Catalunya. Por otra parte hay que considerar el hecho que en el litoral catalán las muestras positivas con toxinas PSP > MPL se dan en raras ocasiones y que normalmente se originan tras blooms de *Alexandrium spp.* que se inician en puertos (Vilanova, Tarragona, Barcelona) y que pueden ser predecibles dados los controles rutinarios que se ejecutan. Normalmente estos blooms quedan confinados en los puertos. Podríamos concluir que por ello el método de cribado (*screening*) de toxinas paralizantes por HPLC-FLO sería un buen método para el monitoreo de la zonas de producción de moluscos del litoral catalán.

#### 4. Futuras acciones para la implementación del cribado de PSP en el laboratorio del IRTA

En estos momentos en el laboratorio del IRTA de Sant Carles de la Ràpita se está empezando la validación del método de cribado de toxinas paralizantes por HPLC-FLO.

Primeramente se comprobó el rango de respuesta lineal para cada una de las diferentes toxinas paralizantes. Ahora se ha empezado la validación por el cálculo de los límites de detección y cuantificación de las diferentes toxinas en diferentes matrices de bivalvos, al ser este un parámetro crítico para la adopción del método de cribado para el control y la toma de decisiones sobre las zonas de producción de bivalvos.

Una vez se han obtenido los límites de detección y cuantificación teóricos se ha dopado la muestra a los niveles teóricos i se ha observado que los límites cumplieran que la señal fuera 3 y 10 de señal/Ruido respectivamente.

Para una muestra blanca de matriz de mejillón del litoral tenemos el siguiente cromatograma.

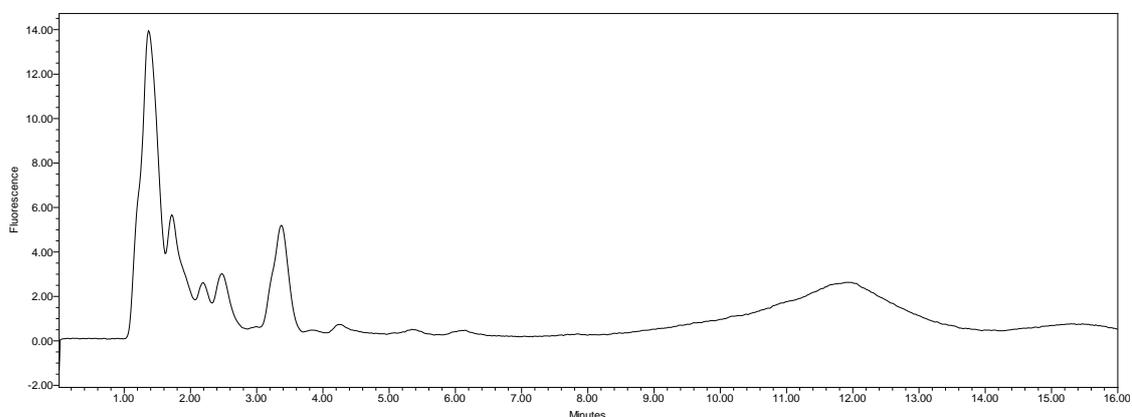
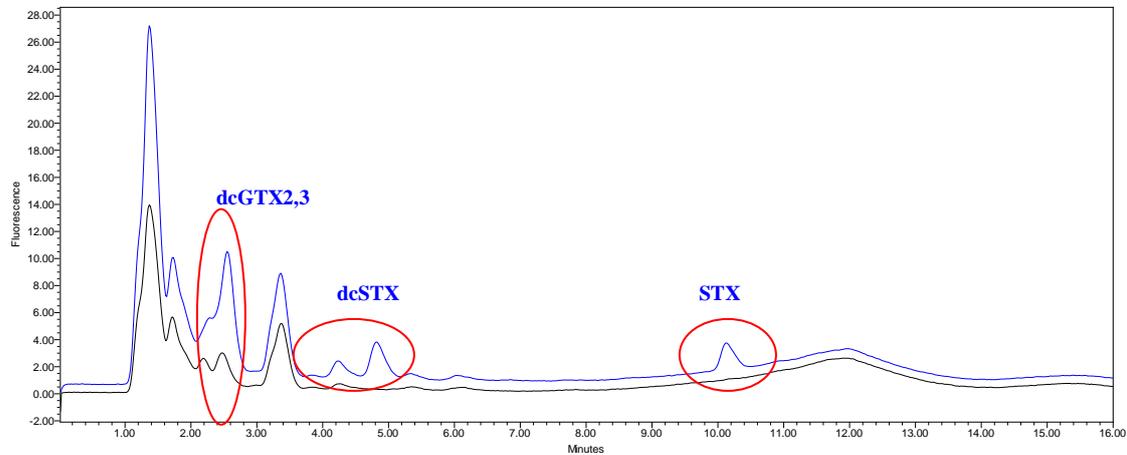


Figura 110. Cromatograma de una matriz "blanca" de mejillón de la costa catalana

Si dopamos la muestra a niveles de límites de detección con el MIX 1, que contiene dcGTX 2,3, dcSTX i STX obtenemos el siguiente cromatograma.



**Figura 111.** Cromatograma de límites de detección en una matriz de mejillón. Se ha dopado el extracto de mejillón de una muestra blanca a niveles de los límites de detección teórico con el MIX1. El cromatograma negro es el obtenido de la matriz blanca y el azul es de la matriz dopada.

Con esto el laboratorio del IRTA de Sant Carles ha obtenido una tabla de valores iniciales de límites de detección y cuantificación, que se muestra a continuación.

		dcGTX2,3	dcSTX	STX	C1&2	GTX2,3	GTX5	GTX1,4	NEO	dcNEO
Dissolvente H <sub>2</sub> O Milli-Q	ld (µmol/L)	0,0006	0,0014	0,0012	0,0008	0,001	0,031	0,002	0,0017	0,0009
	lq (µmol/L)	0,0019	0,0046	0,0041	0,0026	0,003	0,102	0,006	0,0056	0,0030
	ld (µg eqSTX/g de carn)	0,0007	0,0041	0,004	0,0002	0,002	0,009	0,006	0,005	0,0011
	lq (µg eqSTX/g de carn)	0,0021	0,0138	0,012	0,0008	0,005	0,030	0,018	0,017	0,0036
Matriz de mejillón	ld (µmol/L)	0,015	0,021	0,015	0,0339	0,025	0,056	0,0467	0,0158	0,012
	lq (µmol/L)	0,052	0,069	0,049	0,1187	0,084	0,189	0,233	0,0475	0,041
	ld (µg eqSTX/g de carn)	<b>0,018</b>	<b>0,062</b>	<b>0,044</b>	<b>0,010</b>	<b>0,045</b>	<b>0,017</b>	<b>0,139</b>	<b>0,0470</b>	<b>0,015</b>
	lq (µg eqSTX/g de carn)	<b>0,062</b>	<b>0,206</b>	<b>0,147</b>	<b>0,035</b>	<b>0,150</b>	<b>0,056</b>	<b>0,694</b>	<b>0,1415</b>	<b>0,049</b>

**Tabla 38.** Resultados iniciales de la validación de los límites de cuantificación y detección con matriz de mejillón de las zonas de producción de la costa catalana.

A falta de terminar la validación de los límites de detección y cuantificación, con el método de cribado de toxinas paralizantes por HPLC-FLO se podrían dar resultados de presencia de picos de toxinas en que el sumatorio de fuera <350µg eq STX diHCl/kg carne. Con esto se la técnica cromatográfica se equipararía a niveles de límites de detección al bio-ensayo ratón (MBA).

En estos momentos en el laboratorio del IRTA se están optimizando las condiciones cromatográficas para resolver mejor la GTX 1,4 del frente de matriz y extendiendo la validación de estos límites a otras matrices de bivalvos, como ostión, coquina y almeja.

La validación del método de cribado de toxinas por HPLC-FLO continuará con:

Exactitud y recuperación en la etapa de purificación con SPE-C18.

Estabilidad del extracto con ácido acético.

Repetibilidad con muestras contaminadas en episodios naturales.

Ejercicios de precisión intermedia entre analistas.

Robustez del método.

Participación en ejercicios interlaboratorio (proficiency test).

Aplicabilidad a las muestras de monitoreo del litoral catalán.

Una vez finalizada la validación del método de cribado se podrá revisar y modificar, en caso de que sea necesario, la instrucción técnica IT-2001-L-37 de cribado de toxinas paralizantes por UPLC-FLO. Así se podrán definir los parámetros y periodicidad para evaluar el aseguramiento de la calidad del análisis con el tiempo, con vistas a solicitar una ampliación del alcance de acreditación ISO 17025 para el método de cribado de toxinas paralizantes por UPLC-FLO.

## 2.5. CONCLUSIONES

**Se dedicará especial atención a la utilidad de los resultados para el sector acuícola.**

### **CONCLUSIONES DEL OBJETIVO 1**

#### **Comparación de métodos de determinación de toxinas PSP**

- 1.1) Metodologías accesorias.
- 1.2) Metodologías de determinación de toxinas.

#### **1.1) Metodologías accesorias**

Datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya:

Los datos de los programas de vigilancia de Andalucía, Galicia y Catalunya han sido fundamentales para el seguimiento de microalgas de interés y para el reconocimiento de toxinas en moluscos a lo largo de toda la ejecución del proyecto. Cabe resaltar que si bien ha habido episodios puntuales de toxinas paralizantes a lo largo de todo el proyecto, en ningún caso éstas han estado las más representativas de los problemas identificados en las tres comunidades, habiendo sido los episodios por toxinas diarreicas los más representativos. A pesar de esta circunstancia, han existido episodios puntuales de presencia de toxinas paralizantes, que bien pudiesen haber tenido más amplitud si las circunstancias oceanográficas, ambientales u otras lo hubiesen permitido, Por ello, los datos de episodios de toxinas PSP permiten concluir de la vigencia de la problemática abordada en el proyecto y que persiste como un elemento clave a seguir de cerca de cara a asegurar la calidad alimentaria del producto e inocuidad hacia el consumidor, elementos claves para el desarrollo del sector.

#### Obtención de patrones certificados

En este sentido las conclusiones son pocas, si bien cabe resaltar que los patrones certificados siguen siendo disponibles en el NRC (Halifax, Canadá) al igual que al inicio del proyecto, aunque cabe resaltar que no ha habido un fundamental avance en la disponibilidad de nuevos patrones de referencia. Se puede por ello concluir que respecto a material certificado, éste está disponible, principalmente para aplicaciones analíticas. Sin embargo material certificado o de referencia para requerimientos mayores, sigue siendo éste escaso lo cual ha podido solventarse en el marco de este proyecto mediante actuaciones propias del proyecto para obtener material de referencia con toxinas. Por ello podemos concluir que la disponibilidad de patrones y material de referencia en el mercado, principalmente para el interés de los laboratorios de control, es modesta y que debería haber a nivel internacional cierto esfuerzo para incrementar la disponibilidad. Se identifican carencias en relación a patrones de las toxinas GTX6, C3 y C4. En

particular la carencia de GTX6 afecta al análisis de toxinas asociadas a floraciones de *Gymnodinium catenatum*.

#### Obtención de muestras de campo, en particular durante episodios críticos:

La obtención de muestras de campo durante episodios de toxicidad PSP ha sido crucial para la ejecución del proyecto. En este sentido, fundamentalmente por episodios acontecidos en Andalucía y Galicia se ha podido disponer de material contaminado con toxinas PSP lo cual ha permitido la comparación entre métodos de ensayo, objeto de la actual propuesta. Esto representa una fuente inestimable de material necesario para la ejecución de proyectos de investigación asociados a toxinas PSP y recomendamos que los laboratorios que disponen de material obtenido durante episodios de toxicidad puedan de manera sistemática considerar el obtener y compartir, de la forma que definan, este material.

#### Experimentación en mar:

La experimentación en mar de forma a obtener material de referencia durante proliferaciones de microalgas productoras de toxinas PSP ha resultado una estrategia clave en el caso de Catalunya. Fruto de la proliferación de la microalga *A. minutum* en puertos de Catalunya a lo largo de la ejecución del proyecto, se han podido realizar exposiciones semi-controladas de moluscos durante episodios lo cual ha permitido obtener material de referencia contaminado utilizado en el marco de este proyecto. Las muestras obtenidas, han sido empleadas para la comparación de metodologías, y muy recientemente han sido donadas al Laboratorio Comunitario de Referencia de toxinas marinas en Vigo, para la realización de ejercicios inter-laboratorios en toda la UE. Por ello concluimos que el potencial que presenta la experimentación en mar en puertos para la obtención de material de referencia resulta una buena estrategia de poco coste y alta eficacia.

#### Cultivos de microalgas tóxicas

El cultivo de microalgas tóxicas es fundamental para una mejor comprensión de las toxinas que puedan estar presentes en las diferentes áreas geográficas del litoral español. Constituye una base para identificar las toxinas que posteriormente el propio molusco puede metabolizar en diferentes derivados. Por ello, estos cultivos pueden ser primordiales para la puesta a punto de metodologías, con la ventaja inicial de que resulta un material que pueda presentar menos interferencias debido a la matriz. En el marco del proyecto los cultivos de *A. minutum* y *G. catenatum* han sido los cultivos utilizados. Cuando se está en medida de realizar cultivos de éstas microalgas a mediana o gran escala, la obtención de biomasa algal puede por una parte favorecer el estudio de derivados de toxinas que puedan hallarse en pequeñas cantidades, no detectables en cultivos de pequeña escala. Ello en nuestro caso no ha sido identificado como una

ventaja ya que no se ha dado la circunstancia de la detección de derivados particularmente de interés que no se conociesen. Por otra parte, la obtención de esta biomasa permite la exposición controlada en laboratorio de moluscos a las microalgas para obtener material contaminado con toxinas.

#### Experimentación en laboratorio:

La experimentación en laboratorio para la obtención de material de referencia a partir de exposiciones controladas de moluscos a cultivos de microalgas ha mostrado dificultades. Por una parte, la eficiencia en la disponibilidad de suficientes microalgas a partir de los cultivos es un elemento limitante y dentro de la estructura de este proyecto no se ha podido contemplar unas etapas de optimización de los cultivos a gran escala como para disponer de suficiente material para exposiciones a gran escala. Por otra parte, otro elemento limitante ha sido la necesaria aclimatación de los moluscos a las condiciones de laboratorio, que si bien es posible, en nuestro caso presentó problemas de desove lo cual no permitió obtener con eficacia suficiente material contaminado. Por ello concluimos que si bien las exposiciones controladas en laboratorio son posibles y podrían representar una buena estrategia siempre que se desee obtener pequeñas cantidades de material de referencia, la obtención de mayores cantidades puede necesitar largas etapas de puesta a punto de las metodologías de exposición de los moluscos a las microalgas tóxicas, y la disponibilidad de infraestructuras relativamente complejas.

#### Purificación de extractos HPLC

De la evaluación del efecto matriz sobre las columnas de separación se determina que su vida útil es muy corta. Se establece que la media de muestras sin perder resolución se encuentra en el rango de 100 a 200. Por acción del efecto matriz se van a generar dobles picos y se incrementa la presión en cabeza de columna llegando a sobrepasar el límite de seguridad del sistema provocando la parada de las bombas.

Con respecto a sustancias interferentes (material fluorescente no toxinas) y en concreto la co-elución de interferentes con las toxinas GTX4 y GTX1. Debido a la toxicidad elevada de estas dos toxinas, la interferencia a este nivel no sólo impide una correcta cuantificación de dichas toxinas sino que contribuye significativamente al cálculo de  $\mu\text{g}$  STX equivalentes.

Con el objetivo de dar una solución a los dos problemas anteriores, que están relacionados entre sí, se procedió a ensayar diferentes sistemas de limpieza del extracto de mejillón y que se resumen a continuación:

1.- Desproteización de una alícuota de homogeneizado de mejillón con ácido tricloroacético (TCA) según el protocolo descrito por (Rourke et al. 3008). Este tratamiento resulta insuficiente ya que el extracto mantiene una gran cantidad de compuestos coloreados, amarillo-anaranjados, en disolución que al entrar en la

columna se fijan selectiva y permanente en la cabeza de la misma dando lugar a un aumento de presión y la consecuente pérdida de resolución.

2.- Repartos con hexano, acetato de etilo y éter etílico.

En contra del objetivo previsto con este procedimiento, el material amarillento no fue arrastrado por la capa orgánica. De este ensayo se deduce que el material coloreado es claramente hidrofílico al permanecer en la fase acuosa.

3.- Extracción en fase sólida con cartuchos de C18 según el protocolo descrito en el método pre-columna (Lawrence et al. 2005).

El efecto real es una dilución ya que si la muestra está muy coloreada, puede pasar ese material al extracto. Y en muestras con niveles bajos de toxinas PSP tiene el mismo efecto que la dilución simple.

4.- Extracción con Lichroprep RP18 (40-63  $\mu$ m).

Este ensayo fue previo a los derivados posteriormente de dispersión de matriz al comprobar que se producía un descenso del color del 45 %.

5.- Purificación con dispersión de matriz

Los ensayos comparativos efectuados con otras dos fases Oasis HLB y Sepabeads mejora el descenso de color del ensayo anterior, pero la recuperabilidad de toxinas se encuentran es solamente del orden del 80%.

Por lo que se podría concluir que la fase de preparación de muestras a partir de moluscos nos encontramos con un paso de limpieza no resuelto actualmente y que limita en gran medida la duración de las columnas además de la habitual presencia de interferentes no tóxicos. Si a esto le sumamos el efecto añadido de la variabilidad de los perfiles de toxinas, relacionado con el fitoplancton de la zona, podemos concluir que resulta muy difícil la aplicación rutinaria de esta metodología, en particular dentro de un programa de Control y Seguimiento.

## 1.2) Metodologías de determinación de toxinas:

### El bioensayo ratón para toxinas paralizantes de la AOAC

Este método ha resultado ser eficaz en la aplicación de los programas de control de biotoxinas desde los años 60. Tiene dos importantes ventajas que son su rapidez para actuar sobre situaciones de alerta, desde 1,5 a 3,7 horas se puede disponer del resultado de 1 y/o 5 muestras y la segunda es que mide toxicidad. Por lo contrario presenta las desventajas de que es inespecífico y utiliza animales de experimentación, hecho que la legislación europea pretende reducir por ética animal (Commission Recommendations 2007/526/EC de 18 de junio).

### Desarrollo e implementación de metodologías cromatográficas, LC-FD, LC-MS-MS. Perfiles tóxicos.

## LC-MS/MS

Es posible utilizar la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas con interfase electrospray para la determinación de las toxinas de tipo PSP en moluscos bivalvos. La tecnología de detección de triple cuadrupolo se mostró suficientemente sensible en general, pero no la de trampa iónica. Cromatográficamente, la tecnología HILIC con una columna de tipo zwitteriónico resultó la más adecuada. No obstante, al igual que en con otros métodos cromatográficos para la separación de estas toxinas, la obturación parcial de las columnas cuando se inyectan extractos de bivalvos es muy rápida, requiriendo, por tanto el desarrollo de métodos de preparación de la muestra adaptados a tanto a las condiciones cromatográfica (HILIC) como a las de ionización en el espectrómetro de masas (ESI), antes de que se pueda utilizar para el control rutinario de la toxicidad de bivalvos.

## HPLC-PreColumna

Para poder abordar un monitoring intenso ( $\geq 25$  muestras/día) con el método HPLC-FD con oxidación precolumna (AOAC) exclusivamente, requeriría automatizar la etapa de preparación de muestra. Su uso como complementario del bioensayo encarece el coste total del ensayo sin que se mejore en operatividad, ni seguridad debido al aumento en la demora de entrega de resultados. Existe una relación importante entre la aplicabilidad de la técnica de HPLC-FD con oxidación precolumna y el perfil toxínico de las muestras de moluscos, tanto es así que, para el caso de moluscos afectados por *Alexandrium minutum*, podría ser factible su aplicación en programas de control, mientras que en los moluscos afectados por *Alexandrium catenella* serían difíciles y en episodios de *Gymnodinium catenatum* lo haría prácticamente inviable. Existe la posibilidad en este caso de emplear el método de forma abreviada como método de cribado en conjunción con el bioensayo ratón, que se emplearía en caso de identificar toxinas por cromatografía.

## HPLC-Postcolumna

A lo largo del proyecto se han utilizado dos formatos de determinación de toxinas PSP siendo la parte de reacción postcolumna y detección fluorimétrica comunes, salvo muy pequeñas diferencias que no van a suponer diferencias sustanciales.

Básicamente las diferencias se establecen en la separación, en el primer formato se usan dos isocráticos diferentes con el que se pueden separar ocho toxinas (GTX6, GTX4, GTX1, dcGTX3, dcGTX2, GTX5, GTX3 y GTX2) y en el otro para separar las tres más apolares (neoSTX, dcSTX y STX). A nivel de patrones la separación es buena.

Ahora bien con respecto a muestras implica inyectar dos veces la misma muestra y cuando se detecta la presencia de toxinas Cx, GTX6 y GTX5 hay que hidrolizar el extracto para, por un lado, confirmar cualitativamente esas toxinas al generar los

productos de hidrólisis y poder cuantificar por comparación con el original el aumento de las toxinas a que dan lugar, lo que equivale a tener que inyectar la muestra cuatro veces. Esta metodología tiene como desventaja un elevado consumo de tiempo por muestra, además de una gran manipulación de los extractos.

En el segundo formato se usa un gradiente de dos eluyentes que suele resolver bastante bien las once toxinas con patrones. Lo mismo que con el método anterior cuando hay Cx, GTX6 y GTX5, hay que hidrolizar. La ventaja es en tiempo ya que en el peor de los casos solamente hay que inyectar la muestra dos veces y no hay que parar el sistema para cambiar de eluyente, lavar y reacondicionar la columna.

Con respecto a las muestras la robustez se ve comprometida y no sólo por las particularidades de las distintas matrices, sino que también se ve afectada por el fitoplancton presente en las áreas de producción. Así, las muestras procedentes del Mediterráneo donde no es habitual la presencia de *Gymnodinium catenatum* y si es dominante *Alexandrium minutum* transmiten un perfil de más fácil resolución mientras que *Gymnodinium catenatum* presenta un perfil mucho más complejo se hace muy difícil la identificación y cuantificación debido a la presencia de interferentes en la zona del par GTX41.

En la fase de preparación de muestras a partir de moluscos nos encontramos con un paso de limpieza no resuelto actualmente y que limita en gran medida la duración de las columnas además de la habitual presencia de interferentes no tóxicos. Si a esto le sumamos el efecto añadido de la variabilidad de los perfiles de toxinas, relacionado con el fitoplancton de la zona, podemos concluir que resulta muy difícil la aplicación rutinaria de esta metodología, en particular dentro de un programa de Control y Seguimiento.

En resumidas cuentas, ambos métodos tal y como se describen aquí, no son equivalentes al método biológico, ni económicamente, ni en tiempo de respuesta, ni desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, por lo que se necesita una depuración mayor para que cumplan los requerimientos exigidos por la legislación para la erradicación del método biológico. Pese a esto, el método de Cromatografía líquida de Alta Eficacia con oxidación Postcolumna es de gran ayuda a la hora de estudiar perfiles y comportamientos ante episodios tóxicos de tipo Paralizante.

### Evaluación de la citotoxicidad de toxinas y extractos

En el marco del actual proyecto se ha puesto a punto el ensayo de citotoxicidad para la determinación de toxinas PSP abordando diferentes modelos celulares, entre ellos alguno como el modelo celular NG108-15 que anteriormente no se había empleado. Ello ha permitido confirmar el ensayo de citotoxicidad como un utensilio práctico para la identificación de toxinas PSP. No obstante en el marco de este proyecto se ha intentado optimizar el protocolo para evaluar toxinas del PSP en moluscos. Hemos podido constatar que el modelo de citotoxicidad tiene

una capacidad limitada para su aplicación a identificación de toxinas presentes en moluscos por lo que su empleo como herramienta de cribado queda comprometida, entendemos fundamentalmente debido al efecto matriz de los moluscos. Su aplicación a la identificación de la toxicidad de microalgas resulta posible.

### Utilización y evaluación del test de diagnóstico rápido de toxinas paralizantes, MIST Alert™

Entre las diferentes metodologías propuestas, el test de diagnóstico rápido para toxinas paralizantes MIST Alert™ puede ser una buena herramienta de cribado que demuestra identificar toxinas paralizantes cuando éstas se encuentran a concentraciones altas, superiores al límite máximo permitido. Por ello su uso como herramienta de cribado de forma continuada queda comprometido dado que no da seguridad de que la presencia de toxinas PSP a concentraciones cercanas o ligeramente superiores al LMP puedan ser detectadas, con lo que el cumplimiento de los actuales reglamentos quedaría en entredicho. Puede ser una buena herramienta de seguimiento de las toxinas cuando éstas se encuentran entorno al LMP, por ejemplo para gestionar un episodio y reducir el número de análisis mientras los niveles de toxinas son altos, pero siempre en conjunción con otras herramientas de determinación de toxinas PSP. Se tiene que tener en cuenta que para valores algo inferiores al LMP pueden dar positivo (falsos positivos). Su uso por parte del sector es posible, pero siempre cuando éste sea consciente de las limitaciones descritas.

### Correlación y concordancia entre los resultados obtenidos de determinación de las toxinas paralizantes mediante los diferentes métodos: el bioensayo ratón, las determinaciones por cromatografía, LC-MS-MS como indicadores de toxicidad.

#### *Bioensayo*

Se detectan diferencias significativas entre laboratorios, aunque éstas son moderadas en los niveles próximos al cierre. La dispersión de los datos es, en general, mayor en los dos laboratorios que no realizan de forma intensa y continuada las determinaciones de toxicidad PSP por este método, por lo cual, es posible que, en la realidad, un uso óptimo del bioensayo requiera más formación, entrenamiento o práctica del personal encargado, que lo que habitualmente se asume.

La reproducibilidad ( y por tanto el porcentaje de falsos negativos y positivos) de los bioensayos varió con las especies , siendo en el corruco y el mejillón, por ejemplo, del mismo orden, pero existiendo 7 veces más variabilidad en los resultados de toxicidad en la chirla.

El perfil tóxico, sin embargo, no parece tener un efecto importante en la variabilidad de los resultados obtenidos por el bioensayo.

#### *HPLC con oxidación precolumna*

Esta técnica, en promedio se obtuvieron valores en toxinas inferiores a los del bioensayo de ratón en los dos laboratorios que la utilizaron. En promedio, la dispersión de las observaciones fue similar a la del bioensayo de ratón, aunque existieron diferencias significativas tanto en las estimaciones medias de toxicidad como en la dispersión entre los dos laboratorios que la utilizaron.

No parece existir un efecto significativo del perfil tóxico. La utilización de esta técnica requeriría un calibrado detallado contra el bioensayo o con materiales tóxicos específicamente diseñados para esta calibración.

#### *HPLC con oxidación postcolumna*

El método postcolumna utilizado por Andalucía (consistente en dos eluciones en modo isocrático) dió en mejillón resultados muy similares a los del bioensayo de ratón, sólo que con una subestimación relativa de la toxicidad mayor cuanto más alto fue el nivel tóxico (relación cuadrática, no lineal). La concordancia entre las dos técnicas fue buena en los niveles próximos al nivel de cierre.

La eficacia del método en relación al bioensayo depende considerablemente de la matriz biológica en la que se hallen las toxinas, ya que en el caso de la almeja la subestimación es similar a la que se da en el mejillón, pero en corruco y chirla las subestimaciones son considerablemente mayores, rayando en el primer caso el 40% y en el segundo el 60.

Las dispersiones son, en general similares a las obtenidas con bioensayo.

El método postcolumna utilizado en Galicia, que prácticamente es el mismo que ha sido validado por AOAC, dió resultados francamente pobres con cualquiera de los dos perfiles de toxinas probados, pero especialmente con el de *Alexandrium minutum*. Los malos resultados obtenidos y la casi nula consistencia de los resultados obtenidos en los reanálisis de las mismas muestras después de unos meses parecen justificarse, al menos en parte por la presencia y aparición de contaminantes que interfieren con la estimación de la concentración de las toxinas, especialmente de la GTX1, y hacen que esta técnica sea en la actualidad inutilizable para el control de los bivalvos en España.

#### *Jellett Rapid Tests*

Los kits de Jellett Rapid Tests detectaron toxicidad casi sin excepción en todas aquellas muestras probadas con respuesta detectable por bioensayo de ratón, es decir, con niveles aproximados de toxicidad de 400 ug.kg-1.

Igualmente, con una única excepción, las muestras que se consideraba que no contenían toxinas en cantidades apreciables, dieron resultados negativos.

Adicionalmente, las muestras discordantes una vez re-extraídas y vueltas a probar, dieron los resultados correctos, lo que indica que, con casi absoluta seguridad, los tests funcionan correctamente y detecta toxicidades iguales o incluso menores que 400 con los perfiles tóxicos habituales en *Alexandrium* del Mediterráneo y *Gymnodinium catenatum*.

Esta sensibilidad supone que con estos perfiles el número de falsos positivos debe ser muy elevado y por tanto que su uso en un sistema de control debe restringirse al cribado de muestras, dejando a otras técnicas la obtención de resultados definitivos.

#### *Efecto de la conservación de las muestras*

No se han encontrado diferencias ni por bioensayo de ratón ni por HPLC-precolumna ni HPLC-postcolumna debidas a la conservación de la muestra en congelación a -20°C. Si bien un número reducido de muestras mantenidas en esas condiciones durante más de 150 días dieron estimaciones de toxicidad considerablemente menores que las procesadas sin congelar o que las mantenidas en congelación menos de 40 días.

## CONCLUSIONES DEL OBJETIVO 2

### Estudio de la aplicabilidad de los métodos en los programas de seguimiento

En relación a los resultados, se observan discrepancias entre laboratorios en principio debidas a la propia organización del laboratorio en cuanto a personal, coordinación con otras actividades, espacios, determinación de costes. No obstante, se han podido obtener valoraciones en cuanto a coste y tiempo de ejecución que entran dentro del mismo orden de magnitud. Cabe señalar que en el laboratorio de INTECMAR, debido al gran número de muestras procesadas (5200 anualmente), los costes disminuyen significativamente respecto a otros laboratorios

#### GALICIA

Galicia utiliza actualmente el método biológico (AOAC Oficial Method 959.08) para la cuantificación de biotoxinas PSP en el desarrollo del programa de control de acuerdo a los reglamentos (CE) 853/2004, 854/2004 y 2074/2005. Todos los ensayos tanto los de las zonas de producción como las inspecciones de los servicios veterinarios y pesqueros se realizan en el INTECMAR- Consellería del Medio Rural y Mar , y es el laboratorio oficial de la Xunta de Galicia El número medio de muestras analizadas al año está en torno a las 5.200, lo cual supone una media diaria de 25 muestras/día. El personal y los medios disponibles están adecuados a la aplicación de los análisis programados anualmente con el método biológico. Se dispone además de un cromatógrafo para la realización de análisis por técnicas alternativas que se ha usado para el desarrollo de este proyecto.

Un cambio en la técnica oficial, implicaría que para mantener el programa de control acorde con la reglamentación en vigor, sería necesario un incremento en el coste por infraestructuras para adquirir mas instrumental y un incremento en potencial técnico al ser necesario entrenamiento del personal existente sin que esto redunde en una mejora en la operatividad del actual sistema ni en la seguridad del producto bajo control.

#### ANDALUCIA

La Comunidad Autónoma tiene competencia exclusiva en materia de marisqueo y acuicultura y en consecuencia le corresponde efectuar el Programa de Control y Seguimiento de las Condiciones Sanitarias en las Zonas de Producción de moluscos bivalvos, gasterópodos y equinodermos marinos del litoral andaluz. Los diferentes controles analíticos se realizan en el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros (L.C.C.RR.PP.) de la Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía, acreditado según la norma europea UNE-EN-ISO 17025 para el procedimiento de detección de toxinas paralizantes, entre otras.

El L.C.C.RR.PP cuenta con la infraestructura, medios técnicos y personal cualificado que el desarrollo del sistema de control sanitario del litoral andaluz requiere. Para la detección de toxinas paralizantes se emplea el ensayo biológico, que es en la actualidad el método oficial de referencia (AOAC, Oficial Method 959.08). Si se requiriese un cambio en el método oficial la adaptación a las necesidades del sistema sanitario supondría una gran inversión en infraestructuras y formación del personal adscrito al área para responder con la misma eficacia actual.

## CATALUNYA

Catalunya utiliza actualmente el bioensayo ratón de la AOAC bajo acreditación (Laboratorio de Salud Pública de Tarragona) para el seguimiento de toxinas PSP en moluscos, si bien existen limitaciones en cuanto a estructuras y personal para cubrir la totalidad de las muestras, en particular en situaciones de cierre con incremento de muestras. De forma a cubrir la totalidad de los ensayos, participa un laboratorio externo (ANFACO en Galicia). En Catalunya existe el potencial de uso de la cromatografía para el análisis de toxinas PSP (IRTA), actualmente fuera de acreditación. Está en curso la propuesta de uso de un método abreviado de cromatografía con derivatización pre-columna como utensilio de cribado que en caso de identificar presencia de toxinas se secundará en bioensayo ratón complementario.

### 2.6. VALORACIÓN

El presente proyecto ha sido ejecutado de forma correcta, cumpliendo con los objetivos propuestos y permitiendo disponer en España, tras la ejecución del proyecto, de una mejor comprensión y ejecución de las metodologías de ensayo y análisis de toxinas paralizantes. Igualmente el proyecto ha permitido establecer una mejor comunicación e intercambio entre los laboratorios que ejecutan estos protocolos. Con ello, si bien han podido surgir dificultades a lo largo del proyecto, éstas han sido solventadas y podemos decir que las expectativas formuladas en la propuesta inicial han sido cubiertas.

Cabe resaltar que por la propia estructura de la propuesta, centrada en la valoración y desarrollo de metodologías de análisis, el impacto de la ejecución de este proyecto sobre el sector de producción de moluscos debe ser medido en relación a la aplicabilidad de los resultados en los laboratorios de control. Podemos concluir que en efecto, los resultados del proyecto son de inmediata aplicación, por lo que se estima que el proyecto ha tenido el impacto deseado. Exponemos a continuación nuestra valoración según los diferentes elementos que se diferencian en el proyecto.

#### Establecimiento de una red de laboratorios y mejoras en la comunicación

La concesión del proyecto supuso un impulso importante en consolidar relaciones ya establecidas entre laboratorios que abordan el estudio de las toxinas paralizantes, y en particular aquellos que ejecutan programas de seguimiento de las toxinas para gestión de las zonas de producción. El proyecto ha permitido

intensificar los canales de comunicación, a través de reuniones periódicas, pero igualmente a través de una comunicación continuada, favoreciendo que en el futuro este intercambio se mantenga, y no exclusivamente dentro del ámbito de las toxinas paralizantes sino dentro de los controles realizados para un mayor espectro de toxinas: toxinas diarreicas, amnésicas y toxinas emergentes.

#### Intercambio de muestras entre los diferentes laboratorios y complementariedad respecto a los potenciales metodológicos particulares

La red de laboratorios participantes ha permitido aprovechar los potenciales metodológicos complementarios existentes en los diferentes laboratorios para poder desarrollar objetivos comunes. Entre estos potenciales cabe resaltar complementariedad tanto entre los recursos humanos y las diferentes especializaciones como en las infraestructuras de equipos y metodologías asociadas. Por ello nuestra valoración es que la actual red de laboratorios ha constituido una excepcionalidad en la actual propuesta, que a nuestro entender, pocos países podrían haber dispuesto de unas circunstancias similares. Por otra parte, la red de laboratorios ha permitido el disponer de unas muestras necesarias para ejecutar los análisis que hubiese sido muy difícil de obtener de otra manera. Estas muestras tienen el valor añadido de ser representativas de las problemáticas relacionadas con las toxinas PSP en las diferentes regiones, de forma que se ha podido abordar con una perspectiva global, las particularidades regionales. Igualmente cabe destacar, a título de ejemplo, que dentro de las muestras obtenidas en el actual proyecto han podido ser distribuidas al Laboratorio Europeo de Referencia de Biotoxinas Marinas y que estas muestras serán utilizadas en ejercicios intercomparativos de análisis de toxinas entre laboratorios de toda Europa.

#### Puesta a punto de las metodologías e implementación de metodologías en los diferentes laboratorios

Los diferentes laboratorios han podido a lo largo del proyecto poner a punto algunas de las metodologías empleadas, ya sea por disponibilidad de muestras, por transferencia de protocolos entre los participantes o por adquisición de nuevos equipos. Por ejemplo, los kits de Jellett evaluados en el proyecto eran prácticamente desconocidos para la mayoría de participantes, y han permitido confrontar a los laboratorios de control a una estrategia diferente a la rutina que emplean. A nivel del bioensayo ratón, el proyecto no planteaba cambios en la ejecución de protocolos, si bien como se verá en el apartado de comparación de metodologías si se han obtenido resultados de interés. A nivel cromatográfico, el proyecto ha permitido abordar el posible uso de la espectrometría de masas, que de todas maneras ha sido descartado. Igualmente se han abordado las metodologías más extensas de cromatografía mediante derivatización pre o post columna. En este sentido, el proyecto por ejemplo ha sido clave para incorporar en Catalunya la metodología pre columna, anteriormente ausente. Respecto al uso del bioensayo celular, el proyecto ha permitido abordar esta orientación si bien se ha revelado poco práctica dentro de los programas de vigilancia rutinaria.

## Comparación entre las metodologías entre los diferentes laboratorios

El ejercicio de comparación de las metodologías entre los diferentes laboratorios ha permitido, bajo una intensa colaboración y coordinación, aunar esfuerzos para comparar, a partir de muestras compartidas, diferentes metodologías asegurando la intervención de todos los participantes especializados en las técnicas abordadas y pertenecientes a las diferentes comunidades. Posteriormente, los datos obtenidos de los análisis fueron procesados y analizados por el Dr. Juan Blanco del CIMA, y las conclusiones fueron contrastadas por el conjunto de los participantes. Este esfuerzo de coordinación ha permitido abordar un análisis de forma consensuada que difícilmente hubiese podido ejecutarse fuera del contexto de un proyecto como éste. Sin disponer de material de referencia certificado con condiciones óptimas para este tipo de estudio, similar al descrito por Van den Top et al. (2000 y 2001) y, por tanto, no poder determinarse la exactitud, para valorar la idoneidad de los distintos modelos de ensayo se recurrió al estudio de la distribución de los datos (tendencia y dispersión), lo que permite determinar respuestas más probables, si las hay, y niveles de semejanza entre métodos y laboratorios. En nuestro caso no se han podido establecer comportamientos normales o más probables lo suficientemente robustos como para catalogar a determinadas respuestas como normales y a otras como anómalas. Así, adquiere mayor importancia el dirigir esfuerzos encaminados a la obtención de materiales de referencia certificados para una evaluación definitiva de la idoneidad de cada método.

### Estudio de evaluación de la aplicabilidad

Respecto a la evaluación de la aplicabilidad, el proyecto ha permitido estimar el tiempo y coste en la ejecución de los análisis, según la perspectiva de cada laboratorio condicionada a los diferentes recursos de que disponen. Estos datos pueden proporcionar un elemento comparativo entre laboratorios o comunidades, si bien las conclusiones que se han podido establecer son altamente dependientes de los recursos propios, de las estrategias de trabajo, de consideraciones administrativas o legislativas propias, etc... Por ello constituyen igualmente unos resultados para que de forma independiente, cada laboratorio o comunidad pueda evaluar su actual estrategia y reconsiderar decisiones. En el caso de Catalunya, por ejemplo, los resultados del proyecto abren la posibilidad a un cambio estratégico en la aproximación que se hace de las toxinas PSP, y fruto de los resultados y conclusiones del actual proyecto, es posible que se implante en un futuro cercano, debido a la particularidad de los perfiles de toxinas PSP en Catalunya, un método cromatográfico de cribado en conjunción con el uso del bioensayo ratón para aquellos casos positivos. Ello como consecuencia permitiría reducir de forma sustancial el uso de animales de laboratorio. Por ello en este sentido nuestra valoración del proyecto es altamente positiva ya que del estudio de aplicabilidad podrá derivar una propuesta formal a nivel de la gestión de las toxinas PSP en Catalunya.

## 2.7. DIFUSIÓN

Nuestra valoración respecto a la difusión del proyecto es correcta. Entendemos que del proyecto no se han derivado excesivas publicaciones científicas, si bien cabe señalar que los objetivos del proyecto preveían que la aplicabilidad de los resultados del proyecto serían de orden interno para la propia gestión de los programas de vigilancia y toma de decisiones respecto a las metodologías empleadas tal como se formulaba en la propuesta: “los resultados de este proyecto definirán estrategias útiles para su adaptación en los programas de vigilancia de toxinas en zonas de producción de moluscos a nivel nacional”. Por ello no era de esperar una fuerte contribución en cuanto a publicaciones científicas. En cuanto a la difusión entre el sector, de nuevo, los resultados del proyecto no eran de esperar de ser de aplicación inmediata sobre el sector de producción, sino sobre los propios laboratorios de control que ejecutan ensayos para toxinas del PSP. Tal como se ha comentado anteriormente, la relación con el Laboratorio Europeo de Referencia de Biotoxinas Marinas, por ejemplo, ha permitido la difusión de los resultados del proyecto. Mayores detalles en relación a la difusión del proyecto están contemplados en el anexo específico.

## 2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

Se puede concluir que no han surgido incidencias notables en el desarrollo del proyecto que hayan condicionado su ejecución. El grupo del CSIC en Catalunya tuvo que dejar de intervenir ya que no disponía de la posibilidad de participar en el análisis de cromatografía HPLC Post-columna, hecho que se comunicó a JACUMAR en febrero de 2010. Igualmente señalamos la necesidad que tuvimos de solicitar una prórroga de 6 meses sin presupuesto para concluir el proyecto.

## 2.9. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Franco, J.M., Riobó, P. & Gómez, P.I. 2011. The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile, *Harmful Algae* 12: 105-112.

AOAC, 1995. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, sec 959.08. Chapter 35: 21-22.

Asp, T.N., Larsen, S., Aune, T. (2004) Analysis of PSP toxins in Norwegian mussels by a post-column derivatization HPLC method. *Toxicon* 43 (2004) 319-327.

Aune, T.; Yasumoto, T.; Engeland, E. (1991) Light and electron microscopic studies on effects of marine algal toxins freshly prepared hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.* 34 :1-9.

Bates, H.A. & H. Rapoport. (1975). A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. Agric. Food Chem.* 23: 237-239.

Caterall, W. (1975) Cooperative activation of action potential Na<sup>+</sup> ionophore by neurotoxins. *Proc. Natn. Acad. Sci.*: 1782-1786.

Cefas (2007) Qualitative screening of shellfish samples for paralytic shellfish poisoning toxins by high performance liquid chromatography with pre-column oxidation and fluorescence detection. Final project report. 2007. CEFAS. Cefas contracts: C2649 & C2333

Chang Yen I., Rojas de Astudillo L., Franco J.M, La Barbera-Sánchez A. 2006. Paralytic shellfish poisoning toxin profiles in green mussels from Trinidad and Venezuela. *Journal of Food Composition and Analysis.* 19: 88–94

Chu, F.S., Hsu, K.H., Huang, X., Barrett, R., Allison, C., (1996) Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different competitive enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Agric. Food Chem.* 44, 4043-4047.

Dell'Aversano, C.; Hess, P.; Quilliam, M.A. (2005) Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, *J. Chromatogr.* 1081, 190-201.

DIR 2010/63/UE (2010) DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Diogene, J.; Fessard, V.; Dubreuil, A.; Puisseaux-Dao, S. (1995) Comparative studies of the actin cytoskeleton response to maitotoxin and okadaic acid. *Toxic. in Vitro* 9: 1-10.

European Food Safety Authority (2009) "Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group", *The EFSA Journal* 1019: 49 – 76

Fernández, M.L.; Míguez, A.; Cacho, E.; Martínez, A.; Diogène, J.; Yasumoto, T. (2002). Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de toxinas. In *Floraciones Algas Nocivas en el Cono Sur americano*. Eugenia A. Sar, Martha E. Ferrario y Beatriz Reguera eds. Instituto Español de Oceanografía, pp: 77-120

Franco J. M., P. Fernández-Vila (1993). Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography, with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35, ( 9-12), 613-620.

Hummert, C., M. Ritscher, K. Reinhardt & B. Luckas. (1997). Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strain of *Alexandrium* sp. by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation and fluorescence detection. *Chromatographia* 45: 312-316.

Janecek, M., Quilliam, M.A., Lawrence, J.F. (1993) Analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by automated pre-column oxidation and microcolumn liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 644, 321-331.

Jellett, J.F., Marks, L.J., Stewart, J.E., Dorey, M.L., Watson-Wright, W., Lawrence, J.F. (1992) Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon* 30, 1146-1156.

Jellett, J.F., Roberts, R.L., Laycock, M.V., Quilliam, M.A. and Barrett, R.E. (2002). Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert (TM), a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC (R) mouse bioassay. *Toxicon*, 40(10):1407-1425.

Lawrence J., Menard C., Charbonneau, C.F., Hall, S., (1991) A study of ten toxins associated to Paralytic Shellfish Poisoning using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC International* 84, 1099-1108.

Lawrence J., Niedzwiadek B., Menard C. (2005). Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Collaborative Study. *J.A.O.A.C. International*. 88, (6) 1714-1732

Lawrence, J.F. & B. Niedzwiadek. (2001). Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 84: 1099-1108.

Lawrence, J.F., C. Ménard & Ch. Cleroux. (1995). Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatography determination of Paralytic Shellfish Poisons in shellfish. *J. AOAC Int.* 78: 514-520.

Leira, L.; Louzao, M.C.; Vieites, J.M.; Botana, L.M.; Vieytes, M.R. (2002) Fluorescent microplate cell assay to measure uptake and metabolism of glucos in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in vitro* 16: 267-273.

Locke, S.J., Thibault, P. (1994) Improvement in the detection limits for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish tissues using capillary electrophoresis electrospray mass-spectrometry and discontinuous buffer systems. *Anal. Chem.* 66, 3436-3446.

Luckas, B., Hummert, C. and Y. Oshima (2003). Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In "Manual on Harmful Marine Microalgae", Hallegraeff G.M., Anderson D.M. and Cembella A.D. Eds. UNESCO Publishing, Paris. pp: 191-209.

Novelli, A., Kispert, J.; Fernandez-Sanchez, M.T.; Torreblanca, A.; Zitco, V. (1992) Domoic acid-containing toxic mussels produce neurotoxicity in neuronal cultures through a synergism between excitatory amino acids. *Brain Res* 577: 41-48.

Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G., Blackburn, S. (1987) Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon* 25, 1105-1111.

Oshima, Y., Sugino, K., Yasumoto, T. (1989). Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In: *Mycotoxins and Phycotoxins '88* (S.Natori, K. Hashimoto, Y. Ueno, eds.) 319-326. Amsterdam, Elsevier.

Oshima, Y. (1995) Post-column derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78, 528.

Palacios L., Reguera B., Franco J.M. & Marín I. 2006 .Phylogenetic diversity of bacteria associated with toxic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum* *African Journal of Marine Science*, 28: 409–414

Pleasant, S., Ayer, S.W., Laycock, M.V., Thibault, P. (1992) Ion-spray mass spectrometry of marine toxins. III. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by flow-injection analysis, liquid chromatography/mass spectrometry and capillary electrophoresis/mass spectrometry, *Rapid Comm Mass Spectrom*, 6, 14-24.

Quilliam, M.A., B.A. Thompson, G.J. Scott, and K.W.M. Siu. (1989). Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 3: 145-150.

Riobó P., Franco J.M. & López E. 2011. Chemical methods for phycotoxins detection: LC and LC/MS/MS. In: *New Trends in Marine and Freshwater Toxins: Food and Safety Concerns* (A.G. Cabado and JM Vieites Eds.) Nova Science Publishers, Inc. pp. 215-266.

Rodríguez-Vázquez, J.A., Oshima, Y., Lee, J.S., Yasumoto, T. (1989) Analysis of toxins in mussels from the Atlantic coast of Spain. In: *Mycotoxins and Phycotoxins '88* (S. Natori, K. Hashimoto, Y. Ueno, eds.) 367-374. Amsterdam, Elsevier.

Rodríguez P., A. Alfonso, A.M. Botana, M.R. Vieytes, L.M. Botana. 2010. Comparative analysis of pre- and post-column oxidation methods for detection of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 56 (2010) 448–457.

Rourke W. A, Murphy, C. J., Pitcher G., Van De Riet J.M., Burns B.G.; Thomas, K.M. & Quilliam, M. A. 2008. Rapid Postcolumn Methodology for Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish Tissue. *Journal of AOAC International*. 91: 589-597.

Schantz, E.J., McFarren, E.F., Schafer, M.L., Lewis, K.H. (1958) Purified poison for bioassay standardization. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 41, 160-168.

Sullivan, J., Iwaoka, W.T. (1983a) High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning . *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 66, 297-303.

Sullivan, J., Iwaoka, W.T., Liston, J. (1983b) Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochem Biophys. Res. Comm.* 114, 465-472.

Thielert, G.; I. Kaiser & B. Luckas (1992). HPLC determination of PSP toxins in "Internat. Symp. Marine Biotoxins", J. M. Freymy, ed. (CNEVA, Paris), pp121-125.  
Usleber, E., Donald, M., Straka, M., Martlbauer, E. (1997) Comparison of enzyme immunoassay and mouse bioassay for determining paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Addit. Contam.* 14, 193-198.

Touzet N., Franco J.M. & Raine R. 2006 .Inter- and intra-specific variability in morphogenetics and toxin composition of *Alexandrium* spp. in Irish coastal waters. *African Journal of Marine Science*. 28: 181–184

Touzet N., Franco J.M. & Raine R. 2007. Characterization of Nontoxic and Toxin-Producing Strains of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in Irish Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3333–3342

Touzet N., Franco J.M. & Raine R. 2007. Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland. *Toxicon* 50: 106–119

Touzet N., Franco J.M. & Raine R.(2008).Morphogenetic diversity and biotoxin composition of Alexandrium (Dinophyceae)in Irish coastal waters  
Raine. Harmful Algae. 7: 782–797.

Touzet N., Franco J.M. & Raine R. 2008 .PSP toxin analysis and discrimination of the naturally co-occurring Alexandrium tamarense and A. minutum (Dinophyceae) in Cork Harbour, Ireland Aquatic Microbial Ecology. 51: 285–299.

Turner Andrew D., Robert G. Hatfield, Monika Rapkova, Wendy Higman et al. 2011. Comparison of AOAC 2005.06 LC official method with other methodologies for the quantitation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK shellfish species. Anal Bioanal Chem (2011) 399:1257–1270.

Vale, P. & M.A.M. Sampayo. (2001). Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. Toxicon 39: 561-571.

Van de Riet Jeffrey M., Ryan S. Gibbs, Faith W. Chou et al. 2009. Liquid Chromatographic Post-Column Oxidation Method for Analysis of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Scallops and Oysters: Single-Laboratory Validation. JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 92, NO. 6, 2009

Van Den Top H. J., Boenke A., Burdaspal P. A., Bustos J., Van Egmond H. P, Legarda T., Mesego A., Mourino A., Paulsch W. E & Salgado C. 2000 The development of reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins in lyophilized mussel. I: Interlaboratory studies of methods of analysis. Food Additives and Contaminants. 17, 419-433

Van Den Top H. J., Boenke A., Burdaspal P. A, Bustos J, Van Egmond H. P, Legarda T., Mesego A., Mourino A., Paulsch W. E & Salgado C. 2001 The development of reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins in lyophilized mussel. II: Certification study. Food Additives and Contaminants. 18, 810-824

### **3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LAS DISTINTAS CCAA (estos informes podrán tener el formato que determine cada CCAA, incluidos sus logotipos oficiales)**

#### **ANEXO A - RESULTADOS DEL EJERCICIO INTERCOMPARATIVO ENTRE LOS DIFERENTES ANÁLISIS Y ENSAYOS**

# ANEXO A

## JACUMAR JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

### PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

#### INFORME FINAL

#### **Título:**

#### **Resultados del ejercicio intercomparativo entre los diferentes análisis y ensayos**

Anexo A del INFORME FINAL del proyecto: Comparación de metodologías para la determinación de toxinas paralizantes en bivalvos relacionadas con el Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). Aplicación a la acuicultura en España ("JACUMAR PSP")

## Resultados

### Bioensayo de ratón

#### Mejillón con toxinas de *Gymnodinium catenatum*

##### Andalucía

Los niveles de toxicidad estimados fueron algo superiores a los elegidos *a priori*. La dispersión fue reducida salvo en el nivel más alto, en el que estuvo en torno a un 15%.

Aún así, como puede apreciarse en la tabla siguiente, los intervalos de confianza del 95% de los dos niveles intermedios se solapan considerablemente, lo cual indica que en un porcentaje considerable valores inferiores a 800 se asignarán a este nivel y viceversa. No sucede así con el nivel muy tóxico, ya que intervalo de confianza no se solapa en absoluto con ninguno de los otros.

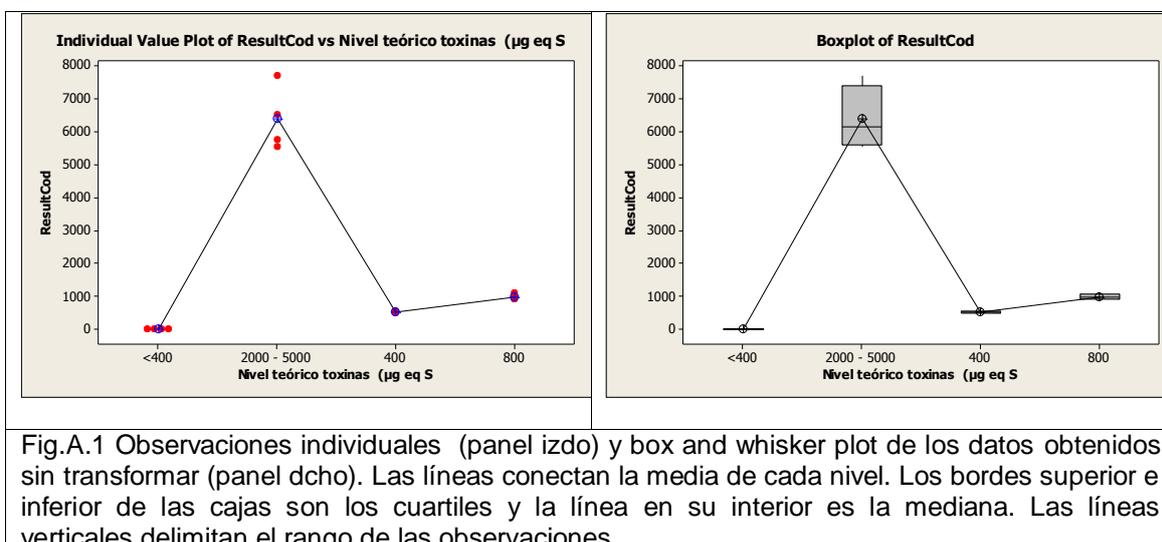
##### One-way ANOVA: ResultCod versus Nivel teórico toxinas ( $\mu\text{g eq S}$ )

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teórico toxinas	3	105625800	35208600	147.54	0.000
Error	12	2863600	238633		
Total	15	108489400			

S = 488.5    R-Sq = 97.36%    R-Sq(adj) = 96.70%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
<400	4	0.0	0.0	(--*--)
2000 - 5000	4	6375.0	973.4	(--*--)
400	4	510.0	29.4	(--*--)
800	4	975.0	78.5	(--*--)

Pooled StDev = 488.5



## Cataluña

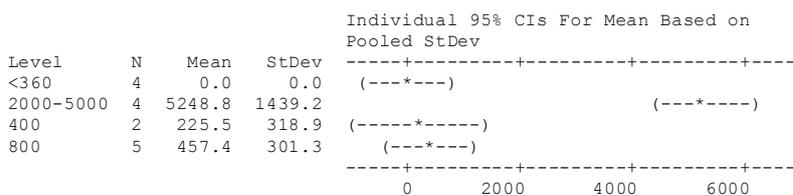
Las toxicidades estimadas fueron, en general, menores que las estimadas a priori y fueron también inferiores a las estimadas inicialmente en Andalucía. Probablemente por la presencia de tres observaciones, una en 800 y otra en 400 que no dieron positivo en el bioensayo, y una tercera en el nivel de 2500-5000, que aunque dio negativo, su valor estimado fue de la mitad que el obtenido en las otras muestras del mismo nivel. Los tres ensayos fueron realizados por el mismo operador. La dispersión igualmente fue mayor, siendo superior al 30%.

En este caso, al ser los intervalos de confianza más amplios, los niveles de 400 y 800 no solo se solapan entre sí, sino que también lo hacen con el nivel 0, lo cual indica que son estadísticamente indistinguibles de este y, por tanto, deberán darse gran número de falsos negativos.

### One-way ANOVA: microgramos eqSTX por kg versus Nivel teórico toxinas

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teórico toxinas	3	73794928	24598309	40.51	0.000
Error	11	6678744	607159		
Total	14	80473672			

S = 779.2 R-Sq = 91.70% R-Sq(adj) = 89.44%



Pooled StDev = 779.2

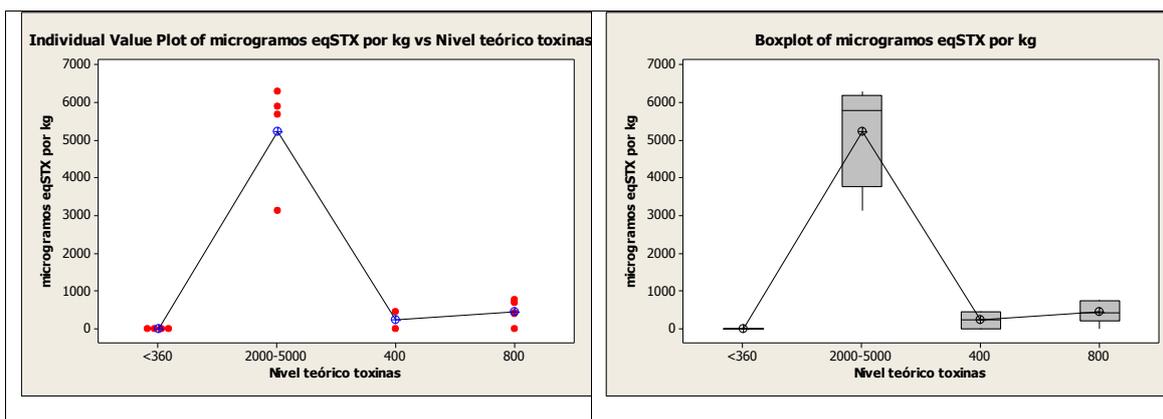


Fig. A2 Observaciones individuales (panel izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

Cuando se excluyen las tres observaciones consideradas incorrectas, las toxicidades estimadas son más elevadas y las dispersiones disminuyen, en algún nivel considerablemente, pero en promedio siguen siendo altas.

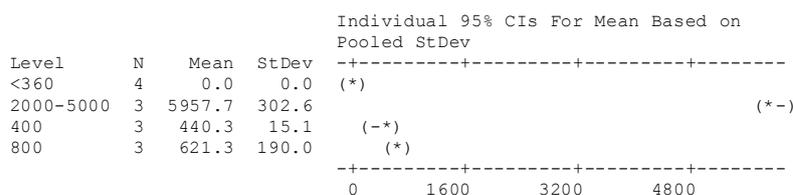
Tras esta corrección los intervalos de los niveles extremos no se solapan con los medios, aunque estos siguen solapándose entre sí. Es esperable, por tanto que se den tanto falsos negativos como falsos positivos pero de niveles de toxicidad próximos.

### Results for: MBA\_Caten\_CatSin62\_85y31

#### One-way ANOVA: microgramos eqSTX por kg versus Nivel teórico toxinas

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teórico toxinas	3	74110502	24703501	869.41	0.000
Error	9	255728	28414		
Total	12	74366230			

S = 168.6 R-Sq = 99.66% R-Sq(adj) = 99.54%

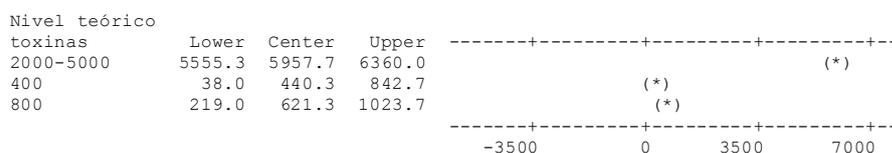


Pooled StDev = 168.6

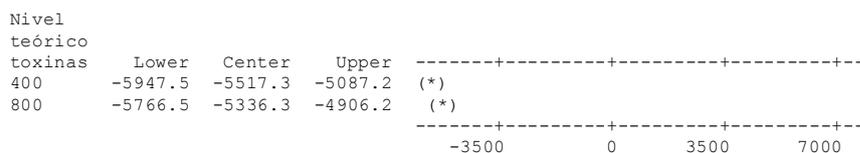
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teórico toxinas

Individual confidence level = 98.78%

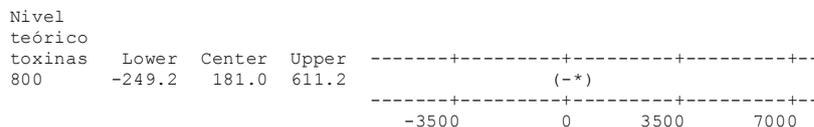
Nivel teórico toxinas = <360 subtracted from:

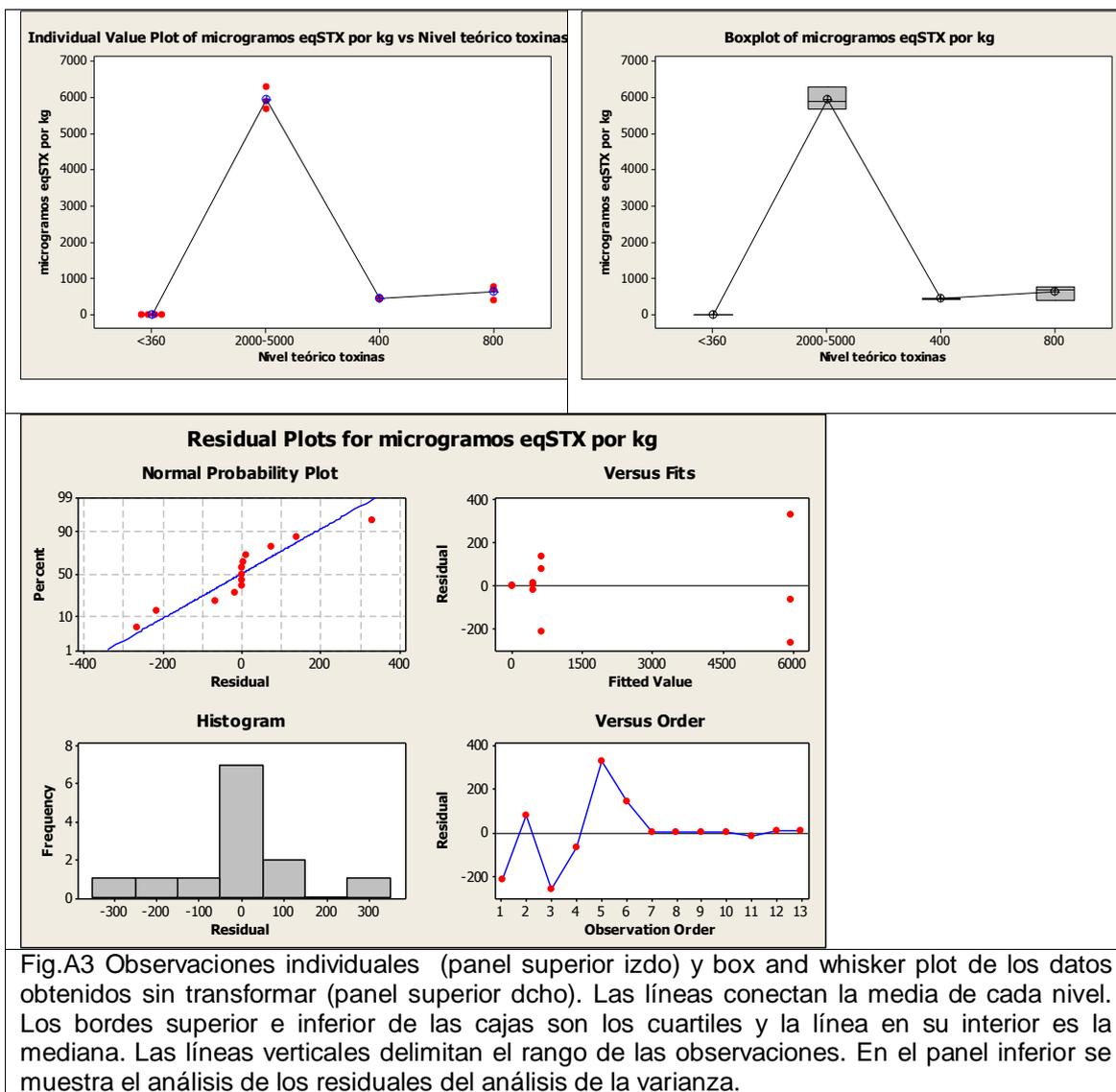


Nivel teórico toxinas = 2000-5000 subtracted from:



Nivel teórico toxinas = 400 subtracted from:





## Galicia

Los valores son notablemente más bajos que los estimados en Andalucía pero las dispersiones son del mismo orden y por tanto también lo son tamaños de los intervalos de confianza y los porcentajes esperables de falsos negativos y positivos.

### One-way ANOVA: STXeq ratón versus Nivel Corr

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Corr	3	11430212	3810071	92.19	0.000
Error	12	495928	41327		
Total	15	11926140			

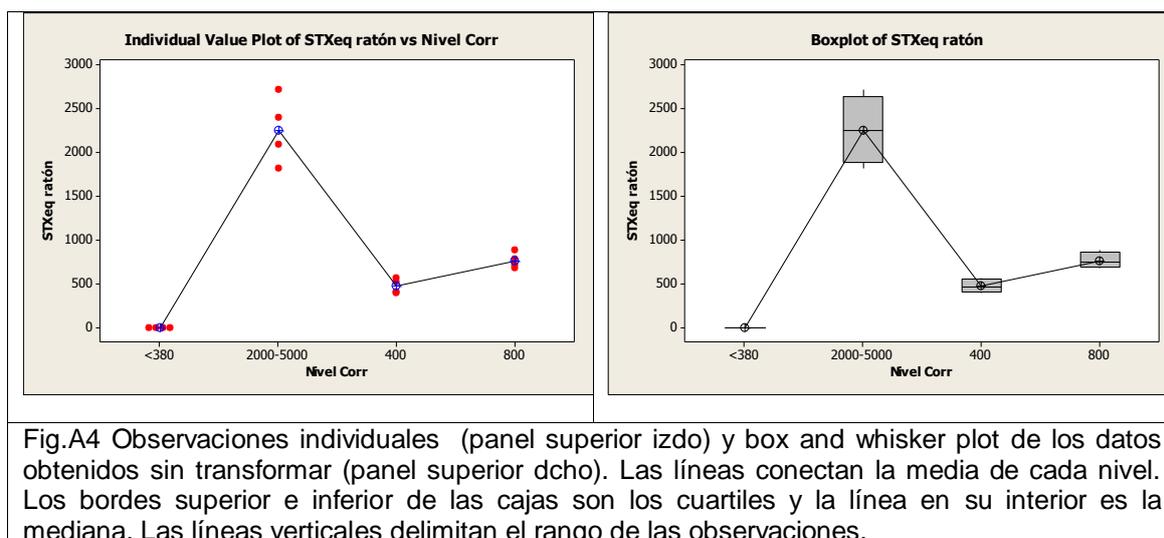
S = 203.3 R-Sq = 95.84% R-Sq(adj) = 94.80%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
<380	4	0.0	0.0
2000-5000	4	2260.0	387.5
400	4	473.0	80.5
800	4	765.0	93.3

0 700 1400 2100

Pooled StDev = 203.3



### Comparación entre laboratorios. Bioensayos mejillón con perfil de *Gymnodinium catenatum*

Cuando se comparan los resultados de los bioensayos de ratón de mejillón con PSP proveniente de *Gymnodinium catenatum* en términos de resultados de toxicidad positiva y negativa (utilizando 800 como umbral), la consistencia de los resultados dentro de cada laboratorio es muy buena. Sin embargo entre laboratorios la concordancia es peor, y aunque es significativa, está en torno a un 75% cuando se consideran los tres laboratorios simultáneamente.

Codificadas las toxicidades obtenidas como:  
 Code (0:800) "No Tóxico" (800:1000) "Tóxico"

#### Results for: MBAsCatenComplglualNumSin62\_85y31

##### Attribute Agreement Analysis for CodigoTox

##### Within Appraisers

Assessment Agreement

Appraiser	# Inspected	# Matched	Percent	95 % CI
AND	4	4	100.00	(47.29, 100.00)
CAT	4	4	100.00	(47.29, 100.00)
GAL	4	4	100.00	(47.29, 100.00)

# Matched: Appraiser agrees with him/herself across trials.

Fleiss' Kappa Statistics

Appraiser	Response	Kappa	SE Kappa	Z	P(vs > 0)
AND	No tóxico	1	0.288675	3.46410	0.0003
	Tóxico	1	0.288675	3.46410	0.0003
CAT	No tóxico	1	0.288675	3.46410	0.0003
	Tóxico	1	0.288675	3.46410	0.0003
GAL	No tóxico	1	0.288675	3.46410	0.0003
	Tóxico	1	0.288675	3.46410	0.0003

##### Between Appraisers

Assessment Agreement

# Inspected # Matched Percent 95 % CI  
 4 3 75.00 (19.41, 99.37)

# Matched: All appraisers' assessments agree with each other.

Fleiss' Kappa Statistics

Response	Kappa	SE Kappa	Z	P(vs > 0)
No tóxico	0.71875	0.0833333	8.625	0.0000
Tóxico	0.71875	0.0833333	8.625	0.0000

Se encuentran diferencias entre las estimaciones de los distintos laboratorios. En parte, aunque no completamente, debido a varios outliers que aparecen en los el laboratorio de Cataluña (resultados negativos del bioensayo en muestras positivas en otros laboratorios, o excesivamente bajos. Cuando se eliminan los outliers, las diferencias siguen siendo significativas aunque son notablemente menores.

El bioensayo, por tanto, con este tipo de toxicidad y matriz, no da resultados perfectamente comparables entre laboratorios. El hecho de haber elegido un nivel próximo al nivel de cierre, hace que las pruebas realizadas sean especialmente sensibles a diferencias de respuesta cuando se categorizan en tóxicos o no tóxicos. Con las dispersiones estimadas para el nivel aproximado de 800, en el ANOVA, el intervalo de confianza del 95% para una muestra de 800 va desde 640- 960 en los ensayos de Andalucía a 420-1180 para los ensayos de Cataluña (una vez descartados 3 outliers), con los resultados de Galicia próximos a los de Andalucía. Hay por tanto un rango relativamente amplio de muestras que pueden dar valores de toxicidad positivos o negativos dependiendo del error del procedimiento.

Resulta, por tanto, prácticamente imposible utilizar el bioensayo de ratón como método de referencia para la determinación de positivos y negativos, ya que los resultados obtenidos son excesivamente variables entre laboratorios.

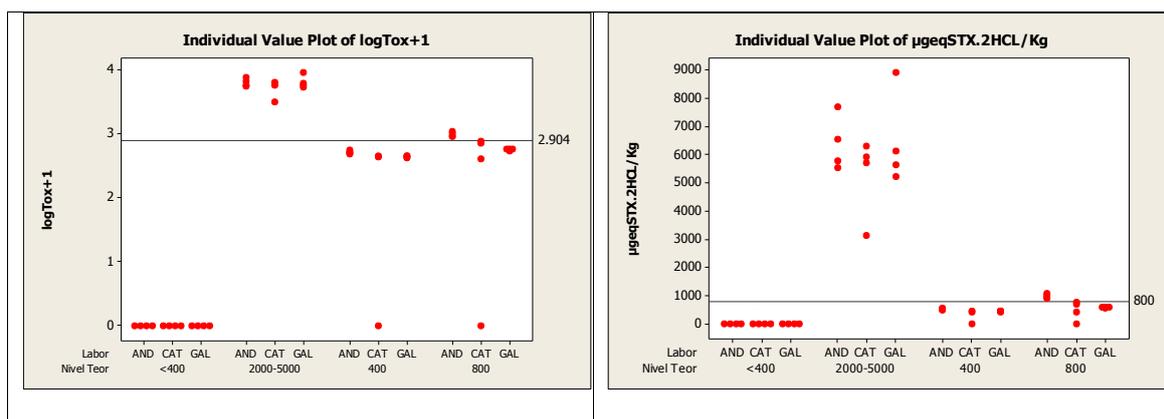


Figura A5 Estimaciones de toxicidad por bioensayo de raton en los distintos laboratorios con los niveles de toxicidad teóricos probados. En el panel izquierdo figuran los datos transformados logarítmicamente y en el derecho los datos sin transformar. En ambos, la línea horizontal corresponde al nivel máximo de toxicidad permisible en la actualidad.

### General Linear Model: logTox+1 versus Nivel Teor, Labor

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	4	<400, 2000-5000, 400, 800
Labor	fixed	3	AND, CAT, GAL

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel Teor	3	90.1677	89.9064	29.9688	99.00	0.000
Labor	2	1.9016	2.0836	1.0418	3.44	0.043
Nivel Teor*Labor	6	1.7147	1.7147	0.2858	0.94	0.477
Error	35	10.5948	10.5948	0.3027		
Total	46	104.3788				

S = 0.550190 R-Sq = 89.85% R-Sq(adj) = 86.66%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
25	0.00000	1.76083	0.31765	-1.76083	-3.92 R
28	0.00000	2.08374	0.27510	-2.08374	-4.37 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

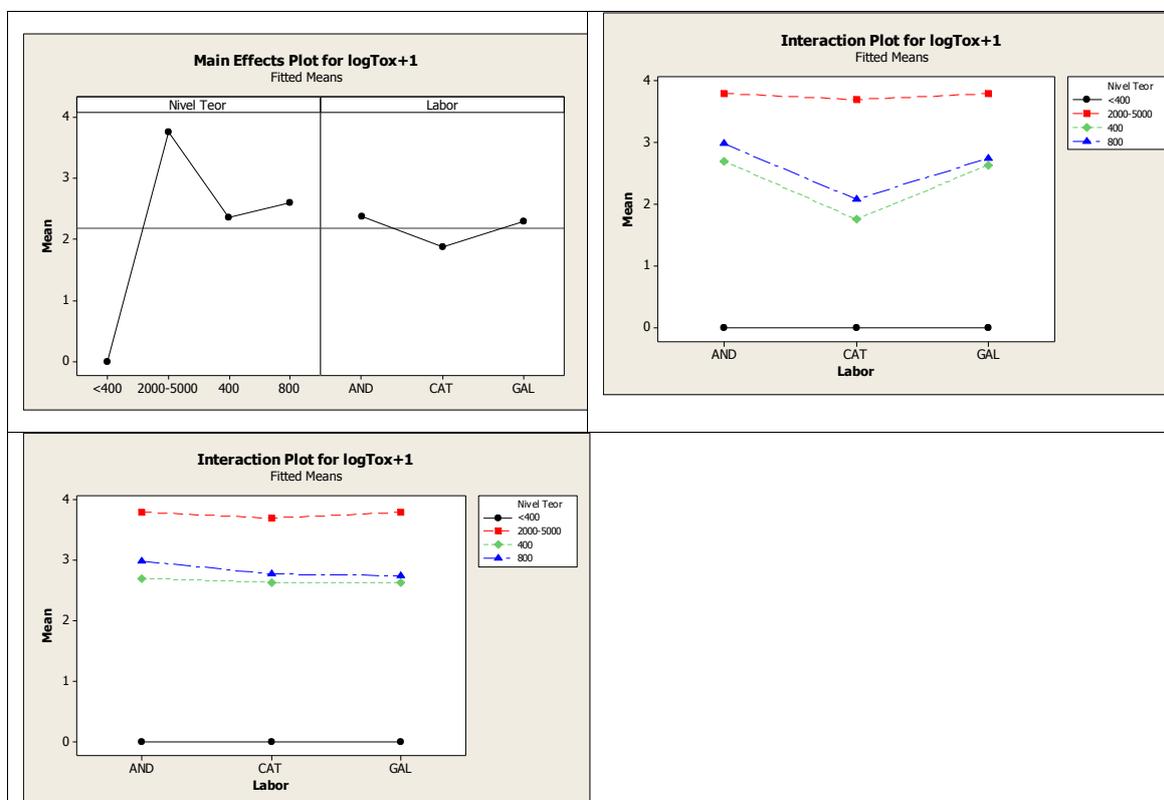


Fig. A6 Efectos principales en interacciones (sin eliminar outliers de Cataluña (superior) y eliminándolos (inferior) de la toxicidad estimada por bioensayo de ratón con nivel de toxicidad definido "a priori" y con el laboratorio que realizó los ensayos.

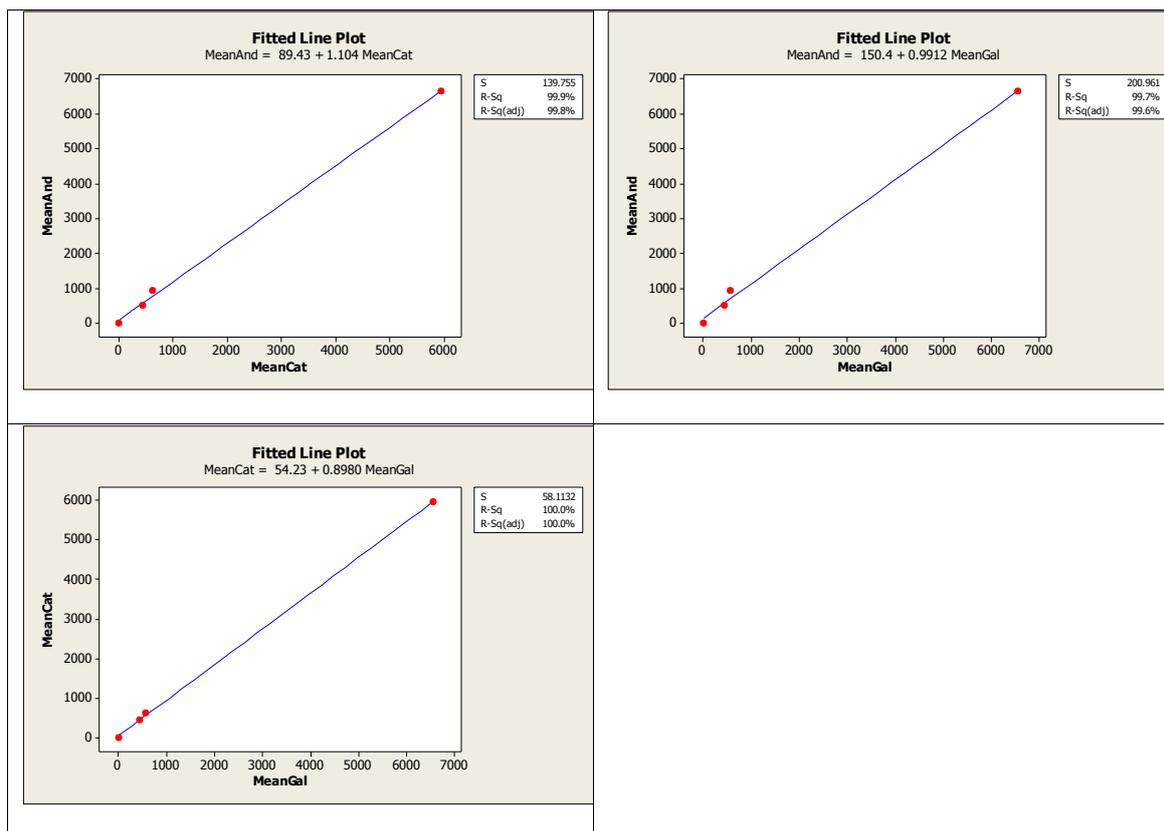


Fig A7 Regresiones entre los valores medios obtenidos por los diferentes laboratorios con bioensayo de ratón, una vez excluidos los dos negativos de toxicidad (outliers) de Cataluña

### Cálculo de valores medios de bioensayos de mejillón con toxinas de *Gymnodinium catenatum*

Se calcularon los valores medios de los bioensayos en los distintos niveles de toxicidad elegidos, después de eliminar los 3 valores extrañamente bajos de Cataluña.

Aunque la intención inicial era utilizar estos resultados con referencia para el resto de las técnicas empleadas, la variabilidad observada hace necesaria su utilización en este sentido con mucha cautela.

Los valores obtenidos son:

Least Squares Means for  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$

Nivel Teor	Mean	SE Mean
<400	-0.00	169.2
2000-5000	6264.56	178.4
400	462.61	178.4
800	719.78	178.4

Las medias obtenidas para los diferentes laboratorios son las siguientes:

Labor		
AND	1965.00	146.6
CAT	1754.83	163.9
GAL	1865.37	146.6

## Mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum*

### Cataluña

Los niveles dan algo más bajos que los teóricos y la dispersión es moderada-baja, pero en el nivel de 400 hay un punto con muy poca respuesta. A juzgar por los intervalos de confianza del 95%, todos los niveles son distinguibles entre sí, no habiendo solapamiento entre ellos a este nivel. Las variables accesorias monitorizadas, como el pH del extracto no tienen efecto alguno.

#### One-way ANOVA: microgramos eqSTX por kg versus Nivel teórico toxinas

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teórico toxinas	3	20940041	6980014	523.16	0.000
Error	20	266840	13342		
Total	23	21206880			

S = 115.5 R-Sq = 98.74% R-Sq(adj) = 98.55%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0	6	0.0	0.0
400	6	376.2	185.4
800	6	661.0	52.5
2600	6	2433.8	127.4

0 700 1400 2100

Pooled StDev = 115.5

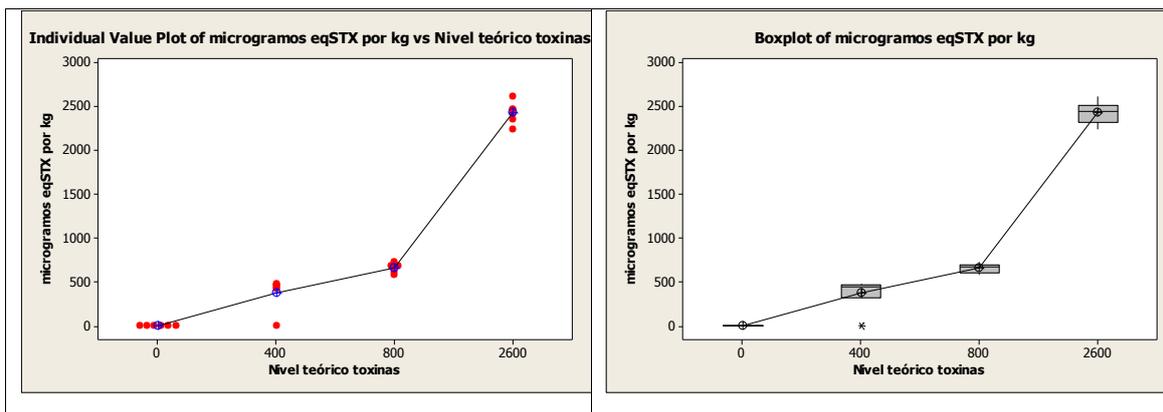


Fig A8 Resultados de los bioensayos de ratón de muestras de mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum* en el laboratorio de Cataluña. Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

## Galicia

Las estimaciones de los niveles teóricos de 400 y 800 salen muy próximos por lo cual deben poder distinguirse adecuadamente, incluso cuando los datos se transforman logarítmicamente para homogeneizar la varianza y minimizar los efectos de los valores extremos. Para el nivel teórico de 2600 este laboratorio estima toxicidades de más del doble y además con una considerable dispersión.

### One-way ANOVA: STXeq ratón versus Nivel Teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	113337603	37779201	55.13	0.000
Error	12	8222639	685220		
Total	15	121560242			

S = 827.8 R-Sq = 93.24% R-Sq(adj) = 91.54%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0	4	0.0	0.0
400	4	437.5	14.8
800	4	563.0	18.4
2600	4	6461.0	1655.4

Pooled StDev = 827.8

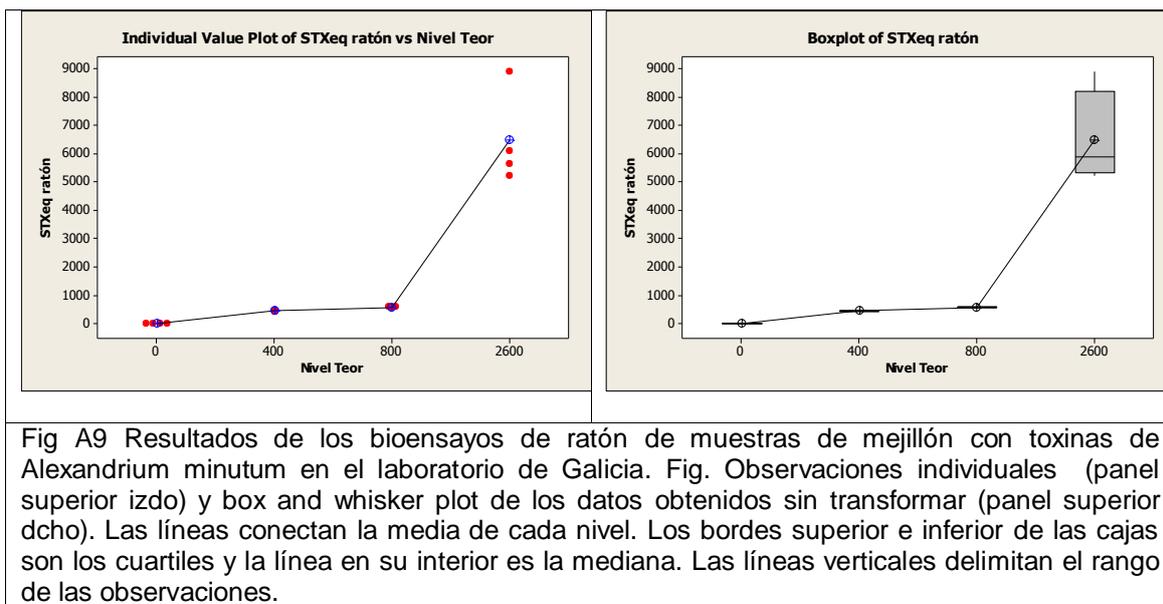


Fig A9 Resultados de los bioensayos de ratón de muestras de mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum* en el laboratorio de Galicia. Fig. Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

### One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel Teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	31.45060	10.48353	3842.70	0.000
Error	12	0.03274	0.00273		
Total	15	31.48334			

S = 0.05223 R-Sq = 99.90% R-Sq(adj) = 99.87%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
0	4	0.0000	0.0000
400	4	2.6418	0.0147
800	4	2.7511	0.0143
2600	4	3.8008	0.1024

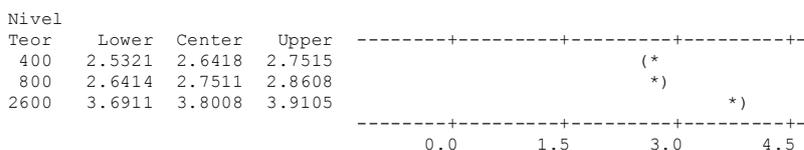
Pooled StDev = 0.0522

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

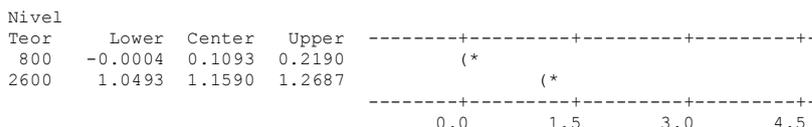
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.83%

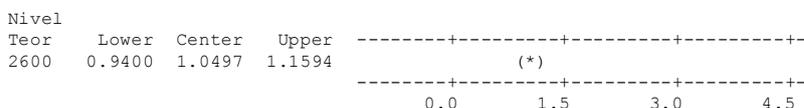
Nivel Teor = 0 subtracted from:



Nivel Teor = 400 subtracted from:



Nivel Teor = 800 subtracted from:



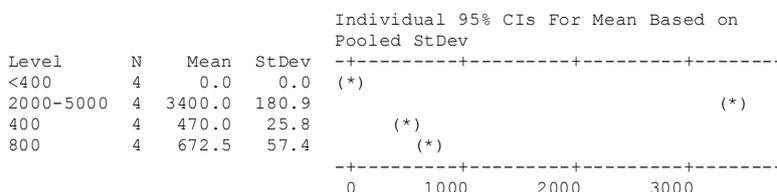
## Andalucía

Los estimaciones obtenidas por Andalucía para las muestras de mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum* presentan una dispersión relativamente baja. Por esta razón, y aunque la diferencia entre los niveles medios es menor que la esperable, es posible distinguir bien el nivel de 400 del de 800 (los otros dos niveles se distinguen mejor en todos los casos), ya que sus correspondientes intervalos de confianza del 95%, no se solapan. Esto puede apreciarse tanto con los datos sin procesar (no distribuidos normalmente) como en los transformados logarítmicamente.

### One-way ANOVA: µgeqSTX.2HCL/Kg versus Nivel teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	28298319	9432773	1028.33	0.000
Error	12	110075	9173		
Total	15	28408394			

S = 95.78 R-Sq = 99.61% R-Sq(adj) = 99.52%



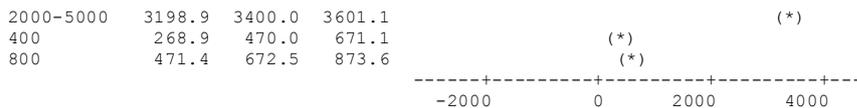
Pooled StDev = 95.8

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

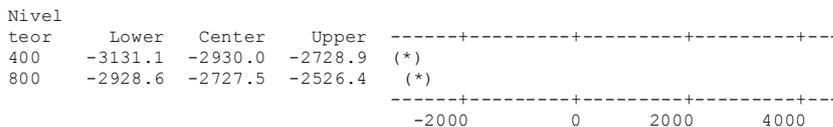
Individual confidence level = 98.83%

Nivel teor = <400 subtracted from:





Nivel teor = 2000-5000 subtracted from:



Nivel teor = 400 subtracted from:

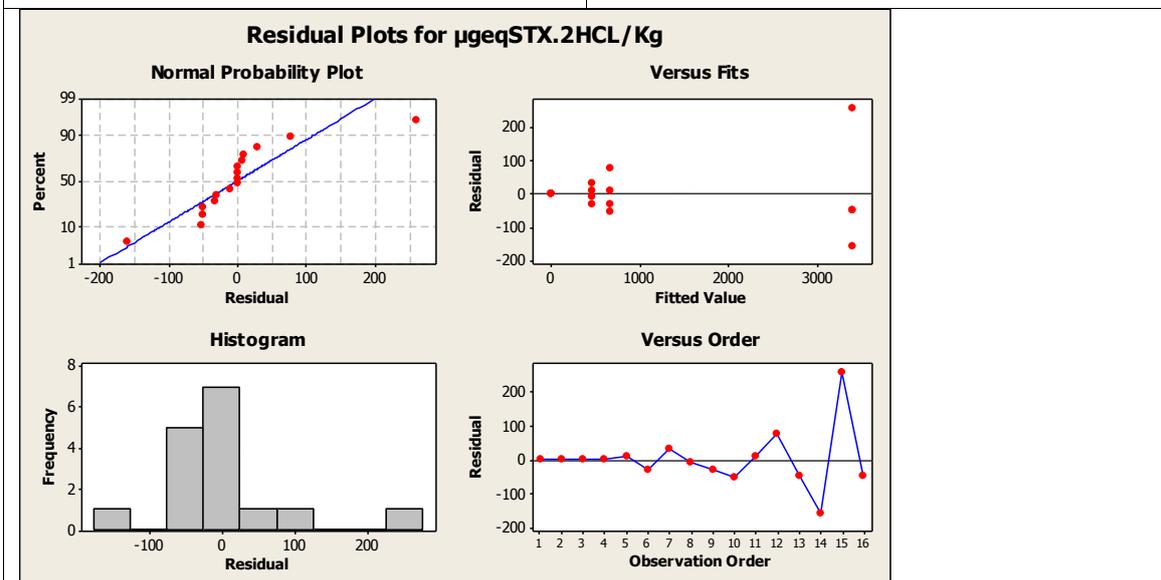
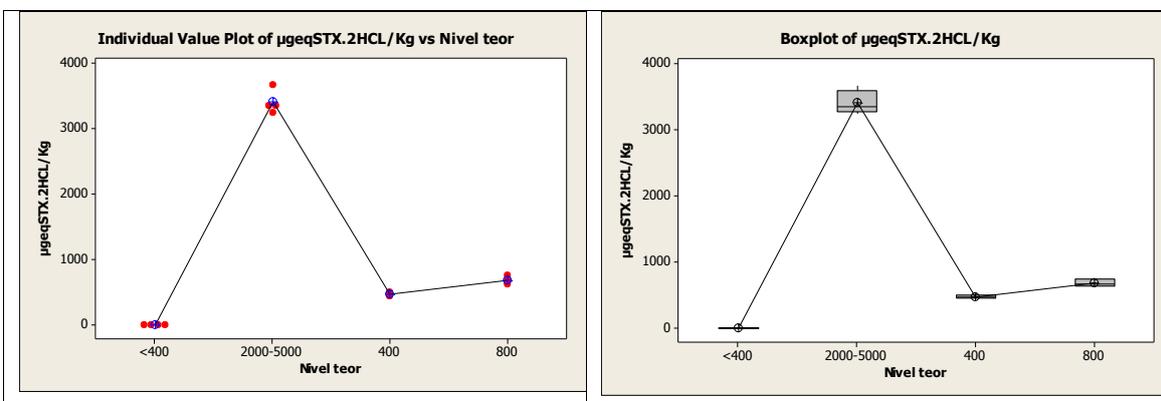


Fig.A10 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel teor**

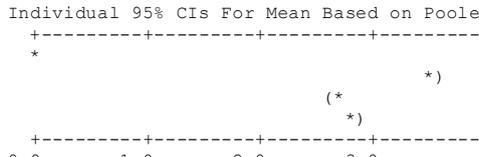
Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	28.86119	9.62040	16016.92	0.000

Error 12 0.00721 0.00060  
Total 15 28.86840

S = 0.02451 R-Sq = 99.98% R-Sq(adj) = 99.97%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
<400	4	0.0000	0.0000
2000-5000	4	3.5312	0.0227
400	4	2.6725	0.0238
800	4	2.8272	0.0363



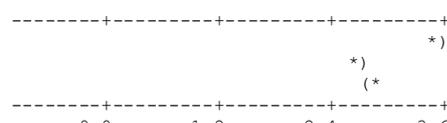
Pooled StDev = 0.0245

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 98.83%

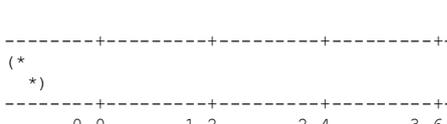
Nivel teor = <400 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
2000-5000	3.4797	3.5312	3.5826
400	2.6211	2.6725	2.7240
800	2.7757	2.8272	2.8787



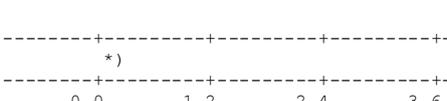
Nivel teor = 2000-5000 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
400	-0.9101	-0.8586	-0.8072
800	-0.7554	-0.7040	-0.6525



Nivel teor = 400 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
800	0.1032	0.1547	0.2061



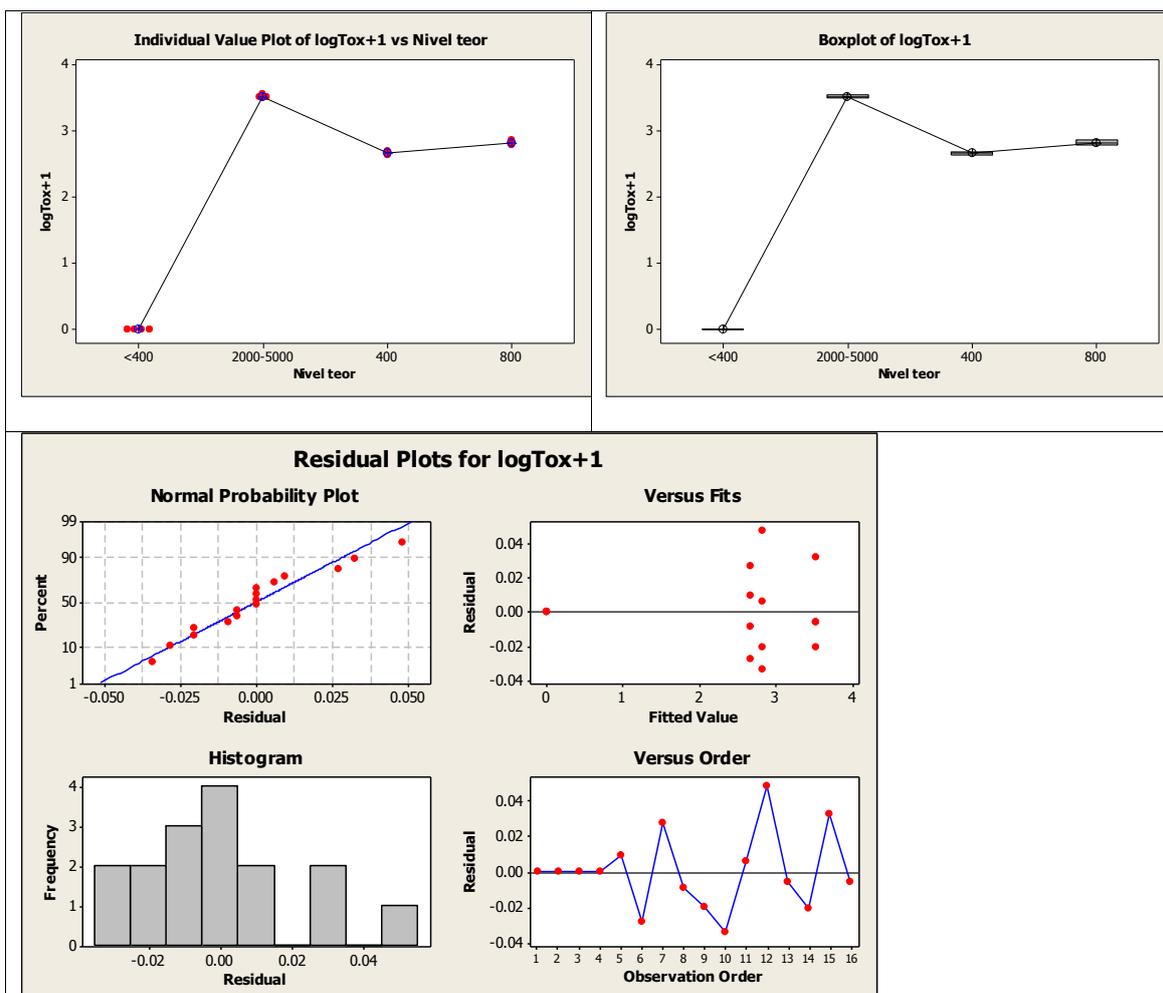
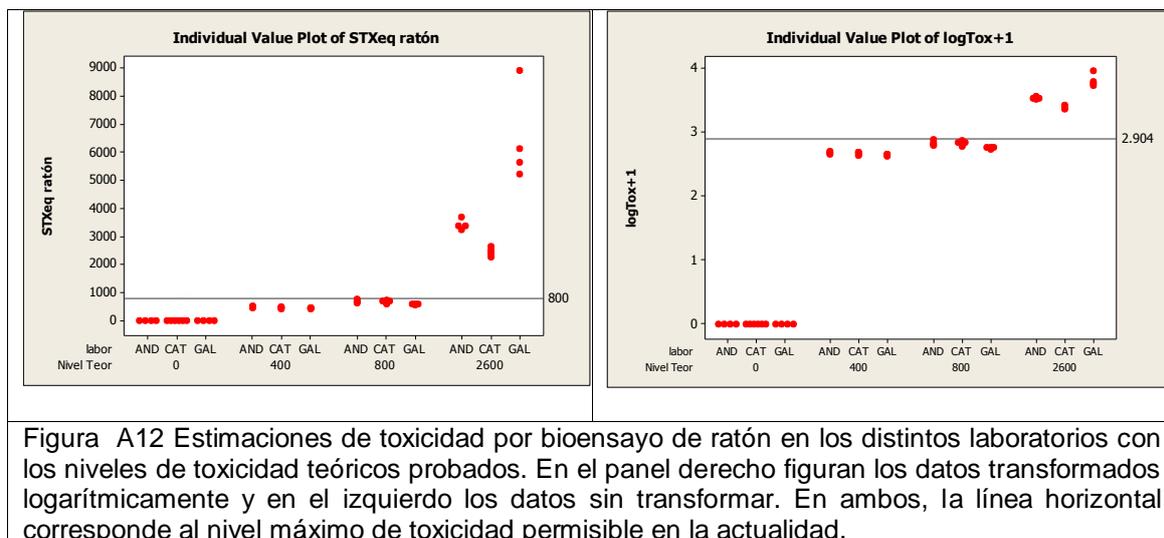


Fig.A11 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

Ninguna de las variables accesorias (tiempo conservación, pH extracto antes de ajustar, pH ajustado, tiempo entre extracción y análisis) tuvo un efecto significativo en las estimaciones de toxicidad por esta técnica, por lo que a ese respecto puede considerarse robusta.

## Comparación entre laboratorios. Bioensayos mejillón con perfil de Alexandrium



Un ANOVA de dos vías muestra diferencias significativas con el nivel teórico, entre laboratorios e interacción entre niveles y laboratorios.

En general, los intervalos de confianza del 95% estimados para estos bioensayos son más estrechos que los encontrados para los mejillones que contenían toxinas de *Gymnodinium catenatum*, de forma que, en el caso más adverso, va de aproximadamente 700 a 800, reduciéndose, por tanto considerablemente las posibles muestras que pueden oscilar fácilmente entre resultados positivos y negativos.

### General Linear Model: STXeq ratón versus Nivel Teor, labor

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	4	0, 400, 800, 2600
labor	fixed	3	AND, CAT, GAL

Analysis of Variance for STXeq ratón, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel Teor	3	130814728	143768488	47922829	244.45	0.000
labor	2	9564521	9285939	4642969	23.68	0.000
Nivel Teor*labor	6	30578911	30578911	5096485	26.00	0.000
Error	43	8429752	8429752	196041		
Total	54	179387912				

S = 442.765 R-Sq = 95.30% R-Sq(adj) = 94.10%

Unusual Observations for STXeq ratón

Obs	STXeq ratón	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
14	5220.00	6461.00	221.38	-1241.00	-3.24 R
15	5634.00	6461.00	221.38	-827.00	-2.16 R
16	8884.00	6461.00	221.38	2423.00	6.32 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for STXeq ratón

Nivel	Mean	SE Mean
Teor		
0	-0.00	120.51
400	452.97	123.48
800	632.17	120.51
2600	4098.28	120.51
labor		
AND	1135.62	110.69
CAT	886.56	92.61
GAL	1865.37	110.69

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals  
Response Variable STXeq ratón  
All Pairwise Comparisons among Levels of labor  
labor = AND subtracted from:

labor	Lower	Center	Upper
CAT	-599.1	-249.1	101.0
GAL	350.1	729.7	1109.4

-600                      0                      600                      1200

labor = CAT subtracted from:

labor	Lower	Center	Upper
GAL	628.8	978.8	1329

-600                      0                      600                      1200

Tukey Simultaneous Tests  
Response Variable STXeq ratón  
All Pairwise Comparisons among Levels of labor  
labor = AND subtracted from:

labor	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
CAT	-249.1	144.3	-1.726	0.2074
GAL	729.7	156.5	4.662	0.0001

labor = CAT subtracted from:

labor	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
GAL	978.8	144.3	6.782	0.0000

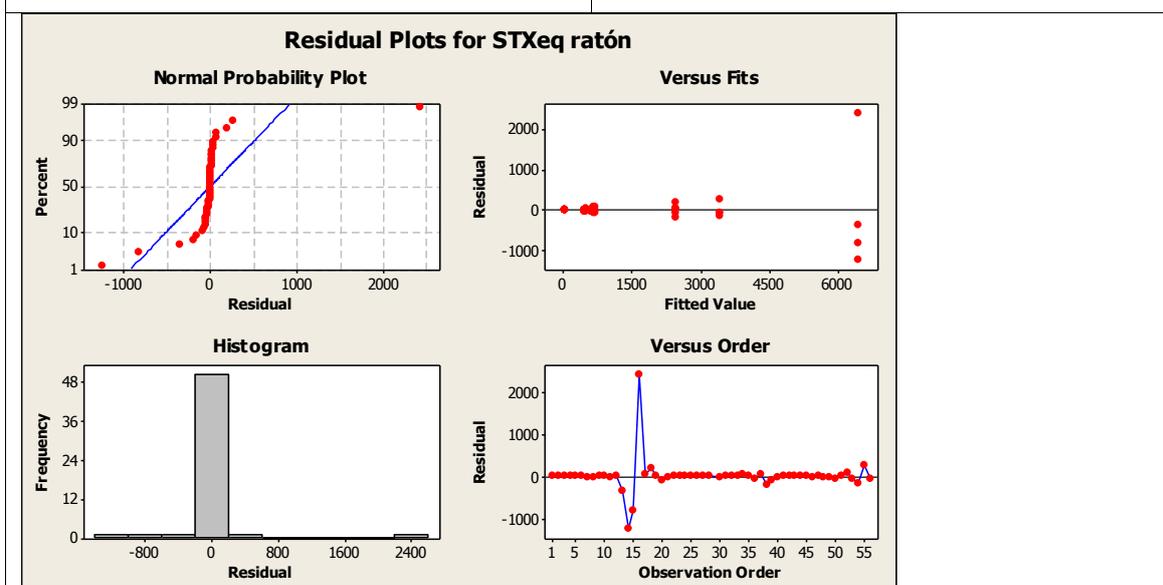
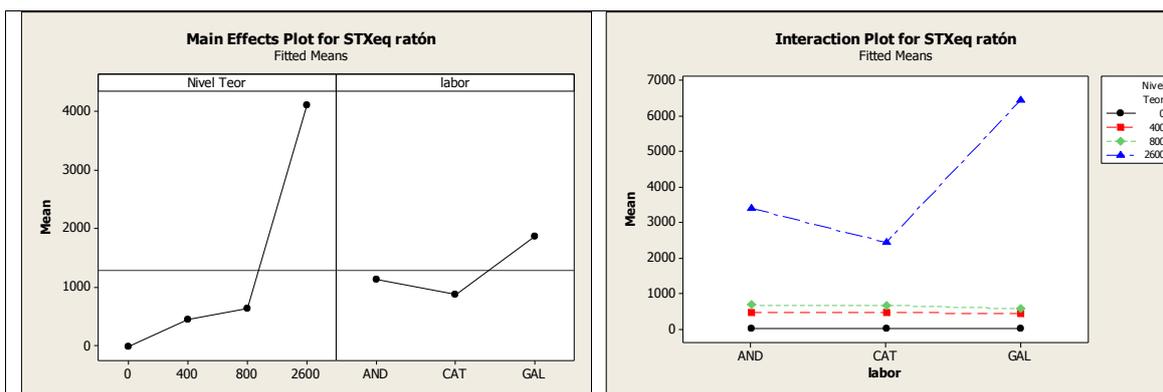


Fig A13 Efectos principales (panel superior izdo) e interacciones (panel superior derecho) del nivel teórico de toxinas de las muestras evaluadas y del laboratorio que realizó los ensayos obtenidos mediante ANOVA de dos vías con los datos sin transformar. Se observa como aspecto más llamativo, la notable diferencia entre laboratorios en las muestras teóricamente más tóxicas.

### General Linear Model: logTox+1 versus Nivel Teor, labor

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	4	0, 400, 800, 2600
labor	fixed	3	AND, CAT, GAL

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel Teor	3	100.8026	98.1579	32.7193	27793.65	0.000
labor	2	0.0688	0.0660	0.0330	28.02	0.000
Nivel Teor*labor	6	0.3621	0.3621	0.0603	51.26	0.000
Error	43	0.0506	0.0506	0.0012		
Total	54	101.2841				

S = 0.0343107 R-Sq = 99.95% R-Sq(adj) = 99.94%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
14	3.71775	3.80078	0.01716	-0.08303	-2.79 R
16	3.94866	3.80078	0.01716	0.14787	4.98 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for logTox+1

Nivel	Teor	Mean	SE Mean
	0	-0.00000	0.009338
	400	2.65646	0.009569
	800	2.79933	0.009338
	2600	3.57264	0.009338
labor	AND	2.25772	0.008578
	CAT	2.21518	0.007177
	GAL	2.29842	0.008578

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals  
Response Variable logTox+1  
All Pairwise Comparisons among Levels of labor  
labor = AND subtracted from:

labor	Lower	Center	Upper	
CAT	-0.06966	-0.04253	-0.01541	(-----*-----)
GAL	0.01128	0.04070	0.07012	(-----*-----)

-0.050      0.000      0.050      0.100

labor = CAT subtracted from:

labor	Lower	Center	Upper	
GAL	0.05611	0.08323	0.1104	(-----*-----)

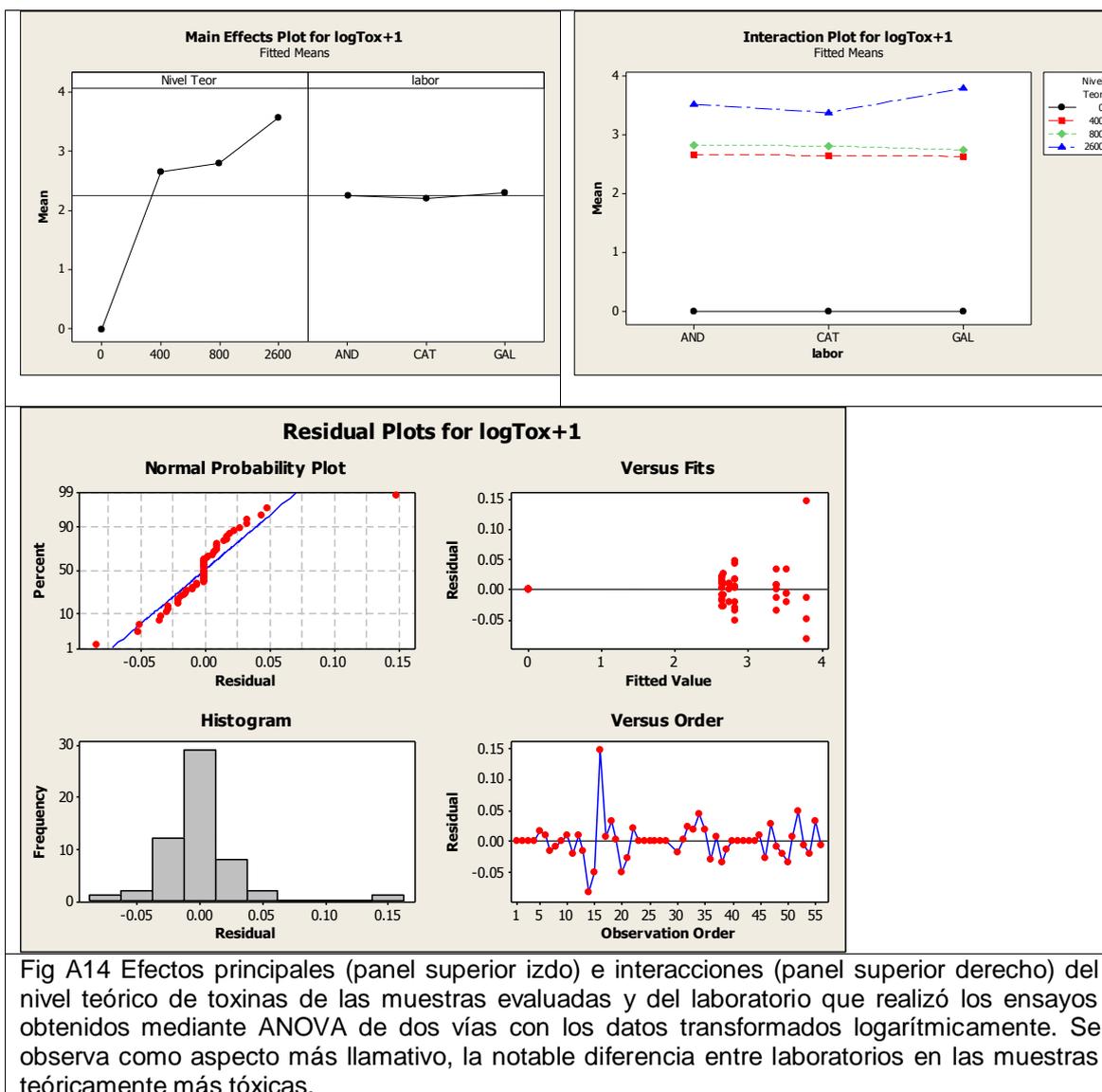
-0.050      0.000      0.050      0.100

Tukey Simultaneous Tests  
Response Variable logTox+1  
All Pairwise Comparisons among Levels of labor  
labor = AND subtracted from:

labor	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
CAT	-0.04253	0.01118	-3.803	0.0013
GAL	0.04070	0.01213	3.355	0.0047

labor = CAT subtracted from:

labor	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
GAL	0.08323	0.01118	7.442	0.0000



### Cálculo de valores medios de bioensayos de mejillón con perfil de Alexandrium

Los promedios de toxicidad estimados por los bioensayos son los siguientes:

Least Squares Means for STXeq ratón

Nivel Teor	Mean	SE Mean
0	-0.00	120.51
400	452.97	123.48
800	632.17	120.51
2600	4098.28	120.51

Sin embargo, en los niveles altos, las diferencias son demasiado grandes como para que el valor medio sea asumido como sólido y, por tanto, no puede utilizarse como referencia.

labor  
 AND 1135.62 110.69  
 CAT 886.56 92.61  
 GAL 1865.37 110.69

## Corruco con perfil de *Gymnodinium catenatum*

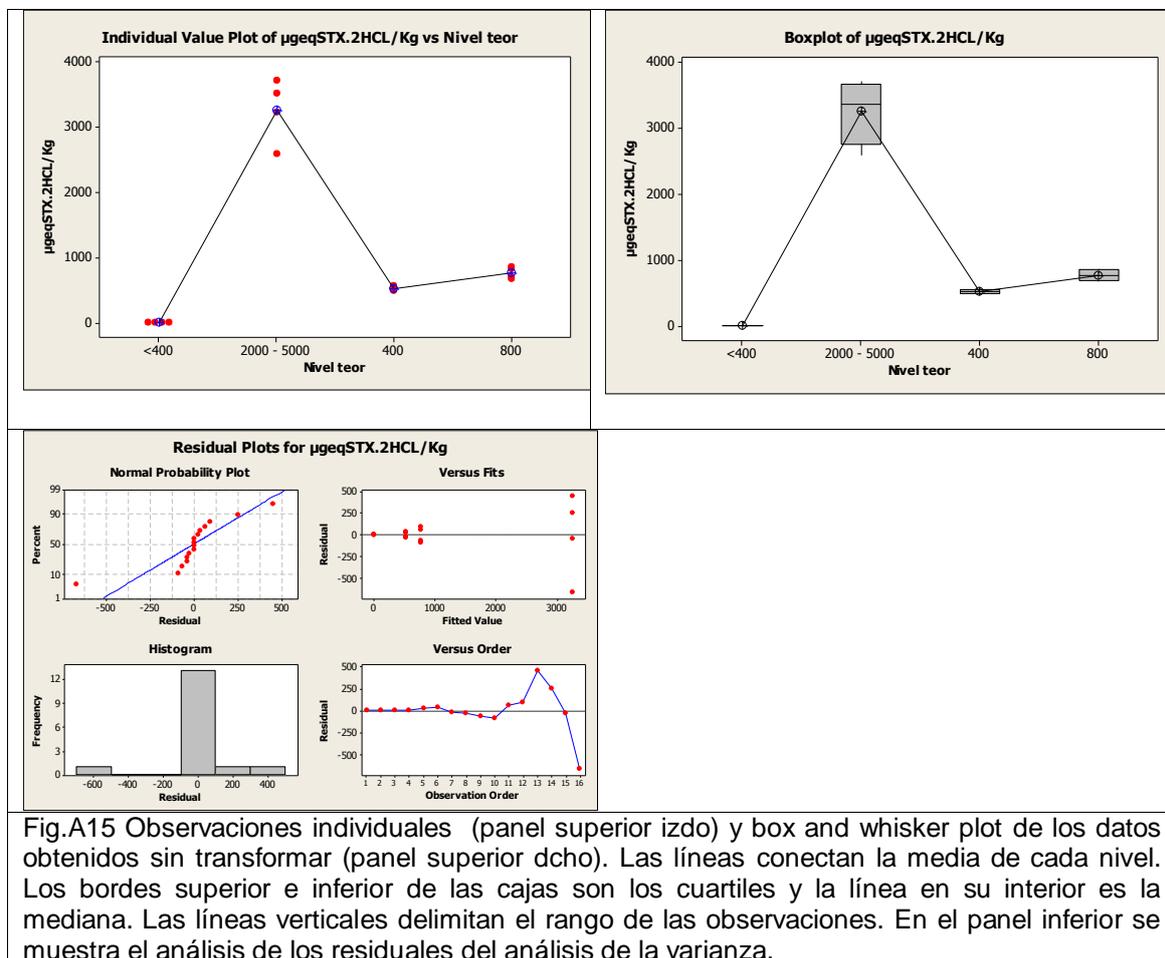


Fig.A15 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

### One-way ANOVA: µgeqSTX.2HCL/Kg versus Nivel teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	25201450	8400483	135.52	0.000
Error	12	743850	61988		
Total	15	25945300			

S = 249.0 R-Sq = 97.13% R-Sq(adj) = 96.42%

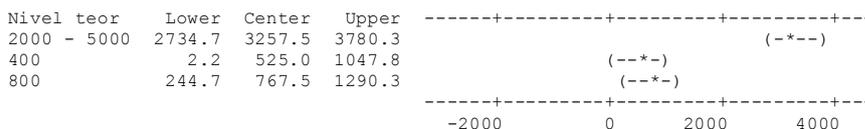
Level	N	Mean	StDev
<400	4	0.0	0.0
2000 - 5000	4	3257.5	488.4
400	4	525.0	35.1
800	4	767.5	90.7

Pooled StDev = 249.0

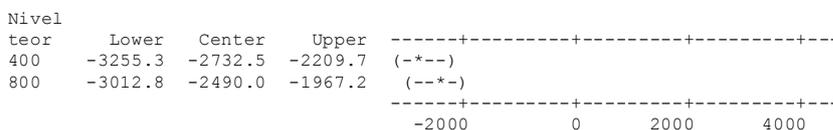
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 98.83%

Nivel teor = <400 subtracted from:



Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:



Nivel teor = 400 subtracted from:

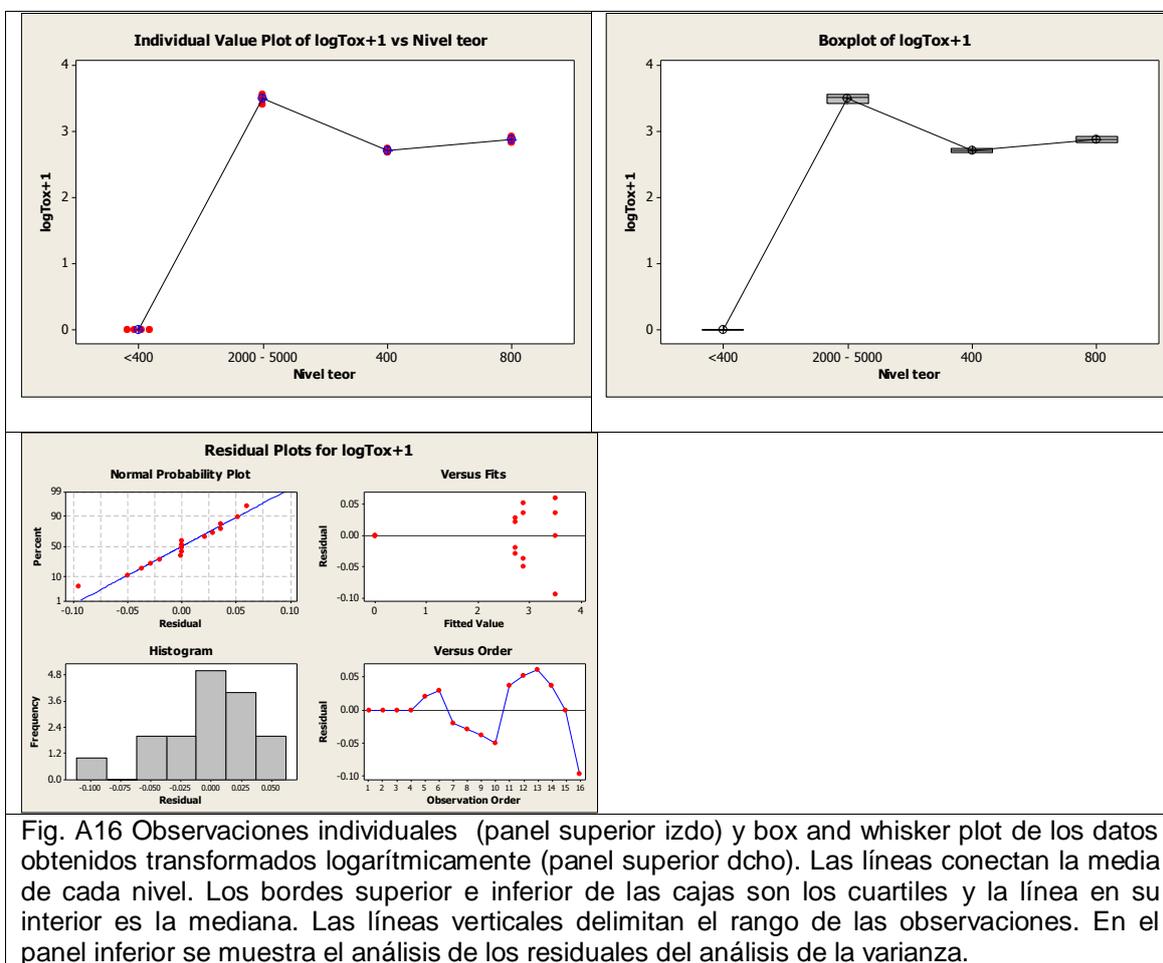
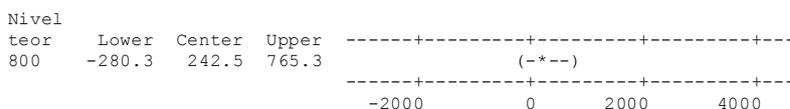


Fig. A16 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

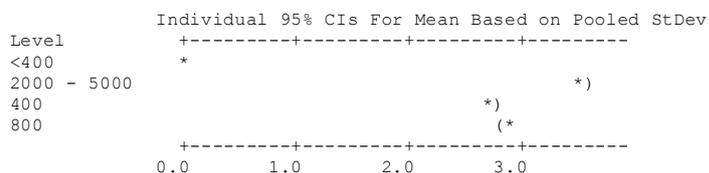
### One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	29.06776	9.68925	4733.92	0.000

Error 12 0.02456 0.00205  
 Total 15 29.09232

S = 0.04524 R-Sq = 99.92% R-Sq(adj) = 99.89%

Level	N	Mean	StDev
<400	4	0.0000	0.0000
2000 - 5000	4	3.5091	0.0686
400	4	2.7203	0.0290
800	4	2.8834	0.0514

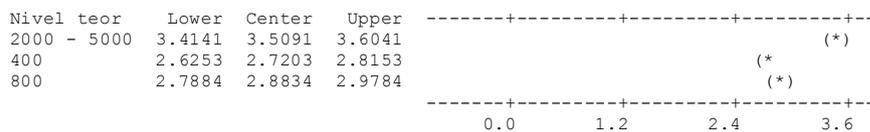


Pooled StDev = 0.0452

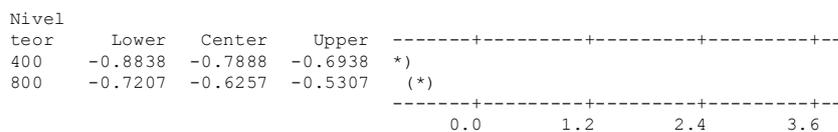
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
 All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 98.83%

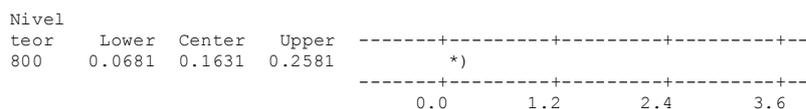
Nivel teor = <400 subtracted from:



Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:

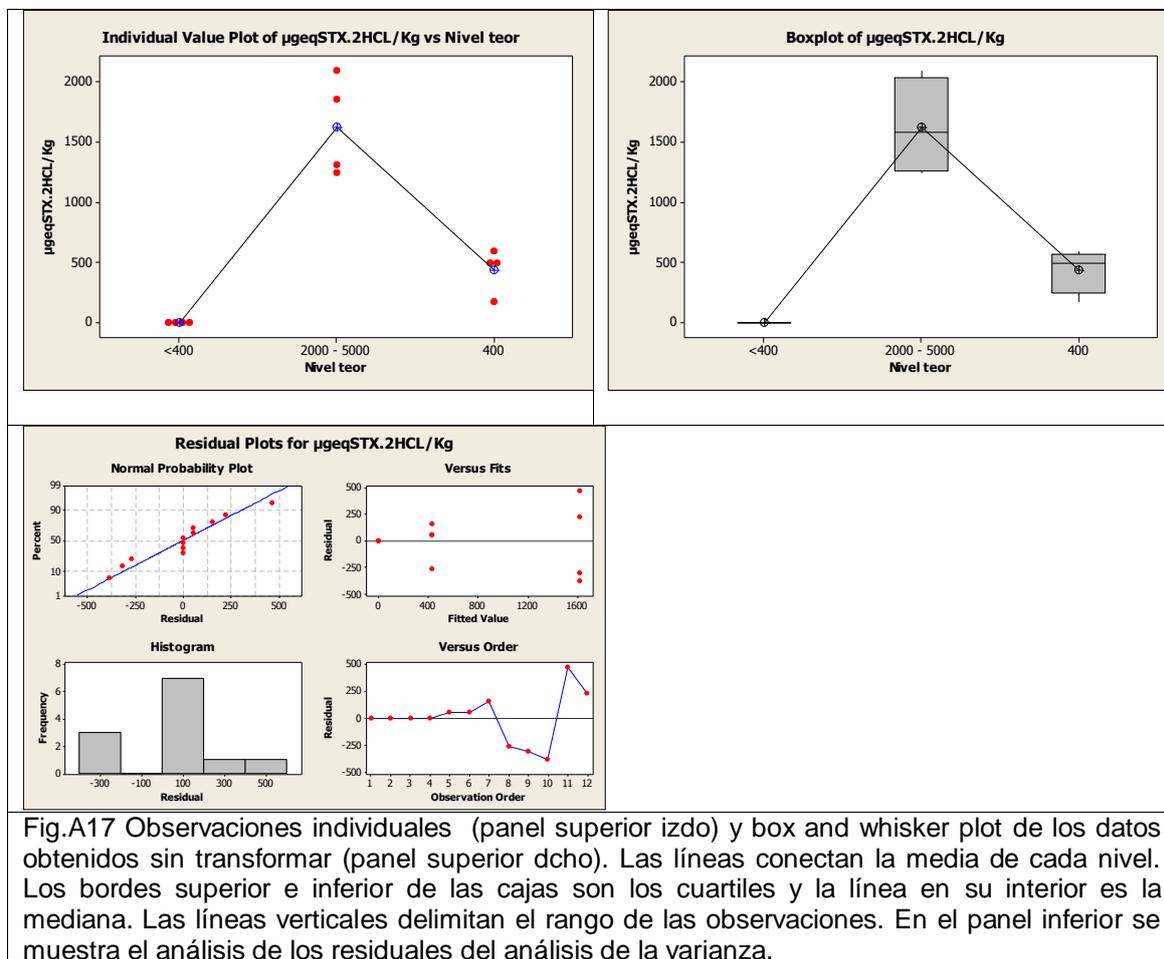


Nivel teor = 400 subtracted from:



## Chirla con perfil de *Gymnodinium catenatum*

### One-way ANOVA: $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$ versus Nivel teor



Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	2	5643521	2821760	41.25	0.000
Error	9	615638	68404		
Total	11	6259159			

S = 261.5 R-Sq = 90.16% R-Sq(adj) = 87.98%

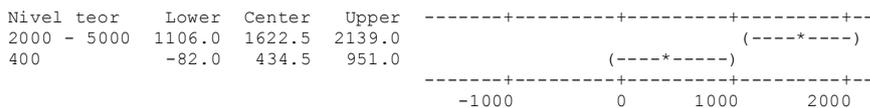
Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
<400	4	0.0	0.0	(-----*-----)
2000 - 5000	4	1622.5	414.0	(-----*-----)
400	4	434.5	183.8	(-----*-----)

Pooled StDev = 261.5

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 97.91%

Nivel teor = <400 subtracted from:



Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:

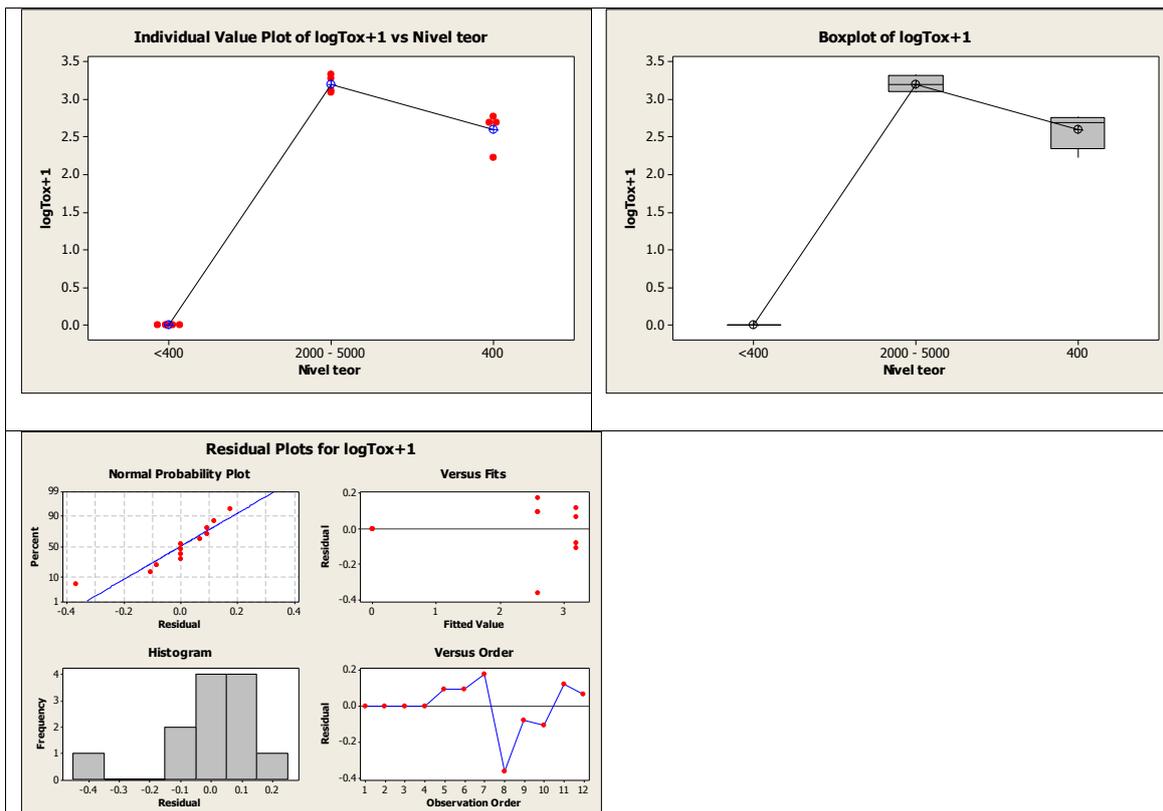
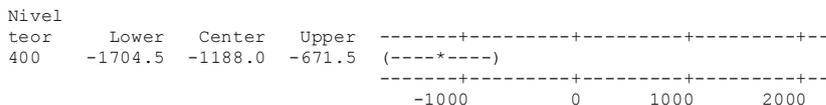
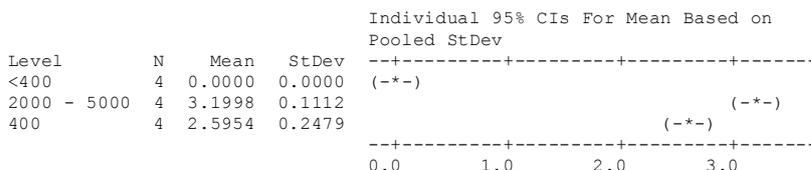


Fig. A18 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	2	23.1200	11.5600	469.66	0.000
Error	9	0.2215	0.0246		
Total	11	23.3416			

S = 0.1569 R-Sq = 99.05% R-Sq(adj) = 98.84%



Pooled StDev = 0.1569

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 97.91%

Nivel teor = <400 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
2000 - 5000	2.8899	3.1998	3.5096
400	2.2856	2.5954	2.9053

(---\*---)  
(---\*---)

Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
400	-0.9142	-0.6044	-0.2945

(---\*---)

## Almeja con perfil de *Gymnodinium catenatum*

En el único nivel estudiado para esta especie, la dispersión de las observaciones fue moderada.

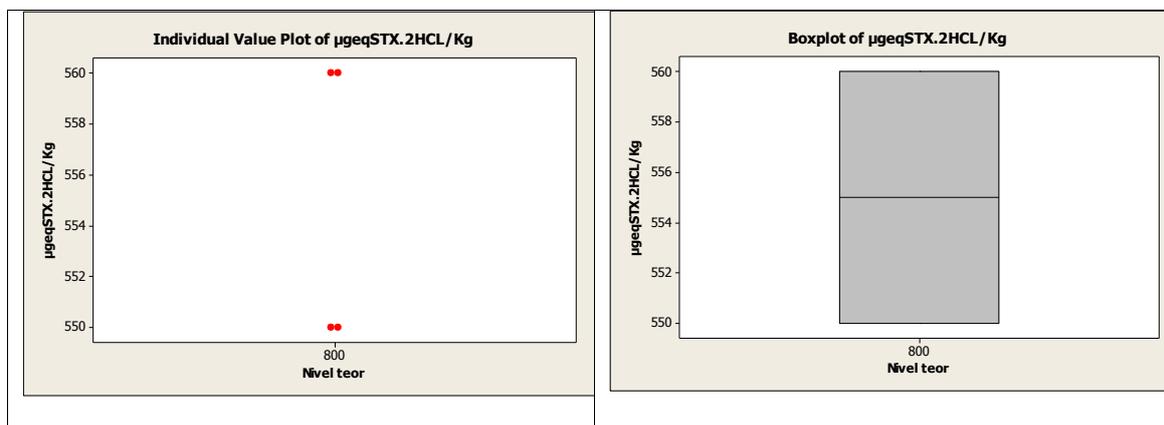


Fig.A19 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

### One-Sample T: µgeqSTX.2HCL/Kg

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% CI
µgeqSTX.2HCL/Kg	4	555.00	5.77	2.89	(545.81, 564.19)

## PSP precolumna

### Mejillón con toxinas de *Gymnodinium catenatum*

#### Cataluña

Ni el tiempo de conservación ni el reactivo de extracción (ácido acético o ácido clorhídrico) ni el pH de extracción, ni el pH ajustado tienen un efecto significativo en los valores de toxicidad estimados por esta técnica.

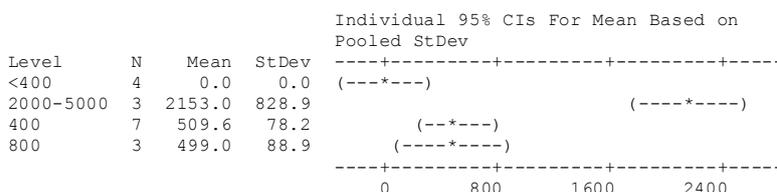
No se encuentran prácticamente diferencias entre los niveles de 400 y de 800, pero estos sí se distinguen de los blancos. Esto sucede tanto cuando se utilizan para el análisis los datos originales como cuando se usan los datos transformados logarítmicamente y sucede fundamentalmente porque las medias de toxicidad estimadas para los dos niveles son muy próximas entre ellas y no porque la dispersión sea elevada.

#### Results for: PrecolCatenIrtSinC43

#### One-way ANOVA: µgeqSTX.2HCL/Kg Oshima versus Nivel Teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	8660311	2886770	26.31	0.000
Error	13	1426572	109736		
Total	16	10086882			

S = 331.3 R-Sq = 85.86% R-Sq(adj) = 82.59%

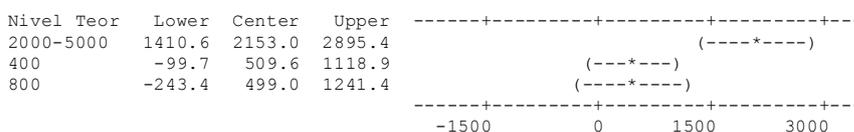


Pooled StDev = 331.3

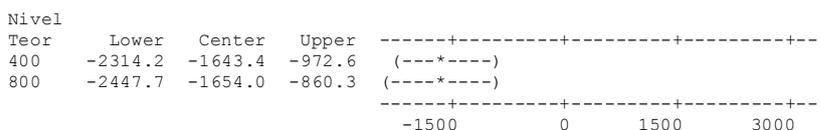
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.84%

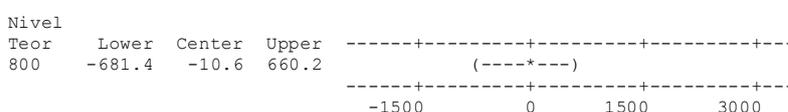
Nivel Teor = <400 subtracted from:

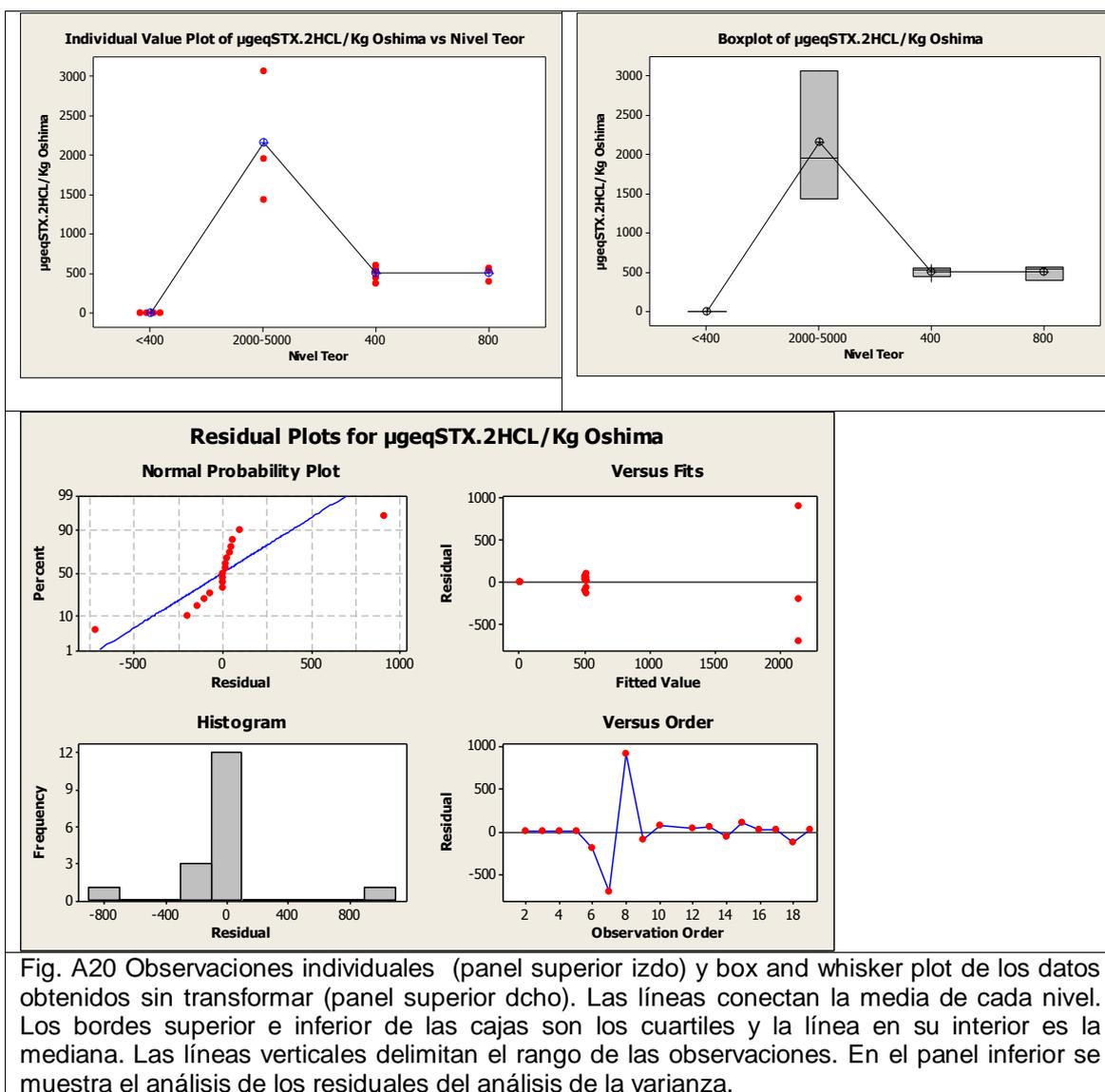


Nivel Teor = 2000-5000 subtracted from:



Nivel Teor = 400 subtracted from:





**One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel Teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	25.56362	8.52121	1127.62	0.000
Error	13	0.09824	0.00756		
Total	16	25.66186			

S = 0.08693 R-Sq = 99.62% R-Sq(adj) = 99.53%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
<400	4	0.0000	0.0000
2000-5000	3	3.3122	0.1648
400	7	2.7033	0.0713
800	3	2.6940	0.0819

0.0 1.0 2.0 3.0

Pooled StDev = 0.0869

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.84%

Nivel Teor = <400 subtracted from:

Nivel Teor	Lower	Center	Upper	
2000-5000	3.1173	3.3122	3.5070	(-*)
400	2.5434	2.7033	2.8632	(-*)
800	2.4992	2.6940	2.8888	(* -)

Nivel Teor = 2000-5000 subtracted from:

Nivel Teor	Lower	Center	Upper	
400	-0.7849	-0.6089	-0.4329	(-*)
800	-0.8265	-0.6182	-0.4099	(-*-)

Nivel Teor = 400 subtracted from:

Nivel Teor	Lower	Center	Upper	
800	-0.1853	-0.0093	0.1668	(-*)

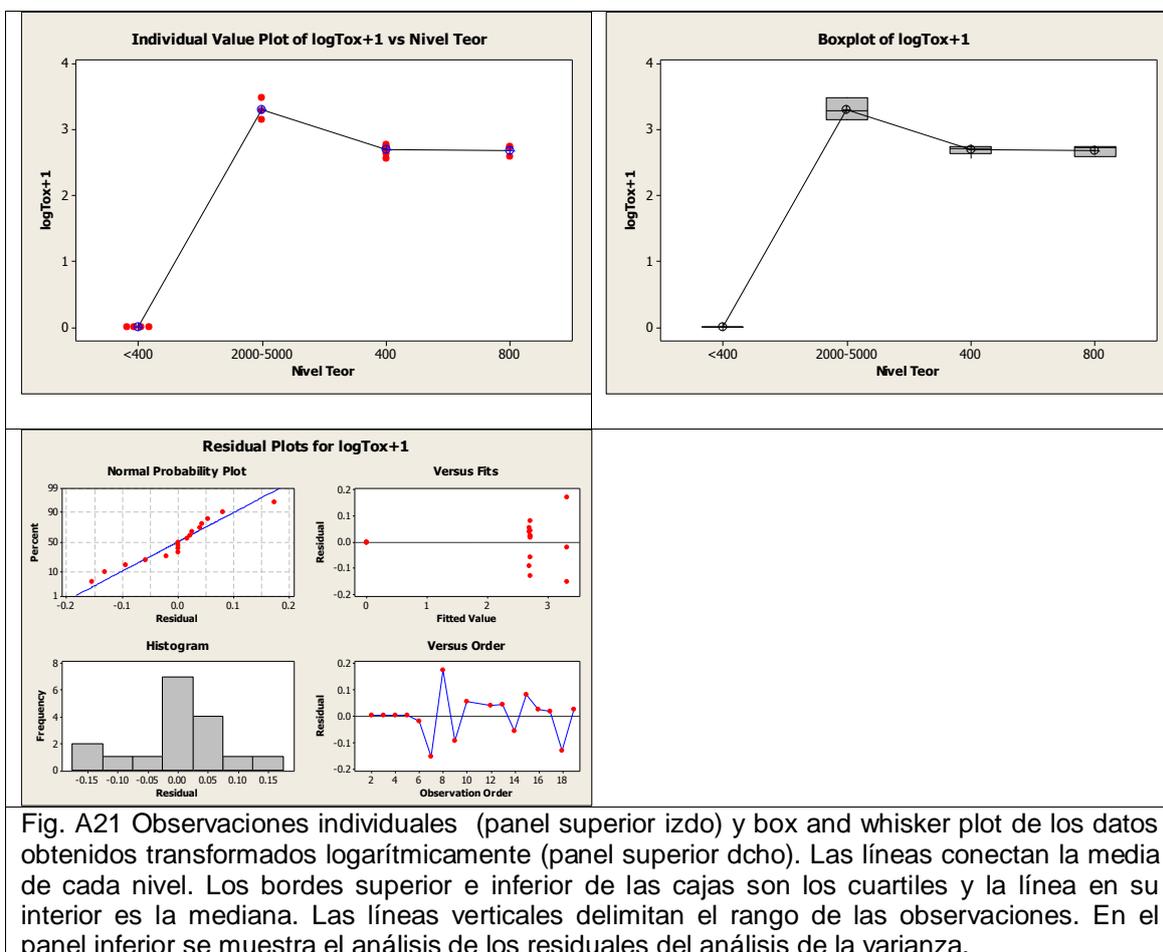


Fig. A21 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

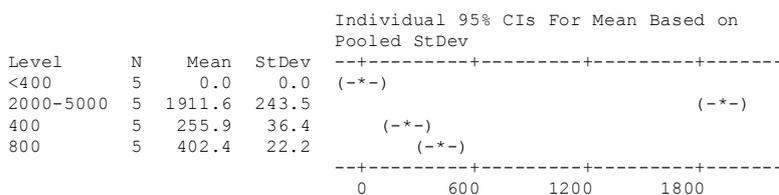
## Galicia

Los resultados son básicamente similares a los obtenidos en Cataluña. Hay dificultad para distinguir correctamente los niveles de 400 y 800, aunque las diferencias entre estos dos son, en este caso, significativas cuando se transforman los datos logarítmicamente.

### One-way ANOVA: ug/Kg MU/L oshima versus Nivel Teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	11153323	3717774	243.40	0.000
Error	16	244391	15274		
Total	19	11397714			

S = 123.6 R-Sq = 97.86% R-Sq(adj) = 97.45%

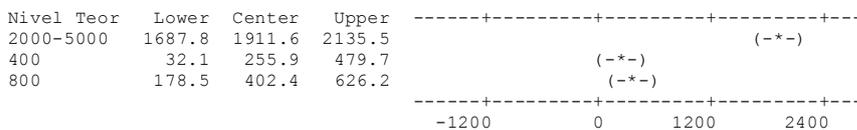


Pooled StDev = 123.6

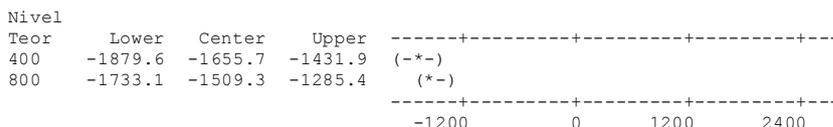
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.87%

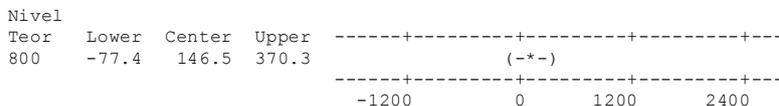
Nivel Teor = <400 subtracted from:

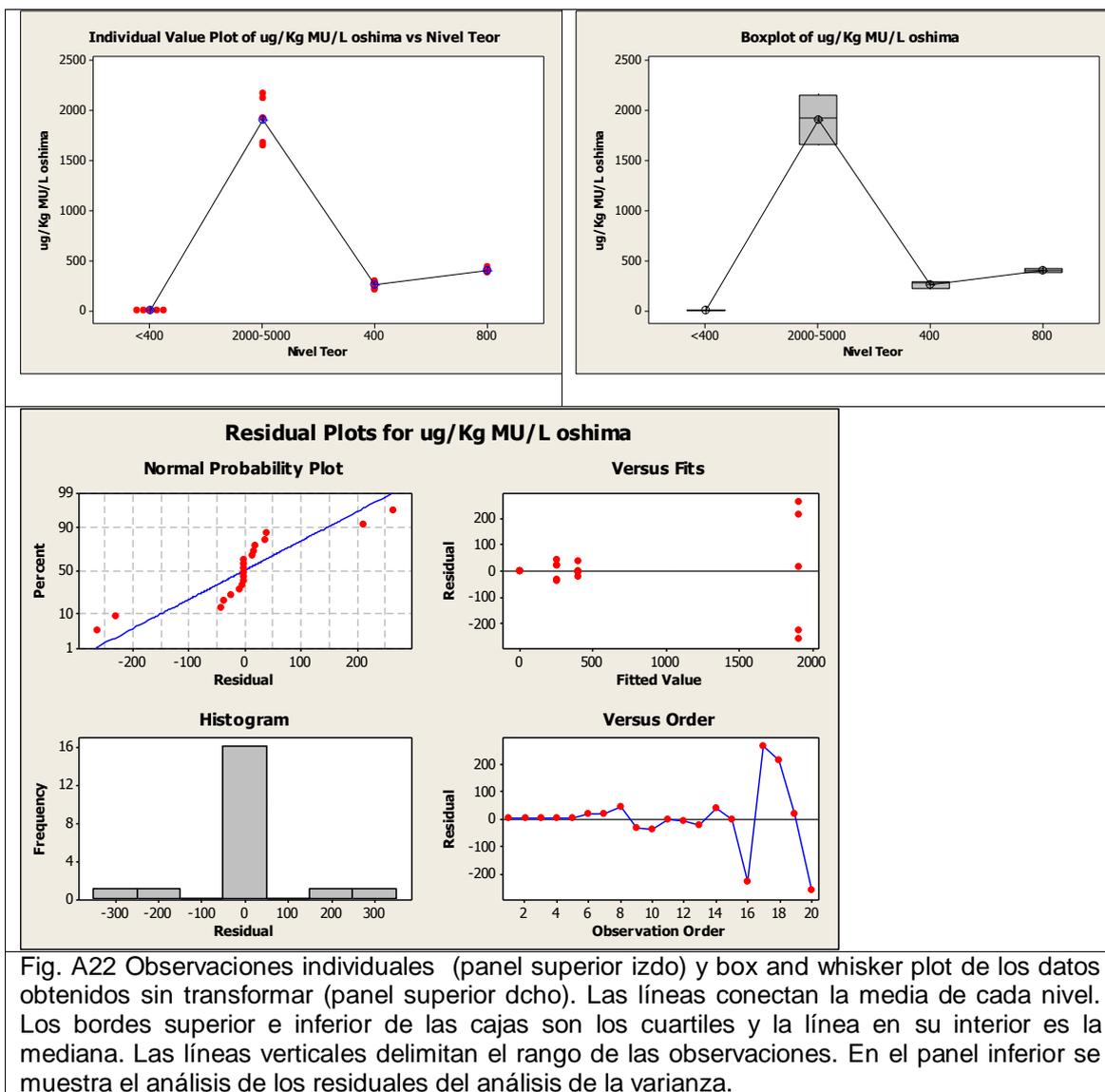


Nivel Teor = 2000-5000 subtracted from:



Nivel Teor = 400 subtracted from:





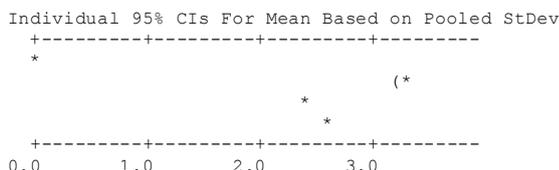
### One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel Teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	30.72735	10.24245	5384.40	0.000
Error	16	0.03044	0.00190		
Total	19	30.75779			

S = 0.04361 R-Sq = 99.90% R-Sq(adj) = 99.88%

Level	N	Mean	StDev
<400	5	0.0000	0.0000
2000-5000	5	3.2788	0.0557
400	5	2.4062	0.0629
800	5	2.6052	0.0234

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

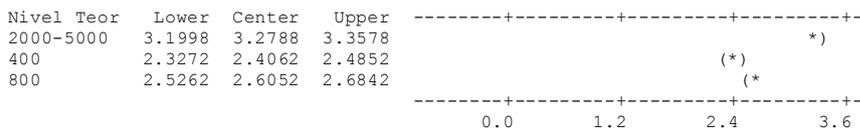


Pooled StDev = 0.0436

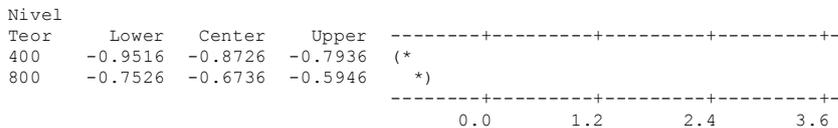
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.87%

Nivel Teor = <400 subtracted from:



Nivel Teor = 2000-5000 subtracted from:



Nivel Teor = 400 subtracted from:

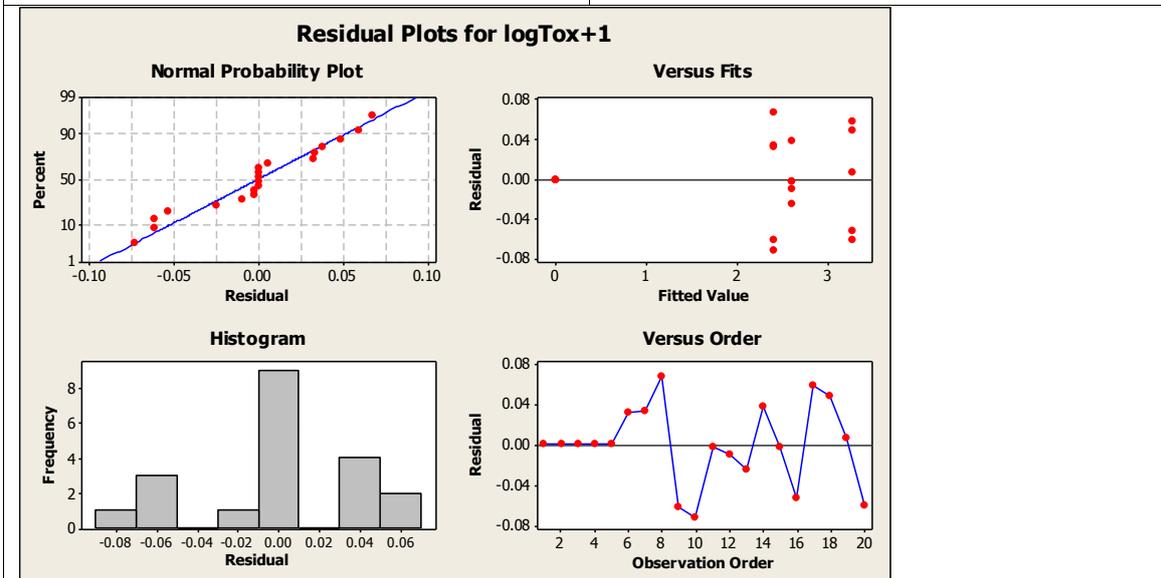
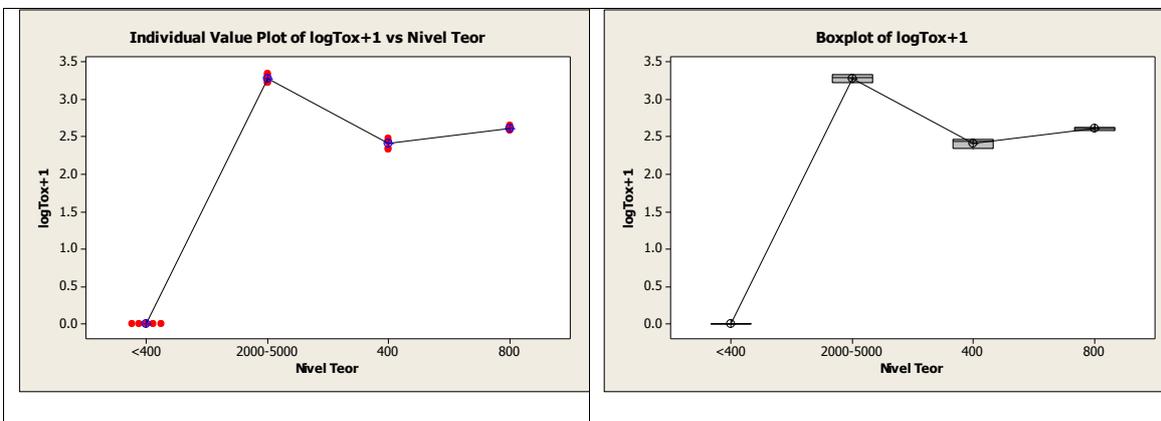
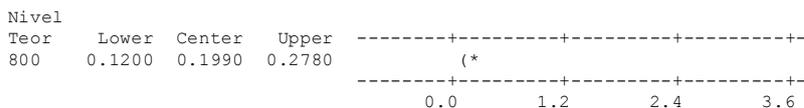


Fig.A23 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

Hay diferencias significativas en los resultados obtenidos con la misma técnica en los dos laboratorios. En general Galicia estimó valores más bajos de toxicidad en las muestras. En promedio aproximadamente un 20%, pero este hecho resultó más evidente en el nivel de 400 (como indica la significación de la interacción entre niveles y laboratorios, y como se aprecia en la recta de regresión).

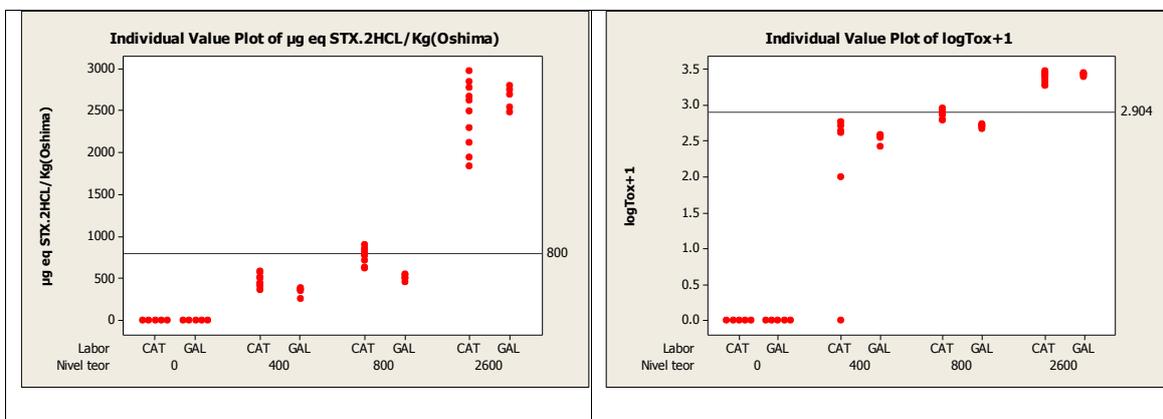


Fig. A24 Comparación entre los resultados obtenidos por Cataluña y Galicia, utilizando los datos sin transformar (panel izquierdo) y transformados (panel derecho). En ambos paneles se indica con una línea horizontal el nivel de cierre.

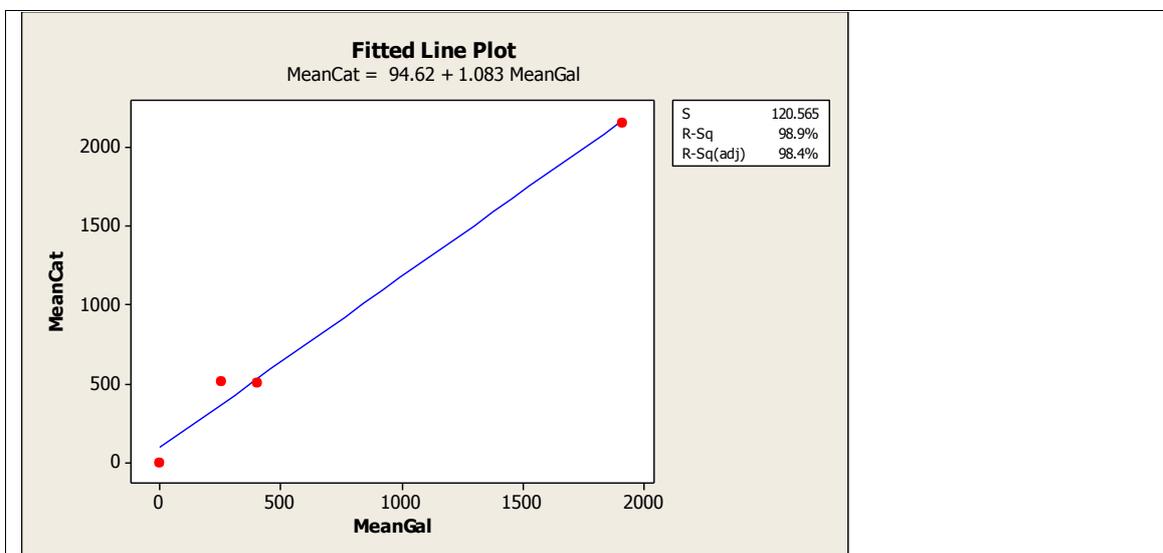


Fig. A25 Relación entre las mediciones de Cataluña y Galicia. La pendiente se aproxima a 1, pero existe una considerable discrepancia en la estimación de uno de los niveles intermedios.

**General Linear Model: µgeqSTX.2HCL/Kg Oshima versus Nivel Teor, Labor**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	4	<400, 2000-5000, 400, 800
Labor	fixed	2	CAT, GAL

Analysis of Variance for µgeqSTX.2HCL/Kg Oshima, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
--------	----	--------	--------	--------	---	---

Nivel Teor	3	19510696	19217983	6405994	111.18	0.000
Labor	1	212267	188257	188257	3.27	0.081
Nivel Teor*Labor	3	102152	102152	34051	0.59	0.626
Error	29	1670963	1670963	57619		
Total	36	21496078				

S = 240.040 R-Sq = 92.23% R-Sq(adj) = 90.35%  
 Unusual Observations for  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$  Oshima

Obs	Oshima	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
7	1439.00	2153.00	138.59	-714.00	-3.64 R
8	3062.00	2153.00	138.59	909.00	4.64 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$  Oshima

Nivel Teor	Mean	SE Mean
<400	0.00	80.51
2000-5000	2032.32	87.65
400	382.74	70.28
800	450.68	87.65
Labor		
CAT	790.39	61.77
GAL	642.48	53.67

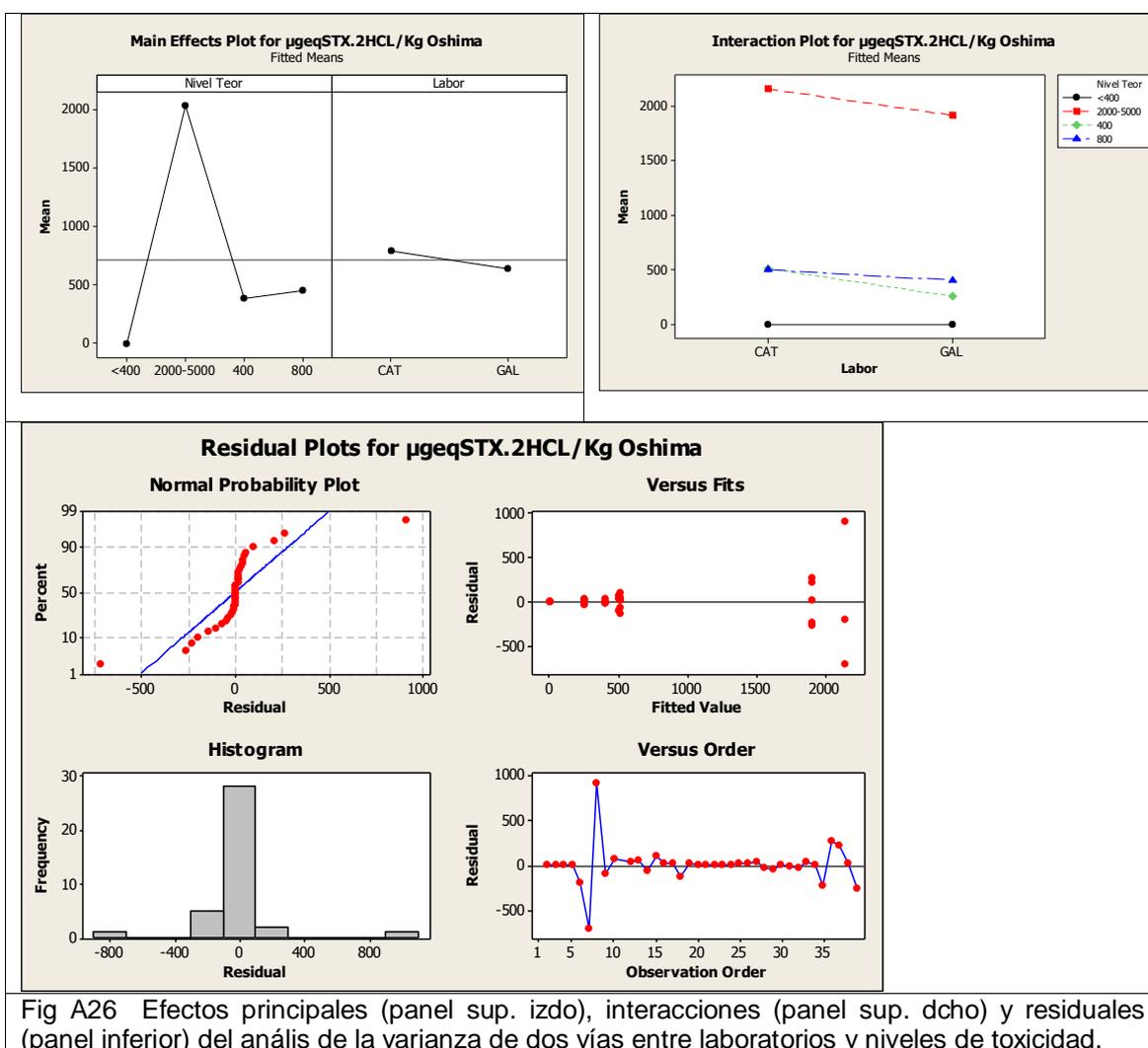


Fig A26 Efectos principales (panel sup. izdo), interacciones (panel sup. dcho) y residuales (panel inferior) del análisis de la varianza de dos vías entre laboratorios y niveles de toxicidad.

### General Linear Model: logTox+1 versus Nivel Teor, Labor

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	4	<400, 2000-5000, 400, 800
Labor	fixed	2	CAT, GAL

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel Teor	3	56.1094	54.5946	18.1982	4101.43	0.000
Labor	1	0.1351	0.0946	0.0946	21.31	0.000
Nivel Teor*Labor	3	0.1393	0.1393	0.0464	10.46	0.000
Error	29	0.1287	0.1287	0.0044		
Total	36	56.5125				

S = 0.0666111 R-Sq = 99.77% R-Sq(adj) = 99.72%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
7	3.15836	3.31218	0.03846	-0.15382	-2.83 R
8	3.48615	3.31218	0.03846	0.17397	3.20 R
18	2.57171	2.70327	0.02518	-0.13157	-2.13 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for logTox+1

Nivel Teor	Mean	SE Mean
<400	0.00000	0.02234
2000-5000	3.29548	0.02432
400	2.55472	0.01950
800	2.64960	0.02432
Labor		
CAT	2.17737	0.01714
GAL	2.07254	0.01489

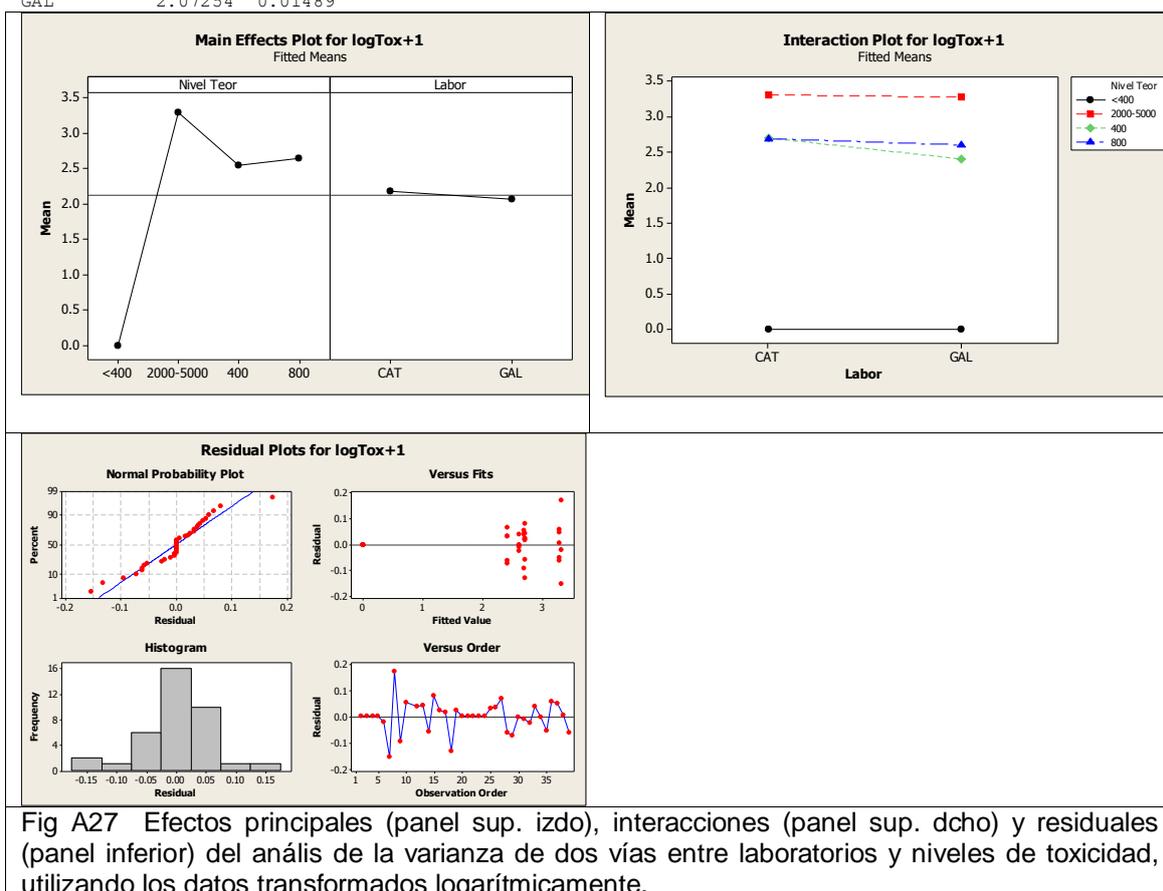


Fig A27 Efectos principales (panel sup. izdo), interacciones (panel sup. dcho) y residuales (panel inferior) del análisis de la varianza de dos vías entre laboratorios y niveles de toxicidad, utilizando los datos transformados logarítmicamente.

## Mejillón con toxinas de *Alexandrium minutum*

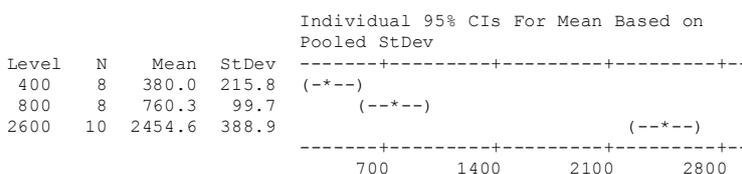
### Cataluña

Los valores estimados se aproximaron a los teóricos. No se encontraron efectos de ninguno de los dos pHs del extracto, ni antes ni después de la purificación por SPE C18, ni ninguna otra variable accesoria.

#### One-way ANOVA: $\mu\text{g eq STX.2HCL/Kg(Oshima)}$ versus Nivel teórico toxinas( $\mu\text{g eq STX}$ )

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teórico toxinas ( $\mu\text{g}$ )	2	22432182	11216091	146.85	0.000
Error	23	1756710	76379		
Total	25	24188892			

S = 276.4 R-Sq = 92.74% R-Sq(adj) = 92.11%



Pooled StDev = 276.4

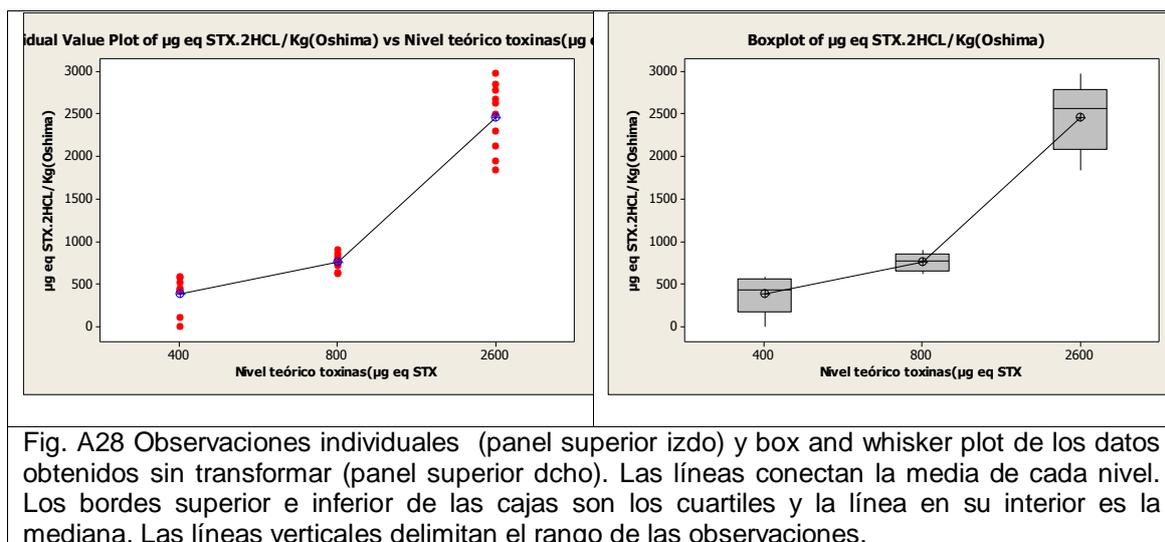


Fig. A28 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

#### General Linear Model: $\mu\text{g eq STX.2HCL/K}$ versus Nivel teórico to

Factor Type Levels Values  
Nivel teórico toxinas ( $\mu\text{g eq STX}$ ) fixed 3 400, 800, 2600  
Analysis of Variance for  $\mu\text{g eq STX.2HCL/Kg(Oshima)}$ , using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pH ajustado	1	240701	8190	8190	0.10	0.757
pH extracto (antes de ajustar)	1	854825	50389	50389	0.61	0.445
Nivel teórico toxinas ( $\mu\text{g eq STX}$ )	2	19611522	19611522	9805761	118.05	0.000
Error	20	1661290	1661290	83064		
Total	24	22368338				

S = 288.209 R-Sq = 92.57% R-Sq(adj) = 91.09%

## Galicia

Las estimaciones obtenidas son próximas a los niveles teóricos. En este caso no se dispone de medidas de pH de los extractos por lo que no se puede evaluar su efecto. Es posible diferenciar correctamente todos los niveles dado que existen diferencias notables en las medias estimadas de cada uno de ellos y además las dispersiones no son elevadas.

### One-way ANOVA: ug/Kg (MU/L oshima???) versus Nivel Teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	21596926	7198975	1307.31	0.000
Error	16	88108	5507		
Total	19	21685033			

S = 74.21 R-Sq = 99.59% R-Sq(adj) = 99.52%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
0	5	0.0	0.0	(*)
400	5	347.2	50.0	(*)
800	5	507.2	33.8	(*)
2000-5000	5	2647.0	135.6	(*)

Pooled StDev = 74.2

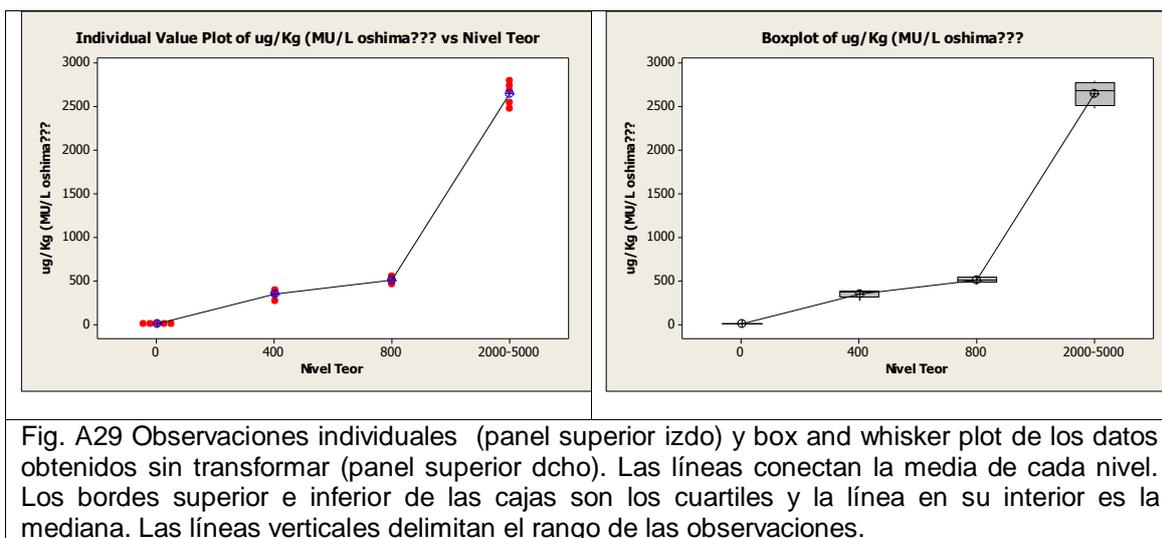


Fig. A29 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

## Comparación entre laboratorios con mejillón con perfil de Alexandrium

Los dos laboratorios dieron resultados similares aunque significativamente diferentes, como se puede observar de los ANOVAs de datos transformados (más preciso) y sin transformar. Aunque la media de las observaciones fue de 922 y 875, para Cataluña y Galicia, respectivamente, se aprecia interacción entre laboratorio y nivel tóxico teórico, de forma que en niveles intermedios los resultados obtenidos por Cataluña son superiores a los obtenidos por Galicia, pero en el nivel más alto sucede lo contrario.

Puede observarse que por esta razón, algunas de las muestras analizadas serían consideradas tóxicas por el laboratorio de Cataluña pero no por el de Galicia, por lo cual en caso de utilizarse esta técnica sería necesario realizar frecuentes intercalibraciones.

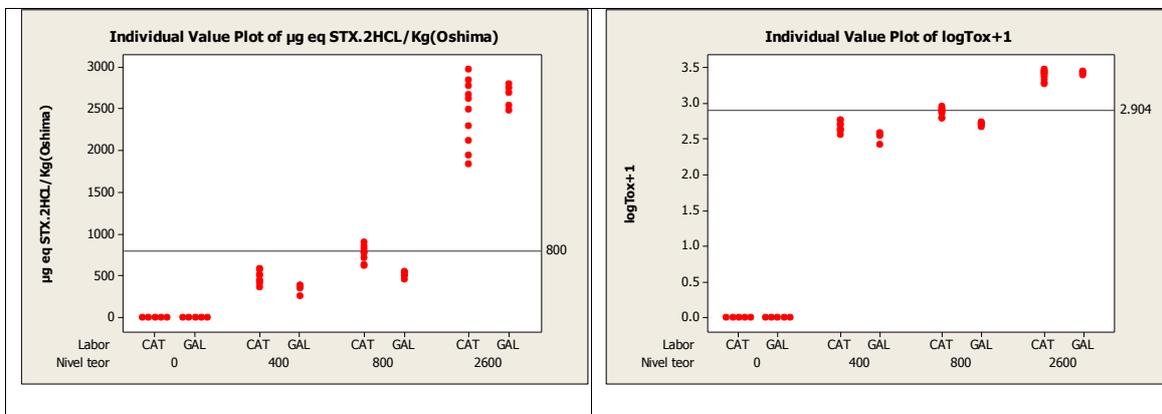


Fig A30 Comparación entre las estimaciones obtenidas por dos laboratorios para las muestras de los distintos niveles de toxicidad estudiados. En el panel izquierdo se representan los datos sin transformar y en el derecho los datos transformados logarítmicamente. En ambos casos se muestra el nivel de cierre con una línea horizontal.

#### General Linear Model: µg eq STX.2HCL/Kg(Oshima) versus Nivel teor, Labor

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	4	0, 400, 800, 2600
Labor	fixed	2	CAT, GAL

Analysis of Variance for µg eq STX.2HCL/Kg(Oshima), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	3	50344529	47962094	15987365	439.61	0.000
Labor	1	23438	26264	26264	0.72	0.400
Nivel teor*Labor	3	347071	347071	115690	3.18	0.033
Error	43	1563770	1563770	36367		
Total	50	52278809				

S = 190.701 R-Sq = 97.01% R-Sq(adj) = 96.52%

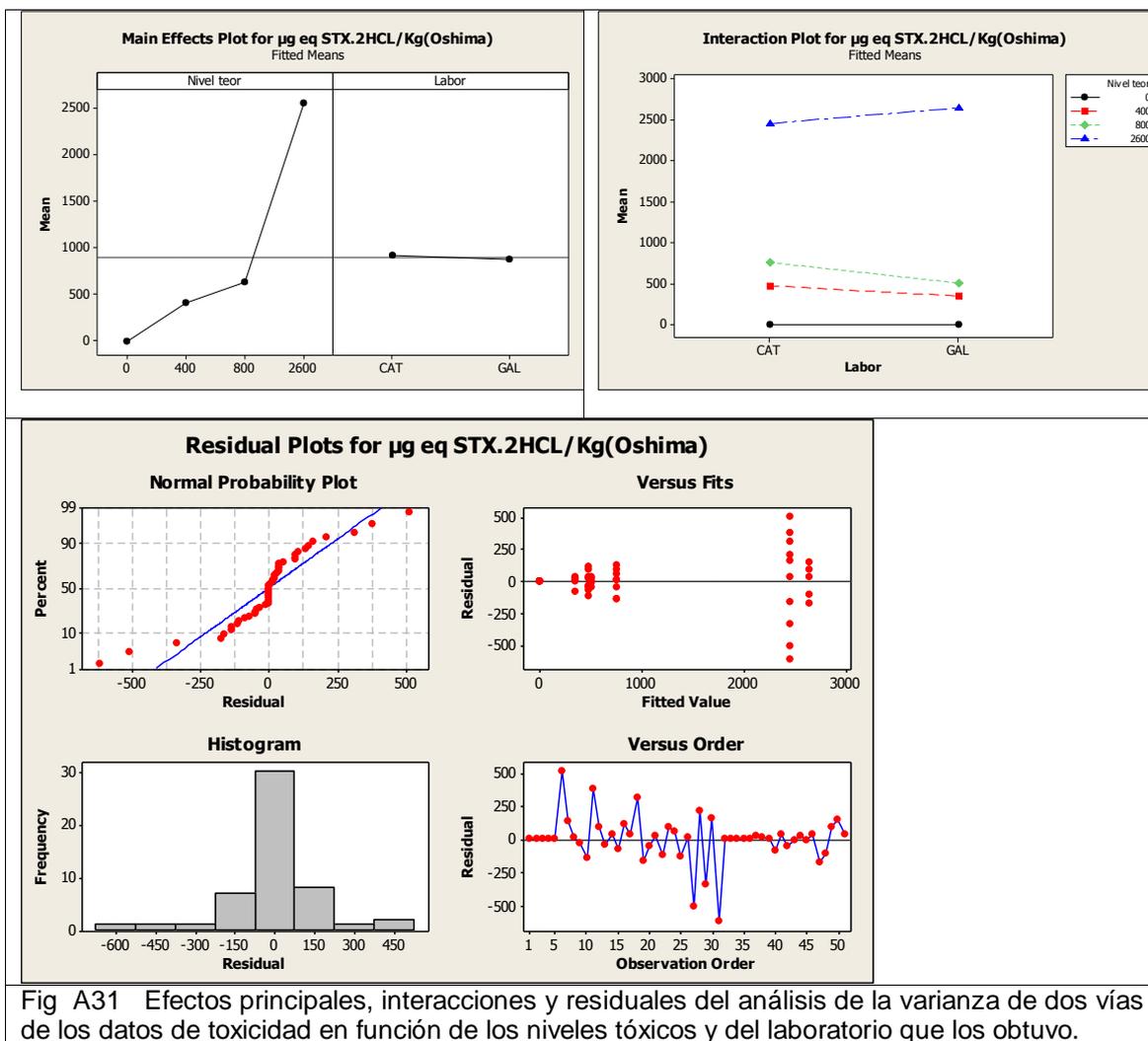
Unusual Observations for µg eq STX.2HCL/Kg(Oshima)

Obs	STX.2HCL/Kg(Oshima)	µg eq	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
6	2968.00	2454.60	2454.60	60.30	513.40	2.84 R
11	2836.00	2454.60	2454.60	60.30	381.40	2.11 R
27	1944.00	2454.60	2454.60	60.30	-510.60	-2.82 R
31	1838.00	2454.60	2454.60	60.30	-616.60	-3.41 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for µg eq STX.2HCL/Kg(Oshima)

Nivel teor	Mean	SE Mean
0	-0.00	60.30
400	411.04	54.36
800	633.74	54.36
2600	2550.79	52.23
Labor		
CAT	922.43	35.36
GAL	875.36	42.64



### General Linear Model: logTox+1 versus Nivel teor, Labor

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	4	0, 400, 800, 2600
Labor	fixed	2	CAT, GAL

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	3	75.345	73.214	24.405	7912.46	0.000
Labor	1	0.056	0.054	0.054	17.47	0.000
Nivel teor*Labor	3	0.096	0.096	0.032	10.38	0.000
Error	43	0.133	0.133	0.003		
Total	50	75.630				

S = 0.0555369 R-Sq = 99.82% R-Sq(adj) = 99.80%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
22	2.55751	2.67204	0.01964	-0.11453	-2.20 R
31	3.26458	3.38498	0.01756	-0.12039	-2.29 R
40	2.41797	2.53776	0.02484	-0.11979	-2.41 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for logTox+1

Nivel

teor	Mean	SE Mean
0	-0.00000	0.01756
400	2.60490	0.01583
800	2.79172	0.01583
2600	3.40372	0.01521
Labor		
CAT	2.23379	0.01030
GAL	2.16637	0.01242

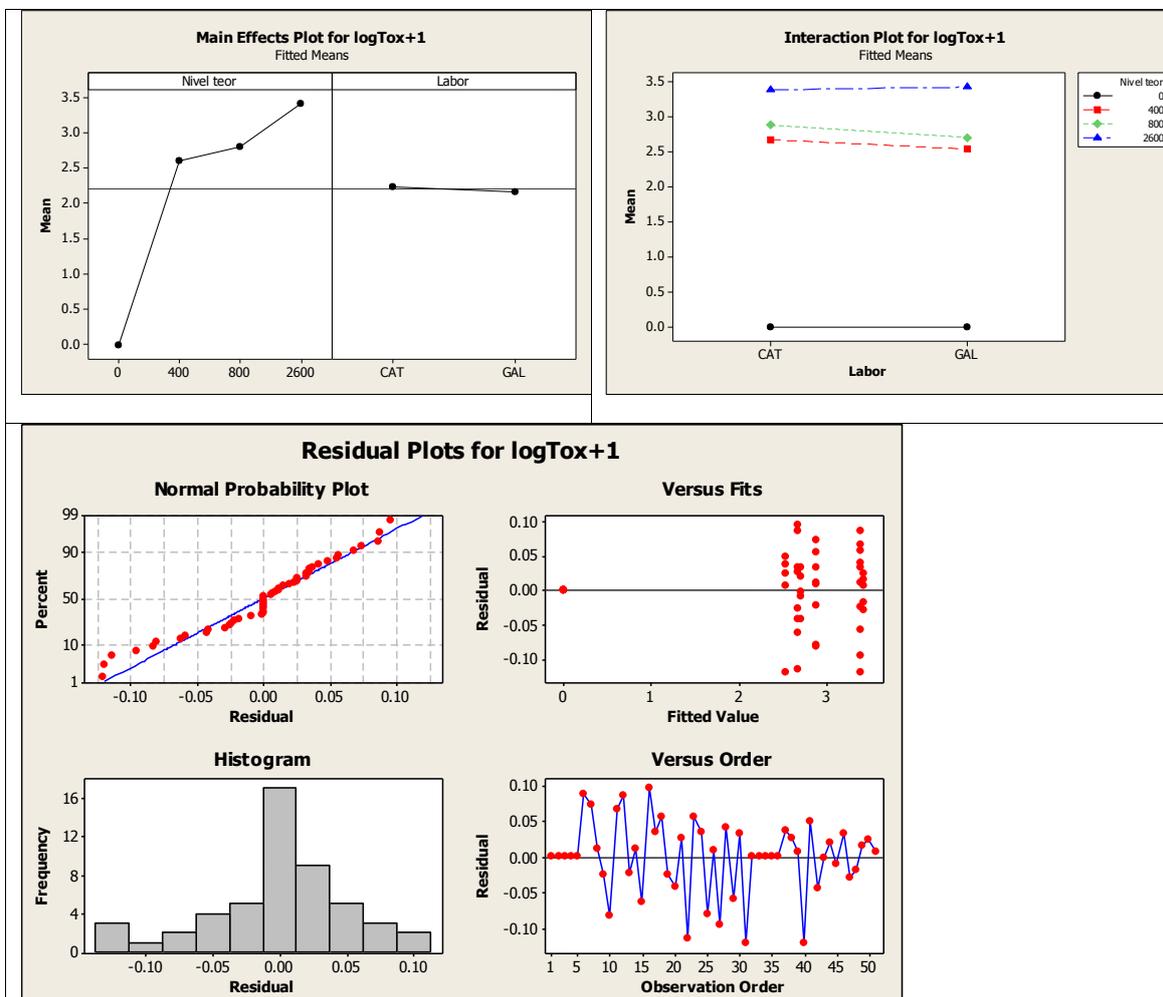


Fig A32 Igual que la figura anterior pero utilizando los datos transformados logarítmicamente

### Comparación métodos mejillón con *Alexandrium* (precolumna y MBA).

Cuando se analizan todos los datos en conjunto de los bioensayos de ratón y los análisis mediante HPLC con oxidación precolumna, no se encuentran diferencias significativas entre laboratorios, pero sí entre métodos. Aunque no se constataron diferencias en el nivel medio estimado por los diferentes laboratorios, se observaron considerables diferencias en las estimaciones dependientes de las combinaciones laboratorio-método-nivel de toxicidad, como muestra la significación de las interacciones.

En promedio, el método precolumna da estimaciones ligeramente más bajas que el bioensayo de ratón.

## General Linear Model: logTox+1 versus Nivel Teor, labor, Método

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	4	0, 400, 800, 2600
labor	fixed	2	CAT, GAL
Método	fixed	2	MBA, Precol

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel Teor	3	147.6092	143.0518	47.6839	20044.40	0.000
labor	1	0.0001	0.0013	0.0013	0.55	0.460
Método	1	0.0428	0.0675	0.0675	28.38	0.000
Nivel Teor*labor	3	0.3632	0.3896	0.1299	54.60	0.000
Nivel Teor*Método	3	0.0881	0.1366	0.0455	19.14	0.000
labor*Método	1	0.1289	0.1191	0.1191	50.05	0.000
Nivel Teor*labor*Método	3	0.1033	0.1033	0.0344	14.48	0.000
Error	74	0.1760	0.1760	0.0024		
Total	89	148.5116				

S = 0.0487741 R-Sq = 99.88% R-Sq(adj) = 99.86%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
16	3.94866	3.80078	0.02439	0.14787	3.50 R
56	2.76864	2.67204	0.01724	0.09660	2.12 R
62	2.55751	2.67204	0.01724	-0.11453	-2.51 R
67	3.28892	3.38498	0.01542	-0.09606	-2.08 R
71	3.26458	3.38498	0.01542	-0.12039	-2.60 R
80	2.41797	2.53776	0.02181	-0.11979	-2.75 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for logTox+1

Nivel Teor	Mean	SE Mean
0	-0.00000	0.011019
400	2.62666	0.010734
800	2.78856	0.010501
2600	3.49855	0.010323
labor		
CAT	2.22449	0.006816
GAL	2.23240	0.008180
Método		
MBA	2.25680	0.007949
Precol	2.20008	0.007084

Dunnett 95.0% Simultaneous Confidence Intervals

Response Variable logTox+1

Comparisons with Control Level

Método = MBA subtracted from:

Método	Lower	Center	Upper
Precol	-0.07793	-0.05672	-0.03550

-0.075      -0.050      -0.025      -0.000

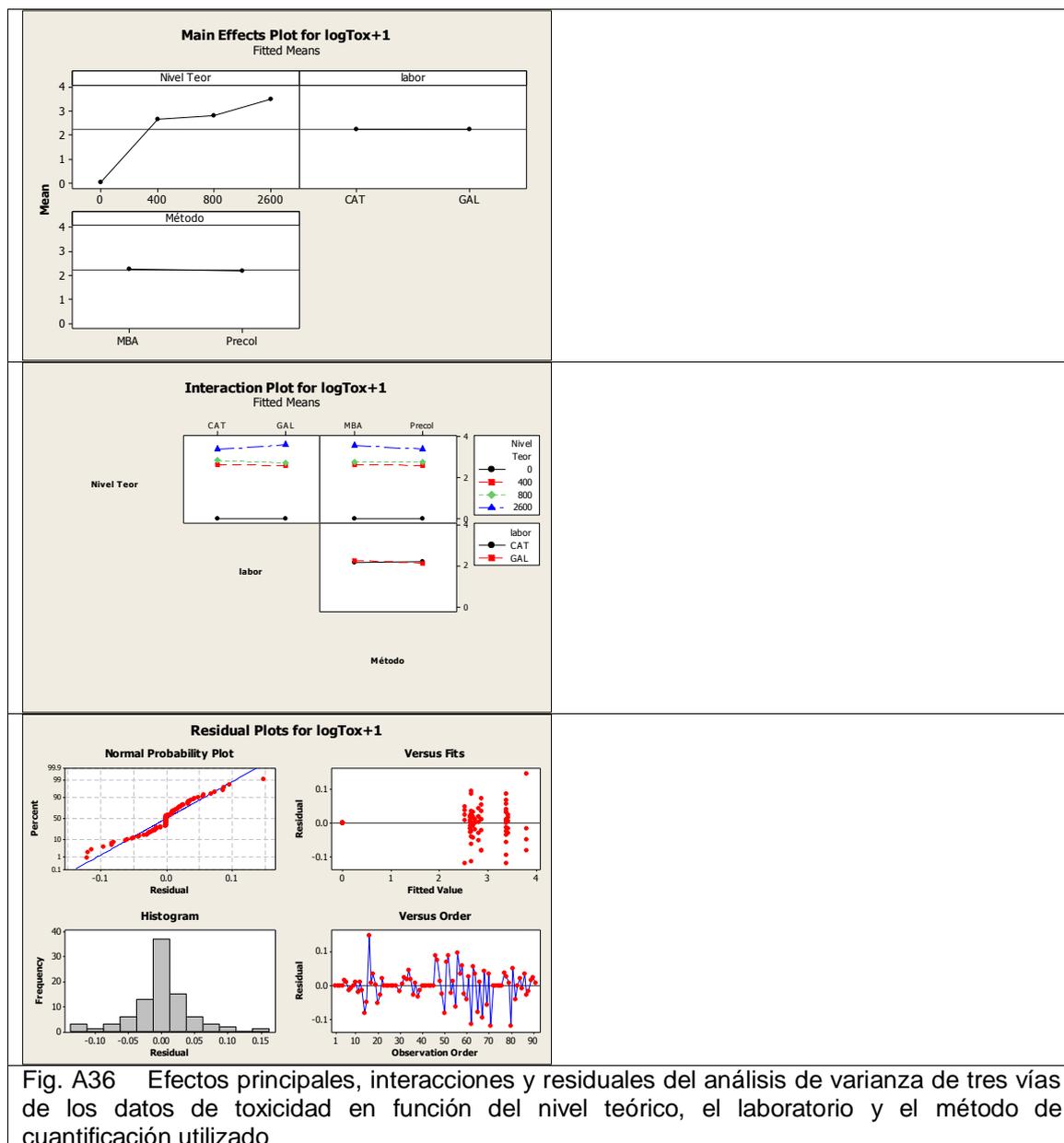
Dunnett Simultaneous Tests

Response Variable logTox+1

Comparisons with Control Level

Método = MBA subtracted from:

Método	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Precol	-0.05672	0.01065	-5.327	0.0000



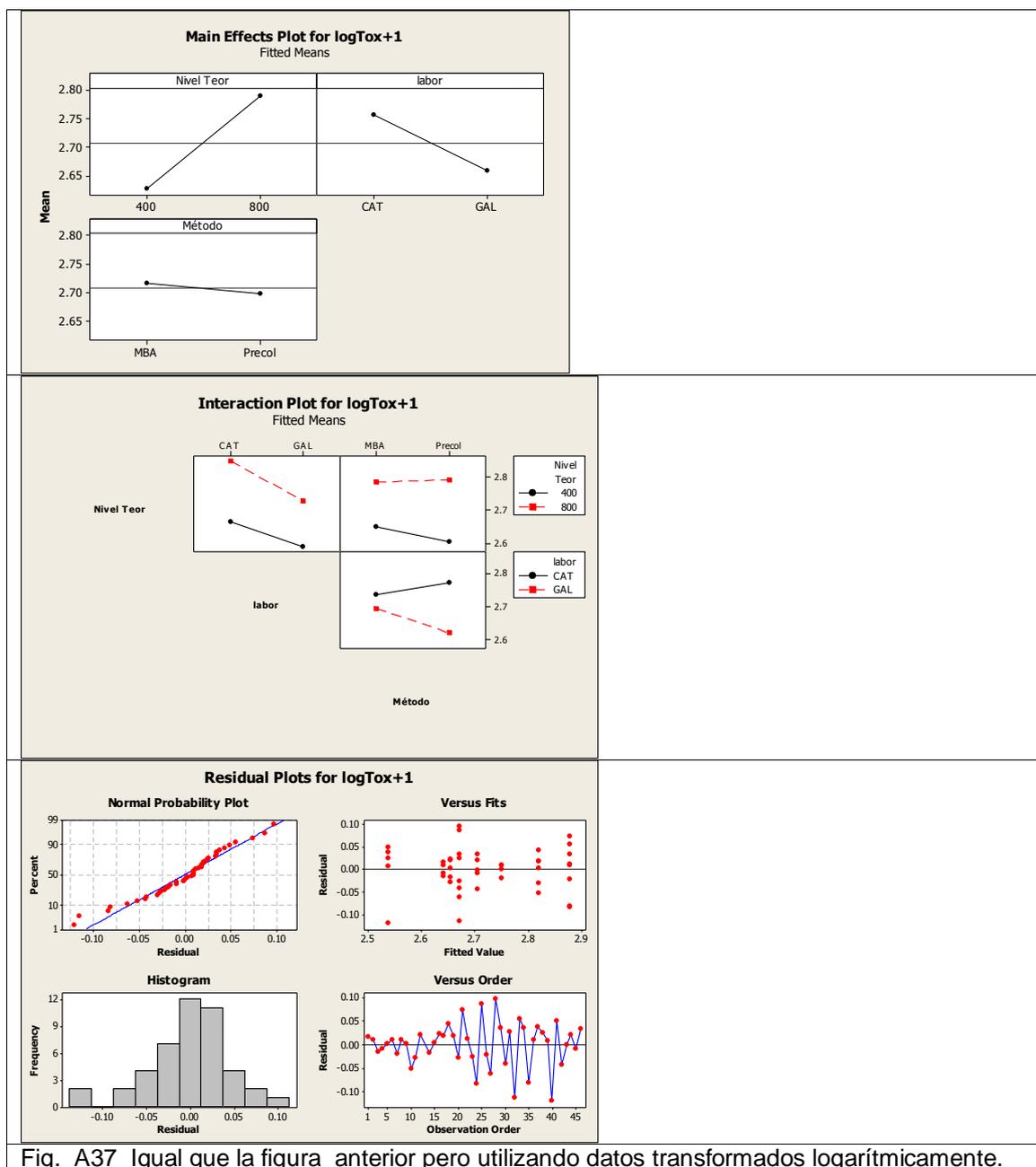
Cuando se estudian únicamente los niveles intermedios, que son los más importantes para el control, no se encuentran diferencias significativas entre métodos, aunque sí entre laboratorios y de la interacción nivel-laboratorio. Es decir los laboratorios varían entre sí en la cuantificación de forma diferente en cada nivel. Los dos laboratorios difieren también en la dispersión de los resultados, siendo mayor en el laboratorio de Cataluña.

#### General Linear Model: logTox+1 versus Nivel Teor, labor, Método

Factor	Type	Levels	Values
Nivel Teor	fixed	2	400, 800
labor	fixed	2	CAT, GAL
Método	fixed	2	MBA, Precol

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests





## PostColumna

### Mejillón con perfil *Gymnodinium catenatum*

#### Andalucía

Los niveles más bajos coinciden razonablemente bien con la toxicidad esperable. La toxicidad estimada para el nivel más alto, sin embargo, resultó considerablemente alta y fuera del rango esperable "a priori". Los intervalos de confianza del 95% en los niveles intermedios se solapan considerablemente,

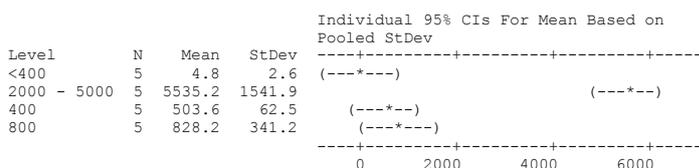
no siendo su diferencia significativa, de forma que es esperable una aparición de falsos negativos y falsos positivos, aunque con toxicidades que se apartan poco del nivel permisible, ya que las diferencias de ambos con el nivel de 0 y con el nivel alto son altamente significativas.

Se observan 4 puntos con valores notablemente inferiores a los restantes. Estos puntos corresponden a muestras que fueron almacenadas antes de su extracción por un período de más de 150 días. El análisis de la covarianza con los niveles teóricos como factor principal y con el tiempo de conservación como covariante, muestran que el tiempo de conservación de las muestras, antes de su extracción, lleva a la reducción de la toxicidad estimada por este método. Dado que en el bioensayo de ratón no se aprecia este efecto, su origen muy probablemente debe ser la desaparición de interferentes que coeluyen con las toxinas y que por tanto, cuando existen, llevan a la sobreestimación de la cantidad de toxina real. En muestras analizadas un tiempo relativamente largo después de su extracción, suelen obtenerse cromatogramas más limpios (y por tanto con menos interferentes) que en las recién extraídas. No se mantuvieron muestras después de la extracción un tiempo suficientemente largo y de forma sistemática, como para poder cuantificar este efecto, pero es posible que sea el mismo que se aprecia con la conservación prolongada.

#### One-way ANOVA: $\mu_{\text{geqSTX.2HCL/Kg}}$ versus Nivel teor

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	98862907	32954302	52.77	0.000
Error	16	9991640	624477		
Total	19	108854547			

S = 790.2 R-Sq = 90.82% R-Sq(adj) = 89.10%

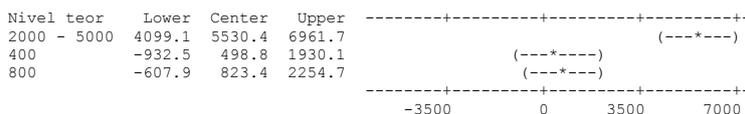


Pooled StDev = 790.2

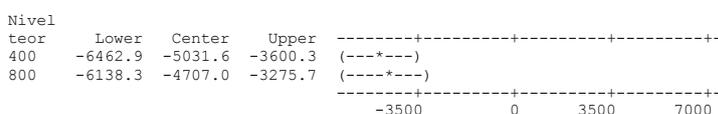
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 98.87%

Nivel teor = <400 subtracted from:



Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:



Nivel teor = 400 subtracted from:



Nivel teor = <400 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
2000 - 5000	2.6437	3.0125	3.3812
400	1.6159	1.9846	2.3533
800	1.7786	2.1473	2.5161

Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:

teor	Lower	Center	Upper
400	-1.3966	-1.0279	-0.6591
800	-1.2339	-0.8651	-0.4964

Nivel teor = 400 subtracted from:

teor	Lower	Center	Upper
800	-0.2060	0.1627	0.5315

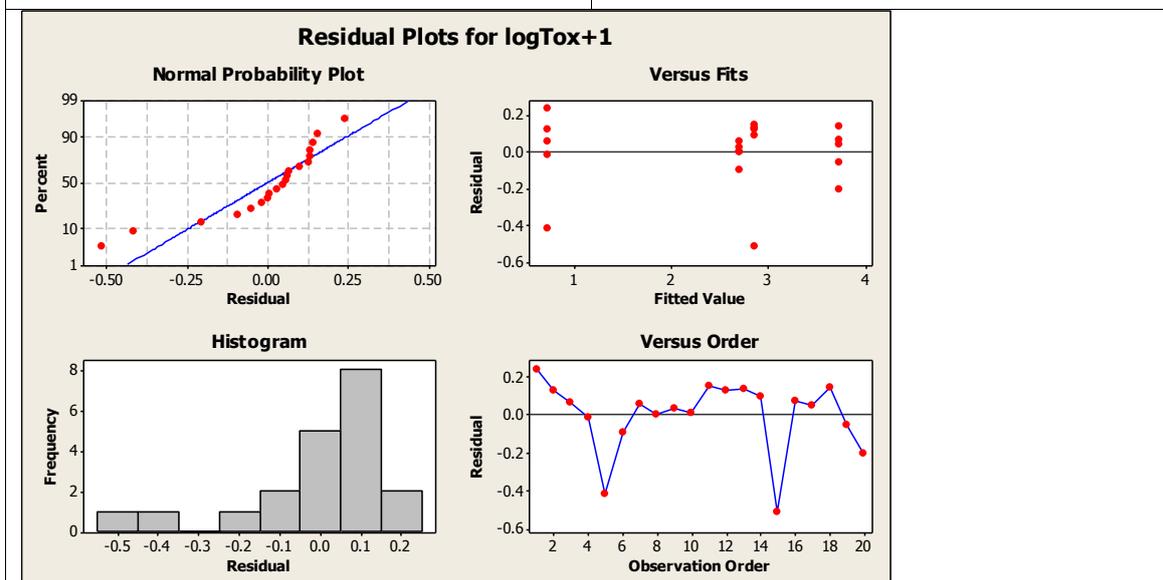
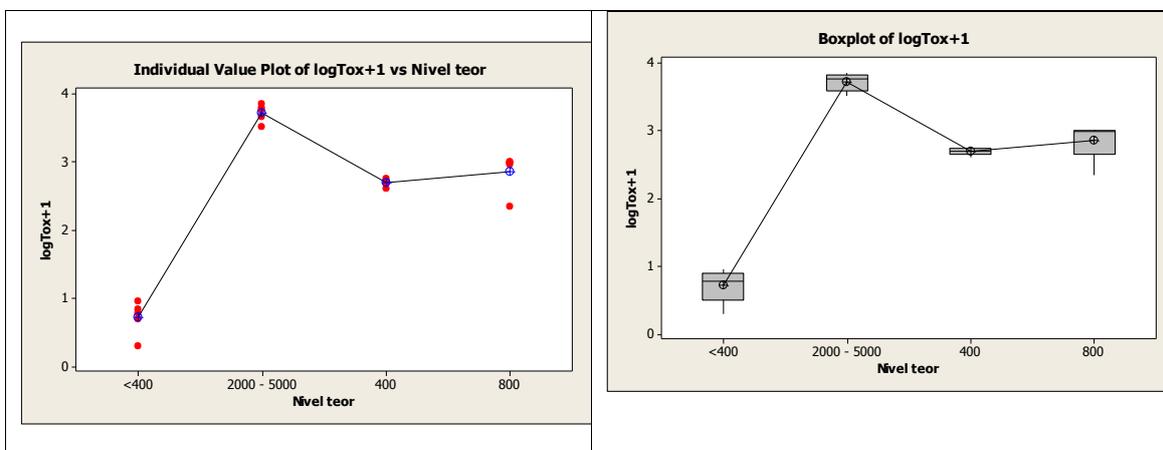


Fig. A39 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**General Linear Model: logTox+1 versus Nivel teor**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	4	<400, 2000 - 5000, 400, 800

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo conservación (días)	1	0.0603	0.3835	0.3835	20.57	0.000
Nivel teor	3	24.6436	24.6436	8.2145	440.60	0.000
Error	15	0.2797	0.2797	0.0186		
Total	19	24.9836				

S = 0.136543 R-Sq = 98.88% R-Sq(adj) = 98.58%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	2.60181	0.03769	69.04	0.000
Tiempo conse	-0.002239	0.000494	-4.54	0.000

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
10	2.70586	2.42065	0.08675	0.28522	2.70 R
15	2.35025	2.57713	0.08773	-0.22688	-2.17 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Means for Covariates

Covariate	Mean	StDev
Tiempo conservación (días)	44.75	63.67

Least Squares Means for logTox+1

Nivel teor	Mean	SE Mean
<400	0.6964	0.06121
2000 - 5000	3.7357	0.06109
400	2.7101	0.06110
800	2.8643	0.06106

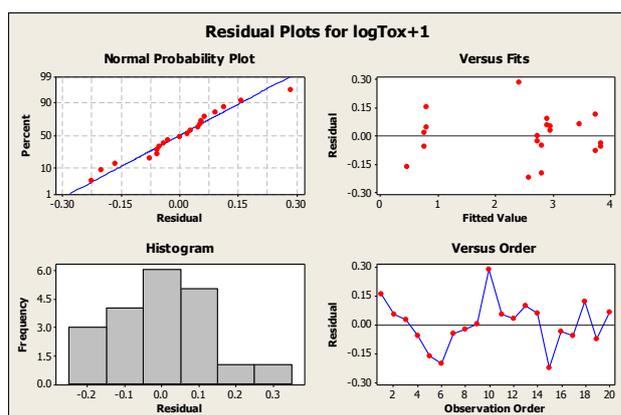


Fig A40

## Galicia

La técnica utilizada en este caso es similar a la postcolumna recientemente validada por AOAC y utiliza un gradiente discontinuo como método de elución, y es diferente de la utilizada en Andalucía, que emplea 2 eluciones isocráticas.

Esta técnica se mostró incapaz de cuantificar adecuadamente la toxicidad de las muestras de *Gymnodinium catenatum*, a pesar de que había cuantificado de forma razonable muestras con toxinas procedentes de *Alexandrium minutum*. Los niveles teóricos de toxinas se distinguen muy difícilmente debido principalmente a la gran dispersión de las medidas y por tanto las diferencias encontradas son escasamente significativas estadísticamente (y sólo cuando los datos se transforman logarítmicamente). Además, los intervalos de confianza del 95% de los tres niveles más altos se solapan completamente

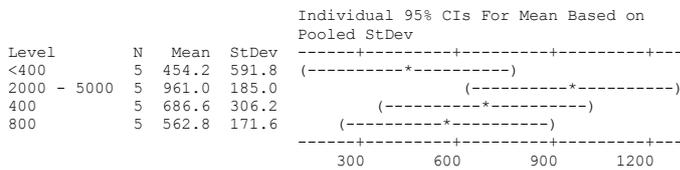
indicando que esta técnica es incapaz de distinguir para esta especie muestras tóxicas de no tóxicas incluso si la toxicidad es alta.

Desconocemos las razones de esta falta de eficacia para la cuantificación de la toxicidad de muestras con toxinas de *Gymnodinium catenatum*, pero esto indica claramente que este tipo de técnicas de cuantificación han de ser evaluadas en las matrices concretas en las que se vayan a utilizar y no es posible extrapolar su viabilidad.

**One-way ANOVA: µgSTXeq/Kg versus Nivel Teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	714794	238265	1.88	0.174
Error	16	2030521	126908		
Total	19	2745315			

S = 356.2 R-Sq = 26.04% R-Sq(adj) = 12.17%

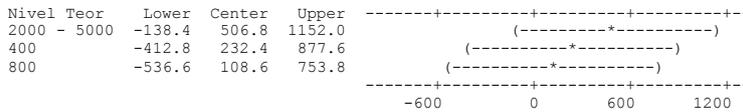


Pooled StDev = 356.2

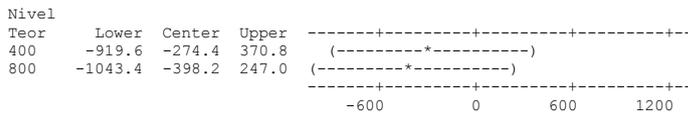
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.87%

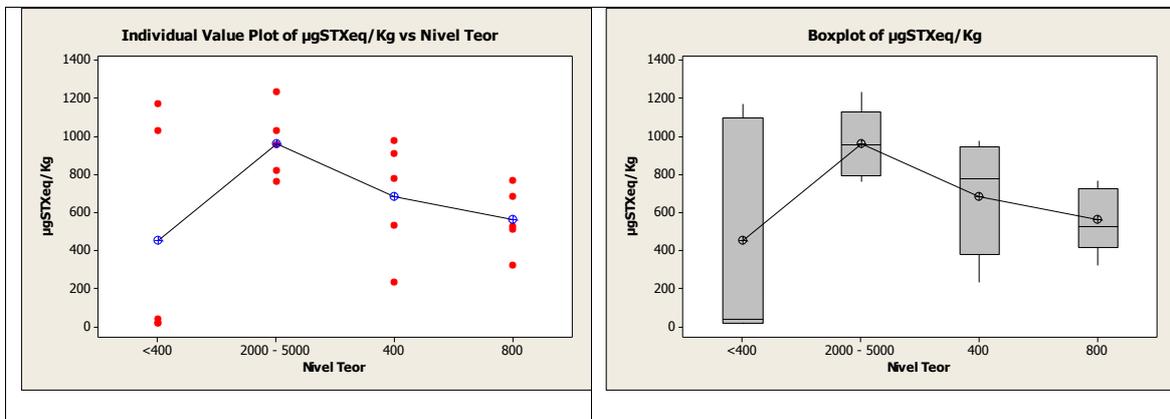
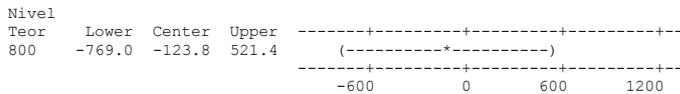
Nivel Teor = <400 subtracted from:



Nivel Teor = 2000 - 5000 subtracted from:



Nivel Teor = 400 subtracted from:



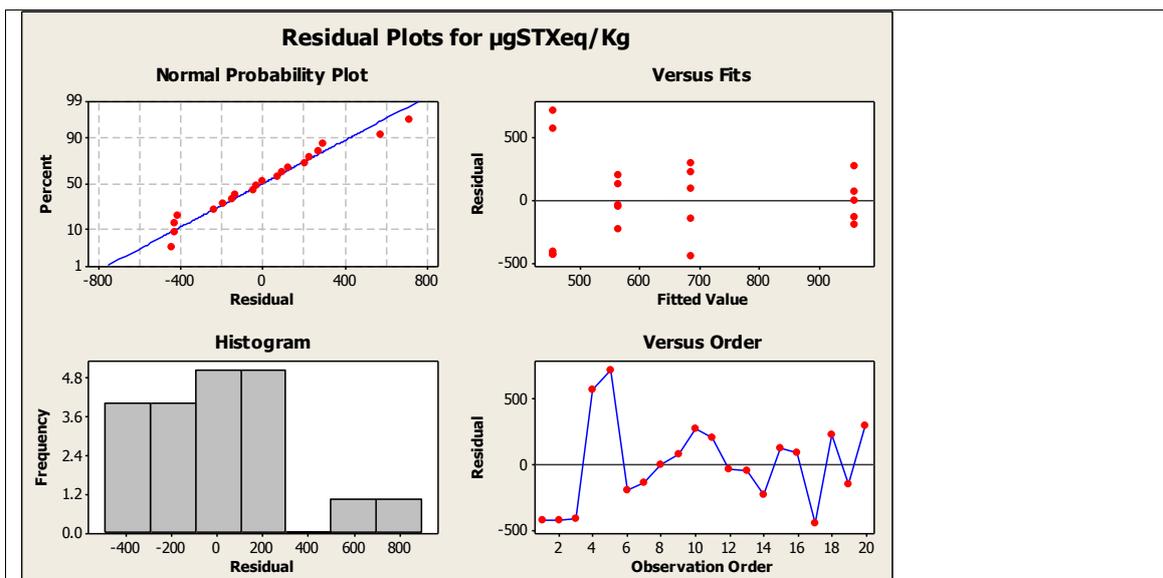
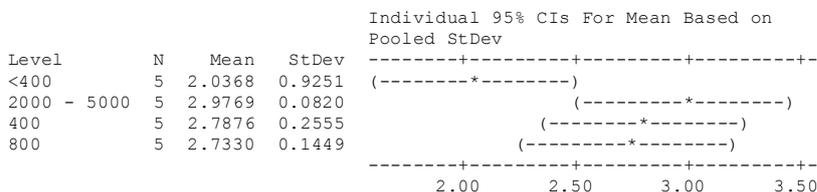


Fig.A41 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel Teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel Teor	3	2.538	0.846	3.57	0.038
Error	16	3.795	0.237		
Total	19	6.333			

S = 0.4870 R-Sq = 40.08% R-Sq(adj) = 28.84%

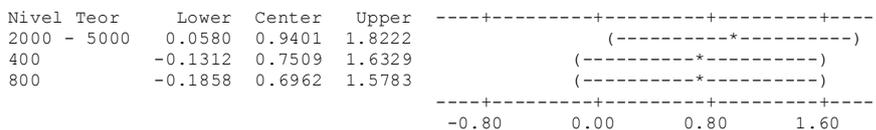


Pooled StDev = 0.4870

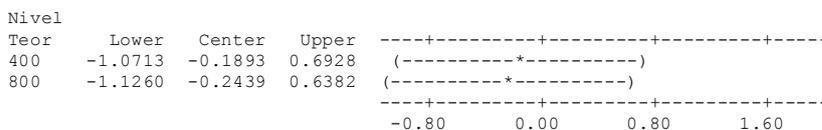
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel Teor

Individual confidence level = 98.87%

Nivel Teor = <400 subtracted from:



Nivel Teor = 2000 - 5000 subtracted from:



Nivel Teor = 400 subtracted from:

Nivel

Teor	Lower	Center	Upper	-----+-----+-----+-----+-----
800	-0.9367	-0.0546	0.8274	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----
				-0.80      0.00      0.80      1.60

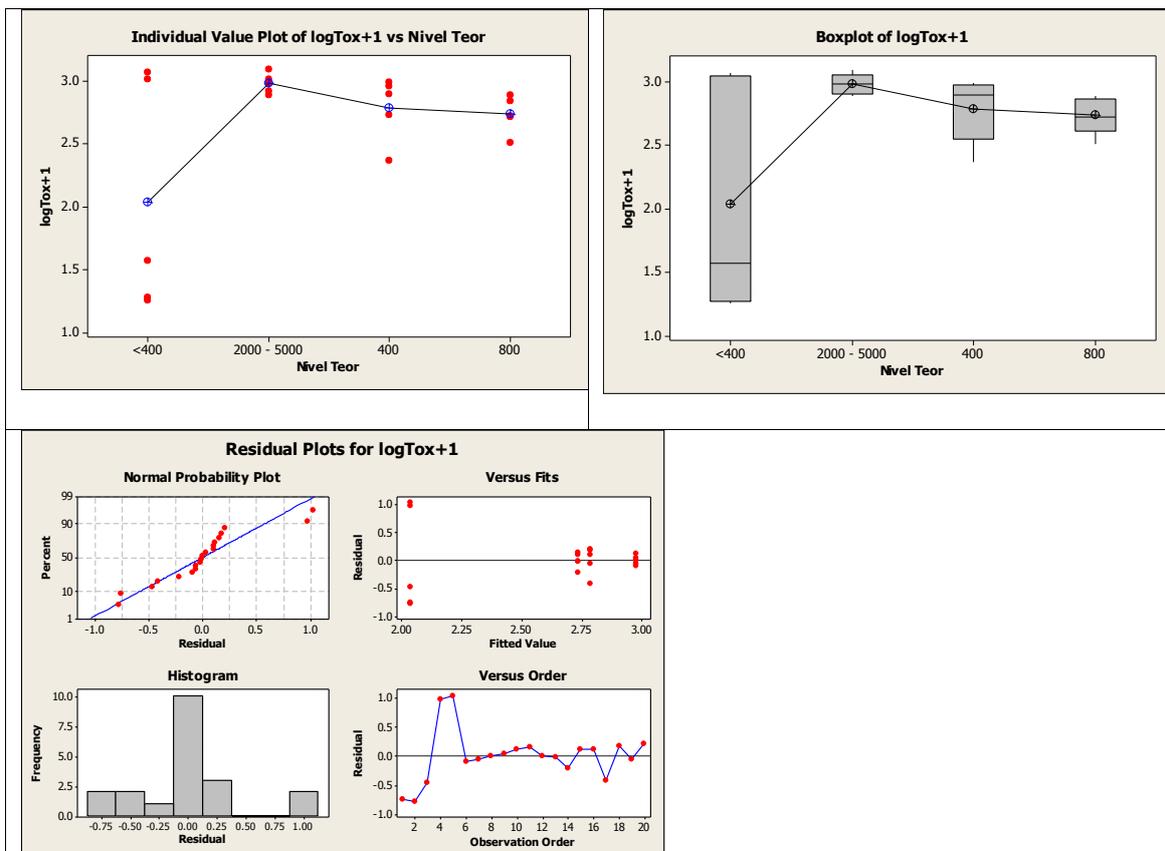


Fig. A43 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

### Comparación HPLC-Postcolumna con bioensayo y HPLC-Precolumna con mejillón con perfil de *Gymnodinium catenatum*

Los distintos métodos de cuantificación dieron resultados diferentes, aunque normalmente el nivel alto y el blanco son distinguibles de los niveles medios (400 y 800). El postcolumna utilizado en Galicia resultó el método que más se aparta de los otros.

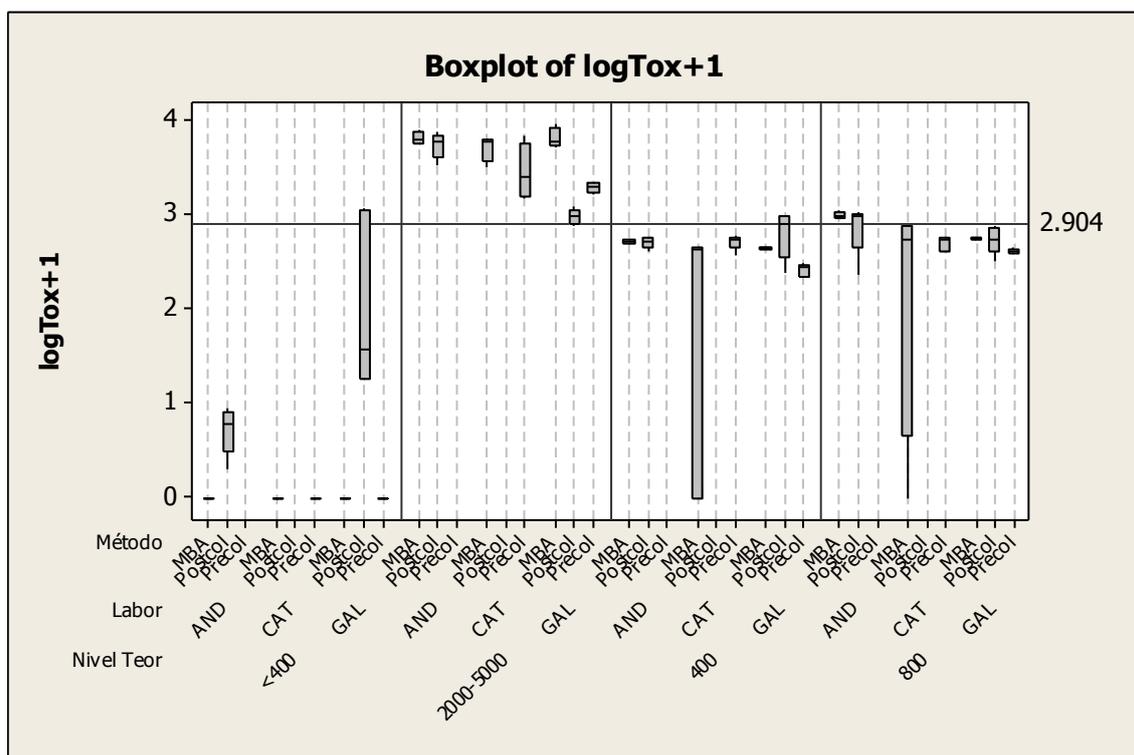


Fig A44

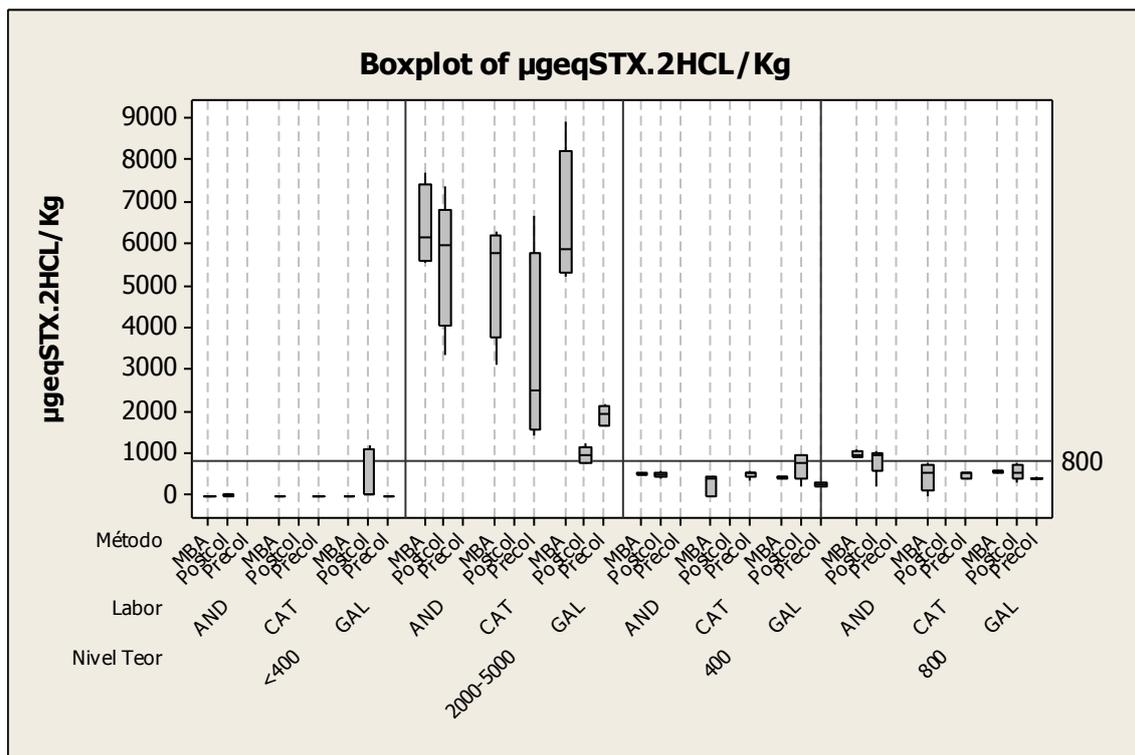
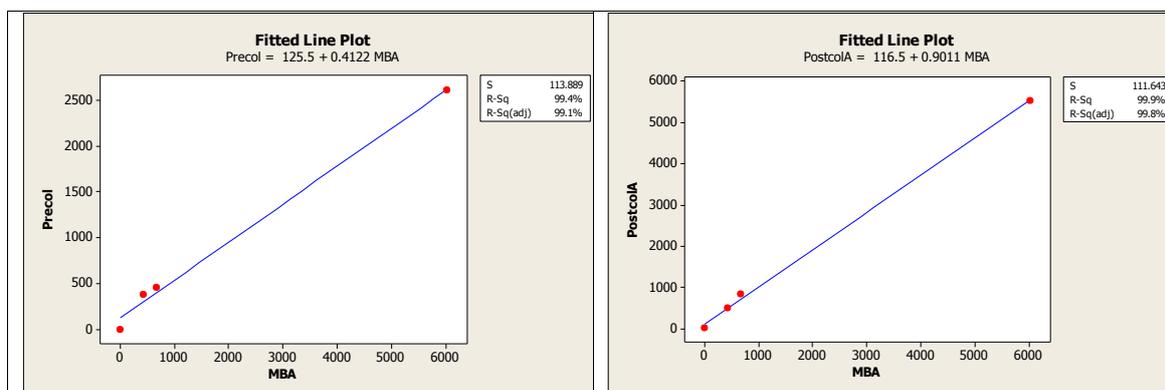


Fig A45

La técnica que mejor relación tiene, desde el punto de vista cuantitativo, con la media de los bioensayos de ratón es el método postcolumna utilizado en Andalucía. Puede apreciarse en las regresiones con el bioensayo de ratón que la pendiente es próxima a 1 y el corte con el eje de la abscisas es relativamente bajo. Un ajuste cuadrático resulta mejor que una línea recta, sugiriendo una cierta falta de linealidad de alguno de los dos métodos (bioensayo y postcolumna de eluciones isocráticas) El método precolumna da resultados considerablemente más pobres, con una pendiente de 0.41, es decir, con una subestimación considerable de la toxicidad medida por el bioensayo. En los niveles intermedios este efecto es menos acusado y la pendiente sube a 0.7 cuando se excluye el nivel de mayor concentración, pero este coeficiente, de todas formas sigue quedando lejos del 1 ideal.



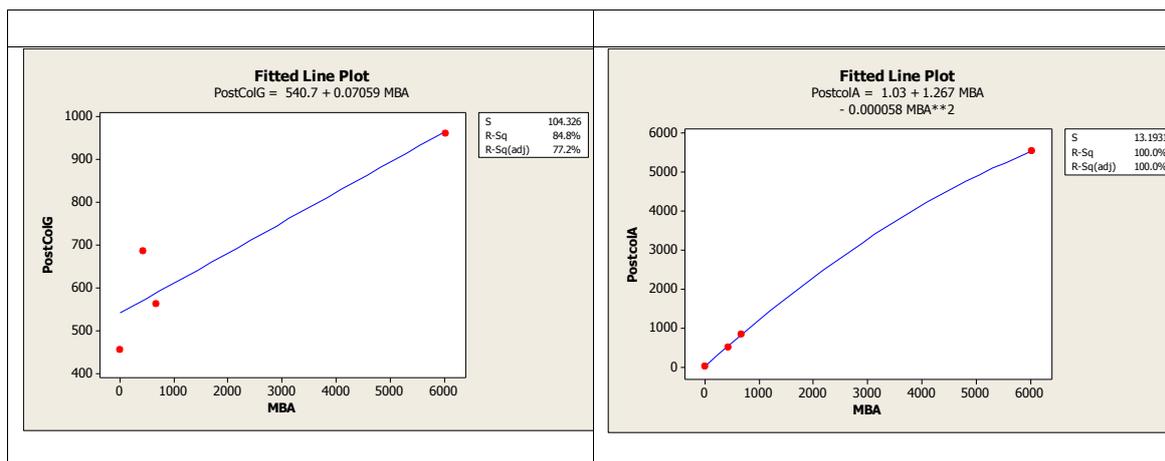


Fig A46 Relación entre la cuantificación por medio de bioensayo de ratón (MBA) y las técnicas cromatográficas empleadas (PostColG= HPLC postcolumna de Galicia, PostColA= HPLC postcolumna de Andalucía, PreCol= Precolumna,). El panel inferior derecho muestra un ajuste cuadrático entre MBA y el Postcolumna de Andalucía.

### Regression Analysis: Precol versus MBA

The regression equation is  
 Precol = 125.5 + 0.4122 MBA

S = 113.889 R-Sq = 99.4% R-Sq(adj) = 99.1%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	4132038	4132038	318.57	0.003
Error	2	25941	12971		
Total	3	4157979			

### Regression Analysis: PostcolA versus MBA

The regression equation is  
 PostcolA = 116.5 + 0.9011 MBA

S = 111.643 R-Sq = 99.9% R-Sq(adj) = 99.8%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	19747653	19747653	1584.34	0.001
Error	2	24929	12464		
Total	3	19772581			

### Regression Analysis: PostColG versus MBA

The regression equation is  
 PostColG = 540.7 + 0.07059 MBA

S = 104.326 R-Sq = 84.8% R-Sq(adj) = 77.2%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	121191	121191	11.13	0.079
Error	2	21768	10884		
Total	3	142959			

## Polynomial Regression Analysis: PostcolA versus MBA

The regression equation is  
 $PostcolA = 1.03 + 1.267 MBA - 0.000058 MBA^2$

S = 13.1931 R-Sq = 100.0% R-Sq(adj) = 100.0%

### Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	19772407	9886204	56798.49	0.003
Error	1	174	174		
Total	3	19772581			

### Sequential Analysis of Variance

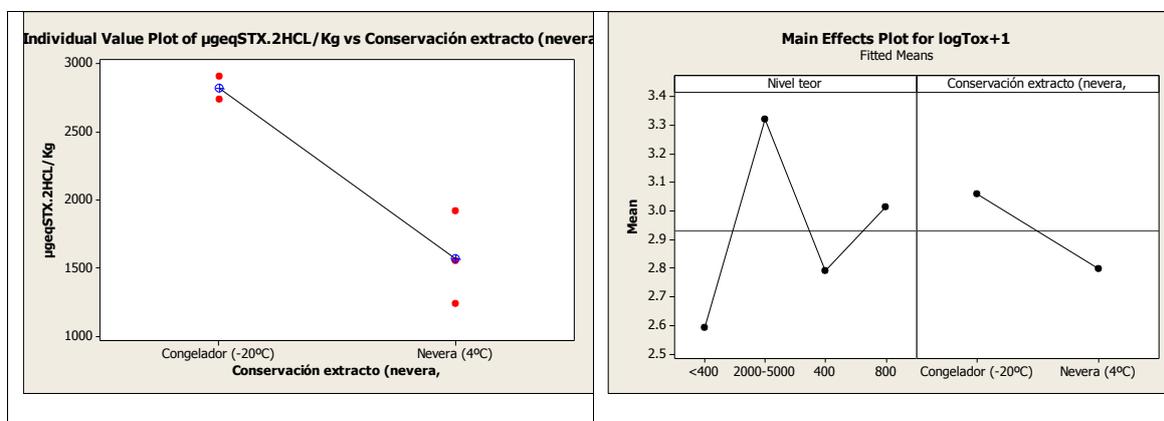
Source	DF	SS	F	P
Linear	1	19747653	1584.34	0.001
Quadratic	1	24754	142.22	0.053

## Mejillón con perfil de *Alexandrium*

### Andalucía

Los resultados obtenidos por esta técnica están significativamente afectados por el método de conservación del extracto, de forma que las muestras que después de su extracción se mantuvieron en nevera a 4°C durante un día dieron valores de toxicidad significativamente inferiores (prácticamente la mitad) a las que se mantuvieron en congelador a -20°C durante 5 días.

Aunque podría pensarse en una degradación de las toxinas en las muestras conservadas en nevera, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras conservadas en esas condiciones durante 1, 2 y 3 días, por lo cual o dicha degradación se produce antes durante el primer día de conservación y luego se estabiliza o algún otro proceso está involucrado, como podría ser la insolubilización con el congelado de compuestos que capaces de retener toxinas.



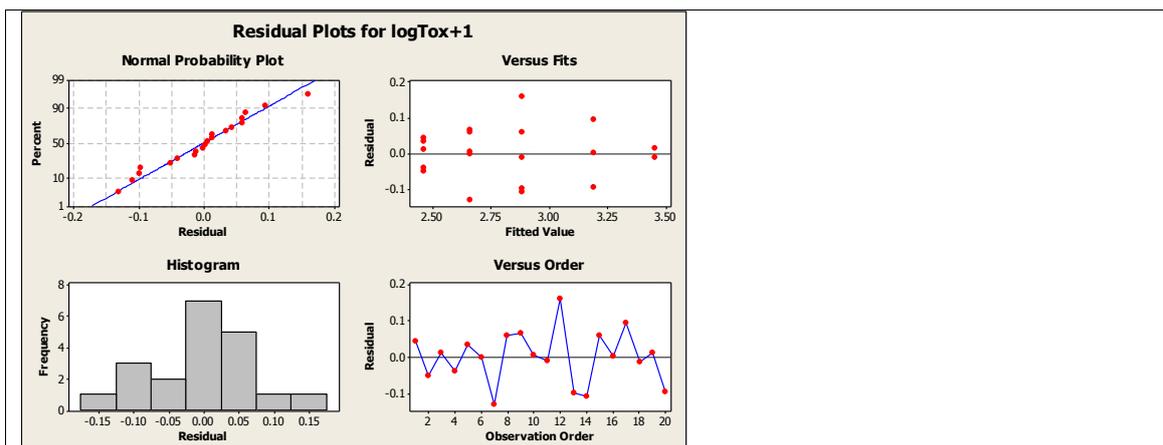


Fig. A47 Diferencias entre mediciones según la conservación de la muestra (panel izdo) y efectos principales obtenidos del análisis de la varianza de dos vías (niveles y conservación) de los datos transformados logarítmicamente.

**One-way ANOVA:  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$  versus Conservación extracto (nevera,**

Source	DF	SS	MS	F	P
Conservación extracto (n	1	1894551	1894551	22.99	0.017
Error	3	247227	82409		
Total	4	2141777			

S = 287.1 R-Sq = 88.46% R-Sq(adj) = 84.61%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Congelador (-20°C)	2	2824.5	119.5	(-----*-----)
Nevera (4°C)	3	1568.0	341.3	(-----*-----)

1400      2100      2800      3500

Pooled StDev = 287.1

**General Linear Model: logTox+1 versus Nivel teor, Conservación ext**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	4	<400, 2000-5000, 400, 800
Conservación extracto (nevera,	fixed	2	Congelador (-20°C), Nevera (4°C)

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	3	1.90718	1.11860	0.37287	54.81	0.000
Conservación extracto (nevera,	1	0.08251	0.08251	0.08251	12.13	0.003
Error	15	0.10204	0.10204	0.00680		
Total	19	2.09174				

S = 0.0824790 R-Sq = 95.12% R-Sq(adj) = 93.82%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
12	3.04336	2.88337	0.03689	0.16000	2.17 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

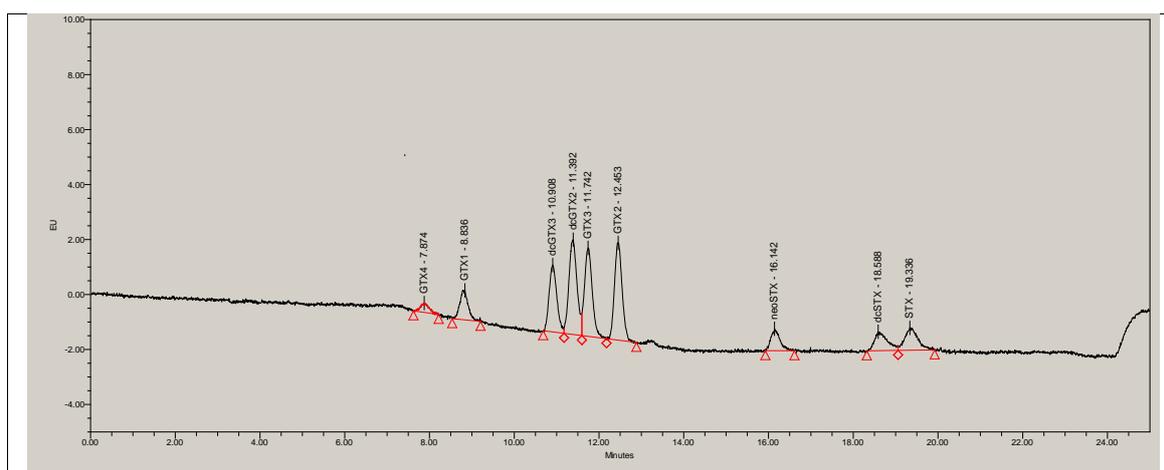
Least Squares Means for logTox+1

Nivel teor	Mean	SE Mean
<400	2.594	0.05270
2000-5000	3.320	0.03765
400	2.790	0.05270
800	3.014	0.05270
Conservación		
Congelador (-20°C)	3.061	0.07023

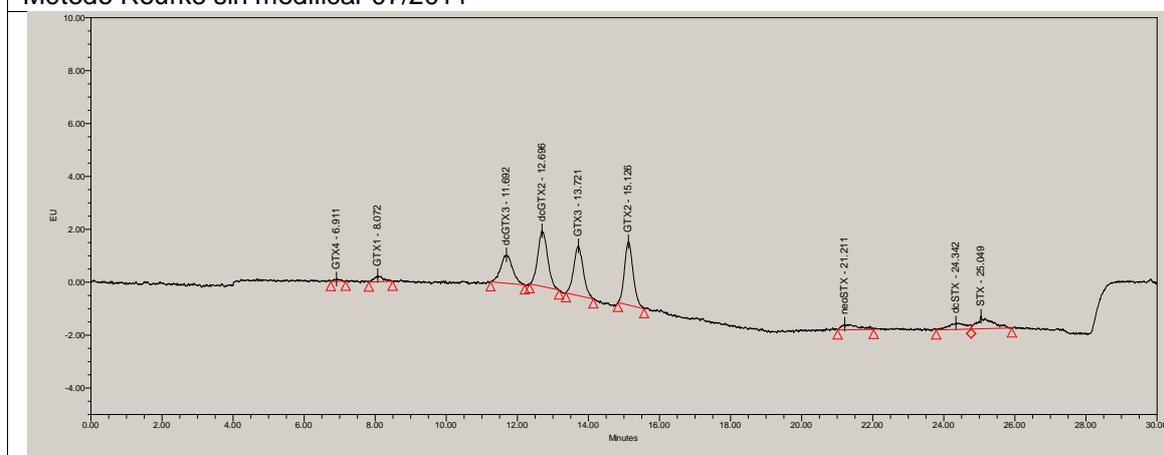


posteriormente en marzo de 2012 se volvieron a realizar con el método modificado que tiene una separación de la zona dcGTX3-dcGTX2 –GTX3 y GTX2 más clara sin menoscabo del resto de las toxinas. Esto se observa comparando los dos patrones M9. Otro de los motivos fue confirmar la presencia del interferente que observamos en julio en la zona de la GTX4-1 tal como se ve en la muestra C21 y que al inyectarla en marzo ese pico parece que mueve y se sitúa en la zona de la GTX3, lo que hizo que las cuantificaciones de marzo generaron unos resultados caóticos. Viendo los cromatogramas de las muestras C79 y C107 en los de julio encontramos la interferencia pero en los de marzo se mueve también hacia la zona de la GTX3 y en la C107 el perfil de julio mantiene un perfil más concordante con que cabe esperar de la toxificación por *A. minutum*.

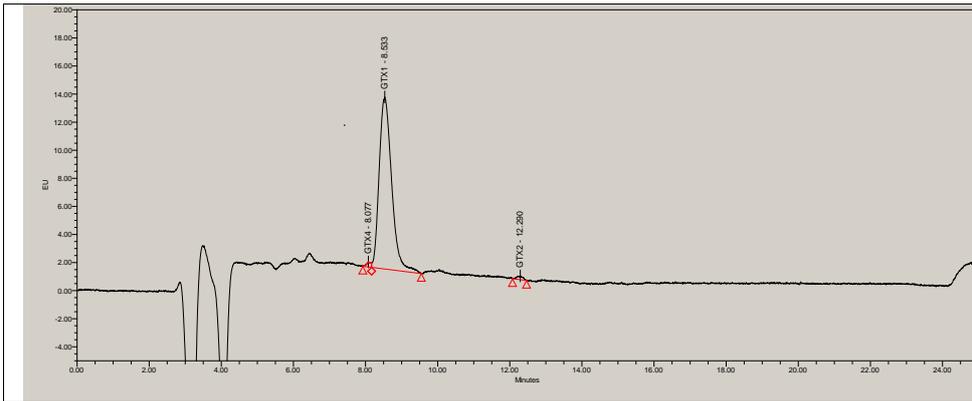
No tenemos una explicación razonable para este fenómeno, salvo suponer que en el periodo entre julio 2011 y marzo 2012 en lo que los extractos se mantuvieron a -18°C se haya producido algún cambio sustancial en el pico interferente de la zona GTX4-1 de forma que eluye en marzo en la zona de GTX3.



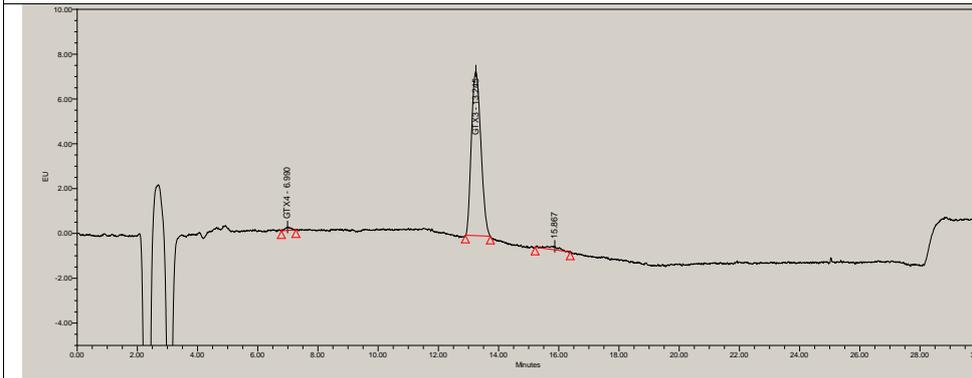
Método Rourke sin modificar 07/2011



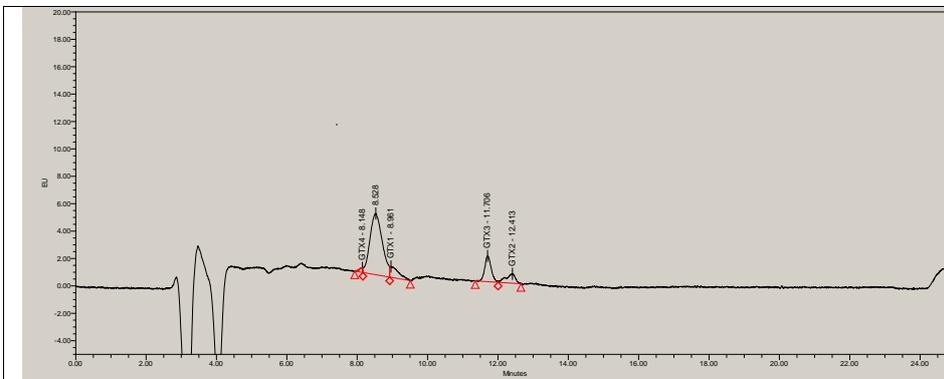
Método Rourke modificado 03/2012  
Fig. A 48 Patrón M9



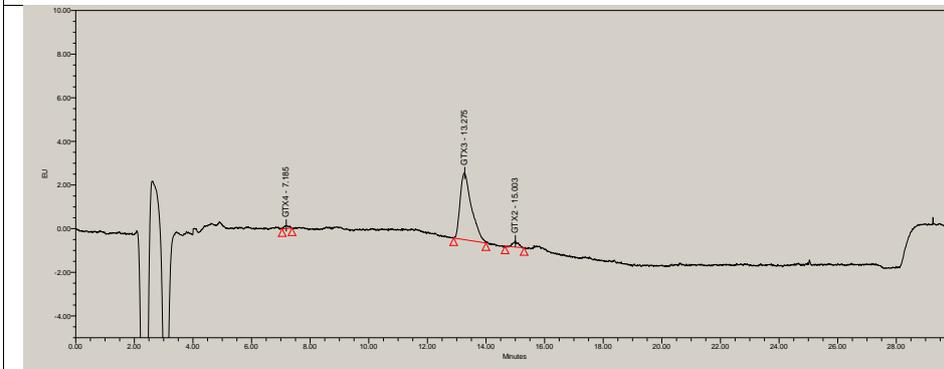
Método Rourke sin modificar 07/2011



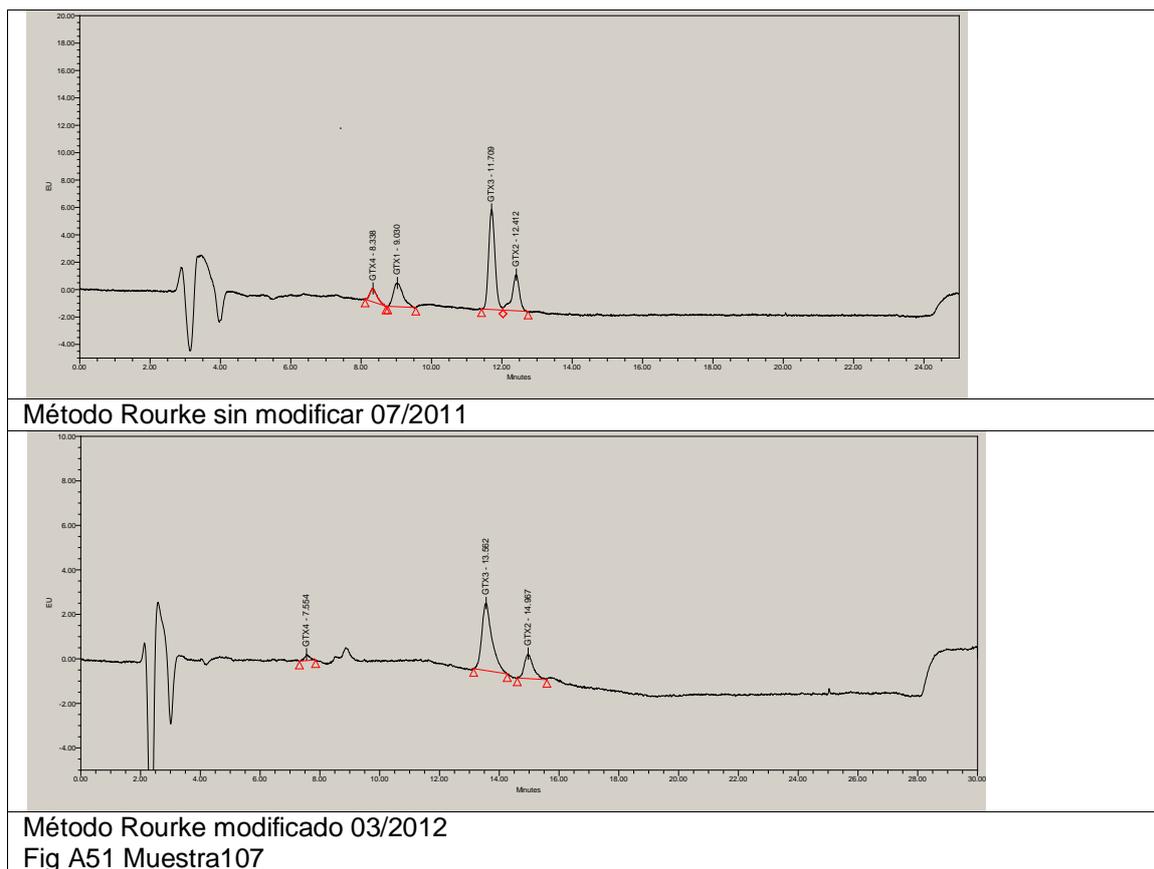
Método Rourke modificado 03/2012  
Fig. A49 Muestra C21



Método Rourke sin modificar 07/2011



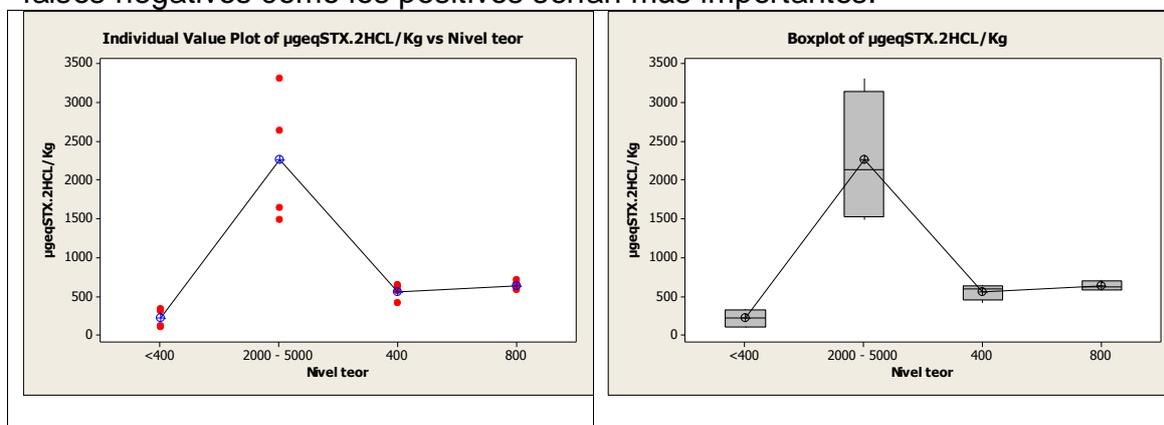
Método Rourke modificado 03/2012  
Fig A50 Muestra C79



### Corruco con perfil *Gymnodinium catenatum* (Andalucía)

Esta técnica de cuantificación presenta en esta especie una dispersión considerable, especialmente en el nivel más elevado. En niveles intermedios es, sin embargo, moderada. En las muestras estudiadas resulta imposible distinguir los dos niveles intermedios (no hay diferencias significativas ya que se solapan los intervalos de confianza de sus medias). No obstante no es esperable que los falsos negativos que puedan darse tengan un nivel de toxicidad real alto y no deberían pasar los 950  $\mu\text{g eq STX.2HCl/kg}$ , en más de un 5% de las ocasiones.

En su explotación para la conserva, para la que el máximo nivel permisible es 3000, el lugar de 800, teniendo en cuenta que la dispersión se amplía, tanto los falsos negativos como los positivos serían más importantes.



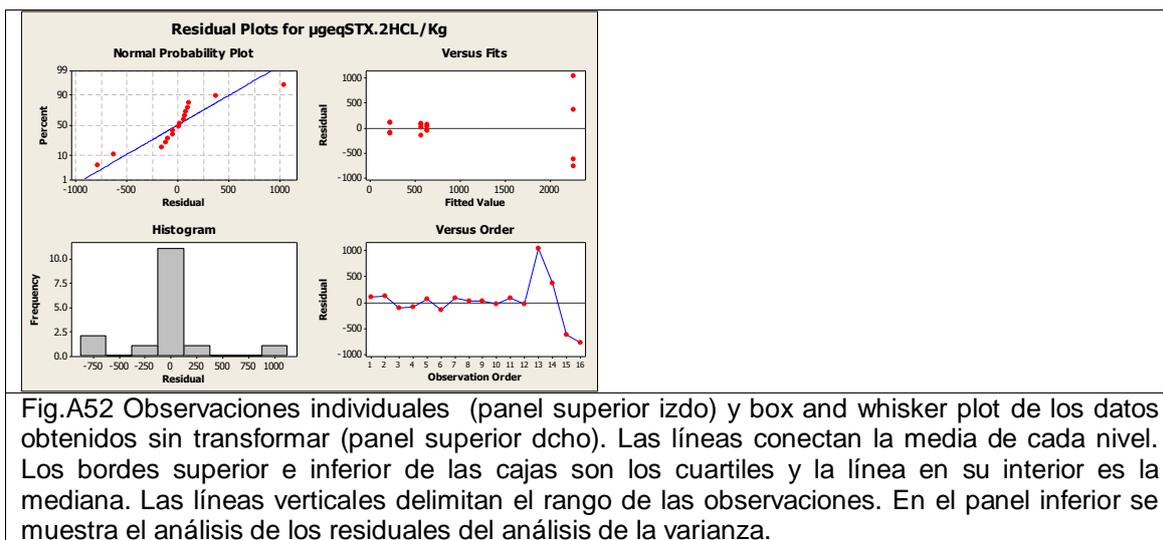


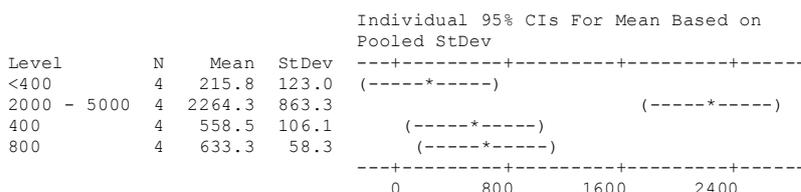
Fig.A52 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

Results for: Andalucía(Matriz = Corruco, Método = HPLC post-columna (OSH))

**One-way ANOVA: µgeqSTX.2HCL/Kg versus Nivel teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	10063468	3354489	17.31	0.000
Error	12	2325459	193788		
Total	15	12388927			

S = 440.2 R-Sq = 81.23% R-Sq(adj) = 76.54%

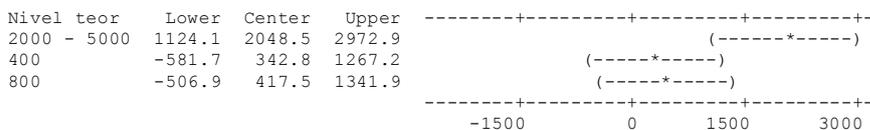


Pooled StDev = 440.2

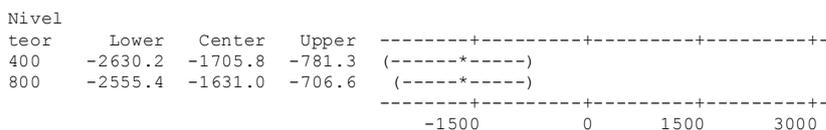
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 98.83%

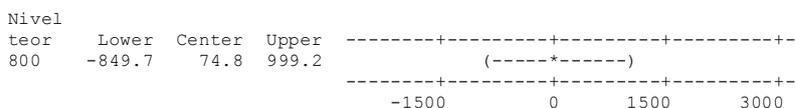
Nivel teor = <400 subtracted from:



Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:



Nivel teor = 400 subtracted from:



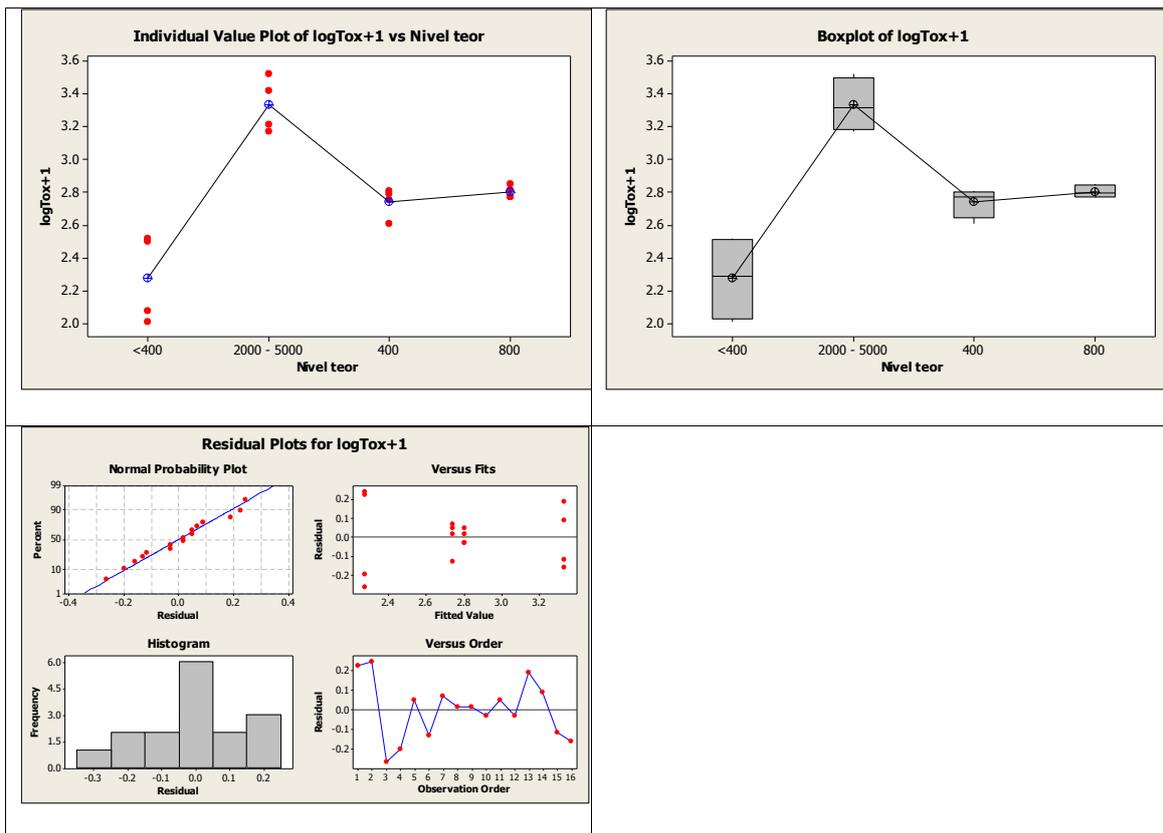
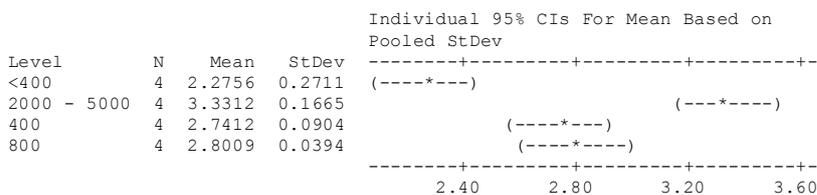


Fig.A53 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	3	2.2400	0.7467	26.92	0.000
Error	12	0.3329	0.0277		
Total	15	2.5728			

S = 0.1665 R-Sq = 87.06% R-Sq(adj) = 83.83%

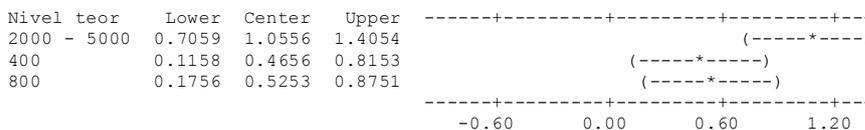


Pooled StDev = 0.1665

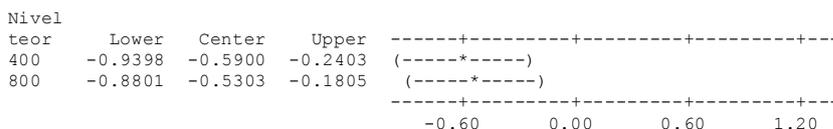
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 98.83%

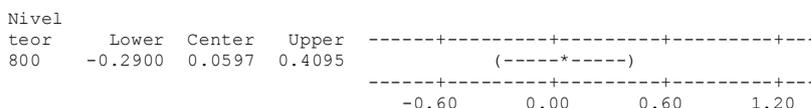
Nivel teor = <400 subtracted from:



Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:



Nivel teor = 400 subtracted from:



### Corruco. Comparación HPLC-Postcolumna- MBA (Andalucía)

Los dos métodos cuantifican la toxicidad de forma similar en los niveles medios. Sin embargo, a medida que la toxicidad aumenta, el bioensayo da respuestas más elevadas. La interacción método –nivel tóxico es claramente significativa, tanto cuando se utilizan los datos sin transformar como los transformados, lo cual se debe a dos razones. La primera de ellas es la ya comentada de la mayor respuesta del bioensayo en los niveles altos de toxicidad. La segunda es la estimación, por el método de HPLC-postcolumna de una toxicidad moderada en el nivel de toxicidad teórica más bajo que el bioensayo no puede detectar por estar por debajo de su límite de detección.

La dispersión de las estimaciones en los niveles intermedios no es sustancialmente mayor en ninguna de las técnicas y por tanto ninguna de ellas contribuye de mayor manera a la existencia de falsos positivos o negativos.

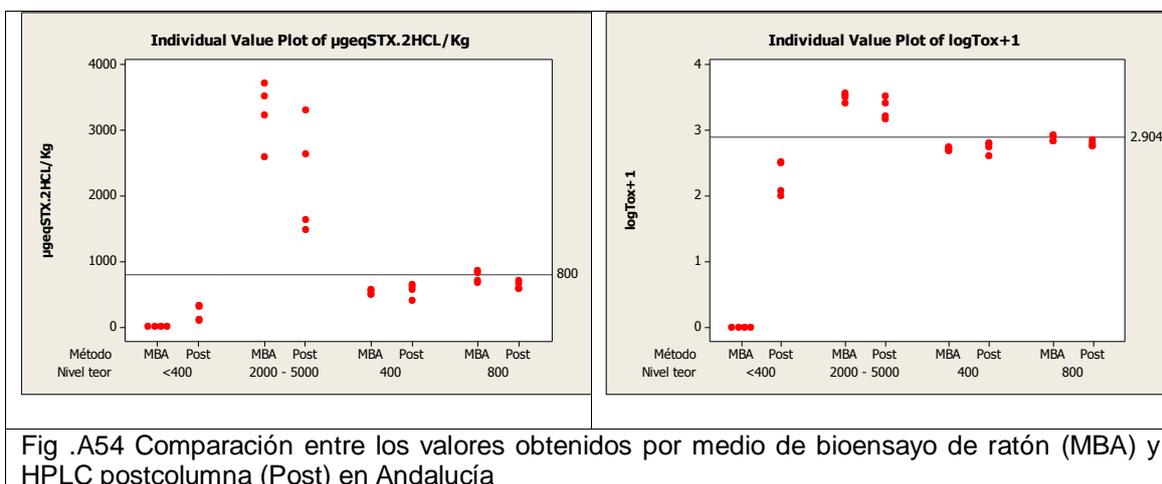


Fig .A54 Comparación entre los valores obtenidos por medio de bioensayo de ratón (MBA) y HPLC postcolumna (Post) en Andalucía

A diferencia de lo observado en el caso del mejillón, sin embargo, la subestimación, que como indica el coeficiente de regresión, es de aproximadamente el 37% ( $1-0.63 = 0.37$ ) tiene lugar de forma proporcional a lo largo de todas las concentraciones, ya que la relación es claramente lineal.

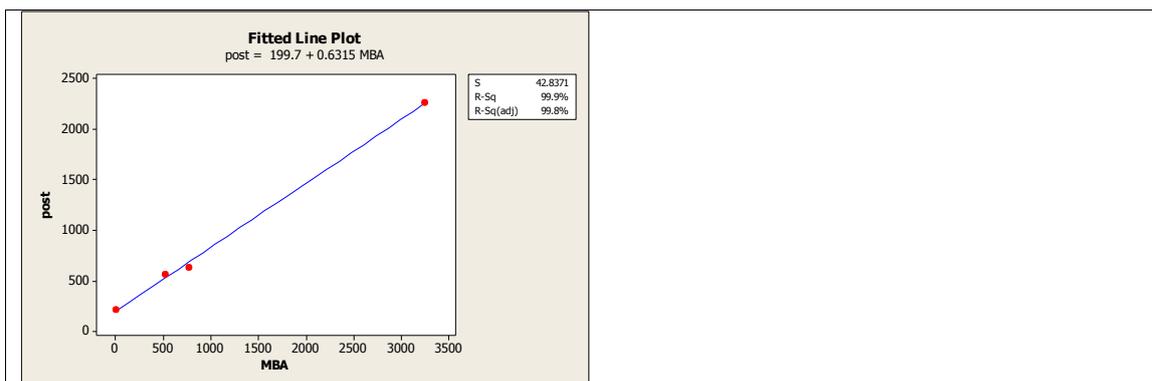


Fig A55 Relación lineal entre las estimaciones por bioensayo de ratón(MBA) y HPLC postcolumna (post), donde se aprecia un coeficiente de regresión por debajo de la unidad

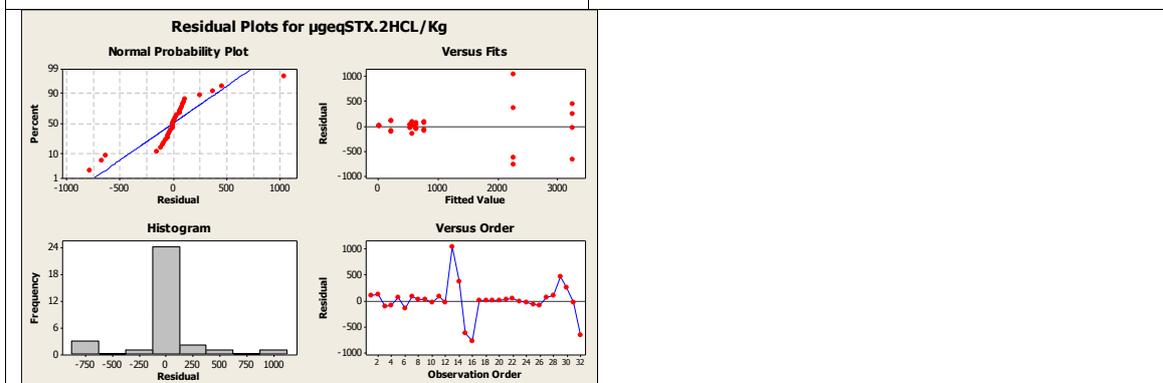
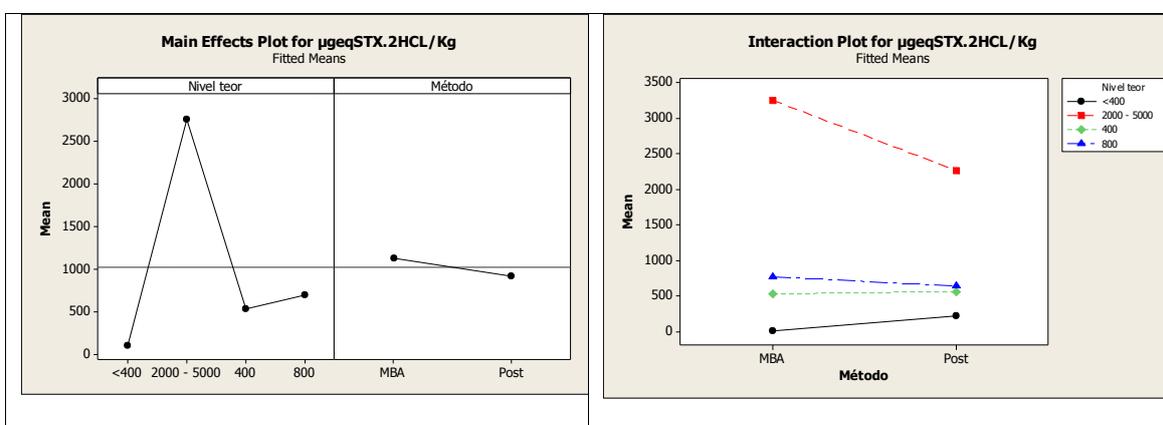


Fig.A56 Efectos principales (izdo), interacciones (dcho) y residuales dele análisis de la varianza de dos vías (Niveles teóricos de toxicidad y técnica empleada para la cuantificación)

**General Linear Model: µgeqSTX.2HCL/Kg versus Nivel teor, Método**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	4	<400, 2000 - 5000, 400, 800
Método	fixed	2	MBA, Post

Analysis of Variance for µgeqSTX.2HCL/Kg, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	3	33546101	33546101	11182034	87.44	0.000
Método	1	385662	385662	385662	3.02	0.095
Nivel teor*Método	3	1718816	1718816	572939	4.48	0.012
Error	24	3069309	3069309	127888		
Total	31	38719888				

S = 357.614 R-Sq = 92.07% R-Sq(adj) = 89.76%

Unusual Observations for  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$

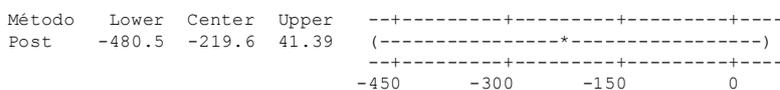
Obs	$\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
13	3307.00	2264.25	178.81	1042.75	3.37 R
15	1636.00	2264.25	178.81	-628.25	-2.03 R
16	1479.00	2264.25	178.81	-785.25	-2.54 R
32	2590.00	3257.50	178.81	-667.50	-2.16 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$

Nivel teor	Mean	SE Mean
<400	107.9	126.44
2000 - 5000	2760.9	126.44
400	541.8	126.44
800	700.4	126.44
Método		
MBA	1137.5	89.40
Post	917.9	89.40

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals  
 Response Variable  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$   
 All Pairwise Comparisons among Levels of Método  
 Método = MBA subtracted from:



Tukey Simultaneous Tests  
 Response Variable  $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$   
 All Pairwise Comparisons among Levels of Método  
 Método = MBA subtracted from:

Método	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Post	-219.6	126.4	-1.737	0.0953

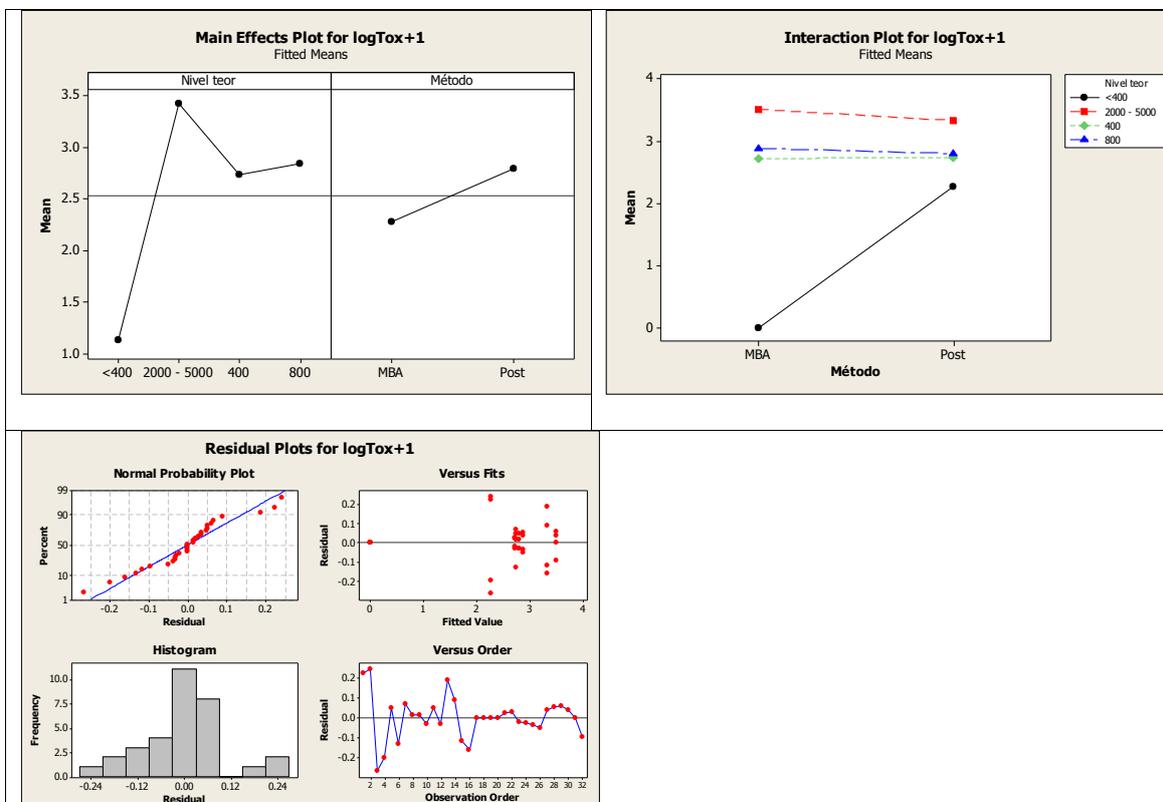


Fig. A57 La misma información que en la figura anterior pero utilizando datos transformados logarítmicamente.

**General Linear Model: logTox+1 versus Nivel teor, Método**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	4	<400, 2000 - 5000, 400, 800
Método	fixed	2	MBA, Post

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	3	22.9463	22.9463	7.6488	513.59	0.000
Método	1	2.0729	2.0729	2.0729	139.19	0.000
Nivel teor*Método	3	8.3614	8.3614	2.7871	187.15	0.000
Error	24	0.3574	0.3574	0.0149		
Total	31	33.7381				

S = 0.122035 R-Sq = 98.94% R-Sq(adj) = 98.63%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	2.49969	2.27559	0.06102	0.22410	2.12 R
2	2.51851	2.27559	0.06102	0.24293	2.30 R
3	2.00860	2.27559	0.06102	-0.26699	-2.53 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for logTox+1

Nivel teor	Mean	SE Mean
<400	1.138	0.04315
2000 - 5000	3.420	0.04315
400	2.731	0.04315
800	2.842	0.04315
Método	Mean	SE Mean
MBA	2.278	0.03051
Post	2.787	0.03051

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals

Response Variable logTox+1

All Pairwise Comparisons among Levels of Método

Método = MBA subtracted from:

Método	Lower	Center	Upper
Post	0.4200	0.5090	0.5981

-----+-----+-----+-----+  
 (------\*-----)  
 -----+-----+-----+-----+  
 0.450 0.500 0.550 0.600

Tukey Simultaneous Tests

Response Variable logTox+1

All Pairwise Comparisons among Levels of Método

Método = MBA subtracted from:

Método	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Post	0.5090	0.04315	11.80	0.0000

## Chirla con perfil *Gymnodinium catenatum* (Andalucía)

Las estimaciones de toxicidad de la Chirla por este método presentaron una dispersión muy considerable, lo que la hace notablemente insegura para el control. Incluso utilizando la dispersión estimada para el nivel teórico de 400, existe una probabilidad aproximada del 5% de que muestras para las que se estima el nivel de cierre (800) tengan en realidad una toxicidad superior a 2200. En número de falsos positivos y negativos sería además importante.

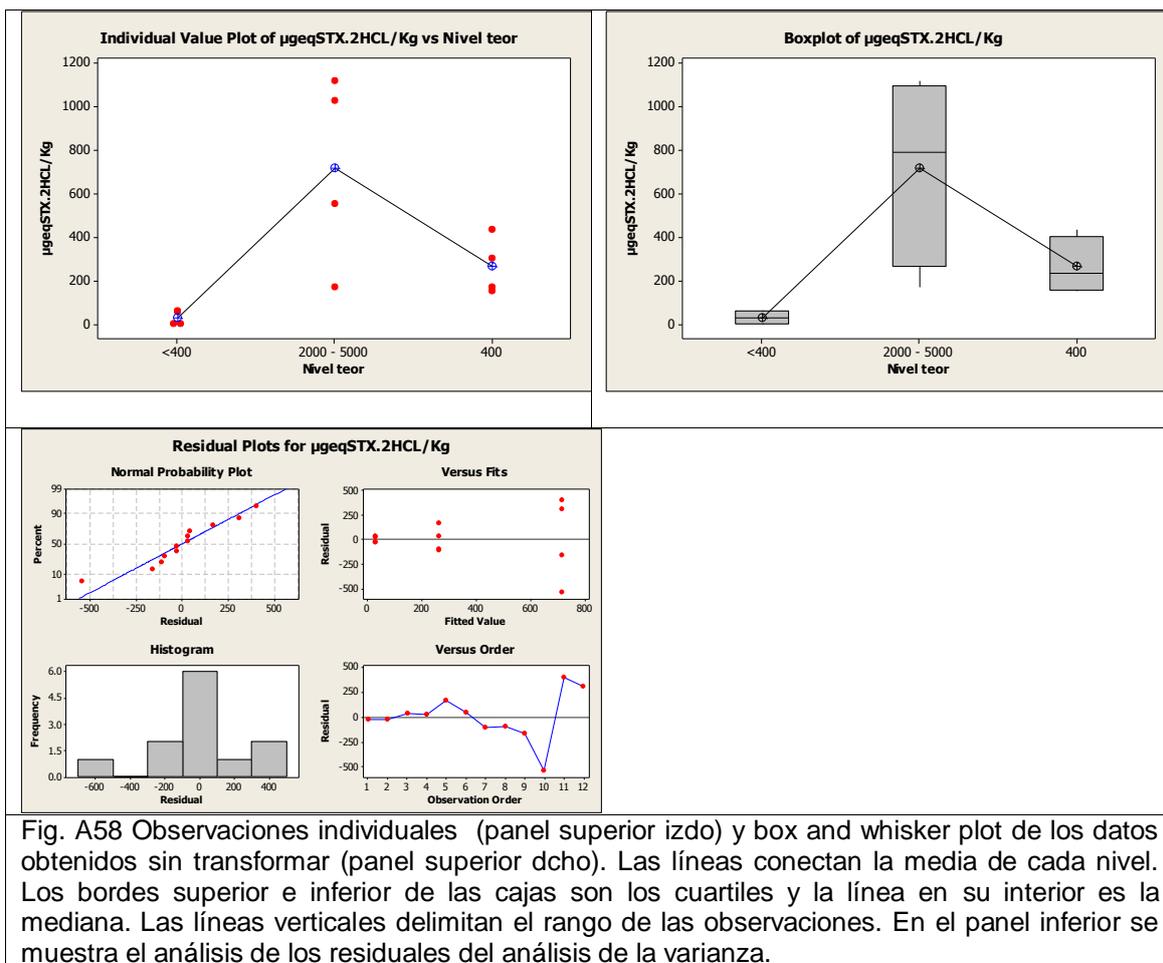


Fig. A58 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**Results for: Andalucía(Matriz = Chirla, Método = HPLC post-columna (OSH))**

**One-way ANOVA: µgeqSTX.2HCL/Kg versus Nivel teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	2	974861	487431	6.87	0.015
Error	9	638684	70965		
Total	11	1613545			

S = 266.4 R-Sq = 60.42% R-Sq(adj) = 51.62%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev
<400	4	29.3	33.8
2000 - 5000	4	716.0	440.9
400	4	263.8	131.7

Pooled StDev = 266.4

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 97.91%

Nivel teor = <400 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
2000 - 5000	160.6	686.8	1212.9
400	-291.6	234.5	760.6

Nivel teor = 2000 - 5000 subtracted from:

Nivel teor	Lower	Center	Upper
400	-978.4	-452.3	73.9

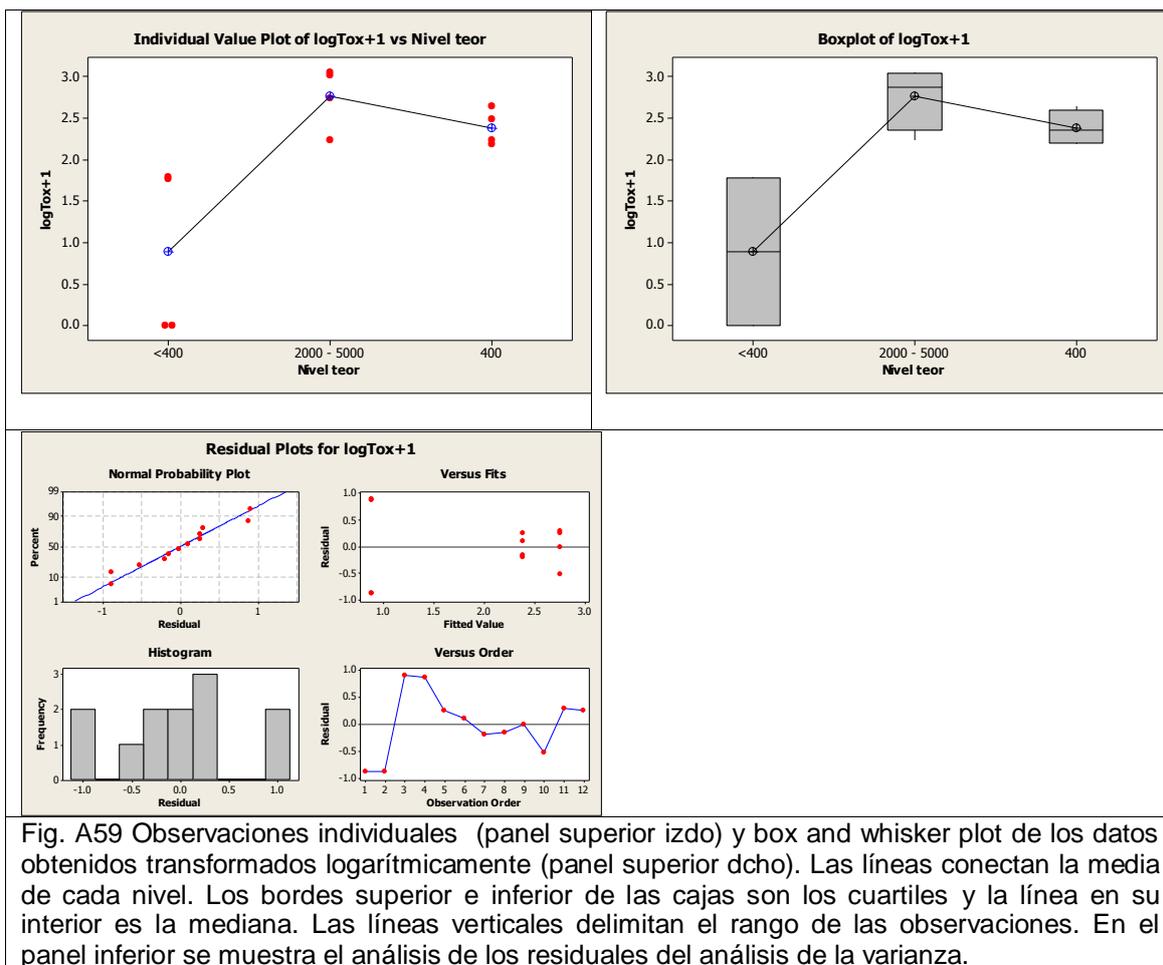


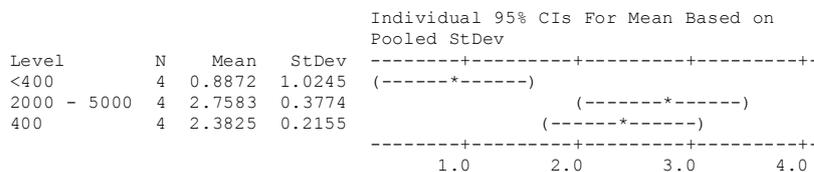
Fig. A59 Observaciones individuales (panel superior izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos transformados logarítmicamente (panel superior dcho). Las líneas conectan la media de cada nivel. Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones. En el panel inferior se muestra el análisis de los residuales del análisis de la varianza.

**Results for: Andalucía(Matriz = Chirla, Método = HPLC post-columna (OSH))**

**One-way ANOVA: logTox+1 versus Nivel teor**

Source	DF	SS	MS	F	P
Nivel teor	2	7.838	3.919	9.49	0.006
Error	9	3.715	0.413		
Total	11	11.553			

S = 0.6425 R-Sq = 67.84% R-Sq(adj) = 60.70%

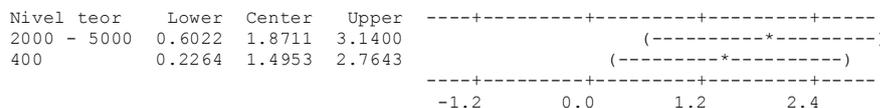


Pooled StDev = 0.6425

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons among Levels of Nivel teor

Individual confidence level = 97.91%

Nivel teor = <400 subtracted from:





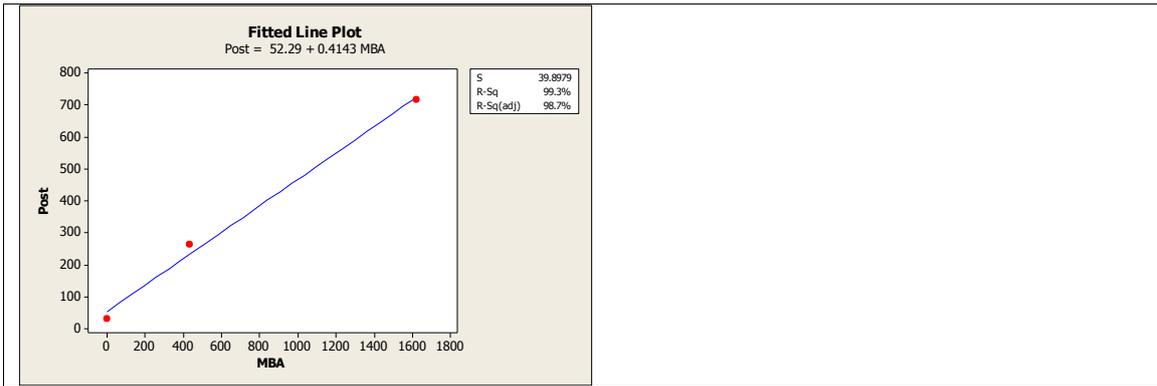


Fig. A61 Relación lineal entre las técnica de estimación de la toxicidad

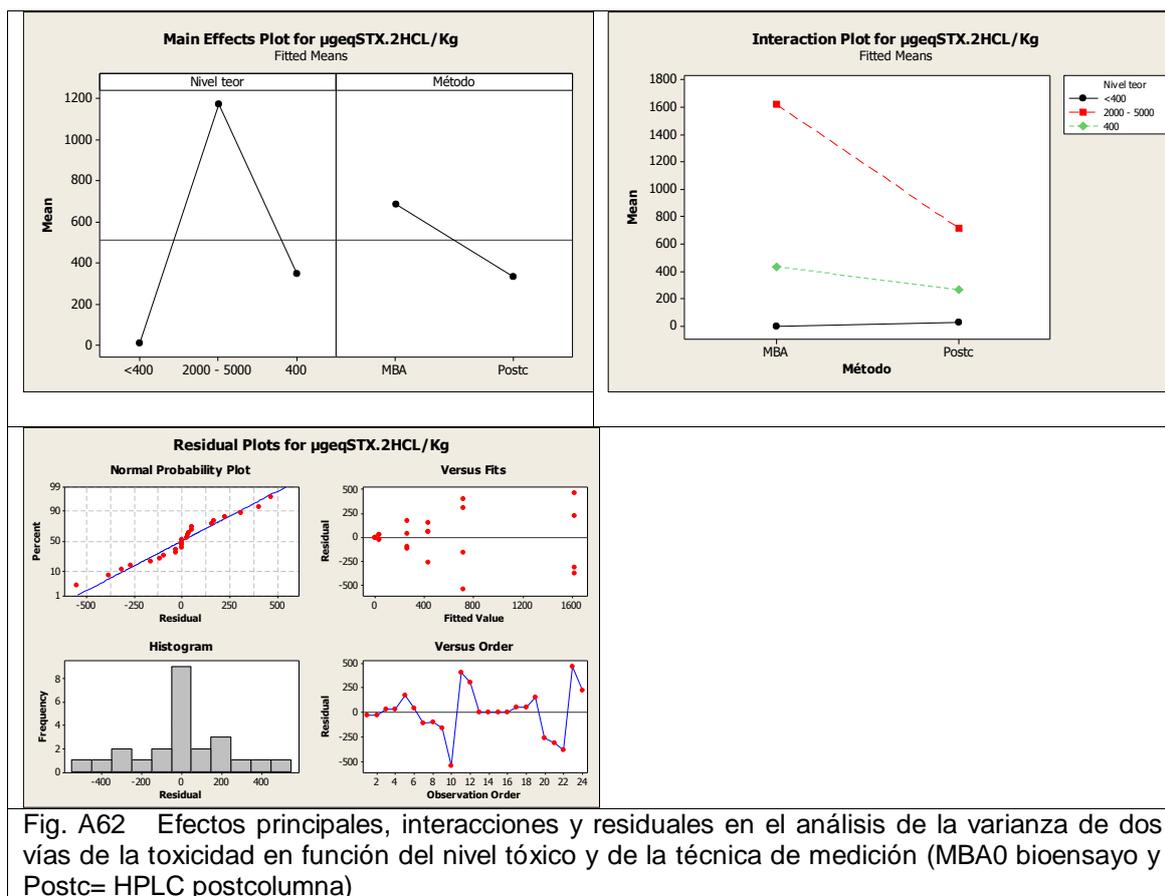


Fig. A62 Efectos principales, interacciones y residuales en el análisis de la varianza de dos vías de la toxicidad en función del nivel tóxico y de la técnica de medición (MBA0 bioensayo y Postc= HPLC postcolumna)

**General Linear Model: µgeqSTX.2HCL/Kg versus Nivel teor, Método**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	3	<400, 2000 - 5000, 400
Método	fixed	2	MBA, Postc

Analysis of Variance for µgeqSTX.2HCL/Kg, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	2	5647078	5647078	2823539	40.52	0.000
Método	1	732203	732203	732203	10.51	0.005
Nivel teor*Método	2	971304	971304	485652	6.97	0.006
Error	18	1254321	1254321	69685		
Total	23	8604906				

S = 263.978 R-Sq = 85.42% R-Sq(adj) = 81.37%

Unusual Observations for µgeqSTX.2HCL/Kg

Obs	µgeqSTX.2HCL/Kg	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
10	169.00	716.00	131.99	-547.00	-2.39 R
23	2090.00	1622.50	131.99	467.50	2.04 R

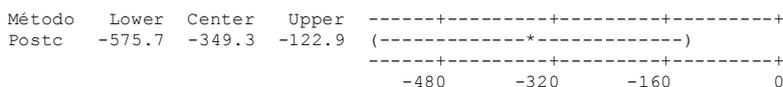
R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for µgeqSTX.2HCL/Kg

Nivel teor	Mean	SE Mean
<400	14.63	93.33
2000 - 5000	1169.25	93.33
400	349.13	93.33
Método		
MBA	685.67	76.20
Postc	336.33	76.20

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals  
Response Variable µgeqSTX.2HCL/Kg

All Pairwise Comparisons among Levels of Método  
 Método = MBA subtracted from:



Tukey Simultaneous Tests  
 Response Variable pgeqSTX.2HCL/Kg  
 All Pairwise Comparisons among Levels of Método  
 Método = MBA subtracted from:

Método	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Postc	-349.3	107.8	-3.242	0.0045

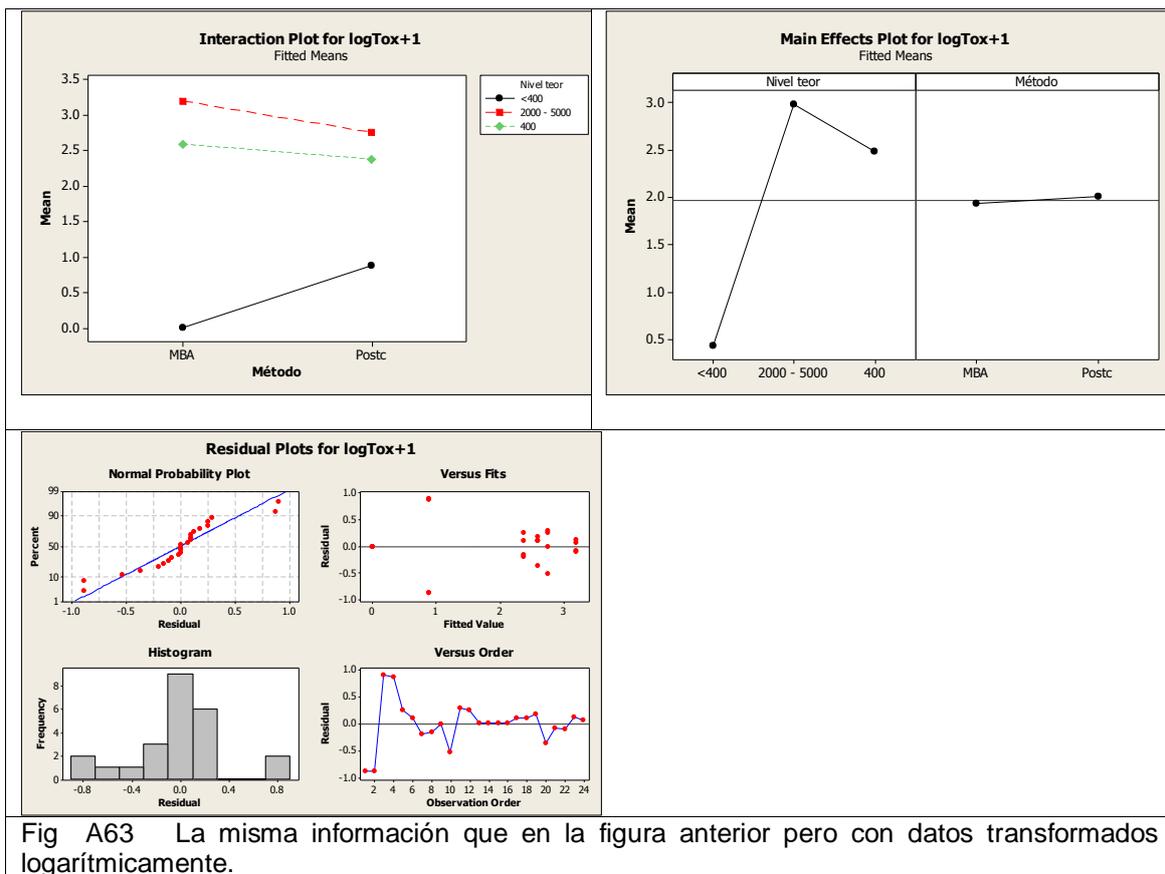


Fig A63 La misma información que en la figura anterior pero con datos transformados logarítmicamente.

**General Linear Model: logTox+1 versus Nivel teor, Método**

Factor	Type	Levels	Values
Nivel teor	fixed	3	<400, 2000 - 5000, 400
Método	fixed	2	MBA, Postc

Analysis of Variance for logTox+1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Nivel teor	2	28.9391	28.9391	14.4696	66.16	0.000
Método	1	0.0361	0.0361	0.0361	0.17	0.689
Nivel teor*Método	2	2.0186	2.0186	1.0093	4.61	0.024
Error	18	3.9367	3.9367	0.2187		
Total	23	34.9305				

S = 0.467657    R-Sq = 88.73%    R-Sq(adj) = 85.60%

Unusual Observations for logTox+1

Obs	logTox+1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
-----	----------	-----	--------	----------	----------

1	0.00000	0.88719	0.23383	-0.88719	-2.19 R
2	0.00000	0.88719	0.23383	-0.88719	-2.19 R
3	1.78533	0.88719	0.23383	0.89814	2.22 R
4	1.76343	0.88719	0.23383	0.87624	2.16 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means for logTox+1

Nivel teor	Mean	SE Mean
<400	0.4436	0.1653
2000 - 5000	2.9790	0.1653
400	2.4890	0.1653
Método		
MBA	1.9317	0.1350
Postc	2.0093	0.1350

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals  
Response Variable logTox+1  
All Pairwise Comparisons among Levels of Método  
Método = MBA subtracted from:

Método	Lower	Center	Upper	
Postc	-0.3235	0.07760	0.4787	(-----*-----)

-0.25      0.00      0.25      0.50

Tukey Simultaneous Tests  
Response Variable logTox+1  
All Pairwise Comparisons among Levels of Método  
Método = MBA subtracted from:

Método	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Postc	0.07760	0.1909	0.4065	0.6892

## Almeja con perfil *Gymnodinium catenatum* y comparación con MBA (Andalucía)

En el caso de la almeja, en en que únicamente fue posible trabajar con un nivel de toxicidad. La dispersión de las estimaciones fue moderada, aunque algo mayor que en bioensayo de ratón. La estimación por esta técnica es ligeramente más baja que por bioensayo (530 contra 555) pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

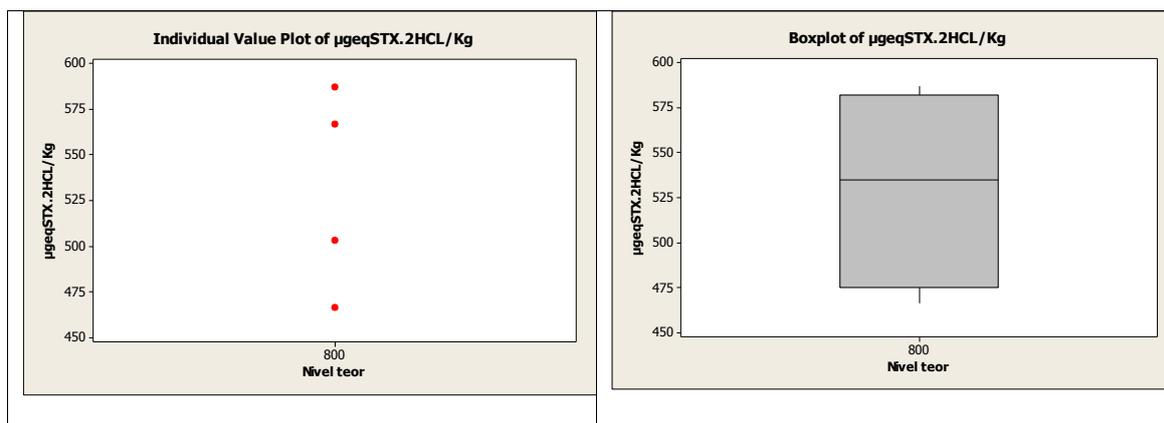


Fig. A63 Observaciones individuales (panel izdo) y box and whisker plot de los datos obtenidos sin transformar (panel dcho). Los bordes superior e inferior de las cajas son los cuartiles y la línea en su interior es la mediana. Las líneas verticales delimitan el rango de las observaciones.

### One-Sample T: µgeqSTX.2HCL/Kg

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% CI
$\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$	4	530.8	56.1	28.0	(441.5, 620.0)

## Tests Jellett

En todos los casos estudiados tanto en Andalucía como en Cataluña, los test Jellett dieron resultados positivos en todas las muestras con toxicidades de aproximadamente 400 en adelante, y negativos en las muestras que no tenían toxicidad o que la tenían extremadamente baja ( $<10 \mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$ ) y etiquetadas con nivel teórico  $<400$ . Únicamente se registraron dos excepciones. Un resultado positivo en una muestra teóricamente negativa y uno negativo en una muestra de alta toxicidad. Ambos se dieron en una tanda de determinaciones realizadas en Andalucía con muestras de mejillón con perfil de *Alexandrium minutum* procedente de Cataluña. Adicionalmente la repetición de las determinaciones en Andalucía, con algo más de cantidad de muestra extraída y con una extracción algo más enérgica (hervido) dio igualmente los resultados esperables, por lo que se ha de concluir que la discrepancia detectada no se debe al test en sí si no a una insuficiente extracción o a un fallo en la manipulación de las muestras.

Los resultados obtenidos suponen que, con los perfiles estudiados, los tests Jellett son seguros para detectar positivos de toxicidad pero dan un gran número de falsos positivos, ya que todas las muestras estudiadas que tienen niveles detectables por bioensayo de ratón incluso estando por debajo de los  $800 \mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$ , dan resultados positivos.

## Andalucía

### Chirla

Rows: Nivel teórico toxinas ( $\mu\text{g eq S}$ )  
 $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$  Columns: Resultados

	Negativo	Positivo	All
$<400$	4 100	0 0	4 100
2000 - 5000	0 0	2 100	2 100
400	0 0	4 100	4 100
All	4 40	6 60	10 100

Cell Contents: Count  
% of Row

### Corruco

Rows: Nivel teórico toxinas ( $\mu\text{g eq S}$ )  
 $\mu\text{geqSTX.2HCL/Kg}$  Columns: Resultados

	Negativo	Positivo	All
<400	4 100	0 0	4 100
2000 - 5000	0 0	2 100	2 100
400	0 0	4 100	4 100
All	4 40	6 60	10 100

Cell Contents:      Count  
                             % of Row

### Mejillón perfil *Gymnodinium catenatum*

Rows: Nivel teórico toxinas (µg eq S      Columns: Resultados  
µgeqSTX.2HCL/Kg

	Negativo	Positivo	All
<400	5 100.0	0 0.0	5 100.0
2000 - 5000	0 0.0	4 100.0	4 100.0
400	0 0.0	5 100.0	5 100.0
800	0 0.0	5 100.0	5 100.0
All	5 26.3	14 73.7	19 100.0

Cell Contents:      Count  
                             % of Row

### Mejillón con perfil de *Alexandrium*

Rows: Nivel teórico toxinas (µg eq S      Columns: Resultados  
µgeqSTX.2HCL/Kg

	Negativo	Positivo	All
<400	5 83.33	1 16.67	6 100.00
400	1 16.67	5 83.33	6 100.00
800	1 16.67	5 83.33	6 100.00
All	7 38.89	11 61.11	18 100.00

Cell Contents:      Count  
                             % of Row

## Cataluña

### Ostrón

Rows: Nivel Teor Columns: kit (positivo, negativo)

	Negativo	Positivo	All
<400	4 100.0	0 0.0	4 100.0
2500-5000	0 0.0	4 100.0	4 100.0
400	0 0.0	4 100.0	4 100.0
800	0 0.0	5 100.0	5 100.0
All	4 23.5	13 76.5	17 100.0

Cell Contents: Count  
% of Row

### Mejillón perfil *Gymnodinium catenatum*

Rows: Nivel Teor Columns: kit (positivo, negativo)

	Negativo	Positivo	All
<400	4 100.0	0 0.0	4 100.0
2500-5000	0 0.0	4 100.0	4 100.0
400	0 0.0	4 100.0	4 100.0
800	0 0.0	5 100.0	5 100.0
All	4 23.5	13 76.5	17 100.0

Cell Contents: Count  
% of Row

## Conservación de las muestras

Con el fin de presentar la valoración del efecto de la conservación de las muestras sobre el resultado final, se han comprobado las posibles diferencias de toxicidad entre muestras analizadas inmediatamente después de realizada la mezcla/homogeneización del material tóxico y muestras congeladas (a  $-20^{\circ}$  C) un mínimo de 15 días. Estas comprobaciones se realizaron para bioensayo de ratón y para HPLC- postcolumna en Andalucía y para HPLC-precolumna en Cataluña, y no se detectaron diferencias significativas. Sin embargo, un número reducido de muestras que se almacenaron a  $-20^{\circ}$  durante más de 150 días

mostraron toxicidades más bajas que las que se mantuvieron en otras condiciones, como se comentó en el apartado de análisis por el método de HPLC postcolumna en Andalucía. Puede concluirse, por tanto, que la conservación de la muestra no afecta al contenido tóxico, si el período con conservación no es muy prolongado (sin efecto al cabo de 40 días), lo cual es normalmente suficiente para la mayor parte de las actividades de los sistemas de control. La observación del efecto en la evaluación de toxicidad por el método de postcolumna de la conservación en congelado tras 150 días, está basada en un número reducido de muestras y debe ser evaluada adicionalmente.

## Conclusiones

### Bioensayo

Se detectan diferencias significativas entre laboratorios, aunque éstas son moderadas en los niveles próximos al cierre. La dispersión de los datos es, en general, mayor en los dos laboratorios que no realizan de forma intensa y continuada las determinaciones de toxicidad PSP por este método, por lo cual, es posible que, en la realidad, un uso óptimo del bioensayo requiera más formación, entrenamiento o práctica del personal encargado, que lo que habitualmente se asume.

La reproducibilidad ( y por tanto el porcentaje de falsos negativos y positivos) de los bioensayos varió con las especies , siendo en el corruco y el mejillón, por ejemplo, del mismo orden, pero existiendo 7 veces más variabilidad en los resultados de toxicidad en la chirla.

El perfil tóxico, sin embargo, no parece tener un efecto importante en la variabilidad de los resultados obtenidos por el bioensayo.

### HPLC con oxidación precolumna

Esta técnica, en promedio subestimó los valores de bioensayo de ratón en los dos laboratorios que la utilizaron. En promedio, la dispersión de las observaciones fue similar a la del bioensayo de ratón, aunque existieron diferencias significativas tanto en las estimaciones medias de toxicidad como en la dispersión entre los dos laboratorios que la utilizaron.

No parece existir un efecto significativo del perfil tóxico.

La utilización de esta técnica requeriría un calibrado detallado contra el bioensayo o con materiales tóxicos específicamente diseñados para esta calibración.

### HPLC con oxidación postcolumna

El método postcolumna utilizado por Andalucía (consistente en dos eluciones en modo isocrático) dió en mejillón resultados muy similares a los del bioensayo de ratón, sólo que con una subestimación relativa de la toxicidad mayor cuanto más alto fue el nivel tóxico (relación cuadrática, no lineal). La concordancia entre las dos técnicas fue buena en los niveles próximos al nivel de cierre.

La eficacia del método en relación al bioensayo depende considerablemente de la matriz biológica en la que se hallen las toxinas, ya que en el caso de la almeja

la subestimación es similar a la que se da en el mejillón, pero en corruco y chirla las subestimaciones son considerablemente mayores, rayando en el primer caso el 40% y en el segundo el 60.

Las dispersiones son, en general similares a las obtenidas con bioensayo.

El método postcolumna utilizado en Galicia, que prácticamente es el mismo que ha sido validado por AOAC, dio resultados francamente pobres con cualquiera de los dos perfiles de toxinas probados, pero especialmente con el de *Alexandrium minutum*. Los malos resultados obtenidos y la casi nula consistencia de los resultados obtenidos en los reanálisis de las mismas muestras después de unos meses parecen justificarse, al menos en parte por la presencia y aparición de contaminantes que interfieren con la estimación de la concentración de las toxinas, especialmente de la GTX1, y hacen que esta técnica sea en la actualidad inutilizable para el control de los bivalvos en España.

### Jellett Rapid Tests

Los kits de Jellett Rapid Tests detectaron toxicidad casi sin excepción en todas aquellas muestras probadas con respuesta detectable por bioensayo de ratón, es decir, con niveles aproximados de toxicidad de 400.

Igualmente, con una única excepción, las muestras que se consideraba que no contenían toxinas en cantidades apreciables, dieron resultados negativos.

Adicionalmente, las muestras discordantes una vez re-extraídas y vueltas a probar, dieron los resultados correctos, lo que indica que, con casi absoluta seguridad, los tests funcionan correctamente y detecta toxicidades iguales o incluso menores que 400 con los perfiles tóxicos habituales en *Alexandrium* del Mediterráneo y *Gymnodinium catenatum*.

Esta sensibilidad supone que con estos perfiles el número de falsos positivos debe ser muy elevado y por tanto que su uso en un sistema de control debe restringirse al cribado de muestras, dejando a otras técnicas la obtención de resultados definitivos.

### Efecto de la conservación de las muestras

No se han encontrado diferencias ni por bioensayo de ratón ni por HPLC-precolumna ni HPLC-postcolumna debidas a la conservación de la muestra en congelación a -20°C. Si bien un número reducido de muestras mantenidas en esas condiciones durante más de 150 días dieron estimaciones de toxicidad considerablemente menores que las procesadas sin congelar o que las mantenidas en congelación menos de 40 días.