

Biotoxinas marinas

**ESTUDIO FAO:
ALIMENTACIÓN Y
NUTRICIÓN**

**Organización de
las Naciones
Unidas para la
Agricultura y la
Alimentación**



Los puntos de vista expresados en esta publicación son los del autor (res) y no reflejan necesariamente los de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ni los de la Organización Mundial de la Salud.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación o de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica o nivel de desarrollo de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites. La palabra “países” en el texto debe entenderse como refiriéndose sin distinción alguna a países, territorios y áreas.

Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión del material contenido en este producto informativo para fines educativos u otros fines no comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor, siempre que se especifique claramente la fuente. Se prohíbe la reproducción del material contenido en este producto informativo para reventa u otros fines comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor. Las peticiones para obtener tal autorización deberán dirigirse al Jefe del Servicio de Gestión de las Publicaciones de la Dirección de Información de la FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia, o por correo electrónico a copyright@fao.org

© FAO 2005

Índice

1.	Introducción	1
2.	Intoxicación paralítica por mariscos (PSP)	5
2.1	Estructuras químicas y propiedades	5
2.2	Métodos de análisis	6
2.3	Organismos fuente y habitat	14
2.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	18
2.5	Toxicidad de las toxinas PSP	24
2.6	Prevención de la intoxicación por PSP	32
2.7	Casos y brotes de PSP	36
2.8	Reglamentación y seguimiento	49
3.	Intoxicación diarreica por mariscos (DSP).....	53
3.1	Estructuras químicas y propiedades	53
3.2	Métodos de análisis	57
3.3	Organismos fuente y habitat	66
3.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	68
3.5	Toxicidad de las toxinas DSP	71
3.6	Prevención de la intoxicación por DSP	79
3.7	Casos y brotes de DSP	81
3.8	Reglamentación y seguimiento	92
4.	Intoxicación amnésica por mariscos (ASP)	97
4.1	Estructuras químicas y propiedades	97
4.2	Métodos de análisis	99
4.3	Organismos fuente y habitat	105
4.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	110
4.5	Toxicidad de las toxinas ASP	114
4.6	Prevención de la intoxicación por ASP	121
4.7	Casos y brotes de ASP	123
4.8	Reglamentación y seguimiento	133
5.	Intoxicación neurológica por mariscos (NSP)	137
5.1	Estructuras químicas y propiedades	137
5.2	Métodos de análisis	140
5.3	Organismos fuente y habitat	145
5.4	Presencia y acumulación en frutos del mar	148
5.5	Toxicidad de las toxinas NSP	150
5.6	Prevención de la intoxicación por NSP	161
5.7	Casos y brotes de NSP	164
5.8	Reglamentación y seguimiento	170

6.	Intoxicación azaspiracida por mariscos (AZP)	173
6.1	Estructuras químicas y propiedades.....	173
6.2	Métodos de análisis.....	174
6.3	Organismos fuente y habitat	176
6.4	Presencia y acumulación en frutos del mar.....	177
6.5	Toxicidad de las toxinas AZP.....	178
6.6	Prevención de la intoxicación por AZP	180
6.7	Casos y brotes de AZP.....	181
6.8	Reglamentación y seguimiento	184
7.	Intoxicación ciguatera por pescados (CFP)	185
7.1	Estructuras químicas y propiedades.....	185
7.2	Métodos de análisis.....	187
7.3	Organismos fuente y habitat	192
7.4	Presencia y acumulación en frutos del mar.....	194
7.5	Toxicidad de las toxinas CFP	197
7.6	Prevención de la intoxicación por CFP.....	206
7.7	Casos y brotes de CFP	207
7.8	Reglamentación y seguimiento	217
8.	Evaluación de riesgos	219
8.1	Evaluación de riesgos para la intoxicación parálitica por mariscos (PSP).....	219
8.2	Evaluación de riesgos para la intoxicación diarreica por mariscos (DSP)	219
8.3	Evaluación de riesgos para la intoxicación amnésica por mariscos (ASP)	221
8.4	Evaluación de riesgos para la intoxicación neurológica por mariscos (NSP)	221
8.5	Evaluación de riesgos para la intoxicación azaspiracido por mariscos (AZP)	221
8.6	Evaluación de riesgos para la intoxicación ciguatera en pescado (CFP).....	222
8.7	Comentarios finales	222
9.	Conclusiones y recomendaciones	223
9.1	Conclusiones	223
9.2	Recomendaciones	227
	Referencias	229

Figuras

Figura 1.1 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 1.2 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 2.1 Estructuras químicas de las toxinas PSP

Figura 2.2 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 2.3 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 3.1 Estructuras químicas del ácido ocadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas

Figura 3.2 Estructuras químicas de yesotoxinas y adriatoxina

Figura 3.3 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 3.4 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 4.1 Estructuras químicas del ácido domoico y sus isómeros

Figura 4.2 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 4.3 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 5.1 Estructuras químicas de las brevetoxinas de tipo A y B

Figura 5.2 Estructuras químicas de los análogos de las brevetoxinas BTX-B1, -B2 y -B4 aisladas de mariscos contaminados

Figura 5.3 Estructura química del análogo de la brevetoxina BTX-B3 aislado de mariscos contaminados

Figura 5.4 Toxina ictiotóxica fosforada aislada del *G. breve*

Figura 5.5 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 6.1 Estructuras químicas de las azaspirácidas

Figura 6.2 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Figura 7.1 Estructura de las ciguatoxinas (CTXs) del Pacífico (P) y del Caribe (C)

Figura 7.2 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000

Cuadros

Cuadro 2.1 Mariscos con toxinas PSP

Cuadro 2.2 Toxicidad aguda de la STX en ratones

Cuadro 2.3 DL50 oral de la STX en otras especies

Cuadro 2.4 Toxicidad relativa de las PSP en el bioensayo en ratón

Cuadro 3.1 Toxicidad aguda (dosis letal) de la administración intraperitoneal de las DSP en ratones

Cuadro 5.1 Toxicidad aguda de las brevetoxinas en ratones suizos

Cuadro 5.2 Toxicidad intraperitoneal aguda de análogos de la brevetoxina en ratones

Cuadro 6.1 Distribución de las toxinas AZP en tejidos de mejillones

Cuadro 6.2 Niveles de AZAs en mejillones y ostras de Irlanda

Cuadro 7.1 Ejemplos de peces asociados con la ciguatera

Cuadro 7.2 Efectos de las ciguatoxinas (CTXs), gambiertoxinas (GTXs) y maitotoxinas (MTXs) administradas intraperitonealmente (i.p.) a ratones de (18-)20 g

Agradecimientos

Este trabajo fue elaborado en el marco del proyecto “Toxinas Naturales” (Proyecto RIVM 310301), implementado por el Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente, de los Países Bajos, en nombre de la Autoridad de Alimentos y de Seguridad de los Productos del Consumidor, Países Bajos.

La FAO expresa su agradecimiento a los autores H.P. Van Egmond, M.E. Van Apeldoorn y G.J.A. Speijers del Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente de los Países Bajos, por su valioso trabajo. Se agradecen las contribuciones de G. Van de Werken (Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente) y R.W. Stephany (Universidad de Utrecht e Instituto Nacional de Salud Pública y el Medio Ambiente). Un especial agradecimiento para D.G. Groothuis (Autoridad de Alimentos y de Seguridad de los Productos del Consumidor) por facilitar y apoyar de manera continúa las actividades resultantes en este trabajo. Se agradece, asimismo, a C. Bélin, Ifremer (Nantes, Francia) por proporcionar mapas de monitoreo de las algas tóxicas y de la presencia de biotoxinas marinas en las aguas costeras de los países miembro del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM). Finalmente la FAO agradece a todos los países que contribuyeron con este trabajo recogiendo y proporcionando valiosos datos e informaciones.

Prólogo

La FAO publica este Estudio de Alimentación y Nutrición sobre Biotoxinas Marinas como un esfuerzo para apoyar el intercambio de informaciones científicas en un tema importante para la inocuidad alimentaria a nivel mundial. Las biotoxinas marinas representan una amenaza importante y creciente para la salud humana en muchas zonas del mundo. El impacto se manifiesta como intoxicaciones en los seres humanos que incluso pueden conducir a la muerte, en mortandades masivas de mariscos o pescados y en la muerte de animales y aves marinos por ingerir mariscos o pescados contaminados.

Se ofrece una extensa revisión de diferentes aspectos vinculados con cinco síndromes de intoxicación por mariscos (intoxicación paralítica por mariscos, intoxicación diarreica por mariscos, intoxicación amnésica por mariscos, intoxicación neurológica por mariscos, intoxicación azaspirácida por mariscos), además del síndrome de intoxicación por pescado (intoxicación por ciguatera). Se discuten en detalle diversos aspectos de estos síndromes, incluso las toxinas responsables producidas por organismos marinos, las estructuras químicas y los métodos analíticos empleados para las toxinas, la presencia y el hábitat de los organismos productores de toxinas, estudios de caso y los reglamentos vigentes. Basado en este análisis, se hace una evaluación de riesgos para cada una de las diferentes toxinas y se elaboran recomendaciones para una mejor gestión de riesgos que permita reducir los efectos nocivos de estas toxinas en la salud pública.

Este estudio destaca las dificultades de una evaluación de riesgos basada en criterios científicos por la falta de datos toxicológicos y de exposición a diferentes toxinas marinas. Los niveles de tolerancia válidos actualmente para las ficotoxinas generalmente se basan en datos de casos de intoxicación en seres humanos. Sin embargo, esta información es pocas veces precisa y completa, habitualmente restringida a toxicidad aguda. En consecuencia, debe prestarse creciente atención a extender y mejorar futuras iniciativas para el seguimiento, la detección y el intercambio de opiniones sobre las biotoxinas marinas de forma de reducir los riesgos a la salud pública asociados con el consumo de mariscos y pescados contaminados.

Abreviaturas

AOAC	Asociación de Químicos Analistas Oficiales
ASP	Intoxicación amnésica por mariscos
AZA	Azaspiracida
AZP	Intoxicación azaspiracida por mariscos
BTX	Análogos de las brevetoxinas, metabolitos formados en peces
CCF	Cromatografía en capa fina
C-CTX	Ciguatoxina caribeña
CE	Comisión Europea
CEN	Comité Europeo de Normalización
CFP	Intoxicación ciguatera por pescado
CG	Cromatografía de gases
CID (= CAD)	Disociación inducida por colisión (= descomposición activada por colisión)
CIEM	Consejo Internacional para la Exploración del Mar
CL	Cromatografía líquida
CL-DF	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia
CL-EM	Cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas
CL-ISP-EM	CL-EM de nebulización iónica
CL-UV	Cromatografía líquida con detector ultravioleta
CTX	Ciguatoxina
CZE	Electroforesis de zona capilar
DA	Acido domoico
DAP	Intoxicación por ácido domoico
DSP	Intoxicación diarreica por mariscos
DTX	Dinofisistoxina
ECA	Electroforésis capilar
EIE	Enzimo inmuno ensayo
ELISA	Ensayo Relacionado con Enzimas Inmuno Absorbente
EM	Espectrometría de masas
EM/EM	Espectrometría de masas en tandem
EM ⁿ	EM de tandem múltiple
ENSO	Oscilación Meridional de El Niño
ESI	Ionización por electronebulización (electrospray)
FAB	Bombardeo con átomos rápidos

FIA	Análisis por inyección de flujo
GNTX	Goniautoxina
GTX	Gambiertoquina
HILIC	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica
HP	Hepatopáncreas
IAC	Columnas de inmuno afinidad
KB células	Línea celular humana derivada de un carcinoma epidermoide
LCR	Laboratorio Comunitario de Referencia
LD	Límite de detección
LNR	Laboratorios Nacionales de Referencia
LOAEL	Nivel mínimo con efecto adverso observable
MAB	Anticuerpos monoclonales
MEKC	Cromatografía electrocinética capilar micelar
MIA	Ensayo con inmunoesferas de membrana
MTX	Maitotoxina
N : P	Relación Nitrógeno:fósforo
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
NSP	Intoxicación neurológica por mariscos
OA	Acido ocadaico
OCR	Oficina Comunitaria de Referencia
PbTx	Brevetoxina
pc	Peso corporal
P-CTX	Ciguatoxina del Pacifico
PSP	Intoxicación parálitica por mariscos
PTX	Pectenotoxina
PTX2SA	Acido pectenotoxina-2 seco
RIE	Radioinmunoensayo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAX-SPE	Extracción en fase sólida-Intercambio aniónico fuerte
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SIM (= SIR)	Seguimiento con ión selectivo
SIR (= SIM)	Registro con ión selectivo
SMT	Programa de Normas, Medidas y Ensayos
SPIA	Ensayo con inmunoesferas en fase sólida
SRM	Seguimiento selectivo de reacción (una técnica EM/EM similar a la SIM)

STX	Saxitoxina
STXOL	Saxitoxinol
TDI	Ingesta diaria tolerable
UV	Ultravioleta (Detección)
Activación de banda ancha	Un tipo de excitación de resonancia (en EM de captura iónica) en la que el voltaje RF se aplica a una ventana de masa sustancialmente más ancha que la ventana iónica padre.
YTX	Yesotoxina

1. Introducción

Las algas planctónicas microscópicas de los océanos del mundo resultan críticas para los mariscos bivalvos que se alimentan por filtración (ostras, mejillones, vieiras, almejas), así como para las larvas de crustáceos y peces con escamas comercialmente importantes. De las 5 000 especies de algas marinas existentes, aproximadamente 300 pueden a veces presentarse en cantidades tan elevadas (floraciones) que decoloran la superficie del mar, en las denominadas “mareas rojas” (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998). La palabra “floración” se emplea para indicar el crecimiento explosivo de cualquiera de estos organismos, cuyo color puede variar del rojo indicado comúnmente (las denominadas “mareas rojas”) a diferentes tonalidades de amarillo, verde, marrón o azul según el tipo de protista, su profundidades y concentración. La denominación corriente de “marea roja” resulta del hecho que a menudo cantidades masivas de organismos se presentan como franjas rojas sobre la superficie del agua (Bower *et al.*, 1981). No están aun totalmente aclaradas las condiciones para la floración de un alga, pero influyen probablemente sobre el fenómeno circunstancias climáticas e hidrográficas (Van Egmond y Speijers, 1999). Los crecimientos explosivos ocurren a veces al cambiar las condiciones climáticas, pero otras causales agregadas pueden ser variaciones en las corrientes verticales, la temperatura, transparencia, turbulencia o salinidad de las aguas, la concentración de nutrientes disueltos, los vientos o la iluminación superficial (Bower *et al.*, 1981).

No existen razones para suponer que las intoxicaciones con mariscos puedan predecirse a partir de las propiedades de la zona. Las mareas rojas a menudo ocurren cuando aparece una capa superficial estratificada sobre las aguas más frías y ricas en nutrientes como consecuencia del calentamiento o por desplazamientos de agua dulce. Las algas de crecimiento veloz agotan rápidamente los nutrientes en la capa superior, dejando sólo nitrógeno y fósforo por debajo de la superficie de éstas, en la denominada picnoclina. Las algas sin movilidad no acceden fácilmente a esta capa, pero las móviles, como los dinoflagelados, pueden reproducirse aceleradamente. Muchas nadan a velocidades superiores a los 10 metros diarios, y algunas migran verticalmente todos los días; de día habitan en la superficie, como tomando el sol y, por la noche descienden a la picnoclina para absorber nutrientes. Como resultado pueden súbitamente aparecer floraciones sobre las aguas superficiales, desprovistas de nutrientes, y en apariencia incapaces de sostener crecimientos tan prolíficos (Anderson, 1994).

Hay suficientes evidencias, de diferentes zonas, (como el puerto de Hong Kong, el Mar Interior de Seto en Japón y aguas costeras del norte de Europa) que la “eutroficación cultural” resultante de aguas domésticas, industriales y de desechos agrícolas puede estimular floraciones perjudiciales de algas. Es incluso posible, que especies de algas no habitualmente tóxicas, se conviertan en tales por exposición a regímenes con nutrientes atípicos (por ej. deficiencia de fosfatos) resultantes de una eutroficación cultural. Los cambios en los usos de la tierra, como la deforestación, pueden también causar cambios en la composición de las especies del fitoplancton, aumentando las concentraciones de sustancias húmicas en los desplazamientos de tierras. La precipitación ácida aumenta aun más la movilidad en los suelos de las sustancias húmicas y de los metales traza (Hallegraeff, 1993).

Algunas especies producen decoloraciones del agua básicamente inocuas. Otras especies, en cambio, pueden florecer tan densamente bajo condiciones excepcionales en bahías protegidas, que matan indiscriminadamente peces e invertebrados agotando el oxígeno. Otras especies de algas pueden ser perjudiciales para peces e invertebrados (especialmente en sistemas de acuicultura intensivos) dañando o tapando sus agallas. Hay, además unas 75, especies de micro algas capaces de producir poderosas toxinas (denominadas ficotoxinas) que se desplazan por la cadena alimentaría (moluscos, crustáceos y peces de escama) para ser consumidos finalmente por seres humanos, provocando diversas enfermedades gastrointestinales y neurológicas. Algunas especies de algas ya producen toxinas poco concentradas, de unos pocos cientos de células por litro, en tanto que otras deben contar con millones de células por litro, para resultar de alguna manera perjudiciales. La mayoría de las especies perjudiciales tiene patrones de distribución limitados, aunque algunas lo están por todo el mundo (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998).

No resulta claro porque producen toxinas algunas especies de microalgas. Las toxinas son metabolitos secundarios sin papel explícito en la economía interna de los organismos productores y con actividades muy específicas en mamíferos. Son probablemente utilizadas por los organismos productores como una forma de luchar por espacios, combatir la predación o como defensa contra un crecimiento desmesurado de otros organismos (Botana *et al.*, 1996).

Durante las dos últimas décadas, ha aumentado la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las floraciones de algas perjudiciales, así como la de los compuestos tóxicos presentes en la cadena alimentaria marina. Se han ofrecido diferentes explicaciones para esta tendencia, como una mayor concientización a nivel científico de las especies de algas tóxicas, una mayor utilización de las aguas costeras en acuicultura, la transferencia de mariscos de una zona a otra, la eutroficación cultural de aguas domésticas, industriales y de desechos agrícolas, mayor movilidad de las sustancias húmicas y metales traza desde el suelo por deforestación y/o precipitaciones ácidas (lluvia ácida), y condiciones climáticas poco comunes (Hallegraeff *et al.*, 1995). Además, se realiza actualmente la vigilancia de especies tóxicas de algas y/o mariscos y peces en diversas zonas costeras del mundo. Las Figuras 1.1 y 1.2 ilustran la vigilancia de las aguas costeras de países europeos y norteamericanos en el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM).¹ Otra posible explicación de la creciente tendencia de aparición de floraciones de algas perjudiciales es el traslado de quistes en reposo de dinoflagelados, especialmente desde productores de toxina paralítica de mariscos (McMinn *et al.*, 1997), en las aguas de lastre de los barcos o por el movimiento de poblaciones de mariscos de una zona a otra (Hallegraeff *et al.*, 1995).

El quistes en reposo o hipnozígote es la forma inmóvil de algunos dinoflagelados. Estos quistes se hunden hasta el fondo del mar, acumulándose en el límite entre agua y sedimento donde invernan. Cuando vuelven a darse condiciones favorables de crecimiento, los quistes pueden germinar y volver a inocular el agua con células nadadoras que pueden florecer posteriormente. De esta manera se asegura la supervivencia de algunos dinoflagelados de una estación a la siguiente (Mons *et al.*, 1998).

Los cambios del agua de lastre de los barcos cargada en un puerto abierto, por agua de mar abierto en medio del océano, puede resultar parcialmente eficaz para controlar no sólo quistes sino dinoflagelados y diatomeas perjudiciales. La descarga incompleta del agua y sedimentos de los tanques de lastre durante la operación de recarga causa la eliminación incompleta de los organismos perjudiciales (Zhang y Dickman, 1999). Sin embargo, los cambios en mares regionales (por ejemplo el Mar del Norte, el Mar de Irlanda el Canal de la Mancha) son menos eficientes que los realizados con aguas oceánicas. Los cambios en aguas regionales pueden disminuir los riesgos de aguas contaminadas de puertos europeos, pero resultar en el traslado de especies de fitoplancton potencialmente peligrosas de estas zonas (Macdonald y Davidson, 1998)

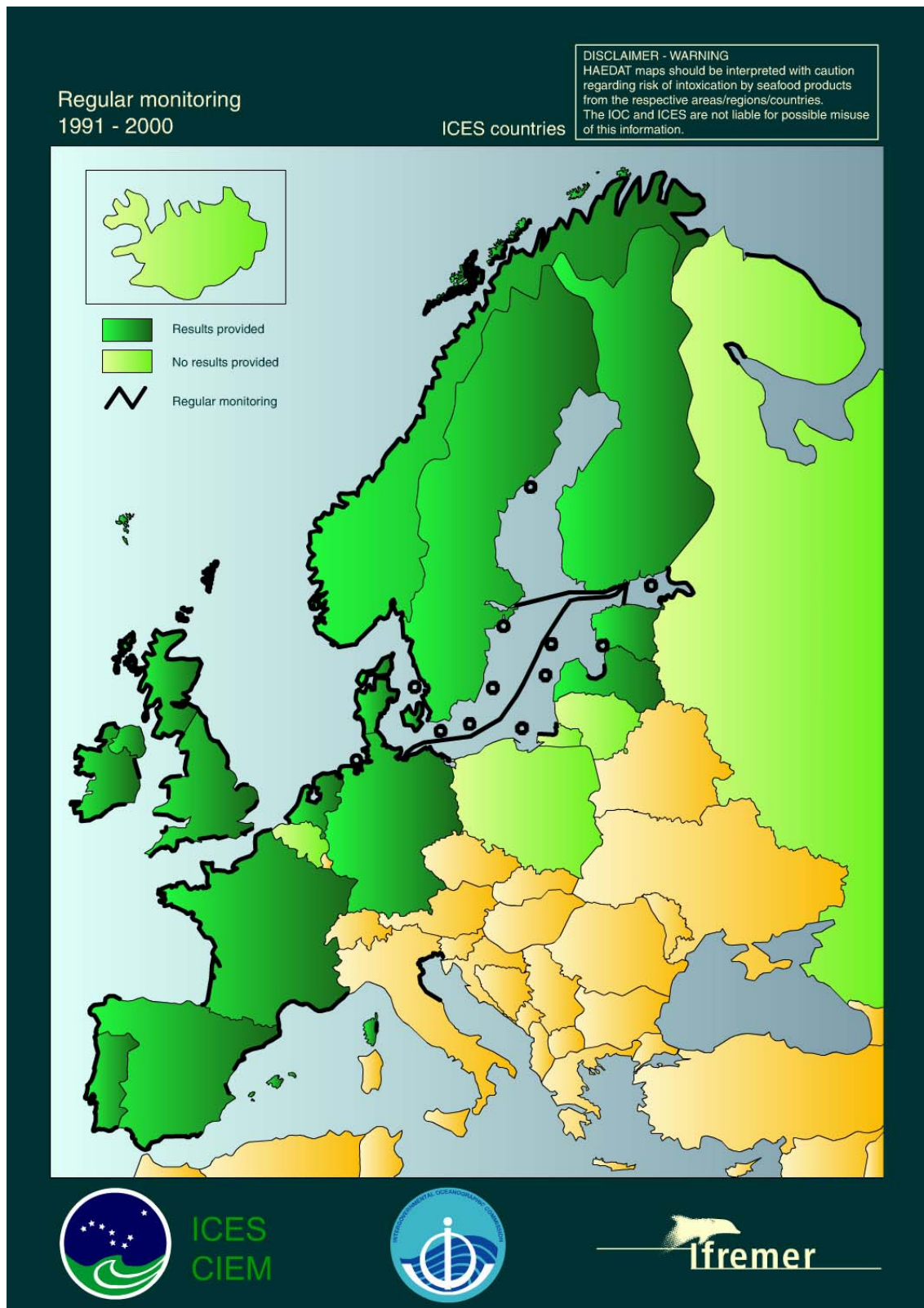
Las ficotoxinas marinas más importantes son las toxinas de mariscos y las ciguatoxinas. Hasta ahora, se distinguen cinco grupos de toxinas de mariscos, denominadas:

- i. toxinas paralíticas de mariscos, causantes de la intoxicación paralítica por mariscos (PSP);
- ii. toxinas de mariscos diarreicas, causantes de intoxicación diarreica por mariscos (DSP);
- iii. toxinas de mariscos amnésicas, causantes de intoxicación amnésica por mariscos (ASP);
- iv. toxinas de mariscos neurotóxicas, causantes de intoxicación neurotóxica por mariscos (NSP); y
- v. toxinas de mariscos azaspirácidas, causantes de intoxicación azaspirácida por mariscos (AZP) (Hallegraeff *et al.*, 1995; Lindahl, 1998).

Las ciguatoxinas causan intoxicación por ciguatera en pescados (CFP). Las PSP, DSP, ASP, NSP y AZP son causadas por seres humanos que consumen productos de mariscos contaminados, en tanto que la CFP es causada por el consumo de pescados marinos carnívoros tropicales y sub tropicales que han acumulado la toxina de la ciguatera a lo largo de la cadena alimentaria. En esta publicación se presentarán diversos aspectos de estas toxinas.

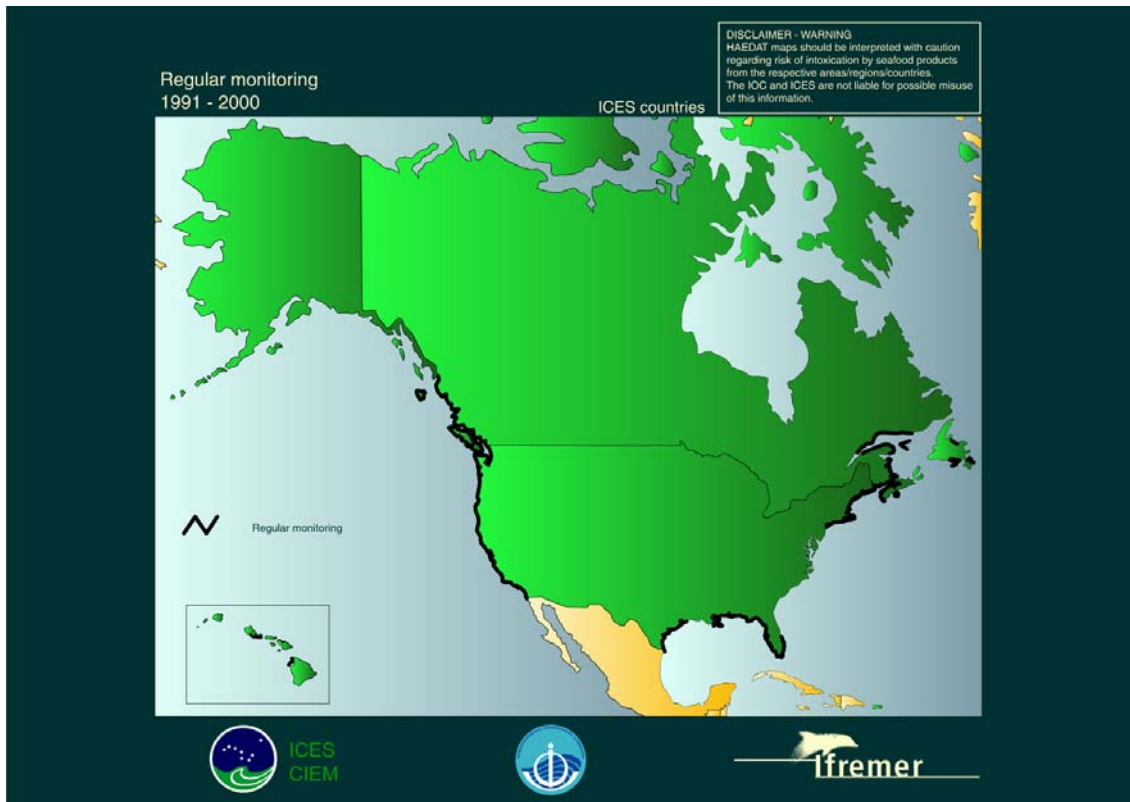
¹ Fuente: www.ifremer.fr/envlitt/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm

Figura 1.1 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm

Figura 1.2 Vigilancia de algas tóxicas y/o mariscos en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm

2. Intoxicación Paralítica por Mariscos (PSP)

Las toxinas paralíticas (PSP) son compuestos que se acumulan en los mariscos que ingieren algas productoras de estas toxinas. La ingestión de estos mariscos contaminados por acumulación de toxinas causa, en el ser humano, la intoxicación paralítica por mariscos. Los síntomas de PSP pueden presentarse como un entumecimiento o picazón leve hasta la parálisis respiratoria completa, que en casos fatales, ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión.

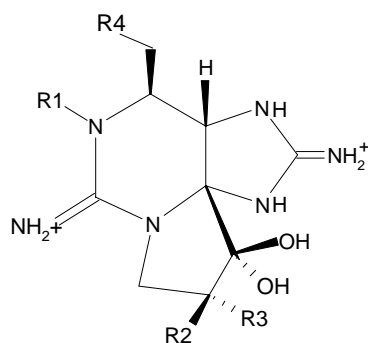
Las toxinas PSP son un grupo de 21 tetrahidropurinas estrechamente relacionadas (ver la Figura 2.1) cuya toxicidad difiere ampliamente. La más tóxica es la saxitoxina (STX), la primera toxina PSP caracterizada químicamente. Los dinoflagelados del género *Alexandrium* de zonas de clima tropical o templado son los principales responsables de la producción de estas toxinas. Los mariscos que se alimentan de estos dinoflagelados acumulan las toxinas, sin sufrir los efectos nocivos de las toxinas ya que son bastante resistentes. En los últimos 20 años se ha registrado un aumento aparente de las intoxicaciones causadas por PSP. Sin embargo, aún no se sabe a ciencia cierta si el aumento es real, si puede ser la consecuencia de los progresos en la identificación, detección y de registros médicos, o si se debe a una expansión del cultivo y del consumo de mariscos. Una veintena de países cuentan con reglamentación referente a las toxinas PSP, en la mayoría de los casos referida a las toxinas PSP como un grupo.

2.1 Estructuras químicas y propiedades

Las toxinas PSP constituyen un grupo de compuestos de la tetrahidropurina estrechamente relacionados, divididos en cuatro subgrupos: i) carbamato (STX, neoSTX y las gonyautoxinas (GNTX1-4); ii) N-sulfo-carbamoil (GNTX5-6, C1-4); iii) decarbamoil (dc-) (dcSTX, dcneoSTX, dcGNTX1-4); y iv) compuestos de desoxidecarbamoil (do-) (doSTX, doneoSTX y doGNTX1). Se han identificado al menos 21 toxinas PSP (ver la Figura 2.1), principalmente a partir de dinoflagelados y de mariscos que se alimentan de algas tóxicas. Los primeros intentos de aislar las toxinas PSP datan de hace más de un siglo, pero, como las toxinas se presentan como mezclas de compuestos con distintas capacidades de ionización, los progresos iniciales fueron muy lentos. La cromatografía de intercambio iónico, junto con el bioensayo en ratón, permitieron aislar una toxina hidrosoluble básica a partir de la almeja amarilla, *Saxidomus giganteus*, denominada, con el transcurso del tiempo saxitoxina (STX).

El primer derivado cristalino de la STX se sintetizó en 1975, y se estudió su estructura (Bower *et al.*, 1981). Esta se determinó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de rayos X (la Figura 2.1 ilustra la estructura química de la STX y de otras toxinas PSP). La actividad tóxica reside en el grupo cetona hidratado o dihidroxi del anillo heterocíclico de cinco miembros, actividad que desaparece cuando estos grupos se transforman en monohidroxi por reducción catalítica con hidrógeno. La sustitución de la cadena secundaria con el grupo carbamoil en el anillo heterocíclico de seis miembros por un grupo hidroxilo resulta en una molécula con aproximadamente el 60 por ciento de la actividad tóxica original. Este grupo hidroxilo activo permite preparar distintos derivados de la STX (Mons *et al.*, 1998). Las toxinas PSP son termoestables en pH ácido (salvo los componentes del N-sulfo-carbamoil), pero inestables en condiciones alcalinas, oxidándose fácilmente (Mons *et al.*, 1998).

Figura 2.1 Estructuras químicas de las toxinas PSP



\underline{R}_1	\underline{R}_2	\underline{R}_3	$\underline{R}_4 = \begin{array}{c} \text{HN} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{O} \end{array}$ carbamate toxins	$\underline{R}_4 = \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{SO}_3^- \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{O} \end{array}$ N-sulfo-carbamoyl toxins	$\underline{R}_4 = \text{OH}$ decarbamoyl toxins	$\underline{R}_4 = \text{H}$ deoxy-decarbamoyl toxins
H	H	H	STX	GNTX5(B1)	dcSTX	doSTX
H	H	OSO ₃ ⁻	GNTX2	C1	dcGNTX2	
H	OSO ₃ ⁻	H	GNTX3	C2	dcGNTX3	
OH	H	H	neoSTX	GNTX6(B2)	dcneoSTX	doneoSTX
OH	H	OSO ₃ ⁻	GNTX1	C3	dcGNTX1	doGNTX1
OH	OSO ₃ ⁻	H	GNTX4	C4	dcGNTX4	

Fuente: Mons *et al.*, 1998; Quilliam *et al.*, 2001

2.2 Métodos de análisis

2.2.1 En general

Las toxinas PSP en los mariscos constituyen un peligro potencial, tanto para el ser humano como para los animales, por lo que es necesario contar con un método rápido, sensible y específico para determinar su presencia. El bioensayo en ratón es el método tradicionalmente utilizado para determinar la presencia de toxinas PSP en mariscos. Sin embargo, la polémica en torno a la utilización de mamíferos en ensayos, sumada a los problemas y limitaciones inherentes a su realización, han impulsado el desarrollo de otros métodos, que incluyen ensayos farmacológicos, inmunoensayos, ensayos químicos o de separación, y bioensayos alternativos (Mons *et al.*, 1998).

2.2.2 Bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

En la actualidad, la mayoría de los programas de control de la toxicidad en mariscos aún utilizan el bioensayo en ratón. El procedimiento fue desarrollado hace más de 50 años. La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) lo refinó y normalizó para contar con un método rápido y relativamente preciso para medir el contenido de toxinas PSP totales (Hollingworth y Wekell, 1990). El procedimiento consiste en inyectar 1 ml de extracto ácido del marisco a ratones de 20 gramos y registrar el tiempo transcurrido hasta la muerte del animal. Si se trata de extractos muy tóxicos, se diluyen de forma de asegurar que la muerte ocurra en un período de entre cinco y 15 minutos. La

toxicidad de la muestra se expresa en unidades ratón (UR) y se calcula según las curvas de respuesta a las dosis obtenidas con estándares de STX. Una unidad ratón es la cantidad de toxina inyectada que causa la muerte de un ratón de 20 g en 15 minutos, equivalente a 0,18 µg de STX. En la mayoría de los países, las pesquerías se cierran si las concentraciones alcanzan 400 UR/100 g de marisco. El límite de detección del ensayo es aproximadamente 40 µg de STX/100 g de tejido de marisco, con una precisión de ± 15-20 por ciento. Al respecto, se determinó que un elevado contenido de sal en la muestra produce interferencias al inhibir los efectos tóxicos (Schantz *et al.*, 1958). La acumulación de zinc en las ostras causa la muerte en ratones en concentraciones que no constituyen una amenaza para la salud humana (Aune *et al.*, 1998). Los resultados de extractos muy tóxicos son sumamente variables (Park *et al.*, 1986). Las dificultades prácticas que presenta este método son:

- es necesario contar con una colonia de ratones de entre 19 y 22 g de peso y puede ocurrir que no se disponga de suficientes ratones en épocas de control intensivo;
- el límite de detección del ensayo varía según la cepa;
- la relación entre el tiempo hasta la muerte y la concentración de toxinas no es lineal;
- la determinación exacta del tiempo hasta la muerte es muy trabajosa; y
- conlleva el sacrificio de un gran número de animales.

A pesar de las dificultades mencionadas, el ensayo se ha utilizado con un amplio espectro de moluscos y crustáceos, y continúa siendo el método oficial en la mayoría de los países que cuentan con reglamentación para las toxinas PSP en productos marinos.

En Francia, LeDoux y Hall (2000) realizaron un estudio de aptitud con ocho laboratorios que utilizaban el ensayo en ratones, con el fin de analizar muestras de ostras contaminadas con toxinas PSP en concentraciones no detectables, de 153 y de 335 µg de STX/100 g de carne. Los autores concluyeron que, en términos del desempeño general, los ocho laboratorios participantes cumplían con los requisitos de aptitud para la realización del ensayo en ratones de la AOAC. Las variaciones dentro de cada laboratorio y entre los laboratorios fueron entre 5 y 10 y entre 8 y 40 por ciento, respectivamente. En muestras enriquecidas, los autores observaron una recuperación baja, lo que apunta a una subestimación de los “efectos de la sal”. Esta falta de precisión obligaría a establecer un margen de seguridad adecuado para proteger a los consumidores

Earnshaw (2003) indica que FAPAS® (Food Analysis Performance Assessment Scheme) organizó un estudio piloto de detección de toxinas PSP por bioensayo con ratones en mejillones liofilizados. Nueve de los 15 laboratorios que participaron en el estudio utilizaron el bioensayo en ratón. Los materiales del estudio se prepararon a partir de materiales de referencia certificados (Van Egmond *et al.*, 1998), a fin de obtener una estabilidad y homogeneidad satisfactorias. Los resultados obtenidos, sin embargo, presentaron una gran variación: entre 1 y 383 µg/100 g (expresados como toxinas PSP totales en base al peso en fresco), con una mediana de 137 µg/100 g. Esta variación no permitió evaluarlos estadísticamente.

ensayos in vitro

ensayo con cortes de hipocampo

Kerr *et al.* (1999) investigaron la utilización de preparaciones *in vitro* de cortes de hipocampo de rata como una forma de detectar, rápida y específicamente, la presencia de toxinas de algas marinas, a saber, STX, brevetoxina y ácido domoico, en tejido de mariscos o de pez de aleta. Los autores identificaron las propiedades electro-fisiológicas específicas de cada toxina y concluyeron que las preparaciones de cortes de hipocampo son útiles para detectar y analizar las biotoxinas marinas en tejido de mariscos contaminados.

ensayo de bloqueo del canal de sodio

Algunos autores proponen, como método de ensayo alternativo, estudiar el mecanismo mediante el cual las neurotoxinas PSP alteran el funcionamiento celular. Las toxinas se unen a los canales de sodio de las membranas de las células nerviosas, alterando la despolarización normal. La toxicidad es

proporcional a la cantidad de toxina unida. Davio y Fontelo (1984) midieron la cantidad de STX radiomarcada que se desplaza en una preparación de cerebro de rata. Kogure *et al.* (1988) y Gallacher y Birkbeck (comunicación personal; Van Egmond *et al.*, 1993) proponen exponer las células de neuroblastoma de ratón a la veratridina. Los autores observaron que las células se hinchan y finalmente se lisan y, que la adición de ouabaina junto con veratridina, aumenta la entrada del ión sodio. La STX, al bloquear los canales de sodio, inhibe la actividad de estos dos compuestos; morfológicamente las células no presentan cambios. La fracción de células no afectadas por la ouabaina y la veratridina es directamente proporcional a la concentración de STX y de sus análogos.

Jellett *et al.* (1992) modificaron el bioensayo para mejorar su rapidez y utilidad, eliminando la necesidad de contar las células individuales para determinar los equivalentes de STX. Los autores utilizaron, en cambio, un lector de microplacas para determinar automáticamente la absorción de cristal violeta en células de neuroblastoma teñidas. Una vez incluida esta y otras modificaciones técnicas de menor importancia, los autores probaron sistemáticamente el bioensayo en cultivo de tejidos y observaron que el límite de detección inferior es 10 ng eq de STX por ml de extracto (= 2,0 µg eq de STX/100 g de tejido de marisco). Luego compararon esta versión del bioensayo en cultivo de tejidos con el bioensayo en ratón estándar, utilizando 10 extractos ácidos de dinoflagelados (*Alexandrium excavata* y *Alexandrium fundyense*) y 47 extractos de tejido de marisco preparados según el procedimiento de la AOAC. Los resultados del bioensayo en cultivo tisular fueron prácticamente idénticos a los del bioensayo en ratón ($r > 0,96$) y los autores observaron que el primero es bastante más sensible que el segundo. Por otro lado, analizaron 12 extractos por CL y observaron que estos resultados son menos uniformes que los obtenidos con los dos bioensayos. Truman y Lake (1996) también compararon los resultados del ensayo en cultivo de células de neuroblastoma y los del bioensayo en ratón. De los extractos de marisco analizados, 29 dieron resultados negativos en ambos ensayos, mientras que 57 dieron resultados positivos en al menos un ensayo. Los estudios realizados con muestras enriquecidas de extractos de marisco muestran que en el ensayo con neuroblastomas, la respuesta a la adición de STX es buena. La correlación entre los ensayos para equivalentes de STX en mariscos fue de 0,876. Los autores concluyeron que, si bien los resultados obtenidos permiten utilizar el ensayo con neuroblastomas como un procedimiento de selección, es conveniente confirmar todo resultado próximo a los límites reglamentarios con el bioensayo en ratón.

En principio, el ensayo con células de neuroblastoma para detectar toxinas PSP en mariscos parece ser una alternativa viable al bioensayo en ratones. Sin embargo, los resultados de un estudio conjunto realizado en 1999 por la AOAC Internacional en el que se probó el procedimiento de Jellett *et al.* (1992), no fueron satisfactorios. El Comité de Métodos para Toxinas Naturales de la AOAC Internacional decidió discontinuar el método en estudio en la etapa de evaluación del procedimiento, debido a problemas prácticos de realización del ensayo y a problemas con el envío de los materiales de estudio (Información personal).

Shimojo e Iwaoka (2000) proponen detectar toxinas marinas específicas del canal de sodio, como por ejemplo la saxitoxina, mediante un ensayo por hemólisis. El método utiliza los principios del ensayo en cultivo de neuroblastomas de ratón para biotoxinas específicas del canal de sodio con glóbulos rojos de la tilapia, *Sarotherodon mossambicus*. Tanto la veratridina como la ouabaina reaccionan con los glóbulos rojos de la tilapia, alterando la permeabilidad de la membrana celular. La saxitoxina puede inhibir esta alteración (dejando a la célula normal del punto de vista morfológico). La detección de toxinas PSP se realiza secuenciando la adición de veratridina y de ouabaina, ya sea con la saxitoxina o con las muestras postextracción, a los glóbulos rojos. Según los autores, el ensayo permite detectar concentraciones de saxitoxina de 0,3 µg/ml, es decir apenas superiores al límite de detección del bioensayo en ratón; aunque no proporcionaron información alguna sobre su utilidad práctica en el análisis selectivo de mariscos.

Tanto el bioensayo en ratones como el bioensayo en cultivo tisular miden la toxicidad total, pero no el contenido de toxinas individuales.

Cheun *et al.* (1998) desarrollaron un sistema biosensor de tejidos consistente en un electrodo de Na⁺ recubierto con una membrana de vejiga de sapo integrado a una célula de flujo. En ausencia de bloqueadores del canal de Na⁺, los autores observaron el transporte activo del ion Na⁺, desde el interior de la membrana de vejiga de sapo hacia el exterior. Los autores escogieron un grupo de toxinas PSP, a saber, GNTX1, 2, 3 y 4, y registraron la respuesta del tejido sensor para cada una de ellas. En cuanto al grado de inhibición del rendimiento del sensor observaron que fue mayor con GNTX4, seguida de la GNTX3, GNTX1 y GNTX2 en orden decreciente. Salvo para el caso de la GNTX2, estos resultados concuerdan con los del bioensayo en ratón estándar.

Los resultados obtenidos para neoSTX y dcSTX con el sistema biosensor de tejidos concuerdan con los del bioensayo en ratón estándar (dentro de 5 µg de toxina/g de tejido húmedo).

Lee *et al.* (2000) utilizaron el sistema biosensor de tejidos para estudiar la toxicidad de cultivos de cepas de *Alexandrium tamarenis* en distintas condiciones ambientales. Los autores concluyeron que el método permite medir cantidades muy pequeñas (de 5 fg) de toxinas PSP en una célula de plancton individual y que es conveniente medir al menos 100 células para aumentar la sensibilidad del sistema. A título comparativo, cabe mencionar que para medir la producción de toxinas por CL es necesario recolectar al menos 6 000 células.

2.2.3 *Bioensayos alternativos*

La polémica en torno de la utilización de mamíferos en bioensayos continúa en aumento. Por este motivo se investiga la utilización de ensayos similares con invertebrados, como por ejemplo embriones de ostra o larvas de peces. En varios países europeos se utiliza el recuento de algas que se presumen tóxicas en el agua de mar como técnica de vigilancia (Hald *et al.*, 1991). Esta técnica, que podría clasificarse como un ensayo cualitativo, permite reducir el número de ensayos en ratones pero no es aplicable al control de calidad de mariscos para comercialización.

2.2.4 *Ensayos bioquímicos*

inmunoensayos

Ensayos ELISA

La popularidad de las pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA) indirectas, con palitos de inmersión aumenta. Estas pruebas se utilizan para detectar una amplia gama de compuestos en función de la interacción entre un antígeno y un anticuerpo. Chu y Fan (1985) describen un sistema de ensayo para toxinas PSP con un antígeno de STX, preparado inyectando albúmina sérica de bovino a conejos. Los anticuerpos que genera el conejo se recogen y se liofilizan. En el sistema de ensayo, los antígenos se colocan en placas de microtitulación, estándares de STX o extractos de mejillón y se agregan diluciones de anticuerpos adecuadas. La cantidad de anticuerpo ligado se determina con un conjugado de peroxidasa IgG de cabra anticonejo y la cuantificación se realiza por medio de un ensayo colorimétrico con el sustrato. La STX del extracto de mejillón compite para ligarse al antígeno de STX que recubre la placa de microtitulación. Hasta hace poco tiempo, solo se disponía comercialmente de pruebas ELISA para la STX, que no son completamente específicas para la STX e inducen un cierto porcentaje de reacción con la decarbamoil-STX (dcSTX) y la neoSTX. Cembella y Lamoreux (1991) describen una prueba policlonal que cuantifica las STX, neoSTX, GNTX1 y GNTX3 y, si bien aún no han finalizado las evaluaciones, parece ser más sensible que la CL y más específica que el bioensayo en ratón.

Chu *et al.* (1996) compararon tres pruebas ELISA competitivas directas para el análisis de un gran número de mariscos contaminados. Los autores concluyeron que los resultados de las ELISA concuerdan muy bien con los del ensayo en ratón. Usleber *et al.* (1997) también concluyeron que, para el análisis de vieiras, los resultados de las pruebas ELISA guardan una buena correlación con los del ensayo en ratón. Kasuga *et al.* (1996), por el contrario, sostienen que, para analizar muestras de mariscos costeros, las pruebas ELISA no pueden reemplazar al ensayo con ratones debido a la

existencia de reacciones cruzadas impredecibles y a la subestimación de la toxicidad registrada en algunas muestras de mariscos contaminados provenientes del mar cercano a Japón.

Garthwaite *et al.* (2001) trabajaron en un sistema de selección de muestras de mariscos sospechosas, utilizando pruebas ELISA integradas para detectar las ASP, NSP, PSP y DSP (incluida la yesotoxina). Las muestras consideradas sospechosas se analizan mediante métodos aprobados por las autoridades reglamentarias internacionales. Los autores determinaron que la extracción con alcohol da una buena recuperación para todos los grupos de toxinas.

Kawatsu *et al.* (2002) desarrollaron un inmunoensayo de enzimas competitivas directas con un anticuerpo monoclonal específico para las gonyautoxinas 2/3 (GNTX2/3) y un conjugado de peroxidasa de rábano picante-saxitoxina. Los resultados mostraron que este inmunoensayo permite detectar concentraciones de GNTX2/3, dc-GNTX2/3, C1/2, GNTX1/4, STX y neoSTX inferiores al límite reglamentario de 80 µg/100 de tejido de marisco.

Varios artículos publicados recientemente tratan de la utilización de ensayos ELISA para analizar las toxinas PSP en mariscos. Las reacciones cruzadas con especificidades de unión más bajas y la falta de respuesta potencial a otras toxinas del grupo PSP, diferentes de la STX, son factores que limitan la aplicación práctica de estas pruebas; salvo que estudios formales y conjuntos, realizados conforme a procedimientos aprobados por la AOAC Internacional o por la ISO, demuestren que cuentan con características de desempeño aceptables. Tales estudios aún no se han publicado.

2.2.5 Análisis químicos

técnicas fluorométricas y colorimétricas

La oxidación alcalina de las toxinas PSP produce compuestos fluorescentes que se prestan a una determinación simple con técnicas fluorométricas (Bates y Rapoport, 1975; Bates *et al.*, 1978). Sin embargo, existen varios factores que afectan la uniformidad de los resultados obtenidos con estas técnicas. Para evitar la variabilidad de los resultados, es necesario controlar algunos factores, como por ejemplo: el pH durante la extracción y antes de la oxidación, la limpieza de la columna de intercambio iónico para eliminar los coextractantes que pudieran interferir y ciertos metales que pueden afectar la oxidación y la fluorescencia de los compuestos resultantes. También es necesario tener en cuenta que no todas las toxinas tienen la misma fluorescencia; por ejemplo la de muchas toxinas carbamato es muy débil. Una técnica que permite sortear este tipo de dificultades es someter las mismas muestras a ensayos colorimétricos. En cuanto a la sensibilidad de estas técnicas, se demostró que la técnica por fluorescencia es un orden de magnitud más sensible y la colorimétrica es apenas más sensible que el bioensayo en ratón (Mosley *et al.*, 1985)

Hungerford *et al.* (1991) automatizaron un método de fluorescencia utilizando el análisis por inyección de flujo. Este método permite realizar la corrección automática de la fluorescencia de fondo y clasificar rápidamente las muestras de mariscos según contengan o no toxinas PSP.

técnicas cromatográficas

La cromatografía líquida (CL) es la técnica de determinación de compuestos PSP más utilizada, además del bioensayo. En los últimos diez años la comunidad científica se abocó al desarrollo de un método de CL automático que permita analizar rutinariamente toxinas PSP. En general, los ensayos parten de la separación de las toxinas por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un reactor postcolumna que oxida el efluente para producir derivados fácilmente detectables. La metodología propuesta por la Administración para el Control de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos separa 12 toxinas PSP carbamato y sulfocarbamato (Sullivan, 1988). La metodología está validada con el bioensayo en ratón con resultados generalmente satisfactorios y buena correlación ($r > 0,9$) (Sullivan, 1988). Los límites de detección son, en general, un orden de magnitud inferior a los del ensayo en ratones. En la práctica, el método de Sullivan (1988) ha presentado dificultades a la hora de

separar la STX de la dcSTX (Van Egmond *et al.*, 1994), motivo por el cual la mayoría de los laboratorios europeos que realizan análisis de PSP lo dejaron de utilizar.

Si bien la CL es una técnica útil, requiere de bastante destreza y necesita mucho tiempo para que el sistema funcione rutinariamente. La técnica tampoco es infalible. Thielert *et al.* (1991) demostraron que el método de Sullivan (1988) no es apto para separar las toxinas 6-decarbamoil, aunque lograron mejorar la resolución utilizando el análisis secuencial de las muestras con distintos sistemas de agentes tampón y reactivos de par iónico. Ledoux *et al.* (1991) describen los problemas que presenta la distinción de las toxinas del grupo C a partir del material fluorescente en mejillones no tóxicos. Waldock *et al.* (1991) concluyeron que la técnica de CL no es lo suficientemente rápida ni sólida para procesar el gran número de muestras generadas durante una floración.

Otro de los problemas que presenta la cromatografía es la separación de los picos debido al gran volumen de las mangueras de reacción postcolumna. Lawrence y Menard (1991) y Lawrence *et al.* (1991a) proponen solucionar el problema preparando derivados fluorescentes antes de separarlas por CL. Pero, por el momento, no se ha logrado separar todas las toxinas PSP conocidas utilizando este método ya que los productos de oxidación de algunas de ellas (por ejemplo GNTX2 y GNTX3) son idénticos.

Además, las diferencias en la química de cada toxina resultan en diferentes tasas de oxidación en el reactor postcolumna para cada compuesto. Estas diferencias obligan a calibrar continuamente el sistema con estándares de toxinas PSP a fin de realizar determinaciones lo suficientemente precisas. Hasta hace poco, solo se disponía comercialmente de un estándar de STX y era imposible estimar con precisión la cantidad de las otras toxinas PSP presentes en la mezcla. Los estándares certificados de STX, neoSTX, GNTX 1-4, GNTX 2/3 y GNTX 5 están disponibles comercialmente desde 2003 (Laycock *et al.*, 1994; NRC, 2003), lo que ha mejorado considerablemente la calidad de los resultados obtenidos por CL (Wright, 1995). El cambio de estándares requiere de especial cuidado, ya que se ha observado discontinuidad de los resultados obtenidos y diferencias de concentración de hasta un 20 por ciento entre las concentraciones de STX de los distintos proveedores (Quilliam *et al.*, 1999).

Earnshaw (2003) describe un estudio piloto sobre toxinas PSP en mejillones liofilizados, organizado en 2003 por el FAPAS[®] (Food Analysis Performance Assessment Scheme) con distintos métodos de CL (además del bioensayo en ratón, ver la Sección 2.2.2). Siete de los 15 laboratorios que participaron en el estudio utilizaron CL. Casi todos los laboratorios analizaron los materiales de ensayo para detectar la presencia de STX y dcSTX. Algunos también determinaron neoSTX, GNTX1/4, GNTX2/3, GNTX5, GNTX6, C1/2 y de C3/4. Los resultados obtenidos fueron desde no detectable hasta 83 µg/100 g (en base al peso en fresco) para STX, y entre 25 y 130 µg/100 g para dcSTX. El material de ensayo contenía < 3,5 µg de STX/100 g y ~ 80 µg de dcSTX/100 g. Al examinar los procedimientos analíticos se observó que todos aquellos laboratorios que detectaron valores positivos de STX utilizaron extracción con HCl y ebullición (al igual que en el ensayo en ratones según el procedimiento de la AOAC) (Hollingworth y Wekell, 1990). Por el contrario, los laboratorios que utilizaron ácido acético sin ebullición en la extracción, no encontraron o casi no encontraron saxitoxina. La explicación está en la extracción con HCl y ebullición que causa la hidrólisis parcial de algunas toxinas PSP, resultando en la conversión de algunas de ellas en análogos más tóxicos (por ejemplo la GNTX5 se convierte en STX). La extracción con ácido acético sin ebullición es un procedimiento más suave que deja el perfil de toxinas de la muestra prácticamente intacto. La muestra utilizada en el estudio de FAPAS no contenía STX pero sí GNTX5. Este problema puede resolverse tomando conciencia y normalizando la metodología, medidas que incluso reducirían la variabilidad de los resultados analíticos, tal como demostró el estudio de aptitud holandés (Van Egmond *et al.*, 2004).

Entre 1993 y 1997 se llevó a cabo un proyecto para desarrollar materiales de referencia de mariscos con fracciones de masa certificadas de algunas toxinas PSP en el marco del Programa de Normalización, Medidas y Ensayos (antes llamado y también conocido como Oficina Comunitaria de Referencia) de la Comisión Europea. El trabajo se realizó con 13 laboratorios públicos y seis

universidades, que representaban los cinco mayores países productores de mariscos de la Unión Europea (UE) y algunos otros países miembro de la UE interesados en la determinación de toxinas PSP en mariscos. Otro estudio interlaboratorial realizado en la UE ya había demostrado que existía una base para desarrollar materiales de referencia (Van Egmond *et al.*, 1994).

El programa de investigación incluyó:

- estudios para mejorar y evaluar la metodología química;
- la identificación y determinación de la pureza de los estándares de PSP y su estabilidad en una solución;
- dos estudios de comparación de métodos analíticos;
- la preparación de materiales de referencia con estudios de estabilidad y homogeneidad; y
- un procedimiento de certificación.

En un principio, se solicitó a los laboratorios que efectuaran los análisis de soluciones de extractos de marisco con PSP y STX utilizando el método de su elección; pero, en el diseño final del estudio de certificación, solo se incluyeron los métodos por CL con derivatización pre y postcolumna. El proyecto concluyó con un informe que describe la certificación de las fracciones de masa de la STX y de la dcSTX en dos materiales de referencia de mejillón (BCR-CRMs 542 y 543). Incluye también la identificación de otras toxinas PSP y el procedimiento utilizado con una solución de enriquecimiento (CRM 663) con STX de concentración másica certificada (Van Egmond *et al.*, 1998; Van den Top *et al.*, 2000, 2001).

El Comité Europeo de Normalización seleccionó dos de los métodos utilizados en el proyecto del Programa de Normalización, Medidas y Ensayos que mostraron buenas características de desempeño (Lawrence y Menard, 1991; Franco y Fernandez, 1993) para redactar una norma. A la fecha, el método de Franco está en la etapa de Pre Norma Europea (CEN, 2002a) y el de Lawrence como Proyecto de Norma Europea (CEN, 2002b). Este último se utilizó con éxito en un estudio de aptitud sobre PSP en mariscos realizado en 2001, en los Países Bajos (Van Egmond *et al.*, 2004). Lawrence modificó este método una vez más y se evaluó en 2002, en un estudio conjunto internacional (Lawrence *et al.*, 2003).

técnicas electroforéticas

electroforesis en gel

Boyer *et al.* (1979), Onoue *et al.* (1983), Ikawa *et al.* (1985) y Thibault *et al.* (1991) desarrollaron distintos métodos de electroforesis en gel o en papel para separar las toxinas PSP. En teoría, la técnica en un recipiente y en una sola dimensión, permitiría clasificar rápidamente varias muestras. Sin embargo, la cuantificación constituye el obstáculo más importante y la mayoría de los métodos utilizan nebulización con peróxido y una lámpara UV para visualizar las toxinas en la placa electroforética. Para sortear el obstáculo se planteó como alternativa utilizar detectores de barrido fluorescente (Van Egmond *et al.*, 1993).

electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica relativamente nueva que, hasta la fecha, se ha utilizado pocas veces en el análisis de toxinas, pero cuya flexibilidad amerita continuar investigando su utilización. En resumen, la técnica utiliza un capilar fino de sílice fundido (~100 μm de diámetro interno) en lugar de gel electroforético y el procedimiento consiste en introducir cantidades de la muestra, en nanolitros, por uno de los extremos de la columna, antes de usarla como puente entre dos recipientes con agentes tampón. Al aplicar un voltaje alto, las toxinas migran a través de la columna y se detectan a medida que pasan por una célula de fluorescencia o de rayos UV. La técnica se utiliza con una amplia gama de compuestos con movilidad electroforética e incluso con compuestos que no tienen una carga neta, ya que estos forman micelas que sí migran.

Wright *et al.* (1989) determinaron estándares de STX con un sistema de electroforesis capilar acoplado a un detector de fluorescencia láser. La técnica permite detectar concentraciones de STX de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Si bien el volumen de inyección es necesariamente muy pequeño, entre 1 y 10 nl, los límites de detección teóricos en las muestras son de $\mu\text{g}/\text{kg}$. Hasta la fecha, las desventajas de la técnica son que no se ha demostrado la misma separación en biota con toxinas mezcladas, que el equipo no está disponible comercialmente, que es costoso y que la metodología presenta los mismos problemas que la CL, es decir, es necesario preparar un derivado fluorescente antes de proceder a la separación o a la detección.

Thibault *et al.* (1991) utilizaron la electroforesis capilar con muestras de biota marina y lograron separar la neoSTX y la STX, con un límite de detección de $5 \mu\text{M}$ (aproximadamente $1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) con espectrometría UV. Los autores sugieren que la técnica de electroforesis capilar con detección UV cuenta con un potencial prometedor para el análisis rutinario de estas toxinas en extractos naturales, aunque, en la actualidad, los límites de detección todavía se consideran demasiado altos como para utilizar la metodología en programas de control.

espectrometría de masas

En las últimas dos décadas se promovió la detección de biotoxinas marinas por espectrometría de masas, no solo mediante el desarrollo de la CL acoplada a EM, sino también mediante la integración de tecnologías computarizadas, de detección y de separación. La clave del éxito y de la creciente utilización de la CL acoplada a EM (incluida la CL acoplada a EM en tándem) es, y será, la cantidad y calidad de los resultados obtenidos, la confiabilidad, el bajo costo y la disponibilidad comercial de los sistemas (Willoughby *et al.*, 1998).

Hacia fines de la década de los años ochenta Quilliam *et al.* (1989) informaban de la determinación de la STX por CL acoplada a EM con una técnica de ionización “ion-sprayTM”, nombre comercial de la electronebulización asistida neumáticamente (Sparkman, 2000). El análisis de inyección de flujos con seguimiento con ión selectivo (modo SIM, por sus siglas en inglés) y concentrándose en los iones positivos permitió estimar un límite de detección de concentraciones de $0,1 \mu\text{M}$ (con una inyección de $1 \mu\text{L}$), es decir aproximadamente cinco veces más sensible que el bioensayo en ratón de la AOAC. Los espectros con barrido completo de 100 ng de STX y los espectros del ión producto (ión hijo) de una única molécula protonada ($[\text{M}+\text{H}]^+$) suministraron información útil para confirmar la identidad y desarrollar un método de seguimiento selectivo de la reacción (SRM, por sus siglas en inglés).

Pleasant *et al.* (1992a) estudiaron la CL acoplada a EM y la EC acoplada a EM para analizar las toxinas PSP. Los autores utilizaron EM (modo EM¹ con barrido completo y control de iones específicos) acoplada a CL para controlar la purificación de la saxitoxina aislada de extractos de células de dinoflagelados. La espectrometría de masas en tándem (EM²) se utilizó para obtener información estructural. Según parece, los métodos detectan 10 pg inyectados, que equivalen a una concentración de $0,03 \mu\text{M}$, mejoría obtenida cambiando la fase móvil y disminuyendo la velocidad de flujo. Los autores presentan una curva de calibración para soluciones estándar (calibración externa) con un rango de concentración de relación 55 (concentraciones máxima/ mínima). Si bien el panorama es prometedor, faltan valores para los indicadores de linealidad y reproducibilidad (r^2 y desviación estándar, respectivamente). Los autores trataron de forma exhaustiva la posible aplicación del análisis de inyección de flujo a la determinación de toxinas PSP en extractos marinos más complejos y concluyeron que tiene serias limitaciones.

Quilliam *et al.* (1993) estudiaron los aspectos cualitativos de la CL acoplada a EM. El estudio trató la caracterización de los productos de la oxidación con periodato de las toxinas PSP y obtuvieron los espectros másicos (especialmente los espectros EM¹) de varios de ellos. Los autores observaron una marcada reducción de la sensibilidad (respuesta relativa) de estos productos de la oxidación con respecto a las toxinas progenitoras. Concluyeron que “En general la sensibilidad es tal que la oxidación pre-columna combinada con CL acoplada a EM, no constituye un método competitivo para analizar las toxinas PSP en cantidades traza.”

Jaime *et al* (2001) mencionan un método para la cuantificación de las PSP utilizando cromatografía con intercambio iónico acoplada a espectrometría de masas con ionización por electronebulización. Los autores realizaron la separación cromatográfica por elución del gradiente, tomaron las medidas con modo de control de iones específicos y describieron los sistemas automatizados. El estudio se centró en los límites de detección y en la linealidad: “los LD obtenidos para las toxinas PSP individuales son comparables a los de otros métodos de cromatografía de par iónico con oxidación química y detección fluorescente”, que se adaptan bien a la determinación de toxinas PSP en materiales biológicos (límite reglamentario mencionado para mejillones y mariscos de 800 µg de PSP/kg). La linealidad se demostró con buenos coeficientes de correlación (> 0,99), obtenidos a pesar del rango de calibración de la concentración limitado (aproximadamente una década en promedio).

Quilliam *et al.* (2001; 2002) proponen varios métodos de determinación de toxinas PSP por CL acoplada a EM. Los autores mencionan especialmente la detección por cromatografía líquida con interacción hidrófila acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electronebulización. Sostienen que cuentan con un método que detecta todas las toxinas PSP en una sola corrida, pero hasta la fecha no ha sido publicado.

Oikawa *et al.* (2002) utilizaron un método de CL acoplada a EM para confirmar la acumulación de toxinas PSP (toxinas GNTX y C) en el cangrejo comestible, aunque no describieron la cuantificación con CL acoplada a EM. Para la EM con ionización por electronebulización se realizó la purificación parcial, es decir, un tratamiento consecutivo con carbón activado y una columna de Bio-Gel P2.

En resumen, las publicaciones científicas sobre CL acoplada a EM para el análisis de toxinas PSP se centran principalmente en los aspectos cualitativos y muestran la utilización convencional del modo EM¹, aunque sí se han utilizado equipos en tándem. El análisis de toxinas PSP por CL acoplada a EM en tandem se presentó recientemente, pero aún no se publicó.

2.3 Organismos fuente y hábitat

2.3.1 Organismos fuente

Las toxinas PSP se encuentran en algunos géneros de dinoflagelados y en una especie de algas verde-azuladas. Las especies del género *Alexandrium* (conocido como *Gonyaulax* o *Protogonyaulax*) identificadas como contaminantes de los mariscos son: *Alexandrium tamarenis*, *A. minutum* (*syn. A. excavata*), *A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. fundyense* y *A. cohorticula*. Otras especies de dinoflagelados, que también se identificaron como fuente de STX son *Pyrodinium bahamense* y *Gymnodinium catenatum* (Mons *et al.*, 1998). La toxicidad de los dinoflagelados varía según la mezcla de derivados de STX, cuya composición difiere según la especie que los produce y/o la región en que se presentan.

El perfil de toxinas de *A. minutum* en Marlborough, Nueva Zelanda, está compuesto, en general, por distintas cantidades de GNTX1, GNTX2, GNTX4, neoSTX y STX (ver la Figura 2.1). Estos perfiles son similares a los observados en otros cultivos aislados de *A. minutum* en Nueva Zelanda, pero difieren de los observados en esta misma especie de otros lugares del mundo (MacKenzie y Berkett, 1997).

Algunos dinoflagelados tienen una forma inmóvil: un quiste de resistencia o hipnocigoto. Estos quistes descienden al fondo del mar y se acumulan en el límite entre el agua y el sedimento, donde hibernan (Mons *et al.*, 1998). Una vez que las condiciones de crecimiento se vuelven favorables, los quistes germinan y vuelven a inocular el agua con células nadadoras, que pueden entonces resultar en floraciones, asegurando así la supervivencia de ciertos dinoflagelados de estación en estación. El quiste en sí también es tóxico, pero ésta aún no se ha determinado con certeza. Algunos investigadores sostienen que es similar a la del dinoflagelado. Otros afirman que las concentraciones de toxinas PSP en los quistes son entre 10 y 1 000 veces superiores a las de las células móviles (Mons *et al.*, 1998). En la Bahía de Yacarta, en Indonesia, se encontraron formas móviles de *Pyrodinium*

bahamense inmediatamente después de hallar los quistes de la misma especie en sedimentos superficiales y probablemente la especie cumpla su ciclo de vida completo en dicha bahía (Matsuoka *et al.*, 1998). En las costas de Portugal se encontraron quistes de los tres grupos principales de dinoflagelados tóxicos o potencialmente tóxicos: i) en toda la costa se encontraron quistes de *G. catenatum*, los que en la costa suroeste constituían hasta el 68 por ciento del total; ii) en la zona este, sobre el Océano Atlántico se encontraron quistes de *P. bahamense*; y iii) en toda la costa se encontraron quistes del género *Alexandrium*, los que en la costa sur constituían entre el ocho y el 31 por ciento del total (Amorim y Dale, 1998).

Además de los *Protistas*, la especie *Aphanazomenon flos-aquae*, una cianofita de agua dulce, también contiene STX y neosaxitoxina (neoSTX) (Mons *et al.*, 1998). Otros investigadores han señalado la presencia de componentes de PSP en mariscos y cangrejos, por ejemplo en *Spondylus butler* y *Zosimos acnus* (Mons *et al.*, 1998), sin constatar la presencia de *Protistas* tóxicos. No se ha esclarecido en qué medida esto se debe al consumo de algas del arrecife coralino. Por otro lado, los autores de un estudio reciente sobre la producción de quistes de dinoflagelados en el Golfo de Nápoles observaron que durante los meses de verano, los quistes esféricos y de paredes lisas germinan y producen individuos de la especie *A. andersonii*. Si bien esta especie no se consideraba tóxica, Ciminiello *et al.* (2000c) analizaron un cultivo clonal por bioensayo en ratón y obtuvieron resultados positivos para PSP.

2.3.2 Condiciones favorables

Ni el momento en que aparece una floración, ni la densidad de la población son predecibles. La floración comienza como una pequeña población de células de dinoflagelados tóxicos en fase latente o como quistes de resistencia depositados en el sedimento del fondo. El momento en que los quistes comienzan a germinar y el lugar donde han estado depositados determinan cuando y donde aparecerá una floración. Ciertas condiciones climáticas y medioambientales, como por ejemplo cambios en la salinidad, un aumento de la temperatura del agua, de los nutrientes y de la radiación solar fomentan la germinación de los quistes, que ingresan en un estado vegetativo, en el que se reproducen rápidamente. Una vez desencadenada la floración, se ingresa en una fase de crecimiento exponencial de la población que resulta en un aumento descomunal de la misma. El mayor porcentaje de células tóxicas se registra generalmente en la mitad de esta fase de crecimiento exponencial. A medida que transcurre el tiempo, la floración causa una marcada disminución de nutrientes y del contenido del dióxido de carbono en el agua y degrada las condiciones medioambientales, limitando el crecimiento de la población. Ingresa, entonces, en una fase estacionaria, se estabiliza y el agua adquiere un color rojizo fluorescente, que se conoce como marea roja. La degradación medioambiental continúa y aumenta la muerte celular hasta que la población se destruye. En esta etapa, muchas especies de dinoflagelados forman quistes de resistencia que se hunden al fondo, a la espera de la próxima floración (Mons *et al.*, 1998).

En aguas costeras y de estuarios (con temperaturas entre 13 y 25 °C) de la provincia de Nueva Gales del Sur, en Australia, abundan los bancos de quistes de *A. catenella*. El período de latencia de los quistes de cultivos aislados en Australia ocurre a 17 °C y dura entre 28 y 55 días solamente, a diferencia de los períodos más largos de poblaciones templadas de *A. catenella* en Japón (97 días a 23 °C) y de *A. tamarensis* en Cape Cod, Estados Unidos, o en Columbia Británica, Canadá. El aumento de la temperatura de 17 a 25 °C durante una hora fomenta, en algunos casos, la germinación, hasta un 100 por ciento (luego de 98 días) de los quistes de ciertos cultivos de *A. catenella* de Australia. Por otro lado, los requisitos de latencia permanecieron incambiables en los cultivos que se mantuvieron en frío y a oscuras, a diferencia de lo observado en quistes de poblaciones templadas en hibernación de otros países. Estos datos indican que las condiciones de latencia de quistes de cultivos aislados de un mismo taxón de dinoflagelado, provenientes de distintos lugares geográficos, no son necesariamente idénticas (Hallegraeff *et al.*, 1998).

Taroncher-Oldenburg *et al.* (1997) observaron que la producción de toxinas en *A. fundyense* es discontinua, está inducida por la radiación solar y siempre ocurre en un período de tiempo definido, entre aproximadamente 8 y 10 horas, en la fase G1 temprana del ciclo celular y se reduce a cero durante el resto de la interfase y de la mitosis.

Los dinoflagelados se desarrollan a temperaturas relativamente altas y con abundante radiación solar, por lo que en Europa y en Sudáfrica los casos de intoxicación y la mortalidad ocurren generalmente entre mayo y noviembre, mientras que en América del Norte ocurren entre julio y setiembre (Mons *et al.*, 1998).

El tipo de hábitat donde se han observado las intoxicaciones por PSP varía considerablemente y se cree que las condiciones hidrográficas juegan un papel importante. Ciertos factores indirectos, como la fuerza del viento y la turbulencia del agua influyen en la formación de una capa termoclina, es decir una capa de agua de mar superior que no se mezcla con el agua que está por debajo, cuya presencia es de suma importancia (Mons *et al.*, 1998).

Hao (2001) estudió las características de crecimiento de *A. tamarensis* con cultivos artificiales en el laboratorio. Según los resultados obtenidos, el autor concluyó que las condiciones óptimas para el crecimiento son: temperatura entre 22 y 26 °C, salinidad entre 28 y 31 ‰; intensidad de luz entre 1500 y 2500 lux y relación luz/oscuridad de 16/8 horas. El tiempo de duplicación promedio es de 85 horas (Hao, 2001).

El Niño es un fenómeno causado por un desequilibrio de la presión atmosférica y de las temperaturas del este y del oeste del Océano Pacífico, que provoca una disminución de la profundidad de la capa termoclina. Se encontraron pruebas de la coincidencia de floraciones de *Pyrodinium* y los cambios climáticos ocasionados por el Fenómeno de Oscilación Austral del Niño (ENSO) (Mons *et al.*, 1998).

Los organismos necesitan satisfacer sus necesidades y es imprescindible que la cantidad de nutrientes del agua de mar sea la adecuada, especialmente en lo que respecta a la concentración de elementos traza, quelatos, vitaminas y material orgánico en general. Sin embargo, el rol exacto que juegan los nutrientes en el desarrollo de las mareas rojas aún no se ha determinado con certeza. En algunos casos, bajas concentraciones de sal estimulan el desarrollo de la marea roja, pero otras veces parecería ser que son las altas concentraciones salinas las que inducen la floración (Mons *et al.*, 1998).

La irradiación es otro de los factores que afecta el crecimiento. El crecimiento de *A. minutum*, se estudió en un cultivo de un brote en Nueva Zelanda (en la Bahía Plenty), con 54 combinaciones de irradiación y distintas fuentes de N (NO_3^- , NH_4^+ y urea) en concentraciones variables. El efecto de la irradiación en el crecimiento es mayor en cultivos enriquecidos con NO_3^- , que en los enriquecidos con NH_4^+ o con urea. Se observó que el crecimiento se saturó con irradiaciones relativamente bajas, lo que sugiere que las tasas de crecimiento de *A. minutum* pueden mantenerse relativamente buenas, incluso a profundidades poco iluminadas de la columna de agua (Chang y McLean, 1997). Las condiciones medioambientales óptimas para el crecimiento celular y para la producción de toxinas de un cultivo aislado de *A. minutum* en fase T1, de Taiwan, Provincia de China fueron: 25 °C de temperatura, pH 7,5, $120 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz y 15 ‰ de salinidad. Las concentraciones óptimas de nutrientes agregados al medio con 50 por ciento de agua de mar natural fueron: 0,02 por ciento de fosfato, 0,01 por ciento de nitrato, 5,0 ng/g de ión cúprico, 270 ng/g de ión férrico y ácido húmico libre. La toxicidad celular y la toxicidad total máximas se registraron en la fase de crecimiento post-estacionario y luego decayeron rápidamente (Hwang y Lu, 2000).

En un estudio con un cultivo aislado en el laboratorio de *A. catenella*, de China, Región Administrativa Especial de Hong Kong, las concentraciones máximas de toxina por litro del medio se registraron a 20 °C, al principio de la fase estacionaria (luego de cuatro horas de oscuridad y con una duración de cuatro a cinco horas), cuando la densidad celular estaba en su punto más alto y la cantidad de toxina por célula aún era relativamente elevada. La densidad celular registrada a 10 °C fue baja,

pero la cantidad de toxina por célula alta. A 30 °C, la densidad de la población en pleno, al igual que la cantidad de toxina por célula fueron bajas (Siu *et al.*, 1997).

La relación N:P es otro de los factores que afecta la producción de toxinas durante la proliferación. La literatura cita varios estudios que describen los efectos de distintas relaciones N:P en el crecimiento de *Alexandrium* spp. y en el contenido de toxinas (Mons *et al.*, 1998; Béchemin *et al.*, 1999; John y Flynn, 2000). Una disminución del nitrógeno limita el crecimiento de la población y la producción de toxinas, mientras que una disminución del fósforo limita solamente el crecimiento de la población y fomenta la producción de toxinas. En la especie *A. catenella*, si los nutrientes no constituyen un factor limitante, los principales factores limitantes son: la temperatura (entre 20 y 25 °C), la salinidad (entre 30 y 35 ‰) y el pH (entre 8,0 y 8,5) (Siu *et al.*, 1997).

Los distintos autores que han estudiado la participación de las eubacterias, diferentes de las algas verde-azuladas, en la producción de toxinas PSP aún no están de acuerdo. Algunos sugieren que las bacterias juegan un papel en la producción de toxinas, aunque los mecanismos todavía no se conocen con exactitud. Es probable que la producción de toxinas PSP sea una función inherente a algunas bacterias marinas y necesaria en su proceso fisiológico, pero incidental en relación a la toxicidad de los mariscos y dinoflagelados. Varios estudios han demostrado que las bacterias cuentan con la capacidad de metabolizar las toxinas PSP. Esta función reviste importancia práctica en términos de toxicidad, tanto de los mariscos como de los dinoflagelados. Es necesario continuar investigando en profundidad las interacciones entre las bacterias y los dinoflagelados en ambientes marinos (Gallacher y Smith, 1999).

2.3.3 Hábitat

Los dinoflagelados y sus quistes se han encontrado principalmente en aguas próximas a América del Norte, Europa y Japón, aunque aumentan los informes de su presencia en Asia (Mons *et al.*, 1998). En el noreste de Canadá, las PSP se hallaron hace ya más de 100 años. En el noreste de EE.UU., especialmente en la región de Nueva Inglaterra, donde la toxicidad se encontraba restringida a ciertas áreas del extremo este de Maine, cerca de la frontera con Canadá, los primeros casos de PSP datan de 1958 (Anderson, 1997).

La especie *A. catenella* se halla especialmente en las costas de América del Norte, del sur de Japón y Venezuela; *A. tamarensis* en América del Norte, en el norte de Japón, en el sur de Europa, en Turquía y Australia (Mons *et al.*, 1998). En aguas costeras y de los estuarios, con temperaturas entre 13 y 25 °C, en la provincia de Nueva Gales del Sur, Australia, abundan los bancos de quistes de *A. catenella*. El período de latencia de los quistes de cultivos aislados en Australia ocurre a 17 °C y dura entre 28 y 55 días solamente, a diferencia de los períodos más largos de poblaciones templadas de *A. catenella* en Japón (97 días a 23 °C) y de *A. tamarensis* en Cape Cod o en Columbia Británica (Hallegraeff *et al.*, 1998).

En aguas costeras del noreste de América del Norte se halla la especie *A. fundyense* (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1997) y en el Golfo de Maine se observó que las floraciones de *Protogonyaulax tamarensis* son comunes en ciertas estaciones (Shumway *et al.*, 1988).

La especie *A. excavata* (syn. *A. minutum*) se halló en las costas del noreste de América del Norte, Egipto, Australia, el Mar del Norte (Dinamarca, Alemania, los Países Bajos, Noruega y el Reino Unido), en la costa mediterránea (Mons *et al.*, 1998) y en Nueva Zelanda (Chang *et al.*, 1997a). *A. minutum* se detecta desde 1990, en una laguna en Sicilia, Italia, donde se explotan los bancos naturales de almejas (*Ruditapes decussata* y *Cardium* spp.) y se cultiva el mejillón común (*Mitylus galloprovincialis*) en pequeña escala. No se ha informado de casos de intoxicación en seres humanos. Las densidades máximas de células se observan en mayo (Giacobbe *et al.*, 1996). En 1994, 1995 y 1996, entre abril y julio se encontró *A. minutum* en las estaciones de muestreo de Emilia Romagna, en la costa del noroeste del Mar Adriático, en Italia (Poletti *et al.*, 1998). Hasta la fecha, en el Mar

Mediterráneo solo se hallaron *A. minutum* y *A. tamarensis*, ambas con potencial tóxico. Sin embargo, Ciminiello *et al.* (2000c) realizaron un estudio con material de cultivo compuesto por quistes del Golfo de Nápoles que germinaron en *A. andersoni*, y obtuvieron resultados positivos para PSP por bioensayo en ratón. El perfil de toxicidad de *A. andersoni* está compuesto principalmente por toxinas de la clase STX, especialmente STX y neoSTX.

Las floraciones de *Gymnodinium catenatum* causaron brotes de PSP en Japón, en la costa noroeste de América del Norte, en el sur de Irlanda, en España, Méjico, Argentina y Tasmania, en Australia. Actualmente, la distribución de la especie incluye el Golfo de California, el Golfo de México, Argentina, Venezuela, Japón, las Filipinas, Palau, Tasmania, el Mar Mediterráneo y la costa atlántica de España y Portugal (Mons *et al.*, 1998). En el caso de Tasmania, la especie no es endémica, sino que fue introducida hace ya algunas décadas. La primera floración se registró en 1980 y luego se observaron floraciones importantes en 1986, 1991 y 1993. Muchos indicios apuntan a que probablemente la especie se introdujo por el vaciado de las aguas de lastre de buques de carga provenientes de Japón y de la República de Corea y, menos frecuentemente, de Europa (McMinn *et al.*, 1997).

En 1972 se observaron las primeras consecuencias perjudiciales de las floraciones de *Pyrodinium* en Papua Nueva Guinea. Desde entonces, las floraciones parecen haberse extendido a Brunei Darussalam, Sabah, en Malasia, y a las costas del centro y norte de las Filipinas. En 1987 en Champerico, en la costa guatemalteca sobre el Océano Pacífico, 187 personas fueron hospitalizadas y 26 murieron durante una floración de *Pyrodinium* (Rodrigue *et al.*, 1990). En 1989, otra floración en la costa del Pacífico de América Central se extendió hacia el norte, causando varios casos de intoxicación y muertes (Mons *et al.*, 1998).

El riesgo de PSP asociado a *A. ostensfeldii* es bajo, según demostró la medición directa de la toxicidad específica en cultivos aislados. La especie se ha descrito en numerosos sitios en la costa oeste de Europa, como en Islandia, las Islas Faeroe, en Dinamarca, Noruega y España, así como también en Egipto, en la costa oeste de EE.UU., en el Golfo de St. Lawrence, en Canadá y en la región del este asiático de la Federación Rusa. La literatura indica que los quistes de *A. ostensfeldii* son comunes en los sedimentos de la costa neocelandesa (Levasseur *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1996).

2.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

2.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas PSP en los organismos acuáticos

La filtración transporta las células y los quistes de dinoflagelados al esófago y al estómago de los moluscos bivalvos. La digestión, que ocurre en el estómago y en los divertículos, es el proceso por el cual las toxinas PSP se liberan y entran a los órganos digestivos. La mezcla de toxinas que se aloja en los tejidos del marisco varía según el tipo de marisco del que se trate, la especie y la cepa del dinoflagelado en cuestión. La concentración de las toxinas que componen la muestra varía con el tiempo y en función de otros factores, como las condiciones medioambientales. El 96 por ciento de la toxicidad total se encuentra en las vísceras del mejillón que constituyen solamente el 30 por ciento del peso del tejido total. En las almejas, las toxinas se acumulan rápidamente en las vísceras, para luego disminuir gradualmente. Luego de un período de latencia de cuatro semanas o más, las toxinas se detectan principalmente en el sifón, aunque pueden alojarse en otras partes del animal, y su composición varía con el tiempo (Mons *et al.*, 1998).

Varios autores estudiaron la toxicidad de los distintos tejidos de las vieiras observando las siguientes generalidades (Shumway *et al.*, 1988):

- El músculo aductor no acumula toxinas y de hecho se ha probado que inactiva las toxinas presentes. La vieira de roca, *Hinnites giganteus*, es una excepción ya que las concentraciones de toxinas alcanzaron 2 000 µg/100 g de tejido.
- Los tejidos de las glándulas digestivas, el manto, las gónadas y las branquias retienen toxinas, variando la cantidad según el tejido y la especie.
- La toxicidad de los diferentes tejidos varía con la estación.

Una vez absorbidas y distribuidas, las toxinas pueden transformarse. Se alimentaron almejas amarillas no tóxicas con *A. catenella* con GNTX 1-4 y neoSTX, pero sin STX. La STX se detectó luego de 83 días, lo que llevó a los autores a concluir que *in vivo* ocurre algún tipo de síntesis o biotransformación de la GNTX 1-4 y/o neoSTX en STX. Otros autores obtuvieron resultados similares (Mons *et al.*, 1998).

La epimerización es una transformación común que ocurre cuando se reacomoda una porción de la molécula original de STX. En vieiras y mejillones, por ejemplo, la epimerización de la STX de un alga tóxica ocurre cuando el H y el grupo OSO_3^- se intercambian en la posición 11 de la molécula de STX. Esta transformación disminuye la toxicidad once veces. Por el contrario, otras transformaciones aumentan la toxicidad. La hidrólisis ácida causa la separación del grupo SO_3^- de la posición 21 de la molécula de STX y aumenta la toxicidad seis veces (Mons *et al.*, 1998).

En la almeja amarilla, la molécula de STX altamente tóxica, se une químicamente al tejido del sifón. Esta almeja es capaz de retener las toxinas PSP por períodos de hasta dos años luego de la ingestión inicial. La almejuela común, *Prothotaca staminea*, también puede convertirse en tóxica, aunque no tanto como la almeja amarilla. Esto se debe, en parte, a su capacidad de transformar las toxinas STX muy tóxicas en formas de toxicidad moderada. El efecto combinado de la almejuela común de transformar las STX en formas menos tóxicas y la capacidad de la almeja amarilla de concentrar y retener las formas muy tóxicas, puede resultar en una gran diferencia de toxicidad entre las dos especies. Esta diferencia es significativa ya que ambas especies coexisten en las mismas playas y, para un recolector aficionado, son muy similares (Mons *et al.*, 1998). MacKenzie *et al.* (1996) estudiaron los cambios de los perfiles de toxinas PSP en la almeja *Paphies subtriangulata*, de las playas de la Bahía Plenty, en Nueva Zelanda. El estudio se realizó durante la fase de contaminación (con picos $\leq 412 \mu\text{g eq de STX}/100 \text{ g}$) en enero de 1993 y durante seis meses un año más tarde, cuando aún persistían concentraciones de toxinas bajas ($40 \mu\text{g}/100 \text{ g}$). Durante el pico de contaminación, los perfiles se componen con distintas cantidades de derivados del carbamato, GNTX 1-4, neoSTX y STX con trazas del derivado decarbamoil, dc-STX. Estos perfiles son similares a los producidos por *A. minutum*, el dinoflagelado responsable del incidente de PSP. Un año más tarde sólo se observaron trazas de los diferentes derivados de la STX. Casi todas las toxinas se encontraron alojadas en el sifón.

Andrino *et al.* (1999a) demostraron que la depuración natural de toxinas PSP en *Aulacomya ater*, un bivalvo que se alimenta por filtración originario de América del Sur, ocurre como una caída exponencial de primer orden (modelo de un compartimiento). Los bivalvos se clasifican según la cinética de la eliminación de las toxinas, en dos grandes grupos: los que eliminan las toxinas lentamente (por ejemplo, *Saxidomus giganteus*, *Spisula solidissima*, *Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis*) y los que lo hacen rápida y moderadamente (por ejemplo *Mitylus edulis* y *Mya arenaria*) (Andrino *et al.*, 1999a). En algunas especies, el modelo bifásico de dos compartimientos es la manera mejor de describir la cinética de la eliminación de las toxinas. Durante la acumulación, la toxicidad de las vísceras es, generalmente, entre dos y cinco veces mayor que la de los tejidos enteros, y los menos tóxicos son los tejidos locomotores (los pies y el músculo aductor). Sin embargo, la eliminación de toxinas de las vísceras ocurre más rápidamente que de otros tejidos, causando, una disminución uniforme de su contribución a la carga de toxinas total. La biotransformación de toxinas en los tejidos es más pronunciada en ciertas especies de almejas capaces de efectuar la decarbamoilización enzimática, por ejemplo *Prothotaca staminea*, y es más limitada en otras especies, por ejemplo *Mya arenaria* y *Mitylus edulis*. En general, los cambios en el perfil de las toxinas son mayores cuando los dinoflagelados ingeridos contienen gran cantidad de toxinas N-sulfocarbamoil de poca potencia (Bricelj y Shumway, 1998).

Algunos bivalvos pueden evitar la ingestión de dinoflagelados tóxicos. La chirla mercenaria, *Mercenaria mercenaria*, por ejemplo, retrae el sifón y cierra sus válvulas ante la presencia de especies de *Alexandrium* (Mons *et al.*, 1998).

Blanco *et al.* (1997) estudiaron la cinética de la eliminación de toxinas en los mejillones, *Mitylus galloprovincialis*, expuestos a una floración de *G. catenatum*, un dinoflagelado productor de toxinas PSP. El perfil de toxinas del mejillón es muy similar al de *G. catenatum*, lo que indica que, en este caso, la biotransformación tiene muy poca o ninguna importancia. La eliminación de toxinas ocurre en dos etapas:

- i. una etapa rápida, al principio del período de eliminación de toxinas (una vez transcurridos un par de días del comienzo de la eliminación, en comparación con la cantidad inicial, solo se encuentran pequeñas cantidades de toxina en el bivalvo), y
- ii. una etapa lenta, desde el fin de la primera etapa hasta que finaliza la eliminación. Los factores que afectan la eliminación, principalmente durante la primera etapa, son las condiciones medioambientales (salinidad, temperatura y transmisión de la luz) y el peso corporal.

Wildish *et al.* (1998) observaron que los ostiones del Pacífico (*Crassostrea gigas*) que se alimentan con *A. tamarensis* y *A. fundyense*, tóxicos y no tóxicos, abren y cierran la bomba del filtro, lo que sugiere que las toxinas PSP no estaban directamente involucradas en la inhibición de la respuesta inicial a la alimentación. En ostiones de control alimentados con *Isochrysis* sp., una microalga de referencia, que fomenta el crecimiento, no se observó este comportamiento. Se observó evidencia adicional del comportamiento de apertura/cierre al alimentar ostiones del Pacífico, aclimatados a *Isochrysis* sp., con mezclas de *Alexandrium/Isochrysis*.

Lassus *et al.* (2000) estudiaron la eliminación de toxinas con un grupo de individuos adultos de ostiones del Pacífico, *Crassostrea gigas*, contaminados experimentalmente con toxinas PSP (por exposición a *A. minutum*) en concentraciones entre 150 y 300 µg eq de STX/100 g y alimentados con dietas de diatomeas o dinoflagelados no tóxicos. Si bien la cantidad de toxinas varió de individuo en individuo, los autores determinaron que el tiempo de eliminación de toxinas es entre tres y cuatro días hasta alcanzar el umbral de seguridad de 80 µg/100 g en el ostión. Las tasas de eliminación de distintos grupos de ostiones alimentados con *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii* o con *Skeletonema costatum* no presentaron diferencias significativas. Los autores observaron que el perfil de toxinas durante el proceso de depuración está dominado por GNTX2 y GNTX3, mientras que los porcentajes de toxinas C son relativamente bajos y la STX y neoSTX no detectables. El perfil de toxinas es igual al de *A. minutum* lo que sugiere que en el ostión no hay biotransformación.

Las vieiras de la especie *Chlamys farreri* tienen gran capacidad de acumulación de toxinas PSP. Sus vísceras contienen hasta 5 000 µg eq de STX/100 g luego de una exposición a *A. minutum* tóxica de 48 horas de duración con tasa de eliminación lenta. Las vísceras contienen el 97 por ciento del total de toxinas. La relación entre las distintas toxinas PSP cambió durante el período experimental. La relación entre GNTX1 y GNTX4 con respecto al total de toxinas disminuyó mientras que la de GNTX2 y GNTX3 aumentó. El perfil de toxinas en las vieiras difiere del que presentan las algas y el de las heces de las vieiras se corresponde con el de la etapa temprana de cultivos de *A. minutum* (Zou *et al.*, 2001).

Bagøien *et al.* (1996) realizaron un estudio con ejemplares adultos de *Euterpina acutifrons*, un copépodo harpacticoide pelágico, que incubaron en grandes recipientes (de 20 litros) con una cepa muy tóxica de *A. minutum* (1 000 o 10 000 células por ml) hasta cinco días. El análisis de los extractos por CL reveló solamente trazas de toxinas PSP. Los autores observaron que luego de transcurridos uno o dos días, permanecen inactivos entre un diez y un 15 por ciento de los copépodos alimentados con una cepa muy tóxica y otra poco tóxica de *A. minutum* (1 000 y 10 000 células por ml). Sugieren que luego de probar unas pocas células, la especie *E. acutifrons* evita alimentarse con estos dinoflagelados.

Chen y Chou (1998) realizaron un estudio con un grupo de almejas, *Hiatula diphos*, al que alimentaron con células de *A. minutum*. Luego alimentaron a un grupo de *Babylonia areolata*, un gastrópodo carnívoro, con estas almejas contaminadas con PSP. La composición de las toxinas en las almejas, en los gastrópodos y en los dinoflagelados es similar, pero el perfil en los gastrópodos es diferente. Los autores observaron una degradación notable de la GNTX1 en los gastrópodos,

comparativamente con las almejas y los dinoflagelados, lo que provocó una disminución de la toxicidad, aunque la cantidad de toxinas aumentó de forma acumulativa. En las vísceras de los mariscos, sólo encontraron la GNTX1-4 transmitida por *A. minutum*. Chou y Chen (2001a) realizaron otro estudio a fin de determinar la acumulación, distribución y eliminación de las toxinas PSP en un grupo de almejas, *Hialuta rostrata*, alimentado con una cepa tóxica de *A. minutum*. Los autores confirmaron la alta toxicidad de la glándula digestiva. También constataron que la eficiencia de depuración del grupo de almejas tóxicas alimentadas con algas no tóxicas y del grupo de almejas sin alimento es similar. Al finalizar el período de alimentación, el perfil de las toxinas de las almejas es similar al de *A. minutum* (compuesto principalmente por GNTX4 y GNTX1). Sin embargo, al finalizar el período de eliminación, el perfil está compuesto principalmente por GNTX3 y GNTX2, lo que indica que las velocidades de eliminación o de transformación de las toxinas son dispares. Las únicas toxinas PSP encontradas fueron las GNTX1-4. Luego de alimentarse con algas tóxicas, otros tejidos además de las vísceras, también son tóxicos aunque con baja toxicidad y con perfil similar al de las algas tóxicas.

2.4.2 Mariscos con toxinas PSP

Si bien la mayoría de las especies de mariscos que se alimentan por filtración son relativamente poco sensibles a las toxinas STX, el mecanismo y la respuesta de cada una de ellas difiere. En condiciones similares parece que, en general, los mejillones, por ejemplo, acumulan más cantidad de toxinas PSP que las ostras. Los ensayos de alimentación en el laboratorio demostraron que los mejillones consumen rápidamente concentraciones de *Alexandrium* iguales o mayores que las que causan el cese del bombeo y el cierre de las ostras. Los resultados de los estudios electrofisiológicos con nervios aislados de bivalvos de la costa atlántica muestran que los de las ostras son sensibles a las toxinas, mientras que los del mejillón son relativamente poco sensibles (Mons *et al.*, 1998).

En zonas templadas, los mariscos asociados a casos de PSP son, principalmente, los moluscos bivalvos, es decir mejillones, almejas y en menor proporción ostras, vieiras y berberechos. El Cuadro 2.1 presenta una lista completa de los mariscos en los que se detectaron toxinas PSP.

En abril de 1991 se detectaron toxinas PSP en la oreja de mar de Europa, *Haliotis (Eurotis) tuberculata*, de la costa de Galicia, en España. En octubre de 1993 se cerró el mercado de este marisco. Las muestras recogidas en diciembre de 1995 contenían por bioensayo en ratón 252 ± 25 μg eq de STX/100 g de carne, y por CL 454 ± 86 μg eq de STX (la suma de STX y dcSTX convertida a equivalentes de STX utilizando los factores de conversión 1,9 y 1,14, respectivamente)/100 g de carne. Todos los valores obtenidos por bioensayo en ratón son superiores a 140 μg eq de STX/100 g de carne. El perfil está compuesto principalmente por dcSTX (entre 83 y 100 por ciento), aunque también se encontró STX en menor proporción. El epitelio contiene 2,6 veces la cantidad de toxinas presentes en el músculo. La eliminación natural de toxinas, manteniendo las orejas de mar bajo condiciones de laboratorio controladas durante tres meses, no dio buenos resultados. La eliminación del epitelio y de las vísceras resultaría en una disminución de la toxicidad del 75 por ciento (Bravo *et al.*, 1999).

En la especie *Chlamys nobilis*, de aguas de la Región Administrativa Especial de Hong Kong, en China, se encontraron concentraciones de 320 μg eq de STX/100 g de tejido. En la misma región se encontraron altas concentraciones de toxinas PSP en la especie *Perna viridis* luego de la marea roja de marzo y abril de 1998 (Zhou *et al.*, 1999). El 5 por ciento de las muestras de mariscos recolectadas desde el norte al sur de la costa china contenía toxinas PSP. Aunque las concentraciones detectadas fueron bajas (solo dos de las muestras presentaron concentraciones superiores al límite reglamentario) se encontraron productores de toxinas PSP en la región (Zhou *et al.*, 1999).

Cuadro2.1 Mariscos con toxinas PSP

Tipo	Nombre científico
Almejas	<i>Soletellina diphos</i> (sinónimo <i>Hiatula diphos</i>)
	<i>Saxidomus giganteus</i>
	<i>Tapes (Amygdala) japonica</i>
	<i>Protothaca staminea</i>
	<i>Siliqua patula</i>
	<i>Mya arenaria</i>
	<i>Spisula solidai</i>
	<i>Spisula solidissima</i>
	<i>Paphies subtriangulata</i> #
	<i>Venerupis rhomboides</i>
	<i>Ensis siliqua</i>
	<i>Donax trunculus</i>
	<i>Scrobicularia plana</i>
	<i>Chamalea striatula</i>
	<i>Venerupis pullastra</i>
	(sinónimo. <i>Venerupis rhomboides</i>)
	<i>Amphichaena kindermani</i>
	<i>Arctica islandica</i> ##
	<i>Mercenaria mercenaria</i> ##
	<i>Mesodesma arctatum</i> ##
<i>Mytilus edulis</i>	
Mejillones	<i>Mytilus californianus</i>
	<i>Pinna bicolor</i> *
	<i>Mytilus chilensis</i> **
Ostras	<i>Arctica islandica</i> ***
	<i>Aulocomya ater</i> **
	<i>Crassostrea gigas</i>
Berberechos	<i>Ostrea edulis</i>
	<i>Cerastoderma edule</i>
	<i>Acantocardia tuberculatum</i>
Gasterópodos	<i>Clinocardium nutalli</i>
	<i>Haliotis tuberculata</i>
	<i>Niotha clathrata</i>
Vieiras	<i>Zeux scalaris</i>
	<i>Concholepas concholepas</i> **
	<i>Argobuccinum ranelliformes</i> **
	<i>Placopecten magallanicus</i>
	<i>Patinopecten yessoensis</i>
	<i>Argopecten irradians</i>
	<i>Venus verrucosa</i>
	<i>Callista chione</i>
	<i>Chlamys farreri</i> *
	<i>Pecten albicans</i> *
	<i>Hinnites giganteus</i> ***
	<i>Buccinum</i> spp. ##
	<i>Colus</i> spp. ##
<i>Thais</i> spp. ##	
Bocinas	<i>Homarus americanus</i> ##
	<i>Buccinum</i> spp. ##
	<i>Colus</i> spp. ##
Langostas	<i>Thais</i> spp. ##
	<i>Homarus americanus</i> ##
	<i>Lunatia heros</i> ##

Fuente: , salvo que se indique otra fuente

* Takatani *et al.*, 1997; ** Lagos, 1998; *** Shumway *et al.*, 1988; # MacKenzie *et al.*, 1996; ## Todd (1997)

2.4.3 Otros organismos acuáticos con toxinas PSP

Teegarden y Cembella (1996) compararon los hábitos de alimentación de dos especies de copépodos comunes en el Golfo de Maine, *Acartia tonsa* y *Eurytemora herdmani*. Los autores alimentaron distintos grupos de copépodos con cultivos aislados de especies de *Alexandrium*, con diferentes toxicidades por célula y perfiles de toxinas, y con un dinoflagelado no tóxico, *Lingulodinium polyedrum*. Los autores observaron que la toxicidad del dinoflagelado no afecta la eficiencia de alimentación de las dos especies de copépodos y ninguna de las especies presentó indicios muy claros de incapacidad o de efectos adversos resultantes de las toxinas ingeridas. Si bien los autores determinaron que en *E. herdmani* la acumulación de toxinas PSP es mayor, las vísceras de esta especie son más grandes. Los experimentos realizados con mezclas de dinoflagelados apuntan a que ambas especies de copépodos tienen la capacidad de escoger sus presas según la palatabilidad y no según la toxicidad. Aunque la eficiencia de retención de toxinas de los copépodos estudiados son bajas (del 5 por ciento), se observó la acumulación de altas concentraciones de toxinas PSP. Esta acumulación apoya la hipótesis según la cual el zooplancton actúa como vector de toxinas de los niveles tróficos más altos.

Teegarden (1999) estudió tres especies de copépodos marinos (*Acartia tonsa*, *Centropagus hamatus* y *Eurytemora herdmani*), que comparten el hábitat con especies de *Alexandrium* tóxicas. El autor observó que las tres especies son capaces de distinguir por medios químico sensoriales entre células tóxicas y no tóxicas de especies de *Alexandrium*. Esta distinción indica que la alimentación de los copépodos está regida por un comportamiento selectivo, más que por los efectos fisiológicos. Los hábitos de alimentación de las distintas especies de copépodos estudiados son diferentes, lo que sugiere diferencias en la presión de pastoreo que ejerce el zooplancton sobre las especies tóxicas de *Alexandrium*.

Bagøien *et al.* (1996) realizaron un estudio con ejemplares adultos de *Euterpina acutifrons*, un copépodo harpacticóide pelágico, que incubaron en grandes volúmenes (de 20 litros) con una cepa muy tóxica de *A. minutum* (1 000 o 10 000 células por ml) hasta cinco días. El análisis de los extractos por CL reveló solamente trazas de toxinas PSP. Los autores observaron que luego de uno o dos días, entre un diez y un 15 por ciento de los copépodos alimentados con una cepa muy tóxica y otra poco tóxica de *A. minutum* (1 000 y 10 000 células/ml) permanecen inactivos. Sugieren que luego de probar unas pocas células, la especie *E. acutifrons* evita alimentarse con estos dinoflagelados.

En Japón y en Fiji, la mayoría de los cangrejos que causaron casos de PSP en seres humanos son xántidos (*Lophozozymus pictor*), además de caracoles de mar y límulos. El denominador común de estas especies es el hábitat, todas de arrecifes coralinos, y que se alimentan por pastoreo superficial (Mons *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000).

En Taiwan, Provincia de China se recolectaron 459 muestras de cangrejos xántidos entre octubre de 1992 y mayo de 1996. Las muestras se analizaron para detectar toxinas PSP y tetrodotoxina. Cinco especímenes (*Zosimus aeneus*, *Lophozozymus pictor*, *Atregatopsis germaini*, *Atergatis floridus*, *Demania reynaudi*) dieron resultados positivos para las toxinas PSP y la tetrodotoxina. Los porcentajes de toxinas PSP se situaron entre 11 y 97 por ciento (y entre el 89 y el 3 por ciento restante de tetrodotoxina). Si bien el perfil de toxinas PSP varía según la especie, la fuente es *A. minutum* (Hwang y Tsai, 1999).

A medida que las toxinas de las algas pasan por la cadena trófica pueden causar la muerte de peces. Hace algunos años, en la Bahía Fundy, toneladas de arenques murieron por ingerir pequeños caracoles planctónicos que habían consumido *Alexandrium*. Del punto de vista del ser humano, es muy positivo que el arenque, el bacalao, el salmón y otras especies de peces comerciales sean sensibles a las toxinas PSP y que, a diferencia de los mariscos, mueran antes que las concentraciones de toxinas en la carne alcancen grados peligrosos. Sin embargo, algunas toxinas se acumulan en el hígado y en otros órganos del pez y ponen en peligro a otros peces, a mamíferos marinos y aves, que ingieren el pez entero incluyendo las vísceras. En 1987, cuatro ballenas jorobadas murieron en la Bahía de Cape Cod,

en Massachussets. La autopsia reveló que habían ingerido caballas con elevadas concentraciones de STX en sus órganos (Mons *et al.*, 1998).

En mayo de 1996 se encontraron toxinas PSP en la estrella de mar, *Asterias amurensis*, del estuario del río Nikoh, Bahía Kure, Prefectura de Hiroshima, en Japón (8,0 UR/g en el cuerpo entero y 28,7 UR/g en vísceras, por bioensayo en ratón). Se cree que las toxinas PSP llegaron por la cadena trófica a partir de bivalvos tóxicos de la misma área. Las toxinas encontradas en la estrella de mar eran compuestos muy tóxicos con un perfil constituido principalmente por GNTX1, GNTX2, GNTX3, GNTX4, dc-GNTX3 y dc-STX, cuya suma representa aproximadamente 77 por ciento molar, además de derivados C1-C4 de N-sulfocarbamoil, con un claro predominio de la GNTX1, con 37,4 por ciento molar (Asakawa *et al.*, 1997).

Castonguay *et al.* (1997) estudiaron la acumulación de toxinas PSP en las caballas del Atlántico, *Scomber scombrus*. Los autores determinaron que estas son vectores letales para sus predadores porque retienen toxinas durante todo el año (STX [96 por ciento], GNTX2 y GNTX3 [4 por ciento]). También observaron que el contenido de toxinas en el hígado (determinado por CL) aumenta considerablemente con la edad del pez, lo que sugiere que la caballa las acumula progresivamente durante su vida. Asimismo, el contenido de toxinas en el hígado aumenta considerablemente durante el período de alimentación estival en el Golfo de St. Lawrence, en Canadá, y probablemente la fuente de las toxinas sea el zooplankton. El contenido promedio de toxinas es de 17,4 nmol por hígado y la toxicidad promedio de 112,4 µg eq de STX/100 g peso hígado en húmedo.

Sato *et al.* (2000) analizaron los tamboriles (*Arothron mappa*, *A. manillensis*, *A. nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. stellatus*, *A. reticularis*) de aguas de las Filipinas. Detectaron cantidades considerables de toxinas PSP (con STX como el componente dominante), además de tetrodotoxina (TTX), otra potente toxina marina que se encuentra en el pez de aleta. Las toxinas se encontraron en el hígado, intestinos, músculo y en la piel. Kungsuwan *et al.* (1997) detectaron toxinas PSP en los tamboriles de agua dulce (*Tetraodon leiurus complex*, *Tetraodon suvatii*) de una provincia al noreste de Tailandia. La toxicidad más alta se encontró en el hígado, con variaciones según el lugar y la estación de la captura. Los perfiles de toxinas obtenidos de las huevas, hígado, piel y músculo revelaron STX, neoSTX y dcSTX. Sato *et al.* (1997) identificaron la STX en el tamboril de agua dulce *Tetraodon fangi*, que causó intoxicación alimentaria en Tailandia, aunque no detectaron tetrodotoxina en esta especie. Las muestras de dos especies de tamboriles de agua dulce (*Tetraodon cutcutia*, *Chelonodon patoca*), provenientes de distintos sitios en Bangladesh fueron letales en el bioensayo en ratón (con entre 2,0 y 40,0 UR/g de tejido como PSP). Se determinó que, en general, la toxicidad de la piel es más alta que la de otros tejidos analizados (músculo, hígado, ovario). Los análisis de *T. cutcutia* revelaron STX, dcSTX, GNTX2 y GNTX3, dcGNTX2 y tres componentes no identificados relacionados probablemente a las PSP. Sin embargo, no se detectaron tetrodotoxinas ni otras sustancias relacionadas (Zaman *et al.*, 1997a).

2.5 Toxicidad de las toxinas PSP

2.5.1 Mecanismo de acción

La acción farmacológica de las toxinas PSP es muy similar a la de las TTX. Como los mecanismos de acción de la STX y de la TTX son casi idénticos se asumió que ambas moléculas tenían la misma interacción con el receptor. El mecanismo por el cual se bloquea el canal de sodio dependiente del voltaje ha sido objeto de varios estudios pues la STX y la TTX son los únicos agentes que lo bloquean selectivamente y con mucha afinidad.

El canal de sodio dependiente del voltaje es una proteína de aproximadamente 250 000 Da, que atraviesa la membrana plasmática de muchas células excitables. Esta caracterizada por una conducción uniforme, depende del potencial y presenta selectividad iónica. Esta proteína se encuentra en los nervios de los mamíferos, en las fibras del músculo esquelético y en la mayoría de las fibras del músculo cardíaco. Una vez que la célula se despolarizó correctamente, la conformación de la

molécula del canal de sodio cambia. Se abre un camino acuoso que permite el desplazamiento del ion Na^+ de la fase extracelular hacia el interior de la célula mediante ciertas fuerzas electroquímicas. El flujo de sodio hacia el interior causa un aumento de la fase del potencial de acción. Las membranas también presentan canales de sodio dependientes del voltaje que, cuando se abren, permiten el desplazamiento del K^+ intracelular hacia fuera con la consecuente repolarización. La STX y varias otras toxinas PSP bloquean el canal de sodio dependiente del voltaje con mucha potencia, enlenteciendo o anulando la propagación del potencial de acción, pero sin afectar el canal de potasio.

La función 7,8,9-guanidina participa en el bloqueo del canal. El C12-OH (como cetona hidratada) es importante y, si bien la cadena secundaria del carbamoilo contribuye, no es vital. Se determinó que los enlaces de hidrógeno entre la molécula de la toxina y el sitio de enlace contribuyen a la energía de enlace. Los investigadores concuerdan en lo que atañe a los aspectos cinéticos del enlace de la toxina. El tiempo promedio de bloqueo del canal depende de la velocidad de disociación y no de la concentración de toxinas. Sin embargo, la duración de la apertura del canal esta relacionada reversiblemente con la concentración de toxinas y depende de la constante de asociación (Mons *et al.*, 1998).

2.5.2 Farmacocinética

estudios con animales de laboratorio

ratas

Naseem (1996) estudió la cinética del saxitoxinol (STXOL), un análogo de la STX, marcado con [^3H] en ratas Wistar. El autor observó que luego de administrar una única dosis intravenosa de STXOL radiomarcado, este se distribuye rápidamente en los distintos tejidos, incluyendo el sistema nervioso central (SNC). Al cabo de dos horas excretaron en la orina el 40 por ciento de la dosis y el 80 por ciento luego de transcurridas 48 horas. La vida media ($t_{1/2}$) en plasma es de 29,3 minutos. El máximo de radioactividad en la mayoría de los tejidos, incluyendo el cerebro, ocurrió ocho horas después de la dosificación. Sin embargo, en el hígado y en el tracto gastrointestinal la radioactividad fue baja en la fase inicial siguiente a la dosificación con su punto más alto transcurridas 24 horas, lo que sugiere una ruta alternativa de eliminación y excreción. El STXOL se metabolizó en varios tejidos. Los porcentajes de actividad asociada a metabolitos no identificados luego de transcurridos diez minutos de la dosificación, son 19 por ciento en el extracto de riñón, 28,5 por ciento en los pulmones y 41,8 por ciento en el corazón. El 75 por ciento de la actividad registrada luego de transcurridas 48 horas se asoció a metabolitos no identificados. La menor biotransformación ocurrió en el músculo (14,4 por ciento) luego de 48 horas de la dosificación. En cuanto al SNC, los porcentajes de actividad asociada a metabolitos no identificados luego de diez minutos de la dosificación son 31,8 por ciento en el cerebro y el 37,4 en la médula. El 76 por ciento de la actividad observada en el cerebro luego de transcurridas 48 horas se asoció a metabolitos no identificados. En la orina no se detectaron metabolitos de STXOL

Un estudio con ratas reveló que la STX radiomarcada de una dosis intravenosa subletal (aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) se excreta rápidamente por la orina. Pasadas cuatro horas de la administración, aproximadamente el 19 por ciento de la dosis de STX se excretó en la orina y aproximadamente el 58 por ciento luego de 24 horas. En todo el período de estudio, el promedio de excreción urinaria total de la STX administrada, fue de aproximadamente 68 por ciento. En ningún momento se detectó radioactividad en las heces. Los autores concluyeron que estos resultados prueban que en la orina de rata pueden detectarse pequeñas cantidades de STX no metabolizada hasta 144 horas luego de la administración intravenosa (Aune, 2001).

gatos

Andrinolo *et al.* (1999a) realizaron un estudio con 14 gatos machos (entre 2,5 y 5 kg de pc), que una vez anestesiados se conectaron permanentemente a un respirador artificial, luego se les inyectó una única dosis intravenosa de 2,7 o 10 μg STX/kg de pc. Durante las cuatro horas subsiguientes se registraron parámetros cardiovasculares, como tensión arterial y electrocardiogramas, y se tomaron

muestras de orina y sangre. Los animales se sacrificaron y se midió la concentración de STX en el cerebro, en el hígado, el bazo y en el bulbo raquídeo. Las dosis bajas no causaron cambios en los parámetros hemodinámicos. Las altas, por el contrario, causaron una reducción drástica de la tensión arterial, seguida de insuficiencia del miocardio y por último un paro cardíaco. La administración de dobutamina (2,5 µg/kg por minuto) restableció la hemodinámica y permitió a los gatos superar el shock. La excreción de la STX sólo se observó en la orina: en cuatro horas el 25 y el 10 por ciento de la dosis administrada a 2,7 y 10 µg/kg, respectivamente. La eliminación renal fue de 0,81 y 3,99 ml/min/kg con las dosis alta y baja, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que la excreción de la STX se realiza principalmente por filtración glomerular. En la orina, en la sangre y en los tejidos analizados sólo detectaron STX y ninguna otra toxina PSP lo que indica que no hubo biotransformación. Sí detectaron STX en los órganos muy irrigados, como el hígado y el bazo, y también en el sistema nervioso central (en el cerebro [1,81 ng/g de tejido húmedo con la dosis alta] y en el bulbo raquídeo [2,5 ng/g de tejido húmedo con la dosis alta]), demostrando la capacidad de la STX de atravesar la barrera hematoencefálica.

observaciones en seres humanos

Los médicos clínicos observaron que si el paciente sobrevive a las PSP durante 24 horas, ya sea con o sin respiración artificial, cuenta con excelentes probabilidades de una recuperación rápida y completa. Esto indica que la o las toxinas que causan la intoxicación por PSP o se excretan rápidamente o se metabolizan, o ambas. Si bien la mayoría de las toxinas PSP tienen carga positiva, se absorben rápidamente a través de la mucosa gastrointestinal. Los síntomas varían según la gravedad de la intoxicación. Esta está determinada por la toxicidad específica de la toxina PSP ingerida, la cantidad de alimento ingerido y la velocidad de eliminación de la o las toxinas PSP del cuerpo. Según la cantidad de alimento tóxico ingerida, los primeros síntomas pueden ocurrir en un par de minutos (Mons *et al.*, 1998).

Gessner *et al.* (1997) estudiaron cuatro brotes de PSP en Alaska ocurridos entre mayo y junio de 1994. En los pacientes determinaron entre 2,8 y 47 nM y entre 65 y 372 nM de toxinas PSP en el suero y la orina, respectivamente, durante la intoxicación grave y luego de los síntomas agudos. También se observó hipertensión grave, aunque se detectaron solamente concentraciones nanomolares en el suero. Las diferencias en el perfil de las toxinas PSP de las muestras biológicas de seres humanos y de los mejillones indican que los primeros las metabolizan. Dentro de las 24 horas, la eliminación de las toxinas PSP del suero era evidente y se constató que la orina es la ruta de excreción principal. (Gessner *et al.*, 1997).

2.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

La toxicidad de las PSP se expresa casi siempre como STX o como equivalentes de STX. Los compuestos sulfocarbamoil son bastante menos tóxicos que los otros grupos de toxinas PSP. Sin embargo, en condiciones ácidas pueden convertirse en carbamatos más tóxicos (Aune, 2001). Comparativamente con otras especies, como peces, anfibios, reptiles y animales de órdenes inferiores, el ratón es muy sensible a las toxinas PSP. El Cuadro 2.2 presenta los valores de DL₅₀ según la vía de administración. El Cuadro 2.3 presenta los valores de DL₅₀ para otras especies.

Cuadro 2.2 Toxicidad aguda de la STX en ratones (Mons *et al.*, 1998)

Vía	DL ₅₀ en µg/kg de pc
oral	260-263
intravenosa	2,4-3,4
intraperitoneal	9,0-11,6

Cuadro 2.3 DL50 oral de la STX en otras especies (Mons et al., 1998)

Vía oral	DL ₅₀ en µg/kg de pc
rata	192-212
mono	277-800
gato	254-280
conejo	181-200
perro	180-200
cobayo	128-135
paloma	91-100

Además de los bioensayos de letalidad en ratones para determinar la potencia relativa de todos los análogos en comparación con la de la STX (ver el Cuadro 2.4), sólo se estudió la acción biológica del 50 por ciento de los análogos naturales. Sin embargo, los resultados de los análogos estudiados muestran que los mecanismos celulares de acción son básicamente los mismos. Los N-sulfocarbamoil son bastante menos tóxicos que sus contrapartes de la serie del carbamoil pero en condiciones ácidas fácilmente se convierten en sus correspondientes compuestos de la serie carbamoil y, en algunos casos la toxicidad aumenta hasta 40 veces. Esta conversión es significativa del punto de vista clínico y de la salud pública, ya que ciertos mariscos poco tóxicos que contienen toxinas del N-sulfocarbamoil pueden causar intoxicaciones desproporcionadamente graves al ingerirlos. Sin embargo, experimentalmente se determinó que la conversión ocurre en jugos gástricos de ratón y de rata artificiales con un pH de 1,1; pero no en el jugo gástrico natural tamponado a un pH de 2,2 (Mons *et al.*, 1998).

Cuadro 2.4 Toxicidad relativa de las PSP en el bioensayo en ratón

Toxina	Toxicidad relativa
STX	1
neoSTX	0,5 – 1,1
GNTX _{2/3} ^a	0,39/1,09 – 0,48/0,76
GNTX _{1/4} ^a	0,8/0,33 – 0,9/0,9
dcSTX	0,43
dcneoSTX	0,43
B1	0,07 – 0,17
B2	0,07 – 0,09
C1 a C4	<0,01 – 0,14
dcGNTX1 a dcGNTX4	0,18 – 0,45

a = mezcla de epímeros α/β
Fuente: Usleber *et al.*, 1997

efectos tóxicos

Se estudiaron en animales los efectos de la STX en el sistema respiratorio, en el miocardio y en los tejidos musculares y nerviosos (tanto del sistema central como del periférico) (Mons *et al.*, 1998).

efectos en el sistema respiratorio

En la intoxicación con PSP, los efectos en el sistema respiratorio son la causa de la muerte. Esta ocurre por asfixia debido a una parálisis progresiva de los músculos respiratorios. En animales, una dosis entre 1 y 2 µg STX/kg de pc por vía intravenosa, reduce la actividad respiratoria, lo que se refleja como una disminución de la amplitud y de la velocidad. Un aumento de la dosis a 4 o 5 µg STX/kg de pc resulta en dificultades respiratorias serias. La muerte se previene mediante respiración artificial. Si la dosis no es excesiva puede ocurrir que la respiración se restablezca espontáneamente. En los experimentos con animales sólo se observó parálisis periférica por efectos directos en los músculos del sistema respiratorio. No se observa inhibición del centro respiratorio del sistema nervioso y los potenciales de acción se envían a los músculos del centro de las costillas y del diafragma. Sin embargo, otros investigadores sugieren una influencia central y no se puede descartar que haya efectos centrales en las neuronas respiratorias. A menudo, la parestesia y la sensación de liviandad están relacionadas con un efecto central, aunque también pueden ser ocasionados por efectos periféricos en el sistema nervioso (Mons *et al.*, 1998).

efectos cardiovasculares

Los estudios con animales anestesiados demostraron que dosis intravenosas de más de 1 µg STX/kg de pc pueden provocar hipotensión (con dosis menores se observa parálisis muscular). Rara vez se observan efectos cardiovasculares en intoxicaciones en seres humanos. Estos parecen ser más bien un reflejo de los efectos periféricos, aunque el sistema nervioso central pueda estar involucrado en cierta medida. La acción periférica es incierta. Además del efecto directo en los tejidos musculares, no se puede excluir la posibilidad de un bloqueo axonal del sistema nervioso simpático. La mayoría de los investigadores concuerdan en que no hay o casi no hay efectos cardíacos directos. Se menciona, a modo de excepción, una distorsión directa de la conducción del seno atrio-ventricular (Mons *et al.*, 1998).

efectos neuromusculares

Una dosis intravenosa entre 1 y 2 µg STX ocasiona un debilitamiento rápido de las contracciones musculares, tanto de aquellas por estimulación directa como por estimulación motoneuronal indirecta. Los efectos abarcan todos los tejidos musculoesqueléticos. Esta dosis induce también un decaimiento de la amplitud – potencial de acción y una extensión del período de latencia en el tejido nervioso periférico. La influencia afecta tanto a las neuronas motoras como a las sensoriales aunque, estas últimas se inhiben con dosis menores. La influencia en el sistema sensorial podría explicar la pérdida propioceptiva y el entumecimiento, pero no la parestesia. La teoría del mecanismo tóxico es objeto de numerosos debates científicos (Mons *et al.*, 1998).

efectos en el sistema nervioso central

No se ha determinado con certeza si las toxinas PSP tienen un efecto sobre el sistema nervioso central, aunque no se ha podido excluirlas. La mayoría de los síntomas pueden atribuirse a efectos periféricos. Algunos investigadores, por ejemplo, examinaron la influencia de la STX sobre el reflejo aquiliano (Mons *et al.*, 1998).

administraciones repetidas

No hay información.

mutegenicidad

No hay información.

estudios de reproducción /teratogenicidad

No hay información.

2.5.4 Toxicidad en seres humanos

toxicidad aguda

La concentración causante de las intoxicaciones por PSP en los seres humanos varía considerablemente. Esto se debe principalmente a diferencias de sensibilidad individuales y a oscilaciones del método de determinación. Se observaron síntomas leves con una ingesta oral entre 144 y 1 660 μg eq de STX/persona e intoxicaciones fatales por ingerir entre 456 y 12 400 μg eq de STX/persona, calculado a partir de los restos de mejillones tóxicos y considerando que estos valores pueden presentar grandes variaciones. En algunos casos, la ingesta oral de 300 μg de toxinas PSP por persona causó la muerte, mientras que en otros casos se observó la ausencia de síntomas tóxicos luego de una dosis oral de 320 μg de toxinas por persona. En Alaska, un pescador murió intoxicado con PSP mientras que otras dos personas lograron finalmente recuperarse. Se encontraron 370 μg de toxinas PSP (eq de STX)/100 g en los estómagos de los pacientes (Mons *et al.*, 1998). Según Aune (2001), otros autores mencionan intoxicaciones leves con dosis de toxinas PSP entre 304 y 4 128 μg /persona, e intoxicaciones graves con dosis entre 576 y 8 272 μg /persona (Aune, 2001).

En 1987 ocurrió un brote de PSP con 187 casos y 26 muertes por ingerir sopa de almeja (*Amphichaena kindermani*). Un 50 por ciento de los casos fatales fueron niños pequeños, en comparación con solo un 7 por ciento en adultos. Se estima que algunos de los niños que murieron habían ingerido aproximadamente entre 140 y 160 UR/kg de pc (Rodrigue *et al.*, 1990). Según Aune (2001), en este mismo incidente la dosis letal mínima fue de 25 μg eq de STX/kg para niños de 25 kg de peso, comparado con entre 86 y 788 μg eq de STX/kg de pc en cuatro de los adultos que murieron.

Según la Autoridad Alimentaria de Nueva Zelanda y Australia, en los seres humanos entre 120 y 180 μg de toxinas PSP pueden ocasionar síntomas leves, entre 400 y 1 060 μg pueden causar la muerte y dosis entre 2 000 y 10 000 μg muy probablemente sean fatales (ANZFA, 2001).

La tasa de mortalidad de las PSP es muy variable. En brotes recientes en América del Norte y Europa Occidental, con más de 200 personas afectadas, no se registró ninguna muerte. Sin embargo, la tasa de mortalidad de brotes similares en Asia Sudoriental y en América Latina es del 2 al 14 por ciento. Gran parte de la diferencia se debe a que los primeros ocurrieron principalmente en áreas urbanas, donde las víctimas cuentan con cuidados médicos. En Asia Sudoriental y en América Latina, por el contrario, las intoxicaciones ocurrieron a menudo en áreas rurales, donde los habitantes y médicos locales nunca habían observado este tipo de envenenamiento (Mons *et al.*, 1998).

síntomas tóxicos

En casos leves, los síntomas clínicos de intoxicación con PSP incluyen una sensación de hormigueo o entumecimiento alrededor de los labios que generalmente aparece dentro de los 30 minutos. Sin duda, esto se debe a la absorción local de las toxinas PSP por las mucosas bucales. Luego el hormigueo o entumecimiento se extiende progresivamente por el rostro y el cuello. Con frecuencia, el paciente experimenta una sensación de picazón en las puntas de los dedos de las manos y de los pies, cefaleas, mareos, náuseas, vómitos y diarrea y, ocasionalmente, también ceguera temporal. La mayoría de los síntomas aparecen rápidamente (en cuestión de horas), pueden durar varios días y son prácticamente invariables en todos los casos de intoxicación parálitica por mariscos. Estos síntomas preceden una debilidad muscular característica ya que los nervios sensoriales son más finos y tienen internodos más cortos que los nervios motores y son los primeros afectados por cualquier agente de bloqueo axonal.

En intoxicaciones moderadamente graves, la parestesia se extiende a los brazos y las piernas, que presentan también debilidad motriz. El paciente padece también vahídos y articulación incoherente. Con frecuencia se observan manifestaciones del cerebelo, como por ejemplo ataxia, falta de coordinación motora y disimetría. Las primeras dificultades respiratorias se manifiestan con una sensación de ahogo alrededor de la garganta. En casos de intoxicación grave, la parálisis muscular se extiende y se agrava. Generalmente, el pulso no presenta anomalías alarmantes. En algunos casos, entre dos y 24 horas luego de la ingestión el paciente presenta dificultades respiratorias graves y muere por parálisis respiratoria (Mons *et al.*, 1998).

Las moléculas de STX tienen carga y son hidrosolubles. Por este motivo se cree que no atraviesan correctamente la barrera hematoencefálica y la mayoría de sus efectos ocurren en los nervios periféricos (Mons *et al.*, 1998). Gessner *et al.* (1997) observaron que los pacientes intoxicados por PSP en Alaska presentaron hipertensión en función de la dosis de toxinas ingerida.

efectos del consumo de alcohol

Aún no se sabe con certeza cuáles son los efectos del consumo de alcohol en la intoxicación por PSP. Algunos autores sostienen que el alcohol podría actuar como un agente protector contra los efectos adversos de las toxinas PSP, pero no se conoce aún el supuesto mecanismo mediante el cual reduciría el riesgo. Se sabe que la eliminación de las toxinas PSP se realiza, al menos parcialmente, por la orina y el alcohol podría actuar como un diurético. También podría causar la inducción de las enzimas hepáticas. En Alaska se efectuó un estudio de casos y testigos en 47 brotes con historial de consumo conocido para todos los individuos. El consumo de alcohol y la ingestión de mariscos preferentemente cocidos y no crudos se asociaron a un menor riesgo de PSP. No se pudo asociar la enfermedad ni con la concentración de toxinas ni con la dosis ingerida (Mons *et al.*, 1998).

tratamiento

El tratamiento clínico de las víctimas es integral. Si no hubo vómitos espontáneos, se procede con emesis inducida o con lavado gástrico para eliminar las fuentes de toxinas aún no absorbidas. En un medio ácido como el gástrico, las toxinas PSP tienen mucha carga y el carbón activado las absorbe eficazmente. Estos pasos son de suma importancia en el tratamiento de niños intoxicados ya que la gravedad de la intoxicación es directamente proporcional a la concentración de toxinas en el cuerpo. En Guatemala, en la epidemia de 1987 la tasa de mortalidad infantil (de hasta seis años) fue del 50 por ciento, mientras que en adultos solo de un 7 por ciento.

En casos moderadamente graves, el objetivo primordial es mantener respirando al paciente. En casos de intoxicación por PSP sin complicaciones, las vías respiratorias no se obstruyen con excreciones excesivas. La insuficiencia respiratoria se debe a distintos grados de parálisis de los nervios y músculos respiratorios por lo que se recomienda someter al paciente a respiración artificial con presión positiva, si corresponde. La acidosis que pudiera presentar el paciente se corrige con terapia de fluidos, que además facilita la excreción renal de toxinas.

Resulta eficaz el manejo integral, conservador y tradicional del paciente. Si el sobrevive 18 horas, la prognosis es buena y la recuperación total rápida. Algunos autores sostienen que en nueve horas se logra la disminución fisiológica de la concentración de toxinas hasta grados relativamente inofensivos, salvo en casos con concentraciones iniciales de toxinas muy elevadas o en víctimas con disfunción renal. Del punto de vista médico, las únicas medidas aceptables en casos de intoxicación con STX son la respiración artificial y el lavado gástrico. En casos de intoxicación grave, la respiración artificial no siempre es recomendable (Mons *et al.*, 1998).

Algunos estudios con animales indican que la 4-aminopiridina es un antídoto útil para intoxicaciones con STX. Chen *et al.* (1996) estudiaron ratas intoxicadas con STX y anestesiadas. Observaron que la sustancia revierte considerablemente la velocidad respiratoria, el volumen de respiración pulmonar y la tensión arterial a valores normales. También observaron que la 4-aminopiridina prolonga el tiempo de supervivencia y además disminuye la mortalidad en ratones (de 71 a 43 por ciento) con una dosis letal normal de STX (30 µg/kg intraperitoneal). Chang *et al.* (1997b) observaron que en cobayos, la sustancia revierte la falla cardiorrespiratoria y los otros efectos letales de la STX. Los autores inyectaron 4-aminopiridina cuando la función cardiorrespiratoria está en peligro grave (a los 30 minutos de una inyección intramuscular de STX). En cuestión de minutos, el bloqueo del diafragma, la bradiopnea, la bradicardia y la disminución de la actividad cortical, fenómenos todos inducidos por la STX, se restablecen a grados comparables o superiores a los observados en el grupo testigo. La administración de las dosis de 4-aminopiridina indicadas para restablecer la función respiratoria y cardiovascular no provoca convulsiones ni ataques. Si provoca efectos secundarios menos pronunciados, como excitación cortical y períodos transitorios de fasciculación del músculo esquelético. Estos se consideran nimios en comparación con su notable efecto terapéutico.

Según Benton *et al.* (1998), en cobayos, la administración de 4-aminopiridina durante el paro respiratorio revierte la letalidad inducida por la STX. También observaron que facilita la recuperación y reduce el tiempo de dependencia de los cobayos en la respiración artificial.

2.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

Zhijun *et al.* (2001) estudiaron los efectos graves y crónicos de *A. tamarensis* en el camarón *Neomysis awatchensis*. Con 9 000 células por litro, la tasa de mortalidad de *N. awatschensis* es del 55 por ciento. La CL₅₀ de 96 horas para la misma especie de camarón es 7 000 células por litro. Con un filtrado sin células, el 25 por ciento de los camarones murió en 96 horas. En un experimento de 62 días, el 37 por ciento de *N. awatschensis* murió con una concentración de 900 células/ml y el número de juveniles fue 27 (solo 16,4 por ciento del número de juveniles en el grupo testigo). La primera fecha de reproducción se prolongó tres días en comparación con los grupos testigo. La longitud y el peso de los camarones progenitores con 900 células/ml es 95,6 y 81,8 por ciento, respectivamente, de los valores del grupo testigo. Las diferencias en longitud y peso no se consideran significativas.

Yan *et al.* (2001) estudiaron la inhibición del nacimiento de la vieira *Chlamys farreri* y la supervivencia de las larvas con distintas concentraciones de *A. tamarensis*. En huevos fértiles de vieira se registró solo un 30 por ciento de nacimientos y cinco por ciento en el grupo testigo con una exposición de 36 horas a células o fragmentos celulares de *A. tamarensis* en concentraciones de 100 y 500 células/ml, respectivamente. No se observó esta respuesta inhibitoria exponiendo los huevos a STX o a contenidos de células (células de algas suspendidas nuevamente o sobrenadantes). El alga también afectó a las larvas en el estadio D temprano de la vieira. Se observó un descenso considerable de las tasas de supervivencia con exposición durante seis días en concentraciones $\geq 3\ 000$ células/ml. Ninguna larva sobrevivió a una exposición de 14 días en concentraciones de 10 000 células/ml. El estudio concluyó que los estadios de desarrollo previos a la blástula son los más sensibles a las toxinas de *A. tamarensis*. La comparación del efecto del alga sobre el nacimiento de los huevos según la fase de crecimiento muestra que el mayor efecto es en la fase de crecimiento exponencial temprana.

La mayoría de los mariscos bivalvos que se alimentan por filtración son relativamente insensibles a las toxinas PSP. Esto se debe a que muchos de ellos cuentan con nervios y músculos operados principalmente por canales de calcio activados por voltaje, en tanto que las STX y otras toxinas bloquean solo los canales de sodio con más potencia (con mucha afinidad). Esto permite a los mariscos continuar alimentándose y convertirse en muy tóxicos. El mejillón común, por ejemplo, puede acumular más de 80 μg STX en menos de una hora debido a su gran tolerancia y a que deja de alimentarse de algas tóxicas (Mons *et al.*, 1998).

Incluso existen ciertas especies de bivalvos que evitan los dinoflagelados tóxicos. Una de estas especies, de especial interés, es la chirla mercenaria, *Mercenaria mercenaria*. En estudios de laboratorio se observó que en presencia de *A. tamarensis*, primero retrae los sifones y luego se aísla por completo del ambiente exterior, cerrando la válvula de la concha. No vuelve a abrir sus válvulas hasta que se agrega agua de mar limpia (Mons *et al.*, 1998).

Las floraciones de *Alexandrium* pueden causar la muerte de peces. Para un arenque adulto, por ejemplo, una dosis entre 10 y 20 μg eq de STX es letal (Teegarden y Cembella, 1996). La observación con el microscopio óptico de pececillos de sabalote, *Chanos chanos*, expuestos (sin ventilación) durante un día a *A. minutum* tóxica ($1,4 \times 10^4$ células/ml $\sim 3,0 \times 10^4$ células/ml) o a extractos de algas tóxicas ($5,13 \times 10^3$ células/ml $\sim 2,05 \times 10^4$ células/ml) reveló edema notorio, hiperplasia y necrosis de las láminas secundarias de las branquias. En peces tratados con STX pura ($6,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) se observaron síntomas similares. En pececillos sometidos al mismo tratamiento se observó un aumento de la tasa de consumo de O₂ y mayor demanda de presión de O₂ crítica. Los pececillos de sabalote tratados con células o extracto celular de algas *A. minutum* no tóxica no presentan daños en las branquias ni aumento de la velocidad de consumo de O₂ ni de la demanda de O₂ crítica. Sin embargo, se observó la muerte de los pececillos por sofoco en un período de 24 horas con

concentraciones de $2,1 \times 10^4$ células/ml de *A. minutum* no tóxica sin ventilación asistida (Chou y Chen, 2001b).

Samson *et al.* (1999) estudiaron los efectos subletales de *Alexandrium*, como los que pueden ocurrir antes y después de las proliferaciones, en un grupo de larvas de fúndulo, *Fundulus heteroclitus*, alimentado con copépodos que pastoreaban *Alexandrium*. Se observó que sistemáticamente las larvas expuestas presentan menor desempeño natatorio y capturan menos presas. En algunos ensayos se observó que los copépodos expuestos eran capturados más fácilmente que los no expuestos. Los resultados sugieren que *Alexandrium* afecta tanto a los peces como a sus presas, facilitando así el pasaje de las toxinas por la cadena alimentaria.

Las respuestas del zooplancton a los flagelados tóxicos son muy variables. Algunas especies evitan la ingestión del alga y otras seleccionan activamente. Bagøien *et al.* (1996) demostraron que *A. minutum* inactiva todos los estadios de desarrollo de *Euterpina acutifrons*, una especie del zooplancton, pero los efectos aparecen más rápido y son más intensos en los nauplios. Sin embargo, los nauplios y los copépodos que no presentan movimiento durante un cierto período de tiempo se definen a menudo como inactivos, aunque en muchos casos no están muertos. Por otra parte, en un estudio de gran volumen, de cinco días de duración, se observó que hacia el final del estudio la tasa de inactivación de los adultos era alta (el 80 por ciento estaba inactivado). Muchos de los copépodos están definitivamente muertos, pero un porcentaje considerable de las hembras adultas aún presentan actividad y son capaces de producir huevos viables. Tras cinco días de exposición a *A. minutum*, solo se detectaron trazas de toxinas PSP en los copépodos adultos lo que sugiere que el *E. acutifrons* evita ingerir los dinoflagelados luego de probar un par de células. La extrapolación de estos resultados a las condiciones naturales asumiendo que el zooplancton no evita la zona afectada, sugiere que, si bien ante una proliferación mediana o densa, los efectos tóxicos no son graves, en algunos casos muere un porcentaje considerable de la población zooplanctónica.

Dutz (1998) estudió los efectos de *A. lusitanicum*, un dinoflagelado productor de toxinas PSP, en la reproducción de *Acartia clausi*, un copépodo calonoide común. No se registró mortalidad de *Acartia clausi* alimentados con *A. lusitanicum* y continuaron siendo capaces de producir huevos, aunque en menor cantidad. Se cree que las toxinas ingeridas interfieren con el proceso digestivo o generan un gasto energético extra debido a la eliminación de toxinas, que resulta en una disminución de la disponibilidad energética y en menor fecundidad. En aguas costeras de Egipto la mortalidad de peces *in natura* y de peces en acuarios con agua de mar filtrada se asoció con floraciones densas de *A. minutum* (Bagøien *et al.*, 1996).

2.5.6 Toxicidad en aves acuáticas

Gochfeld y Burger (1998) describen el envenenamiento grave de pichones de gaviotas plateadas, *Larus argentatus*, que ingirieron un lote de vieiras adquirido en un comercio. Los pichones presentaron un síndrome grave característico, hasta ese momento no registrado en aves y cuya causa se desconoce. Los autores sugieren que fue causado por una variante de las toxinas PSP, ya que los síntomas incluían parálisis y hubo ingesta de mariscos. Sin embargo, los análisis realizados dieron resultados negativos para las STX, brevetoxina y ácido domoico.

2.6 Prevención de la intoxicación por PSP

2.6.1 Depuración

El objetivo de los métodos de eliminación de las toxinas paráliticas de los mariscos contaminados es reducir a un mínimo el tiempo durante el cual dichos mariscos no pueden comercializarse. El método más obvio es transferir los mariscos a aguas sin organismos tóxicos permitiendo que se autodepuren. Sin embargo, este método es costoso y requiere muchas horas de trabajo. Las tasas de eliminación de toxinas varían ampliamente según la especie permaneciendo tóxicas algunas de ellas incluso durante varios meses, como las *Crassostrea*, *Plactopecten* y *Spisula*, entre otras. En el mejillón, el tiempo

necesario para eliminar las toxinas también es variable. Si los dinoflagelados contaminantes desaparecen del agua, las toxinas disminuyen gradualmente. En 12 días, en agua salada sin dinoflagelados, a una temperatura entre 15 y 20° C, la toxicidad del mejillón, *Mitylus edulis*, disminuye en un 50 por ciento. En la almeja *Saxidomus giganteus*, el tiempo de eliminación de las toxinas PSP es más prolongado. Luego de la exposición a dinoflagelados tóxicos es necesario un año, o más, para que esta especie elimine las toxinas (Mons *et al.*, 1998). La tasa de eliminación varía según la estación y parece que temperatura del agua bajas retardan la eliminación. Sin embargo, aún no se sabe con exactitud en qué medida la temperatura del agua afecta la tasa de absorción y eliminación de toxinas. Esta, además, varía en función del lugar en el animal donde se alojaron las toxinas (las toxinas en el tracto gastrointestinal se eliminan más rápidamente que las toxinas alojadas en los tejidos) y de la concentración inicial o del pico de concentración de toxinas. Se sabe que los mejillones acumulan las toxinas PSP más rápido que otras especies de mariscos y que las eliminan rápidamente. En el caso de las ostras, si bien las toxinas no se acumulan tan rápidamente como en los mejillones, los tiempos de eliminación son considerablemente más prolongados (Mons *et al.*, 1998).

Los resultados de las técnicas de eliminación de toxinas con estrés de sal o temperatura han tenido escaso éxito. En vieiras, se acelera la excreción de toxinas con tratamientos de choque eléctrico instantáneo. En almejas amarillas, se intentó reducir el pH para eliminar las toxinas, pero no se obtuvieron buenos resultados. En Francia, se ensayó la cloración, pero el procedimiento altera el sabor del marisco disminuyendo el potencial de comercialización. Por otra parte, se determinó que el agua de mar tratada con ozono ayuda a eliminar las toxinas del marisco recién contaminado con dinoflagelados tóxicos en estado vegetativo. Un estudio realizado durante una marea roja demostró que el tratamiento del agua de mar con ozono impide la acumulación de toxinas PSP en los mariscos. Esta activación podría obtenerse en especies comerciales, como por ejemplo *Mya*, en tiempos económicamente viables. Sin embargo, el ozono es inútil cuando se trata de eliminar quistes o en bivalvos que han ingerido quistes o en los que las toxinas han estado alojadas en los tejidos durante largos períodos. Por otra parte, la eliminación de toxinas de los mariscos, especialmente de las paráliticas, por largos períodos, no es viable del punto de vista económico. El ozono no se recomienda como un método práctico ni seguro para eliminar las toxinas de los mariscos (Mons *et al.*, 1998).

La cocción es otro de los métodos propuestos para eliminar las toxinas PSP de los mariscos contaminados. Sin embargo, si bien reduce las concentraciones de toxinas, no elimina el peligro de intoxicación. En algunos casos, si la concentración inicial de toxinas es baja, la cocción constituye un método efectivo para reducir la toxicidad a un nivel seguro. El método de fritar en una sartén parece ser más efectivo que los otros métodos de cocción. Tanto en la cocción al vapor como por ebullición, las toxinas que se desprenden de los tejidos pasan al líquido de cocción que se vuelve extremadamente tóxico (Mons *et al.*, 1998). La ebullición de las ostras durante los tiempos de cocción habituales en el hogar (98 °C durante 10 minutos) reduce su toxicidad entre 68 y 81 por ciento. Sin embargo, la ebullición por sí sola no es suficiente para eliminar completamente las toxinas de los mariscos muy tóxicos (Jeong *et al.*, 1999).

Beringuer *et al.* (1993) estudiaron los efectos del proceso de enlatado industrial con berberechos, *Acanthocardia tuberculatum*, contaminados con toxinas PSP. Los autores observaron que la ebullición y la esterilización reducen la toxicidad, en promedio, en más de 70,6 y 77,9 por ciento y 81,8 y 90,9 por ciento, respectivamente. Takata *et al.* (1994) investigaron el tratamiento térmico como forma de reducir la toxicidad en ostras, *Crassostrea gigas*, contaminadas con PSP. La ebullición a 98 °C entre cinco y 60 minutos eliminó entre 53 y 88,3 por ciento de las toxinas. La esterilización en autoclave a 120 °C entre cinco y 60 minutos eliminó entre 57,4 y 100 por ciento de las toxinas. La ebullición y la esterilización en autoclave durante 60 minutos resultan en mayores porcentajes de eliminación de toxinas que en cinco minutos.

En ostras contaminadas con PSP la velocidad de eliminación de toxinas por ebullición y esterilización en autoclave es menor. En un grupo de ostras con 17,4 y 29,8 UR de toxinas PSP, sometidas a ebullición, enlatadas y esterilizadas en una autoclave, se observó una reducción de aproximadamente 20 por ciento posterior a la ebullición y de menos de 10 por ciento posterior a la esterilización en

autoclave. La toxicidad inicial determina la eficacia del enlatado como método para reducir la toxicidad por PSP a grados inferiores a los de cuarentena. El método requiere de suma precaución (Mons *et al.*, 1998).

Jeong *et al.* (1999) observaron una reducción <80 µg eq de STX/100 g posterior a la ebullición y enlatado ahumado de ostras, *Crassostrea gigas*, con entre 185 y 778 µg eq de STX/100 g. Los porcentajes molares de los componentes de toxinas en las ostras sin caparazón son 25,1 por ciento de GNTX1 y 19,2; 17,2 y 14,6 por ciento molar de GNTX3, GNTX4 y GNTX2, respectivamente. Los autores observaron cantidades traza de C1, C2, STX y de neoSTX. En cuanto a la toxicidad específica, las toxinas dominantes son GNTX1-4. La suma de GNTX1, 2, 3 y 4 fue >80 por ciento de la toxicidad total. De las toxinas estudiadas, la STX y la dc-STX son las más termoestables.

El enlatado (cocción al vapor, cocción y esterilización) de mejillones, *Mitylus galloprovincialis*, encurtidos y en salmuera, causa una reducción del 50 por ciento de la toxicidad por PSP de la carne del marisco. Esta disminución no está relacionada con las concentraciones de toxinas en la carne de mejillón cruda. La reducción de la toxicidad total se debe a la destrucción de las toxinas y a que un cierto porcentaje se pierde en el agua de cocción y en los materiales de embalaje del producto enlatado. La conversión de toxinas cambia el perfil, que a su vez afecta los porcentajes de eliminación (Vieites *et al.*, 1999).

Indrasena y Gill (1999) estudiaron los efectos de un rango de valores de pH (entre 3 y 7) en la cinética de la destrucción térmica de cada toxina PSP en la glándula digestiva de la vieira. Los autores observaron que la mayoría de las toxinas individuales se degradan más rápidamente cuando se someten a temperaturas más elevadas, con un pH más alto durante períodos más prolongados. También observaron que la toxicidad por PSP a 130 °C, con un pH entre 6 y 7 disminuye rápidamente.

Indrasena y Gill (2000a) estudiaron mezclas de toxinas PSP purificadas y parcialmente purificadas, incluyendo toxinas C1/2 y B1, GNTX1-4, neoSTX y STX, que sometieron al calor (entre 90 y 130 °C), entre 10 y 120 minutos, con pH entre 3 y 7, y analizaron luego por CL. Los autores observaron que con pH bajo, las toxinas C disminuyen rápidamente y las GNTX1/4 disminuyen con temperaturas altas y pH alto. Con pH bajo, la GNTX 2/3 aumenta inicialmente y luego disminuye con el calor, mientras que con un pH entre 3 y 4, la STX aumenta uniformemente. La toxicidad total disminuye con un pH entre 6 y 7. La eficacia de la destrucción térmica está estrechamente relacionada con el pH, observándose una rápida destrucción térmica de las toxinas carbamato con pH alto. También se observó que con calor y pH bajo, los compuestos menos tóxicos se convierten en compuestos muy tóxicos.

Los mismos autores estudiaron la variación de las toxinas C (C1-2), GNTX1-4, STX y neoSTX en la glándula digestiva de la vieira y de una mezcla de toxinas PSP purificada almacenada a -35, 5 y 25 °C, con pH diferente (Indrasena y Gill 2000b). Todas las toxinas permanecen estables con pH bajo (entre 3 y 4) y a -35 °C. También observaron que a 5 y 25 °C, las toxinas C son las más sensibles a todos los cambios de pH, seguidas de las GNTX1/4. A -35 y 5 °C la más estable es la STX, seguida de la neoSTX, especialmente con un pH entre 3 y 4.

A excepción de los métodos mencionados por Berenguer *et al.* (1993) y Takata *et al.* (1994), casi no existen métodos útiles para reducir eficazmente el contenido de toxinas PSP en los mariscos contaminados. La mayoría de los métodos propuestos son poco seguros, demasiado lentos, inviables económicamente, o resultan en productos de aspecto o sabor inaceptables. Considerando el aumento de las floraciones de algas nocivas y el creciente interés en el cultivo de moluscos bivalvos en todo el mundo, es necesario continuar investigando medios eficaces para eliminar las toxinas de los mariscos contaminados con PSP. Si no se encontraran, sería necesario detectar las toxinas PSP controlando los mariscos.

Takatani *et al.* (2003) proponen tratar las ostras *Crassostrea gigas* contaminadas con toxinas PSP, con una solución alcalina y salina, para posteriormente someterlas al calor de microondas para descomponer eficazmente las toxinas.

No se detectó toxicidad en el músculo aductor en las vieiras *Patinopecten yessoensis*, vivas o frescas, contaminadas con PSP, con hasta 2 900 UR /g,. Por otra parte, la toxicidad del músculo aductor de las vieiras enteras congeladas es muy baja. La toxicidad varía según el procedimiento utilizado, especialmente con concentraciones elevadas cuando se dejan descongelar lentamente durante varias horas. El músculo aductor de la vieira *Patinopecten yessoensis* solo es apto para el consumo cuando se prepara a partir de vieiras vivas o frescas, luego de extraer cuidadosamente las vísceras tóxicas, las huevas y otros órganos (Murakami y Noguchi, 2003).

Se investiga en el marco del Programa de Investigación de la CE “Calidad de vida y recursos vivos”, un sistema de eliminación acelerada de toxinas para mariscos marinos vivos contaminados con toxinas PSP. El objetivo del proyecto es determinar los efectos de una dieta de microalgas para acelerar el proceso de eliminación de toxinas en ostras y almejas vivas, en un sistema capaz de sortear las dificultades que presenta la contaminación con PSP. El proceso está orientado a acelerar la cinética de la eliminación de toxinas del marisco con dietas adecuadas utilizando la densidad celular no tóxica (Anonymous, 1999a).

2.6.2 Medidas preventivas

Hasta el momento, los métodos para eliminar las toxinas de los mariscos en gran escala con sistemas artificiales, de manera económicamente viable y eficiente, no resultan prometedores. En las áreas propensas a brotes regulares de algas tóxicas, tanto los cultivadores como los pescadores comerciales utilizan sistemas de control que alertan de la presencia de mariscos tóxicos y planifican sus actividades en consecuencia. Una forma de limitar a un mínimo las pérdidas económicas es poner en práctica un programa de control intensivo y cultivar especies de “eliminación rápida” (por ejemplo *Mitylus edulis*) o de especies que se sabe evitan la ingestión de dinoflagelados tóxicos, por ejemplo *Mercenaria*, y la mayoría de las ostras y vieiras.

La inspección regular del agua en la que se cultivan los mariscos es una de las medidas preventivas para controlar la posible aparición de dinoflagelados tóxicos, particularmente durante la época de floraciones. Además, se recomienda controlar rutinariamente los mariscos para detectar la presencia de quistes de dinoflagelados. En consecuencia, es de suma importancia desarrollar un método rápido y confiable para detectar las especies de *Alexandrium* antes de una floración (Mons *et al.*, 1998). Una alternativa podría ser la identificación morfológica, pero no hay aún unanimidad al respecto (Sako, 1999). Algunas características morfológicas varían según las condiciones medioambientales o según el estadio de crecimiento. Por este motivo es necesario utilizar técnicas biológicas, bioquímicas, inmunológicas y de biología molecular. También se han utilizado análisis con anticuerpos monoclonales y ensayos de unión a la lecitina. Sin embargo, estas técnicas analíticas se basan en características fenotípicas que pueden verse afectadas por factores medioambientales (Adachi *et al.*, 1996). A fin de sortear los problemas fenotípicos, una herramienta útil será definir marcadores genéticos para clasificar las especies de *Alexandrium* productoras de toxinas PSP. Algunos autores investigaron las secuencias del ADN ribosómico (ADNr) y los espaciadores transcritos internos (ITS por sus siglas en inglés), con sondas de ADN e hibridación de toda la célula (Adachi *et al.*, 1996; Sako, 1999).

Haley *et al.* (1999) simplificaron un método para trabajar con un protocolo que insume mucho tiempo y gran cantidad de recursos, para aislar el ADN ribosómico (ADNr) de *A. tamarensis*. El método detecta 10^{-4} ng/ μ l de ADN de *A. tamarensis*. El equipo permite aislar *A. tamarensis* a partir de fuentes de agua con muy poca degradación de la señal. Es una técnica útil que permite detectar rápidamente la presencia de *A. tamarensis*, incluso antes que la cantidad de células sea suficiente para su identificación morfológica.

Guzmán *et al.* (2001) proponen fortalecer la prevención utilizando, además de un programa de control de PSP, un programa de formación de grupos objetivo específicos y mediante un sistema de diseminación de la información adecuado. Un programa utilizado en el sur de Chile en 1997 incluyó:

- talleres de formación para distintos grupos;
- preparación y divulgación de información clave sobre floraciones de algas nocivas y sus efectos, destinada a la comunidad en general; y
- actividades específicas con alumnos, maestros y personal docente de escuelas primarias y secundarias.

Es necesario adoptar las medidas correspondientes para impedir el consumo de mariscos contaminados e informar a las autoridades sanitarias de los casos de intoxicaciones por PSP en los seres humanos tan pronto como sea posible. El Capítulo 2.8 trata del control y la reglamentación vigente.

2.7 Casos y brotes de PSP

2.7.1 Introducción

Hallegraeff (1993) menciona el aumento de la distribución global de la intoxicación parálitica por mariscos. Hasta 1970, sólo se tenía conocimiento de floraciones de dos especies de dinoflagelados productoras de PSP, *A. tamarensis* y *A. catenella*, en aguas templadas de Europa, América del Norte y Japón. Veinte años más tarde se registraban todo a lo largo del hemisferio sur: en Sudáfrica, Australia, India, Tailandia, Brunei Darussalam, Sabah (Malasia), las Filipinas y en Papua Nueva Guinea. El interés creciente en la explotación acuícola de aguas costeras fomentó indudablemente un mayor conocimiento de las especies de algas tóxicas, pero aún no se sabe a ciencia cierta si esta es la única explicación.

2.7.2 Europa

La Figura 2.2 ilustra la presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM, desde 1991 a 2000.

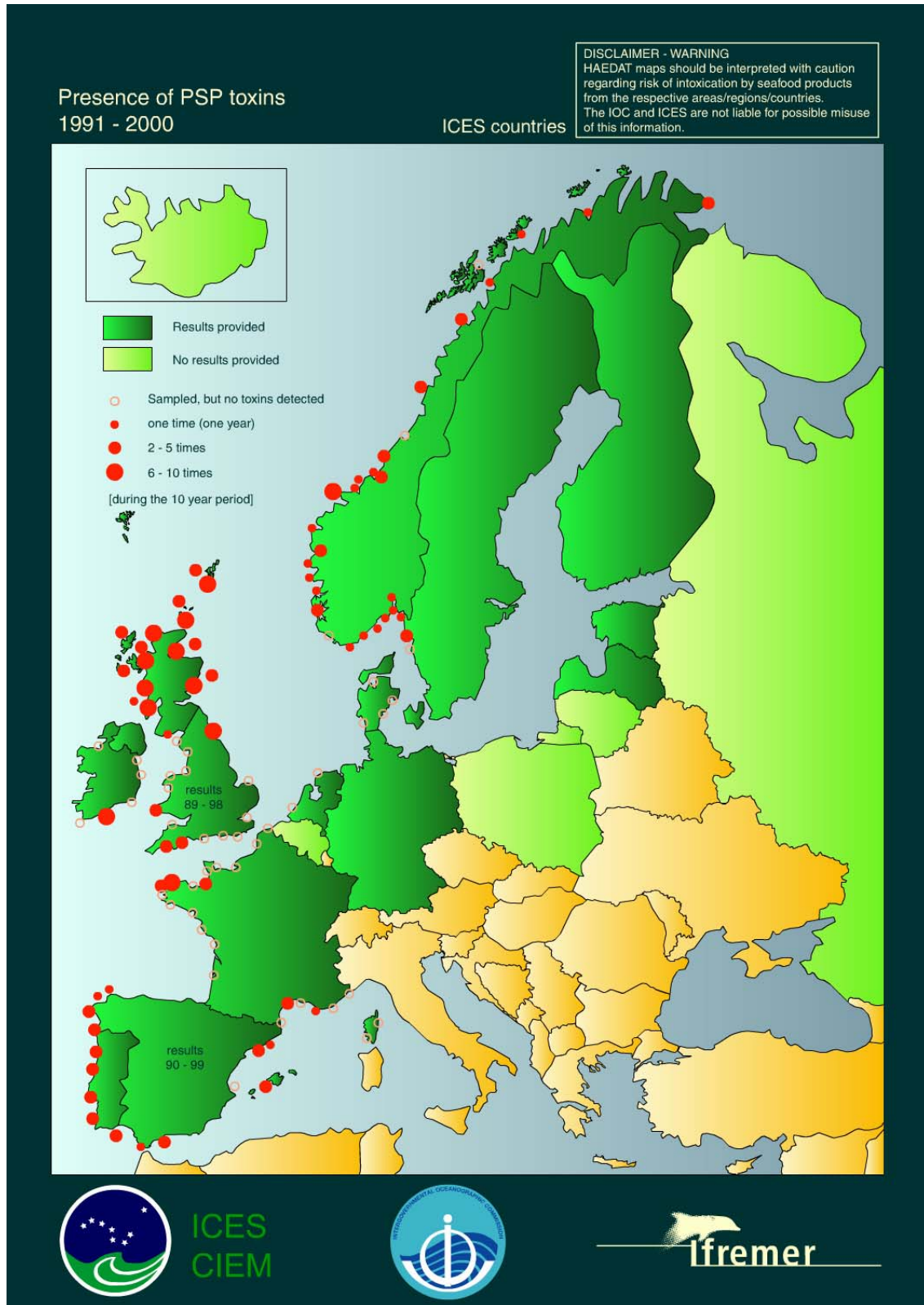
Dinamarca

En 1987 y en 1990 (y probablemente también en 1988) se detectó la presencia de toxinas PSP producidas por las especies *A. tamarensis* y *A. ostentfeldii*, en mejillones de la costa este de Jutlandia. (CRL, 1995). En 1996 se registró otro episodio de PSP, seguido de otro episodio tipo PSP en 1997, aunque en este último caso no se confirmó la existencia de toxinas PSP (EU-NRL, 1998).

Francia

La mayoría de los episodios tóxicos causados por biotoxinas marinas se asociaron con ficotoxinas diarreicas y sólo algunos menos significativos con ficotoxinas paráliticas. Todos ellos ocurrieron en la costa norte de Bretaña y en todos los casos fueron causados por *A. minutum*, con una toxicidad máxima de 400 µg eq de STX/100 g de carne en ostras y mejillones. A fines de 1992 se detectó la presencia de toxinas PSP en mejillones de la costa Atlántica sin que se encontraran algas productoras de toxinas en las aguas (CRL, 1995). A fines de 1998 se observaron concentraciones de hasta 350 000 células de *A. tamarensis* por litro y algunas zonas de cultivo de almejas, ostras y mariscos permanecieron cerradas durante dos meses (EU-NRL, 2000). En 2000 se cerraron dos zonas de cultivo en Bretaña debido a la presencia de toxinas PSP (EU-NRL, 2001).

Figura 2.2 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de los países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Alemania

Desde principios del siglo veinte no se han registrado intoxicaciones asociadas a PSP debidas al consumo de mejillones recogidos en aguas alemanas. Sin embargo, desde 1972, cuando se registraron intoxicaciones en Alemania por consumir mejillones españoles contaminados, éstos se controlan regularmente. Se ha detectado la presencia, aunque limitada en número, de organismos causantes como *A. tamarensis*, *A. minutum* y *A. ostenfeldii*. En 1987 ocurrieron tres casos de PSP en Baja Sajonia los que, una vez más, podrían atribuirse al consumo de mejillones enlatados provenientes de España (CRL, 1995). Desde marzo de 1992 se ha observado la presencia de quistes viables de especies idénticas o muy similares a *G. catenatum* en la costa del Mar del Norte y del Mar Báltico, pero aún no se ha determinado la toxicidad de la cepa. También se han aislado algas verde-azuladas productoras de PSP en agua dulce. No se ha informado de la existencia en aguas alemanas de otras especies productoras de toxinas PSP (IOC, 1995).

Irlanda

En julio de 1992 se observó en el Puerto de Cork, un evento de PSP asociado a *Alexandrium tamarensis*, de tan solo una semana de duración (CRL, 1995). En junio de 1996 se detectó en el mismo puerto la presencia de GNTX2 y GNTX3 en mejillones no cultivados, *Mytilus edulis*, y en ostras de cultivo, *Crassostrea gigas*, luego de una floración de *A. tamarensis*, con concentraciones máximas determinadas por CL de 360 y 88 µg eq de STX/100 g de carne, respectivamente. En 12 días se observó que en *M. edulis* las concentraciones (determinadas por CL) disminuyeron a 25 µg/100 g de carne por depuración natural; mientras que en *C. gigas* disminuyeron a 3 µg eq de STX/100 g de carne en una unidad de depuración (Furey *et al.*, 1998). En 1999 se detectaron quistes de *A. tamarensis* en los sedimentos superficiales del Puerto de Cork, a partir de los cuales se han obtenido cultivos viables (EU-NRL, 2000). En julio de 2002, en el mismo puerto y durante un período de tres semanas, se detectaron concentraciones de toxinas PSP superiores al límite reglamentario, tanto en ostras como en mejillones (EU-NRL, 2002).

Italia

En el Mar Adriático las mareas rojas son un fenómeno recurrente, pero, a pesar de la presencia de especies potencialmente tóxicas como *Alexandrium* spp., hasta 1995 no se registraron casos de intoxicación con PSP en humanos. Entre abril y julio de 1994, 1995 y 1996 se detectó la presencia de *A. minutum* en las estaciones de muestreo de Emilia Romagna, a lo largo de la costa noroeste del Adriático. En mayo de 1994 se detectaron algunas muestras de mejillones con concentraciones de toxinas PSP superiores a 80 µg eq de STX./100 g de carne, pero no se presentaron problemas de salud pública (Poletti *et al.*, 1998). En la costa de Emilia Romagna también se encontraron muestras de mariscos contaminadas con toxinas PSP a causa de la presencia de *A. minutum* en el agua del mar (CRL, 1995). En abril y mayo de 2001 se detectaron concentraciones de toxinas PSP <40 µg eq de STX/100 g de carne, asociadas a *A. minutum* en Friuli Venecia Giulia (EU-NRL, 2001). Casi un año más tarde, a fines de mayo y principios de junio de 2002, en Cerdeña (Golfo de Olbia), se detectó la presencia de toxinas PSP, asociadas a las especies *A. catenella* y *A. minutum*, en concentraciones superiores a 80 µg eq de STX/100 g y un máximo de 2 510 µg eq de STX/100 g (EU-NRL, 2002).

Países Bajos

Rara vez se ha observado la presencia de algas productoras de PSP. Si bien en 1989 se identificaron especies de *Alexandrium* en el Mar del Norte, no se encontraron moluscos con toxinas PSP. En 1990 se registraron algunos casos de personas con síntomas de parálisis luego de ingerir mariscos provenientes del mar de Wadden, pero se determinó que estos casos no estaban relacionados con PSP (Mons *et al.*, 1998). En una ocasión se detectó la presencia de toxinas PSP en vieiras pero resultaron ser una captura incidental del Mar del Norte (CRL, 1995).

Noruega

Los eventos de contaminación con toxinas PSP en Noruega se encuentran entre los primeros registrados en Europa. Las toxinas se han detectado frecuentemente y en varias localidades con casos de intoxicación humana en siete oportunidades (en 1901, 1939, 1959, 1979, 1981, 1991 y 1992) con

un total de 32 víctimas, incluidos dos casos fatales (Mons *et al.*, 1998). En 1994 se puso en práctica un programa de vigilancia que resultó en el cierre de varias zonas de producción debido a la presencia de PSP y en años subsiguientes se observó un patrón similar (EU-NRL, 1998). El 11 por ciento de las muestras analizadas en 1999 contenía toxinas PSP y se informa de algunos casos de enfermedad en humanos asociada a mejillones importados de Suecia (EU-NRL, 2000).

Portugal

Entre 1986 y 1990 se produjeron brotes de PSP en la costa al norte del Cabo Roca. En 1991 no hubo brotes, pero en 1992 volvieron a producirse en la misma zona, en la costa sur de Lisboa y a lo largo de la costa del Algarve, en concentraciones entre 100 y 500 µg eq de STX/100 g de marisco. En 1993 se detectó la presencia de toxinas PSP asociadas principalmente a *Gymnodinium catenatum*, durante prácticamente todo el año y en toda la costa, con concentraciones entre 113 µg eq de STX/100 g de marisco en la costa norte en diciembre, y 9 145 µg eq de STX/100 g en la costa de Lisboa en setiembre. En 1994 se registraron brotes en la costa del Algarve y del sur de Portugal y se determinó que *Gymnodinium catenatum* fue el principal organismo causante. En la Laguna de Obidos se determinó que uno de los organismos causantes de los brotes de PSP fue *Alexandrium lusitanicum* (IOC, 1995). En las últimas dos semanas de octubre de 1994, nueve personas (seis mujeres y tres hombres) se intoxicaron con PSP por ingerir moluscos, *Mytilus edulis*, provenientes de la costa oeste de Portugal (De Carvalho *et al.*, 1998). En 1997 sólo se detectó la presencia de toxinas PSP en una especie: *Tellina crasa* (EU-NRL, 1998). En el área de Algarve se observó la presencia de *G. catenatum* en concentraciones superiores a 3000 células por litro y se estableció un cierre preventivo (EU-NRL, 2000).

España

Desde 1976, la región de las rías de Galicia en el noroeste de la costa atlántica española, donde el cultivo de mejillones es una industria importante, se ha visto seriamente afectada por incidentes de PSP. Los mejillones españoles contaminados causaron intoxicación alimentaria, tanto en España, como en los países que los importaron. En países de Europa Occidental como Alemania, Francia, Suiza e Italia hubo un total de 120 personas afectadas en 1976, aunque sin casos fatales, por ingerir mejillones contaminados, *Mytilus edulis*, importados de España (IPCS, 1984).

Gago-Martinez *et al.* (1996) describen otro episodio muy grave ocurrido en 1993, con eventos tóxicos que se extendieron durante períodos inusualmente largos y que causaron muchos casos en humanos con síntomas poco habituales. Los autores indican que probablemente el organismo causante fue el dinoflagelado *A. catenatum* y señalan la complejidad del perfil de las muestras de mejillones obtenido por análisis químico. El perfil contenía tanto DSP como PSP y entre estas últimas detectaron B1 y derivados decarbamoilados de STX, GNTX2 y de GNTX3, así como pequeñas cantidades de STX y de otras toxinas PSP (no identificadas). En 1995 y 1997 se registraron episodios esporádicos de dos o tres semanas de duración en Galicia (EU-NRL, 1998). En 2000 ocurrieron eventos tóxicos asociados a toxinas PSP que resultaron en la prohibición de cosechar bivalvos en ciertas zonas de cultivo (EU-NRL, 2001).

En enero de 1989 se observó un aumento de las concentraciones de PSP en las escupiñas, *Venus verrucosa*, un bivalvo de la costa mediterránea del sur de España. El aumento, que se constató por medio de análisis rutinarios, probablemente estuvo asociado a la alta concentración de células desnudas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, encontradas en muestras de agua de mar. Las autoridades sanitarias regionales decidieron establecer una veda para la recolección y venta de mariscos en razón de las concentraciones superiores a 80 µg eq de STX/100 g de carne detectadas en otras especies de moluscos (*Venus verrucosa*, *Venerupis rhomboides*, *Callista chione*, *Acanthocardia tuberculatum*) provenientes de las áreas afectadas. El incidente afectó la costa mediterránea de España entre Málaga y Algeciras, una extensión de 150 kilómetros aproximadamente, y probablemente llegó hasta la costa de Marruecos explicando la toxicidad en *A. tuberculatum* importadas de Marruecos en febrero de 1989 (Mons *et al.*, 1998).

En los meses de abril y mayo de 1995, una floración del dinoflagelado *Alexandrium minutum* con concentraciones máximas de 45×10^6 células por litro tiñó las aguas del puerto de Palma de Mallorca (Islas Baleares) de un color marrón rojizo poco habitual. Las muestras de poblaciones no cultivadas de moluscos bivalvos (*Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina* y *Lithopaga lithopaga*), analizadas por bioensayo en ratón dieron resultados positivos, con un máximo de 1170 eq de STX/100 g de tejido. En abril de 1996 y en febrero de 1997 se observaron en esa misma área del puerto mareas rojas de diez días y tres semanas de duración, respectivamente (Forteza *et al.*, 1998).

Tahri Joutei (1998) menciona un brote de PSP observado en octubre y noviembre de 1994 en las costas atlánticas de España, luego de una floración de *G. catenatum*. En 2002, en Galicia (noroeste de España) *A. minutum* y *A. catenella* provocaron eventos tóxicos de corta duración. En Andalucía, la presencia de *G. catenatum* determinó el cierre de ciertas zonas de cultivo, especialmente de *Acanthocardia tuberculata* y de vieiras (EU-NRL, 2002).

Suecia

La contaminación de las zonas de cultivo de mejillones ocurre a finales de la primavera y principios de verano. Entre 1985 y 1988 se detectó la presencia de toxinas PSP en moluscos. En 1986 y 1987 el máximo de toxicidad registrado fue de 1 000 UR/100 g de carne en la especie *A. excavatum* (Mons *et al.*, 1998). El análisis de las muestras por bioensayo se realizó en Noruega y se detectaron concentraciones altas en mayo de 1997 (de aproximadamente 300 µg eq de STX/100 g) (EU-NRL, 1998).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Los primeros casos de intoxicación con PSP ocurrieron en 1968 por ingerir mejillones locales (*Mytilus edulis*) provenientes de la costa noreste de Inglaterra, con entre 600 y 6 000 µg eq de STX/kg, con 78 personas hospitalizadas, pero sin casos fatales (IPCS, 1984). Desde ese entonces, solamente en 1972 y 1973 se ha detectado frecuentemente PSP con concentraciones inferiores a 400 UR/100 g de marisco. En 1977, la toxicidad alcanzó 1 792 UR/100 g. Todos los años entre 1978 y 1981, se observaron eventos de PSP en la costa noreste hacia Escocia, pero la red de control previno eficazmente la intoxicación en humanos. En 1990 se registraron los primeros casos de PSP a lo largo de la costa oeste de Escocia, con concentraciones de toxinas máximas en el orden de 16 480 UR/100 g en mejillones y vieiras (Mons *et al.*, 1993).

En 2000 y 2001 se detectaron concentraciones de toxinas PSP bajas en algunas zonas de Inglaterra y Gales (EU-NRL, 2001). A principios de mayo de 2000 y 2001 se detectaron en Escocia toxinas PSP en mejillones de zonas de cultivo situadas a lo largo de la costa oeste y en el tejido de gónadas de vieiras provenientes de zonas de las Orcadas. A mediados de mayo, las concentraciones en tejido de vieiras alcanzaron 158 µg eq de STX/100 g y se impusieron restricciones al cultivo y recolección de estos moluscos. A fines de mayo se constató que las áreas de cultivo en las Islas Shetland y las áreas de cultivo de vieiras en la costa este estaban también afectadas. En mejillones provenientes de las Islas Shetland se detectaron concentraciones de 211 µg eq de STX/100 g, de 2 999 µg eq de STX/100 g en las Orcadas y de 220 µg eq de STX/100 g en la costa oeste y se impusieron restricciones a la recolección del molusco en ciertas zonas de cultivo. Hacia mediados de julio ya no se detectaron toxinas en mejillones, pero aun a mediados de octubre las vieiras y el tejido de gónadas de vieiras presentaban toxinas. En algunas zonas, las concentraciones en tejidos de vieiras superaban los 80 µg eq de STX/100 g, por lo que se mantuvieron las restricciones impuestas (EU-NRL, 2001).

En el período comprendido entre el 1 de abril de 2002 y el 31 de marzo de 2003 se recolectaron y analizaron 5 409 muestras de mariscos provenientes de 76 zonas costeras de producción primaria y de 36 zonas de pesca secundarias en mar abierto de Escocia. De las muestras recolectadas, 1 690 se analizaron para detectar la presencia de PSP y 21 de ellas dieron resultados positivos (Anonymous, 2003c). En agosto de 2001, luego de que se detectaran toxinas PSP en vieiras, el Organismo de Normas Alimentarias del Reino Unido decretó una veda para la recolección de este molusco en los mares de Irlanda del Norte (Anonymous, 2001a).

2.7.3 África

Marruecos

La presencia de *G. catenatum* se detecta ocasionalmente entre fines de verano y principios de otoño en aguas marroquíes del Atlántico. En octubre y noviembre de 1994 se registró la floración más notable asociada a un brote de PSP, que también se observó en las costas españolas del Atlántico en setiembre de 1994 y en las portuguesas en octubre del mismo año (Tahri Joutei, 1998). Entre 1994 y 1996 se analizaron moluscos bivalvos para detectar la presencia de toxinas PSP, y en noviembre de 1994 se detectaron concentraciones máximas de aproximadamente 6 000 µg eq de STX/100 g de carne en *Mytilus galloprovincialis* en la costa atlántica (Taleb *et al.*, 1998).

En la especie *A. tuberculatum* se encontraron concentraciones de toxinas PSP altas (hasta aproximadamente 800 µg eq de STX/100 g de carne) todos los años en los que se realizaron controles en la costa mediterránea. Pero, en otras especies, como por ejemplo *Venus verrucosa*, *Callista chiona* y *Donax trunculus* de la misma zona, la contaminación fue solo temporaria, en general entre enero y marzo de 1995, y las concentraciones de PSP nunca superaron los 250 µg eq de STX/100 g carne (Taleb *et al.*, 1998).

Sudáfrica

En 1969 y en 1979 se registraron respectivamente 6 y 17 casos de intoxicación con PSP, (dos de ellos fatales), por ingerir mejillones, *Chloromytilus meridionalis*, con hasta 84 000 µg eq de STX/kg (IPCS, 1984). La presencia de *Gonyaulax catenella* se detecta regularmente en la costa oeste del país y ha causado la muerte de varios seres humanos (Collins, 2001).

En marzo de 1994 se detectó *A. tamarensis* en una floración y las muestras de mejillones y ostras analizadas revelaron toxinas PSP con concentraciones superiores al límite de seguridad de toxicidad (Anonymous, 2003a). En abril de 1999, Pitcher *et al.* (2001) detectaron toxinas PSP en abalones de cultivo, *Haliotis midae*, en dos zonas de cultivo en la costa oeste y en especímenes no cultivados de la misma región. Los resultados del bioensayo en ratón de la AOAC fueron desde concentraciones no detectables hasta 1 609 µg eq de STX/100 g y se cree que el organismo causante fue *A. catenella*.

Túnez

En las lagunas de Burger y Gar el Melh se encontraron más de 700 toneladas de peces muertos: róbalo y besugos de criadero y varias especies de peces no cultivados. La muerte se atribuyó a la presencia de las especies *Alexandrium minutum* y *A. tamarensis*, productoras de toxinas PSP y de *Girodinium aureolum*, productora de una sustancia hemolítica (Rhomdane *et al.*, 1998).

2.7.4 América del Norte

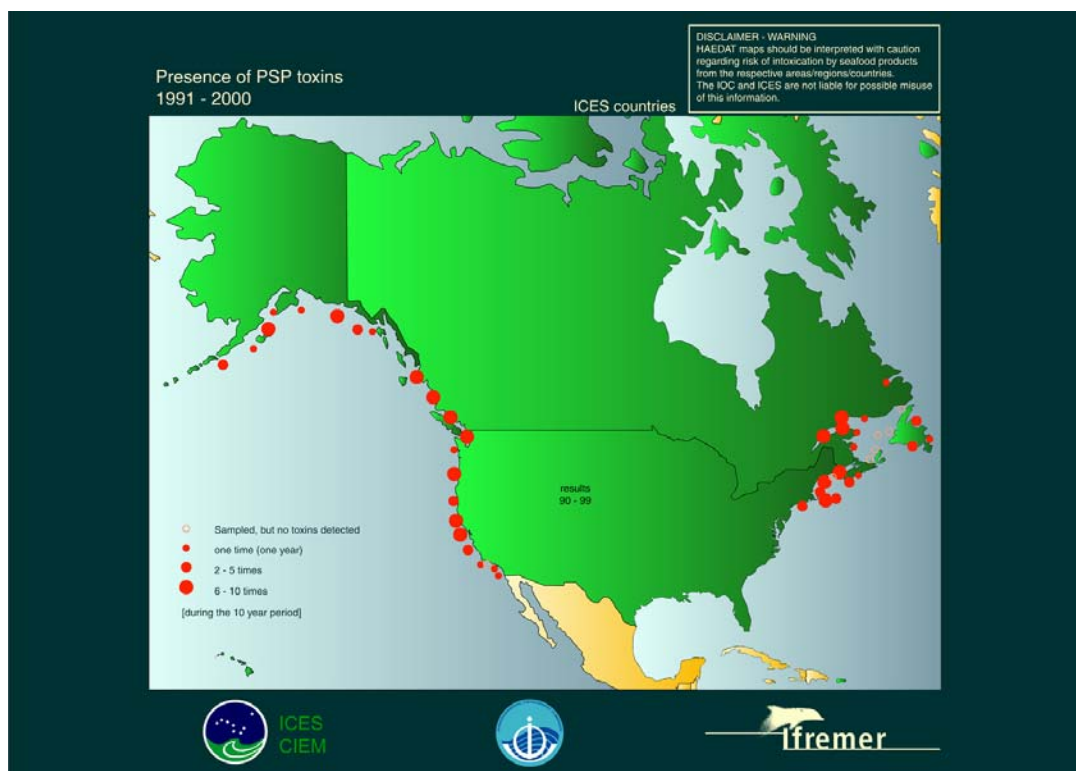
La Figura 2.3. ilustra la presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000.

Canadá

El primer informe de presencia de toxinas PSP es de 1793 en la Columbia Británica, cuando cuatro tripulantes de la expedición de Vancouver enfermaron y uno de ellos murió al poco tiempo de consumir mariscos recogidos en las costas de esta provincia. Existen registros de la presencia de toxinas PSP en el Estuario Saint Lawrence (Québec) y en la Bahía de Fundy (entre Nueva Brunswick y Nueva Escocia) desde la década de 1880 (Todd, 1997). En 1978 y en 1982 se registraron dos y cinco casos de intoxicación con PSP, respectivamente, luego de ingerir mejillones o almejas locales con 430 000 y 21 000 µg eq de STX/kg, respectivamente, con un caso fatal (IPCS, 1984). Entre 1880 y 1995 se documentaron 106 incidentes de PSP con 538 casos y 32 muertes. La mayor cantidad de casos ocurrió entre el 30 de abril y el 18 de agosto de 1974 en el Estuario Saint Lawrence, con concentraciones de toxinas de hasta 4 900 µg/100 g y 43 casos. En la costa oeste, la almeja amarilla, *Saxidomus giganteus*, puede permanecer tóxica durante todo el año (Todd, 1997). En mayo de 1999,

dos empleados de un criadero de salmones en el Canal Herbert, en Columbia Británica, presentaron síntomas de intoxicación con PSP luego de ingerir vieiras no cultivadas en el área de producción (Anonymous, 1999b).

Figura 2.3 Presencia de toxinas PSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Estados Unidos de América

La costa este

Los primeros registros de casos de intoxicación con PSP en la región de Nueva Inglaterra datan de 1958 en las zonas más al este de Maine, próximas a la frontera con Canadá. En 1972, una marea roja de *A. tamarensis* se extendió desde el sur de Maine, a lo largo de New Hampshire y hasta Massachussets, ocasionando por primera vez toxicidad en mariscos en la zona sur, con 33 personas afectadas pero sin casos fatales. Antes de 1972 se detectaron ocasionalmente toxicidades bajas en el sur de Maine, al oeste de la Bahía de Penobscot; pero actualmente los brotes en la zona son mucho más numerosos y tóxicos. Desde 1972, casi todos los años se producen brotes de PSP en Maine, New Hampshire y Massachussets ya que una vez que una floración masiva introdujo los quistes de *Alexandrium*, estos permanecen en el agua. En 1979, la detección de PSP condujo al cierre de algunos bancos de mejillones en la Bahía de Narragansett, Rhode Island, pero nunca se identificó el organismo causante. En años subsiguientes se detectaron células y quistes de *A. tamarensis*, así como también toxicidad por PSP en pequeños embalses en Connecticut y en Long Island. Incluso se han detectado células móviles y quistes de *A. tamarensis* muy al sur, en Nueva Jersey, aunque nunca toxicidad. Los datos de los últimos años indican que en las últimas décadas, las especies tóxicas de *Alexandrium* del noreste de Estados Unidos se dispersan gradualmente hacia el sur. Esta hipótesis explica la floración de 1972, aunque, por otro lado, parte del fenómeno puede atribuirse a la detección de poblaciones autóctonas de baja toxicidad en aguas sureñas (Anderson, 1997). En 1980 se registraron 51 casos de

PSP por ingerir mejillones y ostras locales con entre 3 000 y 40 000 µg eq de STX/kg, pero sin casos fatales (IPCS, 1984).

En Junio de 1990, el Ministerio de Salud Pública de Massachussets tomó conocimiento de seis pescadores embarcados en la zona del George's Bank, en la costa de Nantucket, que padecían una enfermedad transmitida por los alimentos. Los síntomas comenzaron luego de ingerir mejillones comunes cocidos, *Mytilus edulis*, recolectados en aguas profundas, aproximadamente a 115 millas de la isla de Nantucket, con concentraciones de 244 000 y 4 280 µg eq de STX/g en mejillones crudos y cocidos, respectivamente (Anonymous, 1991).

En Connecticut, Long Island (Nueva York) y Nueva Jersey, zonas que parecerían definir el extremo sur de la distribución geográfica del organismo, se detectaron ocasionalmente concentraciones de toxinas PSP (o *Alexandrium*) bajas. Hace algunos años se produjo en alta mar, en George's Bank un brote grave de PSP que ocasionó el cierre generalizado de todas las pesquerías de almejas de Cabo Hatteras y la muerte de pollos alimentados con huevas de pesquerías de vieiras (Boesch *et al.*, 1997).

Desde el 1 de enero de 2002 se registraron 10 casos de PSP por consumir tamboriles provenientes de aguas cercanas a Titusville, Florida (Anonymous, 2002a).

La costa oeste

En Alaska, los episodios de PSP datan de hace siglos, con los primeros casos informados en 1799. Entre 1973 y 1994 se registraron 66 brotes de PSP y 143 personas enfermas, ocho de ellas presentaron parálisis de una extremidad, ocho fueron sometidas a respiración artificial y dos casos fueron fatales. La mayoría de los brotes ocurrieron durante el período comprendido entre la primavera tardía y el verano (es decir, entre mayo y junio), en la Isla Kodiak (en el extremo sur de la mitad este de las Islas Aleutianas) y en el sudeste de Alaska (Gessner, 1996). Entre mayo y junio de 1994 se produjeron cinco brotes de PSP con 12 personas afectadas, cuatro de las cuales sometidas a respiración artificial, y una de ellas murió. La mayoría había ingerido mejillones, *Mytilus edulis* o *Mytilus californianus* (Gessner y Schloss, 1996; Gessner *et al.*, 1997). En abril de 1995 y en agosto y diciembre de 1997 se produjeron otros tres brotes con tres, cinco y tres pacientes, respectivamente (Anonymous, 1995; 1997a; 1997b).

La historia de las PSP en aguas del noroeste comienza en 1942 con varias muertes que resultaron en el cierre anual del estrecho de San Juan de Fuca y de la costa. En la década de los años 1970 los cierres se extendían desde las Islas San Juan hasta Bellingham. En setiembre de 1978, fuertes lluvias seguidas de un veranillo caluroso resultaron en una serie de casos de PSP que se extendieron desde el pasaje de Sarragoto hasta muy al sur, en la Isla de Vashon. A fines de la década se produjeron brotes recurrentes de *Alexandrium* en la región del Canal Puget, en Washington. En 1988 se detectaron concentraciones de PSP superiores a los límites reglamentarios en mariscos de los canales de Carr, Case y Puget (Boesch *et al.*, 1997 en Determan, 1998). En setiembre de 1994, el promedio de toxinas PSP en el caracol *Polinices lewissi*, un gastrópodo predador, del pasaje Agate, en la cuenca del Canal Puget fue de 145 µg eq de STX/100 g de vísceras. En octubre de 1994 se encontraron concentraciones de 652 µg eq de STX/100 g de cuerpo entero en mejillones comunes, *M. edulis*, en la Bahía Mystery (Wekell *et al.*, 1996). A lo largo de las costas del norte de California y de Oregon, los brotes de PSP también son un problema anual recurrente (Boesch *et al.*, 1997).

2.7.5 América Central y del Sur

Argentina

En el sur de Argentina, las toxinas PSP se han asociado a floraciones de *A. catenella* en el sector argentino del Canal Beagle y a floraciones de *A. tamarensis* en las costas atlánticas, desde el sur, hasta Uruguay (Compagnon *et al.*, 1998). En 1980, en la Península de Valdés se registró la primera floración tóxica de *A. tamarensis*, luego de un episodio en el que dos miembros de la tripulación de un barco murieron por ingerir mejillones contaminados (Ferrari, 2001). Desde entonces, el fenómeno se observa periódicamente en primavera y en verano.

En 1993, durante una floración de *A. tamarensis* muy extensa, sólo se detectó toxicidad en las anchoitas, *Engraulis anchoita*, provenientes de aguas cercanas a Mar del Plata. Las concentraciones de toxinas PSP en esta especie alcanzaron los 101 µg eq de STX/100 g de peso en húmedo de vísceras (determinado por bioensayo en ratón), aunque en el tejido muscular la acumulación de toxinas no alcanzó concentraciones detectables (Montoya *et al.*, 1998).

Compagnon *et al.* (1998) mencionan una floración de *A. catenella* observada en el verano de 1991 y 1992, en la ribera noreste del Canal Beagle, e indican que las concentraciones en mejillones, *Mitylus chilensis*, recolectados el 20 de enero de 1993, fueron de 127 200 µg eq de STX/100 g. Montoya *et al.* (1998) registran la mortandad masiva de caballas, *Scomber japonicus*, en la primavera de 1993, en una zona de la plataforma de Buenos Aires, conocida como Rincón. Aparentemente la mortandad ocurrió debido a la asimilación de toxinas PSP. Las muestras de *A. tamarensis* y de mejillones, *Aulacomya ater*, tomadas entre noviembre de 1995 y mayo de 1996, en ocho estaciones de muestreo en la Península Valdés contenían 490 fmol de toxinas PSP por célula y 631 µg eq de STX/100 g, respectivamente (Andronilo *et al.*, 1999b).

Brasil

En aguas brasileñas se produjeron varios brotes de *A. tamarensis* y se han identificado también otras especies productoras de PSP, a saber *A. catenella* y *G. catenatum*. Desde 1992 se observan floraciones de *A. catenella* y se detecta toxicidad en mariscos todos los años. En 1998 se detectó la presencia de *G. catenatum* en la costa del estado de Santa Catarina (Ferrari, 2001).

Chile

Los primeros informes de PSP por consumo de mejillones en pobladores locales de los alrededores de Ushuaia datan de 1886. *A. catenella* se encuentra principalmente en las tres regiones más al sur de Chile. Entre octubre de 1972 y enero de 1997, en dos de estas tres regiones se registraron 329 casos de PSP, 26 de los cuales fueron fatales por ingerir *Aulacomya ater* y *Mytilus chilensis* con contenidos de toxinas PSP entre 1 555 y 96 000 UR/100 g (Lagos, 1998). Compagnon *et al.* (1998) describen una floración de *A. catenella* a principios de otoño de 1996, en el sur de Chile, con concentraciones de PSP en *A. ater* observadas 25 días después del pico de la floración (de $3,1 \times 10^4$ células por litro) de hasta 113 259 µg eq de STX/100 g de marisco entero. Durante los seis meses posteriores al pico de la floración, las concentraciones disminuyeron, aunque permanecieron altas. También se detectaron concentraciones de toxinas PSP elevadas en dos especies de gastrópodos carnívoros: *Concholepas concholepas* con 9 164 y 737 µg eq de STX/100 g en la glándula digestiva y en el músculo del pie, respectivamente; y en *Argobuccinum ranelliformes* con 14 057 y 31 µg eq de STX/100 g en la glándula digestiva y en el músculo del pie, respectivamente. En gastrópodos carnívoros, las concentraciones máximas se detectaron cinco meses después del pico de la floración.

Hasta 2001, las consecuencias de las toxinas PSP y DSP, tanto para la salud pública y la economía chilena, fueron graves ya que obligaron a cerrar todos los bancos naturales de peces situados al sur de los 44 °S y como consecuencia se puso en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001). En marzo de 2002 ocurrió una muerte y al menos ocho casos de intoxicación por consumo de mariscos provenientes de la región de Chiloé al sur. Se prohibió cosechar y comercializar mariscos provenientes de toda la zona alrededor de la isla, incluida la comunidad de Ancud situada a 100 km al norte de Chiloé (Carvajal, 2002).

Guatemala

Un brote de PSP ocurrido en 1987 ocasionó 187 casos y 26 muertes por ingerir sopa de almejas. En niños pequeños el porcentaje de casos fatales fue más alto (50 por ciento) que en adultos (un siete por ciento) (Rodríguez *et al.*, 1990).

México

En 1979 se registraron 20 casos de PSP y tres personas murieron por consumir mejillones locales (IPCS, 1984). Un estudio de dos años, de 1984 a 1986, en la Laguna Tamiahua demostró que en los estuarios con bancos de *Crassostrea virginica*, las floraciones permanentes de *Pyrodinium bahamense* se desplazaban de forma hidrodinámica durante la estación de los vientos, entre noviembre y marzo. Se observaron altas densidades de *P. bahamense* en manglares con corrientes de agua lentas, fenómeno que también se observó en las lagunas costeras del Golfo de México y en las de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an (Gómez-Aguirre y Licea, 1998).

En noviembre de 1989, *P. bahamense* causó un evento tóxico en la costa desde Chiapas hasta Oaxaca, con 99 casos de intoxicación y murieron tres personas por ingerir ostras y mejillones contaminados (Orellana-Cepeda *et al.*, 1998). En mayo de 1992 se encontró un único ejemplar de *Pinna rugosa*, proveniente de la Bahía Concepción, en la Península de Baja California, con una toxicidad por PSP extremadamente elevada, de 23 000 UR/100 g, aunque no se informó de intoxicación en seres humanos (Ochoa *et al.*, 1997).

En el período comprendido entre marzo de 1993 y abril de 1994, en la Bahía Concepción, en el Golfo de California se registraron densidades de 14 000 células de *A. catenella* por litro. Seguidamente se detectaron concentraciones de PSP altas (de hasta 2 400 UR/100 g) en mariscos enteros, principalmente en *Argopecten circularis*. No se permitió cosechar más en la zona, no informándose de intoxicaciones en seres humanos (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

Un brote de *P. Bahamense*, que se produjo en aguas próximas a Michoacán y Guerrero desde 1995 hasta 1996 causó la muerte de seis personas y varios casos de intoxicación. En el invierno de 1995, los resultados del bioensayo en ratón de muestras del sudoeste de México revelaron concentraciones de toxinas PSP altas en ostras, *Ostrea iridiscens* entre 608 y 6 337 µg eq de STX/100 g carne; y en almejas, *Donax* sp. 520 µg eq de STX/100 g de carne. En noviembre de 1996 se observó otra floración excepcional de *P. bahamense* en una zona pequeña de la costa mexicana del Pacífico (Orellana-Cepeda *et al.*, 1998).

El 72 por ciento de los eventos tóxicos ocurridos durante el transcurso de la última década del siglo veinte fueron ocasionados por toxinas PSP y solo tres de ellos representan el 87 por ciento de los casos de intoxicación (con 460 individuos intoxicados y 32 casos fatales, incluido el incidente de 1987 en Guatemala). En México, los eventos de PSP causan la muerte de grandes cantidades de animales marinos, como peces y tortugas. En un principio se informó que la única toxina asociada fue la STX producida por *G. Catenatum*, pero desde el evento de 1987 en la costa guatemalteca se determinó que la especie principal de las mareas rojas del sudeste del Pacífico es *G. bahamense* y los componentes principales son dcSTX y STX y solo pequeñas cantidades de GNTX. Sin embargo, el perfil de toxinas en la Península de Baja California es diferente, lo que sugiere que la especie responsable es *A. catenella* o *A. tamiyavanichi* observada recientemente (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

Trinidad y Tobago

En 1994 se registró por primera vez la presencia de toxinas PSP en Trinidad y Tobago. Los resultados obtenidos tanto por bioensayo en ratones, como por ensayo de unión a un receptor, de muestras de extracto de carne del mejillón *Perna viridis* revelaron una concentración de 28 µg eq de STX/100 g de carne, bastante inferior a los 80 µg/100 g de carne, que se considera la concentración máxima aceptada para consumo humano. No se han registrado casos de intoxicación en humanos (Ammons *et al.*, 2001).

Uruguay

En 1980, en la misma época en que se registraron los incidentes de PSP en Brasil se registraron 60 casos con síntomas neurotóxicos en Uruguay. Si bien se detectaron concentraciones de toxinas PSP altas, nunca se identificó la especie de alga. En el verano de 1991 se produjeron otros brotes de PSP asociados a *G. catenatum*, especie de la que se encontraron densidades altas en sedimentos costeros (Ferrari, 2001).

Venezuela

En 1979 y 1981 se registraron respectivamente 171 y nueve casos de PSP en humanos, con un total de 11 muertes, por ingerir mejillones locales, *Perma perma*, con entre 790 y 33 000 µg eq de STX/kg (IPCS, 1984).

2.7.6 Asia

China

Los primeros casos de PSP revelados en China ocurrieron entre 1967 y 1979 en la Provincia de Zhejiang, con 40 episodios, 23 casos fatales y 423 casos de intoxicación con el caracol marino *Nassarius succinstus* como vector (Zhou *et al.*, 1999). En noviembre de 1986 hubo 136 personas hospitalizadas por PSP y un caso fatal en Dongshan (al sur de la Provincia de Fujian) y la almeja *Ruditapes phillipenensis* como vector (Zhou *et al.*, 1999). En febrero de 1989, cinco personas presentaron síntomas de intoxicación con PSP por ingerir la almeja *Pinna pectinata*. En noviembre de 1989, cuatro pescadores presentaron síntomas de PSP por ingerir el caracol *N. succinstus* (proveniente de Fuding en el norte de la Provincia de Fujian) con un caso fatal. Si bien los casos ocurrieron en Huizhou, probablemente el marisco provenía de la Bahía Daya. En marzo de 1991 se registraron cuatro casos de intoxicación y dos muertes por ingerir el mejillón *Perna viridis* proveniente de la Bahía Daya (Zhou *et al.*, 1999).

Un estudio realizado en la Provincia de Guandong, entre 1990 y 1992 reveló la presencia de toxinas PSP en 33 organismos marinos comestibles con concentraciones de hasta 1 000 µg eq de STX/100 g de carne. En junio de 1994, en la Provincia de Zhejiang se registraron cinco casos de intoxicación y un caso fatal por ingerir el caracol *N. succinstus*.

El control de los mariscos de la costa china es mínimo y los episodios descritos probablemente subestimen el alcance real del problema de las PSP. En la actualidad ocurren entre 40 y 50 mareas rojas por año, cifra que en comparación con el par de floraciones registradas en la década de los setenta, muestra que el problema ha cobrado dimensiones alarmantes, y si bien sólo algunas son tóxicas, la tendencia es alarmante y parece estar ligada al aumento de la polución de las aguas costeras chinas registrado en el mismo período. La rápida expansión del cultivo de mariscos y la presencia documentada de algas productoras de PSP en aguas costeras chinas indican que la toxicidad en mariscos continuará siendo un problema grave durante varios años más (Anderson *et al.*, 1996).

El análisis de las muestras de sedimentos tomadas de 49 estaciones, en 14 sitios a lo largo de las costas de los Mares de China Oriental y de China Meridional, para determinar la presencia de quistes de resistencia viables de dinoflagelados reveló la presencia de quistes de *G. catenatum* en la Bahía de Dapeng. Se encontraron quistes de *A. tamarensis* en ocho sitios relativamente contiguos en la boca del Río de las Perlas, en las Provincias de Guangdong y Fujian hasta la Bahía de Taizhou en la Provincia de Zhejiang. Se observó que, en líneas generales, la distribución coincide con las regiones en las que se han registrado eventos de PSP (Qi *et al.*, 1996). Entre 1996 y 1997, de un total de 91 muestras sólo se detectaron toxinas PSP en cuatro de ellas provenientes de tres sitios de muestreo, con una concentración máxima de 79 µg eq de STX/100 g, inferior a la concentración reglamentaria fijada en 80 µg/100 g (Zhou *et al.*, 1999).

Timor-Leste

Llewellyn *et al.* (2002) estudiaron el caso de un hombre, en Timor-Leste, que murió varias horas después de ingerir un cangrejo *Zosimus aeneus*. Los autores determinaron que la concentración total de toxinas en la parte restante del cangrejo fue de 163 µg eq de STX/100 g de tejido (GNTX2, GNTX3 y STX). Calcularon que la dosis ingerida por la víctima fue entre 1 y 2 µg eq de STX/kg de pc pero, como el cangrejo tóxico no fue el único ingrediente de la comida, no descartaron la posibilidad de que otros ingredientes hayan actuado de forma sinérgica con las toxinas PSP.

China, Región Administrativa Especial de Hong Kong

En 1992 se produjeron tres brotes de PSP en la Región Administrativa Especial de Hong Kong, China pero no se dispone de detalles en cuanto al número de pacientes afectados ni los síntomas clínicos. Es probable que la mayoría de los brotes no se informen (Chan, 1995). En una muestra de *Chlamys nobilis*, analizada en setiembre de 1996 se detectó una concentración de 320 µg eq de STX/100 g de tejido. Las concentraciones de toxinas PSP detectadas en *Perna viridis*, 40 días después de la marea roja de marzo y abril de 1998 fueron de hasta 79 µg eq de STX/100 g, pero no se registraron casos de intoxicación en humanos (Zhou *et al.*, 1999).

India

En 1981 se registraron 98 casos de intoxicación con PSP por ingerir mejillones locales, uno de ellos fatal (IPCS, 1984).

Japón

En 1992 se detectaron los primeros mariscos contaminados con PSP en la Bahía de Hiroshima (Hamasaki *et al.*, 1998). A menudo se observa que los bivalvos con importancia industrial, como las vieiras y las ostras, están contaminados con PSP por la presencia de dinoflagelados tóxicos, especialmente *A. catenella*, *A. tamarensis* y *G. catenatum* (Noguchi, 2003).

En el período comprendido entre julio de 1995 y octubre de 1996, seis especies, - *Pecten albicans* (vieira), *Chlamys farreri* (vieira), *Septifer virgatus* (mejillón), *Pinna bicolor*, *Arca boucardi* y *Pseudochama retrove* - de las 30 recolectadas en la Isla Fakué, Prefectura de Nagasaki contenían toxinas PSP. Las concentraciones de toxinas en las dos especies de vieiras (*P. albicans* y *C. farreri*) fueron superiores al límite reglamentario de 400 UR/100 g y sólo se detectó toxicidad en la glándula digestiva. En *P. albicans* se detectó la concentración máxima (de 13 380 UR/g) y en *P. bicolor* se detectó una toxicidad de 490 UR/100 g, superior al límite reglamentario. En las especies *P. retrove*, *A. boucardi* y *S. virgatus* se detectaron las concentraciones más bajas (inferiores al límite reglamentario), 320, 230 y 200 UR/100 g, respectivamente. En cuanto al perfil de toxinas, en 1995 las toxinas principales en la especie *P. albicans* fueron las GNTX; pero en 1996 se encontró que el perfil contenía principalmente compuestos del grupo C de baja toxicidad, como en la especie *C. farreri*. En la especie *Bryocampus* se detectaron concentraciones de PSP bajas, con un perfil compuesto principalmente por dcGNTX2 y GNTX2, además de dcGNTX3 y GNTX3, un perfil bien diferenciado del obtenido de su huésped, *C. farreri* (Takatani *et al.*, 1997).

En marzo de 1997 se registraron 20 casos de intoxicación por ingerir ostras provenientes de la Isla Fukue (Takatani *et al.*, 1997). En 1999 y en 2001 se observó una floración de *A. tamiyavanichii* que afectó varios criaderos de ostras del Mar de la Isla de Seto. Las muestras analizadas el 28 de noviembre de 2001 revelaron la presencia de toxinas PSP en ostras de cultivo y no cultivadas, con una toxicidad de 17,0 y 3,3 UR/g de parte comestible, respectivamente (Nishio, 2003).

Malasia

En 1977 se registraron 201 casos de intoxicación con PSP por ingerir almejas locales, con cuatro casos fatales (IPCS, 1984). Hasta 1990, los problemas relacionados con las PSP eran relativamente simples ya que estaban confinados a la costa oeste de Sabah, en Borneo y la *P. bahamense* identificada como la especie productora de toxinas. Sin embargo, a principios de 1991 se detectó por primera vez la presencia de PSP en la Península de Malasia con tres casos de intoxicación en humanos por ingerir

mejillones de cultivo provenientes de Sebatu, en el estrecho de Malaca, finalmente se confirmó que las toxinas fueron producidas por *A. tamiyanavichi*. A principios de 2000 se detectaron por primera vez toxinas PSP y toxicidad en mariscos en la costa este de Sabah, pero aún no se identificó el productor de toxinas. En setiembre de 2001 se registraron seis casos de intoxicación en seres humanos por ingerir almejas recogidas en una laguna costera de Kelantan, en la costa este de la Península, y una de las víctimas murió. El bioensayo en ratón y el ensayo de unión a un receptor mostraron que las almejas contenían concentraciones de toxinas PSP elevadas. También se encontraron densidades altas de *A. tropicale* y una especie no identificada de *Alexandrium* (Usup y Ahmad, 2001).

Las Filipinas

En 1992 se encontró que los tamboriles (*Arothron mappa*, *A. manillensis*, *A. nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. stellatus*, *A. reticularis*), recolectados contenían cantidades significativas de toxinas PSP, (con STX como el componente principal) y TTX (Sato *et al.*, 2000). Durborow (1999) informa que ese mismo año, los mejillones de cultivo causaron varios casos de PSP en las Filipinas. Van Dolah *et al.* (2001) mencionan que entre 1983 y 1998 se registraron 2 000 casos de PSP con una tasa de mortalidad de 5,8 por ciento.

Taiwán, Provincia de China

En enero de 1986 se registraron dos casos fatales y 30 personas presentaron síntomas por ingerir *Soletellina diphos*. En febrero de 1991 se registraron ocho casos por ingerir la misma especie (Zhou *et al.*, 1999). Los resultados de un estudio realizado entre agosto de 1995 y marzo de 1997 sobre toxinas paráliticas en mariscos de la parte sur de la isla revelan la presencia de PSP y de TTX en tres tipos de mariscos: *Niotha clathrata*, *Natica lineata* y *Natica vitellus* (Liao y Hwang, 2000). En Taiwán, Provincia de China, las especies que contienen PSP son la almeja *Soletellina diphos* (syn. *Hiatula diphos*), los gastrópodos y los cangrejos xántidos, y las algas tóxicas *A. minutum* entre diciembre y marzo (Hwang, 2003).

Tailandia

En 1983 se registraron 62 casos de intoxicación con PSP por ingerir mejillones locales (*Mytilus* spp.), uno de los cuales fue fatal (IPCS, 1984). En 1990 se registró un caso de intoxicación por ingerir un tamboril de agua dulce, *Tetraodon fangi*, la especie parecía contener STX, pero no se detectó la presencia de tetrodotoxina (Sato *et al.*, 1997).

2.7.7 Oceanía

Australia

Entre 1987 y 1997 se realizó el control de toxinas PSP en la Bahía de Port Philip y en la Bahía de Western Port, en Victoria y ocasionalmente se detectaron concentraciones muy elevadas (la concentración máxima fue de 10 000 µg eq de STX/100 g marisco comestible) (ANZFA, 2001).

Nueva Zelanda

En enero de 1993 se produjo un brote de intoxicación por mariscos en Nueva Zelanda con más de 180 casos, además de varios otros de irritación respiratoria causada por toxinas transportadas por el aire desde el mar. En un principio, la toxicidad pareció poseer las características de NSP, ya que las concentraciones de toxinas PSP en la mayoría de los mariscos comercializados no eran muy elevadas, pero posteriormente se determinó que las toxinas PSP producidas por *A. minutum* habían causado al menos una parte de la toxicidad de los mariscos (en las almejas *Paphies australis* y *Paphies subtriangulata*, en vieiras y en mejillones) (MacKenzie *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997a).

En el período entre enero de 1993 y julio de 1996 se registraron 11 eventos de PSP. El 0,5 por ciento de las muestras de mariscos recogidas semanalmente en ese período, en las costas neocelandesas presentaron concentraciones de toxinas PSP superiores al límite reglamentario (concentración máxima de 920 µg eq de STX/100 g de mejillón), aunque no se registraron casos de intoxicación en seres

humanos (Sim y Wilson, 1997). Durante el verano de 2000 y 2001, las zonas de recolección de mariscos en la costa oeste de la Isla Sur y de la Isla Norte permanecieron cerradas debido a la presencia de *G. catenatum*. La concentración de PSP más alta registrada en Nueva Zelanda fue de 1 007 µg/100 g en 1997, al este de la Bahía Plenty y asociada a la presencia de *A. catenella* (Anonymous, 2003b).

Tasmania

En setiembre de 1994 y en julio de 1996 las concentraciones máximas detectadas en mejillones ostras y vieiras fueron de 18 429, 699 y 83 µg eq de STX/100 g de marisco comestible, respectivamente, con promedios de 636, 123 y 60 µg eq de STX/100 g de marisco comestible, respectivamente (ANZFA, 2001).

2.8 Reglamentación y seguimiento

2.8.1 Reglamentaciones en el mundo

Muchos países ya han adoptado o han propuesto una reglamentación para las PSP. La mayoría considera a las toxinas PSP como un grupo, con límites establecidos en 400 UR/100 g u 80 µg eq de STX/100 g. Otros cuentan con una reglamentación específica para una de las toxinas PSP, generalmente la saxitoxina. Casi toda la reglamentación hace referencia a los mariscos, aunque algunos países establecen que las concentraciones de toxinas PSP máximas permitidas se refieren a un cierto tipo de productos, ya sea a los moluscos en general o específicamente a los bivalvos.

En muchos países, el bioensayo en ratón estándar de la AOAC Internacional continúa siendo el método de análisis utilizado para fines oficiales. Una directiva de la Unión Europea en vigor desde enero de 1993 dispone que el contenido de PSP total en moluscos se determinará según “el método de análisis biológico – al que puede asociarse un método químico de detección de saxitoxina, si fuera necesario. En caso de discrepancia sobre los resultados, el método de referencia deberá ser el método biológico”.

El grado de tolerancia se expresa en distintas unidades de concentración: unidades ratón por g (UR/g) y µg/g (µg/ml con menos frecuencia). Esta última parece ser menos apropiada cuando se utiliza el bioensayo en ratón ya que este mide la toxicidad en el ratón; aunque sí sería útil en el hipotético caso que las distintas toxinas PSP tuvieran la misma toxicidad. Si de todas formas se prefiere utilizar µg/g en lugar de UR/g, un factor de equivalencia de toxicidad permite expresar la concentración de las distintas toxinas PSP (si se midieron de forma selectiva), en unidades de concentración de STX (Mons *et al.*, 1998).

2.8.2 Europa

Unión Europea

La Directiva 91/492/CEE de la Unión Europea establece el límite de las toxinas PSP para moluscos bivalvos en 80 µg eq de STX/100 g de carne. El método de análisis oficial es el bioensayo en ratón, al que puede asociarse un método químico de detección, si fuera necesario. En caso de discrepancia sobre los resultados, el método de referencia deberá ser el bioensayo. (EC, 1991a).

La Comisión Europea, una vez obtenidos los resultados de los estudios realizados con *Acanthocardia tuberculatum* (berberechos), aprobó el tratamiento térmico como método de eliminación parcial de las toxinas del molusco. La recolección de esta especie está permitida cuando las concentraciones de toxinas PSP en las partes comestibles se encuentran entre 80 µg eq de STX/100 g de tejido y 300 µg eq de STX/100 g. Si luego del tratamiento térmico, el análisis del producto indica que las concentraciones de STX son inferiores al límite reglamentario de la UE fijado en 80 µg/100 g, el producto es comercializable y apto para consumo humano (EC, 1996). La mayoría de los países de

Europa cuentan con programas de control para verificar la presencia de organismos productores de PSP.

2.8.3 África

Marruecos

El límite de STX en los moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998).

2.8.4 América del Norte

Canadá

El límite para el consumo de moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el bioensayo en ratón es el método de análisis obligatorio. Los productos, como ciertas almejas y mejillones, con concentraciones entre 80 y 160 µg eq de STX/100 g pueden envasarse (Shumway *et al.*, 1995). La almeja amarilla con concentraciones entre 300 y 500 µg eq de STX/100 g se considera apta para comercializar luego de extraer totalmente el sifón, pudiéndose comercializar aquellas con concentraciones entre 80 y 300 µg eq de STX/100 g después de extraer la mitad distal del sifón (Fernández, 1998).

Desde 1988 se recogen muestras de fitoplancton de cuatro estaciones en el oeste de la Bahía de Fundy, al este de Canadá. Las floraciones de *Alexandrium* se observan todos los años entre fines de mayo y agosto, y las concentraciones más altas se detectan generalmente entre el 9 y el 21 de julio. Los planes incluyen un mayor refinamiento, control de la calidad y el estudio en profundidad de la variabilidad temporal y espacial de los patrones de distribución (Martin *et al.*, 2001). Hallegraeff *et al.* (1995) indican que el programa de control de *Alexandrium* spp. vigente dispone el cierre de las zonas de recolección cuando las concentraciones de toxinas en mariscos exceden los límites de tolerancia.

Estados Unidos de América

El límite de toxinas PSP en bivalvos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis utilizado es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995). La recolección de mariscos con concentraciones de toxinas PSP superiores a 80 µg eq de STX /100 g de tejido está permitida siempre y cuando sean para envasar o se los someta a evisceración (Fernández, 2000).

2.8.5 América Central y del Sur

Argentina

El límite para la STX en los moluscos es de 400 UR/ 100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón. El límite permitido en caracoles de mar para envasar es de 160 µg eq de STX/100 g (Fernández, 1998). Argentina cuenta con un programa nacional de control de toxicidad en mejillones en cada una de las provincias de la costa, del que participan los laboratorios regionales y una estación fija en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

Brasil puso en práctica una iniciativa de control piloto de un año de duración, pero no cuenta con un programa nacional de control (Ferrari, 2001).

Chile

El límite de STX en los moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998). Hasta 2001, las consecuencias de las toxinas PSP y DSP, tanto en la salud pública como en la economía chilena fueron graves ya que obligaron a cerrar todos los bancos

naturales de peces situados al sur de los 44 °S y se puso en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001).

Guatemala

El límite de STX en moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998).

México

El límite reglamentario es de 30 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Aune, 2001).

Panamá

El límite de toxinas PSP en bivalvos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Uruguay

El límite de STX en moluscos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998). El país cuenta con un programa nacional de control de toxicidad en mejillones y de fitoplancton tóxico (Ferrari, 2001).

Venezuela

El límite de STX en moluscos es de 80 µg eq de STX/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Fernández, 1998).

2.8.6 Asia

China, Región Administrativa Especial de Hong Kong

El límite de toxinas PSP en mariscos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Japón

El límite de toxinas PSP en los bivalvos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Malasia

Los problemas relacionados con PSP eran relativamente simples hasta 1990 ya que estaban confinados a la costa oeste de Sabah, en Borneo. El Ministerio de Pesca de Malasia puso en práctica un eficaz programa de control de la toxicidad en mariscos, que redujo los casos de PSP a pesar de la presencia recurrente de floraciones de algas. Un incidente con PSP ocurrido en 1991, en la Península de Malasia, asociado al consumo de mejillones de Sebatu en el Estrecho de Malaca, impulsó al gobierno a abrir otra estación de control de toxicidad en mariscos en el Instituto de Investigación Pesquera, en Penang. En setiembre de 2001 se registraron casos de PSP por ingerir almejas provenientes de la costa este de la Península. Desde punto de vista logístico se justifica la apertura de una estación de control de toxicidad en mariscos en la costa este de la Península de Malasia (Usup y Ahmad, 2001).

Las Filipinas

El límite de tolerancia es de 40 µg eq de STX/100 g (Aune, 2001).

Singapur

El límite de toxinas STX en bivalvos es de 80 µg/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

República de Corea

El límite de gonyautoxinas en bivalvos es de 400 UR/100 g y el método de análisis es el bioensayo en ratón y la CL (Shumway *et al.*, 1995).

2.8.7 Oceanía

Australia

El límite es de 80 µg eq de STX/100 g de carne de marisco y el método de análisis es el bioensayo en ratón (Shumway *et al.*, 1995).

Nueva Zelanda

El Programa de Control de Biotoxinas Neocelandés combina los análisis de mariscos comunes y el control del fitoplancton. El límite reglamentario es de 80 µg eq de STX/100 g de carne de marisco (Sim y Wilson, 1997). En la actualidad se utiliza el bioensayo en ratones como método de análisis primario seguido de ensayos de confirmación (Busby y Seamer, 2001).

El proyecto de Programa de Control de Biotoxinas está diseñado para suministrar información sumamente precisa, en tiempos más cortos y mediante técnicas de CL acoplada a EM que sustituyan al bioensayo en ratón y provean información analítica y química en lugar de resultados de análisis por bioensayo. Actualmente se está trabajando en el desarrollo y la puesta en práctica de nuevos métodos de ensayo, se estudian las distintas alternativas de financiamiento, la validación de los métodos, la reglamentación de los análisis y la disponibilidad de estándares analíticos. Además se realiza la comparación con las pruebas existentes, se evalúan las distintas estrategias para ponerlo en práctica y se exploran las posibilidades de cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

3. Intoxicación Diarreica por Mariscos (DSP)

Las toxinas diarreicas (DSP) son compuestos liposolubles que se acumulan en los tejidos adiposos de los bivalvos, como mejillones, vieiras, ostras y almejas. La ingestión de estos mariscos contaminados por acumulación de toxinas causa, en el ser humano, la Intoxicación Diarreica por Mariscos (DSP), cuyos síntomas incluyen diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Los síntomas aparecen entre 30 minutos y algunas horas luego de la ingestión; la recuperación completa se observa dentro de los tres días. Las toxinas DSP se clasifican según su estructura química. El primer grupo incluye las toxinas ácidas e incluye el ácido ocadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (toxinas DTX); el segundo grupo las toxinas neutras y compuestos tipo poliéter lactona del grupo de las pectenotoxinas (toxinas PTX); y el tercero los poliéteres sulfatados y sus derivados, las yesotoxinas (toxinas YTX) (ver las Figuras 3.1 y 3.2).

Los productores de toxinas DSP son, generalmente, los dinoflagelados del género *Dinophysis spp.*, aunque también se determinó que el género *Prorocentrum* produce toxinas DSP. La producción de toxinas DSP varía considerablemente según la especie de dinoflagelado y los morfotipos estacionales y regionales dentro de una misma especie. También se observó que la cantidad de células de dinoflagelado por litro, necesaria para contaminar los mariscos es variable. Las áreas más afectadas parecen ser Europa y Japón, aunque, se observa una tendencia creciente en la incidencia de las DSP, o al menos en la presencia de toxinas DSP, ya que con frecuencia se informa de algas productoras de toxinas DSP y de bivalvos tóxicos en zonas nuevas.

3.1 Estructuras químicas y propiedades

Todas las toxinas DSP son poliéteres termoestables lipófilos, aisladas de distintas especies de mariscos y de dinoflagelados (Draisci *et al.*, 1996a) (ver las Figuras 3.1 y 3.2). Si bien la diarrea es el síntoma de intoxicación más característico, existen muchos otros que parecen importantes ya que algunas de las toxinas del complejo DSP (por ejemplo, las PTX e YTX) no producen tipo alguno de diarrea (Van Egmond *et al.*, 1993). Según Quilliam (1998a) una segunda evaluación de su toxicidad las eliminaría del grupo de las toxinas DSP. Los distintos tipos químicos de toxinas asociados al síndrome DSP incluyen:

- a) El primer grupo de toxinas ácidas, formado por varios compuestos lipófilos que se acumulan en el tejido adiposo de los mariscos: el ácido ocadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (las toxinas DTX: la DTX1, la DTX2 y la DTX3). Estos compuestos son potentes inhibidores de la fosfatasa, propiedad que está relacionada a la inflamación del tracto intestinal y a la diarrea en los seres humanos (Van Apeldoorn *et al.*, 1998 y Hallegraeff *et al.*, 1995). Draisci *et al.*, (1996a) y Van Egmond *et al.* (1993) indican que en sistemas de ensayo con animales se observó que el AO y la DTX1 son también tumorigénicos. La DTX1 se detectó por primera vez en Japón, en la especie *Dinophysis fortii*, y la DTX2 se identificó en mariscos de Irlanda durante un episodio de DSP (Van Egmond *et al.*, 1993). La DTX2 también se aisló a partir de biomasa de fitoplancton marino, formado principalmente por *Dinophysis acuta* (James *et al.*, 1999). James *et al.* (1997) informan que se aisló e identificó un nuevo isómero de la DTX2, denominado DTX2B, de extracto de mejillones irlandeses. En un principio, la denominación DTX3 describía a un grupo de derivados de las toxinas DSP en los que el grupo 7-OH de la DTX1 estaba unido a grupos acilo grasos, saturados o insaturados. Sin embargo, recientemente se determinó que cualquiera de las toxinas progenitoras, es decir el AO, la DTX1 y la DTX2, pueden estar aciladas con una serie de ácidos grasos, saturados e insaturados, desde el C₁₄ al C₁₈ (Hallegraeff *et al.*, 1995; Wright, 1995). El informe de una reunión de la UE menciona que la longitud de la cadena del ácido graso puede variar entre C₁₄ y C₂₂ y que el número de insaturación varía entre 0 y 6. También se determinó que el ácido graso predominante en la DTX3 es el ácido palmitoílico (EU/SANCO, 2001). Estos compuestos acilados presentan también actividad tóxica y, como solo se han detectado en la glándula digestiva de mariscos contaminados, se cree que quizás sean productos metabólicos de las microalgas productoras de toxinas y no *de novo* (Wright, 1995). Suzuki *et al.* (1999) probaron

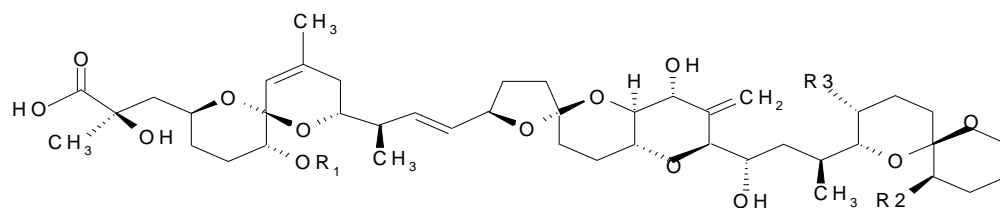
que en la vieira *Patinopecten yessoensis*, la DTX1 se transforma en 7-*oxo*-acil-DTX1 (DTX3). En los compuestos acilados, el enlace éster se puede hidrolizar calentando en una solución de NaOH 0,5 M y metanol al 90 por ciento a 75 °C durante 40 minutos. La lipasa y la colesterol esterasa también hidrolizan fácilmente el enlace éster de la DTX3 (EU/SANCO, 2001).

Dos ésteres diólicos, derivados éster naturales, que *in vitro* no inhiben la fosfatasa, se aislaron de especies de *Prorocentrum*. Sin embargo, estos ésteres diol-alílicos son, en cierta medida, lábiles y al hidrolizarse se obtiene la toxina DSP progenitora activa (Hallegraef *et al.*, 1995). Draisci *et al* (1998) indican que se detectó otro isómero del AO, denominado DTX2C, aislado de *D. acuta* de aguas irlandesas, cuya estructura aún no se ha determinado.

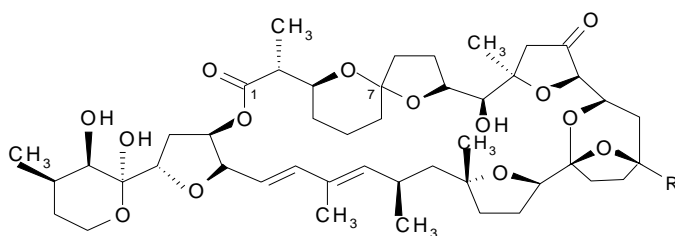
- b) El segundo grupo de toxinas, las neutras, está compuesto por lactonas poliéter del grupo de las pectenotoxinas (toxinas PTX). A la fecha se han aislado diez toxinas PTX y seis de ellas las PTX1, -2, -3, -4, -6 y -7 se han identificado químicamente. La PTX2 (PTX2, CH₃) solo se ha detectado en fitoplancton (*D. fortii* en Japón y en Europa), pero nunca en mariscos, por lo que se cree que se oxida en el hepatopáncreas de los mariscos y produce otras toxinas PTX (PTX1, CH₂OH; PTX3, CHO; PTX6, COOH) (Draisci *et al.*, 1996a; Yasumoto *et al.*, 2001 y citado de Van Apeldoorn *et al.*, 1998). Suzuki *et al.* (1998) demostraron la oxidación de la PTX2 a PTX6 en vieiras, *Patinopecten yessoensis*. Sasaki *et al.* (1998) identificaron a las PTX4 y PTX7 como isómeros espirocetales de la PTX1 y PTX6, *epi*-PTX1 y *epi*-PTX6, respectivamente. Se aislaron también dos compuestos nuevos, la PTX8 y PTX9, cuyas estructuras no se determinaron aún. Daiguji *et al.* (1998) aislaron dos pectenotoxinas a partir del mejillón de Nueva Zelanda, *Perna canaliculus* y de *D. acuta* de Irlanda y determinaron sus estructuras como ácido pectenotoxina 2-secoico (PTX2SA) y ácido 7-*epi*-pectenotoxina-2-secoico (7-*epi*-PTX2SA), respectivamente. Suzuki *et al.* (2001) demostraron que en el mejillón de Nueva Zelanda, *Perna canaliculus*, la PTX2 se transforma en PTX2SA y 7-*epi*-PTX2SA (los dos homólogos más importantes en este marisco). En el mejillón común, *Mitylus galloprovincialis*, se espera observar la misma transformación pues la PTX2SA es también el homólogo predominante de la PTX.
- c) El tercer grupo comprende un compuesto sulfatado denominado yesotoxina (YTX), un poliéter tipo brevetoxina y su derivado la 45-hidroxiyesotoxina (45-OH-YTX) (Draisci *et al.*, 1996a; Van Egmond *et al.*, 1993). La yesotoxina se aisló por primera vez en Japón, a partir de los órganos digestivos de vieiras, *Patinopecten yessoensis* (Ciminiello *et al.*, 1999) y se cree que es producida por las microalgas. La yesotoxina no causa diarrea. En ratones se observó que una administración intraperitoneal de yesotoxina afecta el músculo cardíaco, mientras que la yesotoxina desulfatada daña el hígado (Van Egmond *et al.*, 1993). Ciminiello *et al.* (1997; 1999) trabajaron con la glándula digestiva del mejillón mediterráneo, *Mitylus galloprovincialis*, e identificaron, además de la yesotoxina, dos análogos nuevos: la homoyesotoxina y la 45-hidroxihomoyesotoxina. Tubaro *et al.* (1998) también detectaron la presencia de la homoyesotoxina en *M. galloprovincialis* del Mar Adriático durante una floración de *Gonyaulax polyhedra* (= *Lingulodinium polyedrum*). Satake *et al.* (1997) y Satake *et al.* (1999) aislaron la YTX y la 45,46,47-trinoryesotoxina a partir de células de cultivo de *Protoceratium reticulatum*, un dinoflagelado marino y observaron que la producción de yesotoxinas en esta especie difiere según la cepa. Ciminiello *et al.* (1998) detectaron otro análogo nuevo de la YTX, la adriatoxina (ATX), en la glándula digestiva de mejillones mediterráneos infectados con DSP y recolectados en 1997 en la costa italiana (en Emilia Romagna). En el mejillón mediterráneo, *M. galloprovincialis*, se identificaron además cuatro análogos más de la yesotoxina: la carboxiyesotoxina (un grupo COOH en el C₄₄ de la YTX en lugar de un enlace doble), la carboxi homoyesotoxina (un grupo COOH en el C₄₄ de la homoYTX en lugar del enlace doble) (Ciminiello *et al.*, 2000a; 2000b), la 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX y la 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxohomo YTX (Ciminiello *et al.*, 2001; 2002).

d) Una toxina nueva ($C_{47}H_{71}NO_{12}$), denominada provisoriamente toxina-3 Killary o KT3 se aisló luego de una intoxicación no explicada en seres humanos, con síntomas tipo DSP, ocurrida en Irlanda en 1995 al ingerir mejillones de Killary (Satake *et al.*, 1998a). Esta toxina se denominó azaspiracida (ver el Capítulo 6).

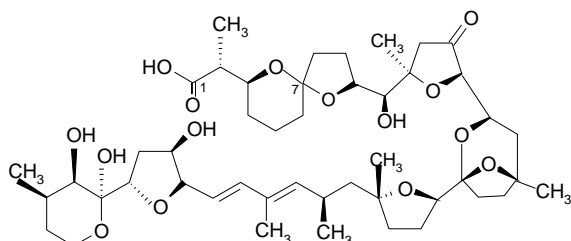
Figura 3.1 Estructuras químicas del ácido okadaico, de las dinofisistoxinas y de las pectenotoxinas



	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	H	CH ₃
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH ₃	CH ₃
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH ₃	H
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH ₃	CH ₃



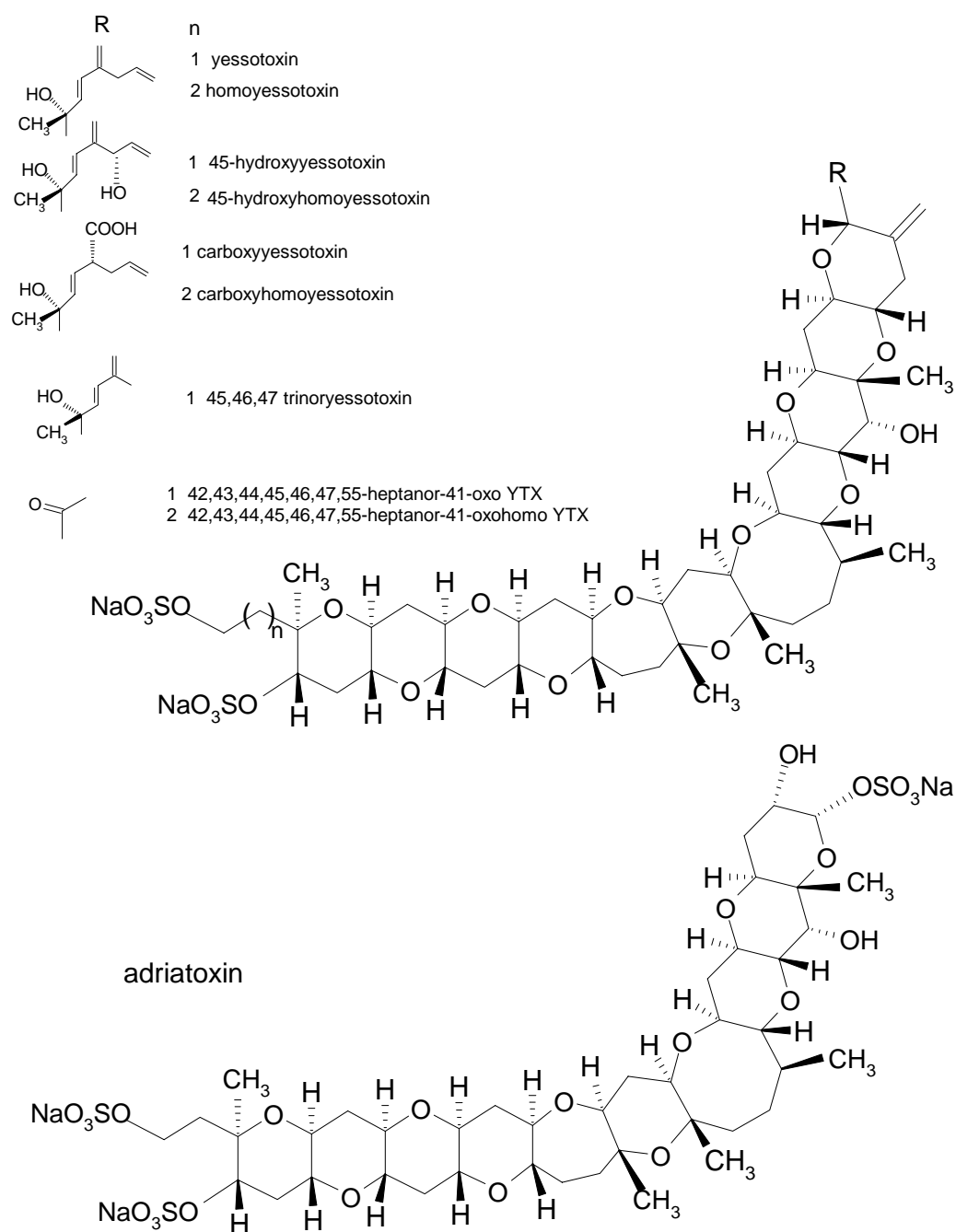
	R	C-7
pectenotoxin-1 (PTX1)	CH ₂ OH	R
pectenotoxin-2 (PTX2)	CH ₃	R
pectenotoxin-3 (PTX3)	CHO	R
pectenotoxin-4 (PTX4)	CH ₂ OH	S
pectenotoxin-6 (PTX6)	COOH	R
pectenotoxin-7 (PTX7)	COOH	S



	C-7
pectenotoxin-2 seco acid (PTX2SA)	R
7-epi-PTX2SA	S

Fuente: Yasumoto *et al.*, 2001

Figura 3.2 Estructura química de las yesotoxinas y de la adriatoxina



Fuente: Ciminiello *et al.*, 1998; 2002 y Yasumoto *et al.*, 2001

3.2 Métodos de análisis

3.2.1 Bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

El bioensayo en ratón del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón (Yasumoto *et al.*, 1978; Japanese Ministry of Health and Welfare, 1981) es el método usado comúnmente. Consiste en extraer las toxinas con acetona del tejido de marisco, evaporar y disolver el residuo obtenido en un volumen pequeño de 1% Tween 60. El extracto se inyecta intraperitonealmente a ratones de 20 g de peso corporal y se registra la supervivencia entre 24 y 48 horas. Una unidad ratón (UR) es la cantidad mínima de toxina necesaria para causar la muerte de un ratón en 24 horas. La toxicidad de la muestra (UR/g de tejido entero) se determina a partir de la dosis más pequeña que causa la muerte de dos o más ratones, de un grupo de tres, en 24 horas. En muchos países, el límite reglamentario se fijó en 0,05 UR/g de tejido entero. Este ensayo probablemente detecta todos los componentes DSP, incluidas aquellas toxinas DSP que no causan diarrea (las PTX e YTX) y cuya toxicidad en seres humanos se desconoce. En algunos casos, otros grupos de toxinas desconocidas con propiedades icotóxicas y hemolíticas pueden ser la causa de la muerte de los ratones.

Las principales desventajas de este ensayo son, la falta de especificidad (no hay diferenciación entre los distintos componentes de las toxinas DSP), la subjetividad del tiempo de muerte de los animales y la necesidad de contar con animales de laboratorio para sacrificarlos posteriormente. Además, el ensayo requiere mucho tiempo, es costoso y puede resultar en falsos positivos por interferencias de otros lípidos (Suzuki *et al.*, [1996] comprobaron que los ácidos grasos libres son muy tóxicos para los ratones). Por último, cabe mencionar que los resultados de los extractos de cuerpo entero y de hepatopáncreas no son uniformes (Botana *et al.*, 1996 y Van Egmond *et al.*, 1993).

En la actualidad, distintos países utilizan distintas versiones del bioensayo en ratón pues la versión original de Yasumoto *et al.* (1978) sufrió varias modificaciones tendientes a solucionar algunos de los problemas que presentaba (Yasumoto *et al.*, 1984a; Lee *et al.*, 1987; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1990). En el afán de normalizar la situación, la UE aprobó una directiva para las toxinas del complejo DSP, que incluye pautas referentes al procedimiento a utilizar en el bioensayo en ratón (EU, 2002a). El Laboratorio Comunitario de Referencia para Biotoxinas Marinas de la UE se embarcó en un estudio de intercalibración cuyos resultados mostraron que los distintos Laboratorios de Referencia Nacionales coinciden razonablemente en el procedimiento que utilizan para el bioensayo en ratón con extractos de mariscos de origen desconocido (CRL, 2001).

Fernández *et al.* (1996) advierten que algunos bioensayos incluyen lavados con hexano para evitar falsos positivos ante la presencia de ácidos grasos libres. Los autores mencionan la conveniencia de volver a evaluar los lavados con hexano, considerando las posibles pérdidas de toxinas DSP de baja polaridad que pueden solubilizarse en la capa de hexano. También es necesario omitir el lavado con hexano si se trata de muestras de origen desconocido, cuyos perfiles de toxinas DSP no se conocen.

ensayo con ratones de cuatro o cinco días de edad

El procedimiento consiste en la administración intragástrica de un extracto de tejido de marisco a ratones de cuatro o cinco días de edad. Se determina el grado de acumulación de fluidos en el tracto gastrointestinal luego de transcurridas cuatro horas, calculando la relación entre la masa intestinal y el resto del cuerpo. La reacción es positiva si los valores son superiores a 0,8 y 0,9. Si bien el tiempo de este ensayo es más corto que el del bioensayo en ratón, la cuantificación de los resultados es mucho más difícil ya que solo producen reacciones positivas las sustancias que causan diarrea (AO y toxinas DTX). Los límites de detección para el AO y la DTX1 son de 0,05 y 1 UR, respectivamente (Hallegraeff *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993).

bioensayo en ratas

Este ensayo utiliza la inducción de diarrea en ratas. El procedimiento consiste en alimentar a los animales (sometidos a ayuno prolongado) con tejido de marisco sospechoso mezclado en la dieta. Las ratas se observan durante 16 horas para detectar signos de diarrea, evaluar la consistencia de las heces o el rechazo al alimento. En el mejor de los casos, el método es semicuantitativo y no detecta las toxinas PTX ni las YTX (Hallegraef *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993). El ensayo se utiliza de forma rutinaria en los Países Bajos y es uno de los procedimientos permitidos por la legislación de la UE.

ensayo con *Daphnia magna*

Vernoux *et al.*, (1994) desarrollaron un ensayo con *Daphnia magna* para analizar el AO en extractos de mejillón. Los autores concluyeron que el método es sensible y poco costoso. Además, puede utilizarse en lugar del bioensayo en ratón para separar el ácido ocadaico y algunas toxinas coextractantes en el mejillón. El método de extracción utilizado permite determinar el ácido ocadaico y la DTX1. El bioensayo con *Daphnia* mide concentraciones de AO hasta 10 veces inferiores al umbral del bioensayo en ratón.

ensayos en asas intestinales

La acumulación de fluidos en el intestino de ratones y conejos intactos es otro método utilizado para detectar las toxinas DSP. El procedimiento consiste en inyectar una suspensión de toxinas DSP en una solución salina de 1% Tween 60 en las asas intestinales. El resultado es positivo si la relación entre el volumen de fluido acumulado, expresado en ml, y la longitud del asa, expresada en cm, es superior a 1,0 (Hungerford y Wekell, 1992).

Edebo *et al.* (1988a) trabajaron con un método para determinar cuantitativamente la actividad diarreaica de las toxinas de las algas en el mejillón común, utilizando asas intestinales ligadas de rata. El procedimiento consiste en desintegrar por presión en frío el hepatopáncreas de mejillones tóxicos, homogeneizar el tejido y suspenderlo en cantidades iguales (p/v) de un agente tampón o del líquido obtenido luego de cocerlos al vapor. La suspensión se inyecta en asas ligadas del intestino delgado de la rata, y se observa una rápida secreción de fluidos. El máximo se observa dentro de las dos horas, con aproximadamente 300 mg de aumento de peso por cm de intestino. Entre 50 y 200 mg/cm, la relación de respuesta a la dosis es casi lineal. La desviación promedio de la media es ± 9 mg/cm (DE= $\pm 4,9$). Los mejillones que producen menos de 100 mg/cm de aumento de peso por g de hepatopáncreas se consideran aptos para el consumo humano, cantidad que concuerda con la concentración de ácido ocadaico permitida. La cantidad mínima de ácido ocadaico que produce secreciones significativas en este ensayo es 0,5 μ g.

en general

Si bien los bioensayos con mamíferos para detectar la toxicidad de las DSP se utilizan mundialmente, existen grandes diferencias en los distintos países en la ejecución de, por ejemplo, el bioensayo en ratón (criterios de toxicidad: muerte del animal, no hay acuerdo en el tiempo de observación apropiado) situación que resulta en diferencias en cuanto a la especificidad y detectabilidad. Uno de los problemas principales es que el bioensayo en ratón detecta todos los componentes DSP y probablemente también otras toxinas. El bioensayo en ratas, por el contrario, solamente detecta el AO y las toxinas DTX, ya que los criterios utilizados incluyen la consistencia blanda de las materias fecales, diarrea y el rechazo al alimento, signos todos que se sabe son solo causados por el AO y las toxinas DTX. Además, el movimiento contrario a la realización de bioensayos en mamíferos presiona cada vez para que no se usen por motivos éticos y, por otra parte, se consideran poco adecuados para fines cuantitativos. En la UE, los representantes de las instituciones gubernamentales de Alemania, el Reino Unido y los Países Bajos presentaron recientemente ante los miembros del Comité Consultivo Científico (CCC) del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA), una recomendación, con pruebas adecuadas y convincentes, destinada a fomentar el desarrollo de una

nueva metodología capaz de sustituir los bioensayos para detectar las toxinas DSP y PSP (Grune *et al.*, 2003).

La Comisión Europea reconoció que la comunidad analítica requiere de otros métodos distintos de los que emplean animales. Al respecto, se presentó una propuesta en el Sexto Programa Marco de la Comisión en el Área 5: “Calidad e Inocuidad de los Alimentos” (EC, 2003). Uno de sus objetivos es desarrollar herramientas de análisis y detección de los peligros asociados a mariscos de aguas costeras, eficaces en función del costo. Estos peligros incluyen las toxinas diarreicas, yesotoxinas, pectenotoxinas y azaspirácidas. De aceptarse la propuesta, caben esperar innovaciones en los próximos años.

ensayos in vitro

ensayos de citotoxicidad

Aune *et al.* (1991) desarrollaron un ensayo utilizando los cambios morfológicos observados en hepatocitos de rata frescos expuestos a toxinas DSP. Este método permite diferenciar las toxinas DSP diarreicas, es decir el AO y la DTX1, de las no diarreicas, la PTX1 e YTX. Las primeras inducen células de forma irregular con ampollas de aire en la superficie. La PTX1 provoca la formación de vacuolas en función de la dosis y la YTX no ocasiona cambios en la forma de la célula, pero sí la aparición de ampollas de aire en la superficie. Los primeros signos aparecen con 0,5 µg/ml de AO y DTX1, con 5 µg/ml de PTX y con 10 µg/ml de YTX. Este método demostró ser una herramienta de investigación útil para separar las toxinas DSP diarreicas de las no diarreicas. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como insumir mucho tiempo y ofrecer resultados que pueden resultar confusos si se está ante la presencia de mezclas de toxinas de algas.

El AO resulta muy tóxico para las células KB (línea celular humana de carcinoma epidermoide), actividad que se observa tras un contacto de tan solo tres horas. Amzil *et al.* (1992) desarrollaron un método para determinar la mínima concentración activa, observando directamente en el microscopio los cambios en la morfología de la célula inducidos por la toxina. La mínima concentración activa de los extractos de hepatopáncreas de mejillón analizados guardó una buena correlación con las concentraciones de AO determinadas por CL (ver la Sección 3.2.3.).

Daiguji *et al.* (1998) observaron citotoxicidad en células KB con 0,05 µg/ml de PTX2, y ninguna toxicidad con dosis de 1,8 µg/ml de ácido pectenotoxina-2-secoico o de ácido 7-*epi*-pectenotoxina-2-secoico. Los autores concluyeron que la citotoxicidad es afectada por la estructura cíclica de las toxinas PTX.

Tubaro *et al.* (1996b) también desarrollaron un ensayo cuantitativo para determinar el AO usando células KB. El método es eficaz para detectar el AO en muestras de mejillón. El límite de detección es de 50 ng/g de glándula digestiva con un punto final de 24 horas. El ensayo de citotoxicidad dependiente de la dosis está basado en la conversión metabólica de una sal de tetrazolio (MTT), en formazan de color azul, cuya absorbancia se mide con un espectrofotómetro con lector de microplacas de barrido.

Pouchus *et al.* (1997) compararon la actividad de extractos de mejillón contaminados en células KB, interpretando directamente los cambios morfológicos y estimaron colorimétricamente la cantidad de células viables después de la tinción. Esta última técnica reveló interferencias con citotóxicas del mejillón no detectados por la primera. Los resultados de la técnica basada en la determinación de la mínima concentración activa de extractos tóxicos de DSP que inducen cambios morfológicos, muestran que es específica para el AO y preferible a la determinación de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) por el método de cultivo celular.

Croci *et al.* (1997, 2001) desarrollaron un método para detectar el AO y compuestos relacionados, basado en los cambios morfológicos que generan en cultivos de células de riñón de *Chloropithecus aethiops*, muy sensibles a la toxicidad de estos compuestos. En muestras contaminadas naturalmente

de *Mitylus galloprovincialis*, los resultados del bioensayo oficial en ratón (de Yasumoto, con un tiempo de observación de cinco horas) concuerdan con los de este ensayo de citotoxicidad.

Otros ensayos de citotoxicidad de las toxinas DSP son, por ejemplo, el de Diogene *et al.* (1995) con fibroblastos y los de Oteri *et al.* (1998), Fairy *et al.* (2001) y Flanagan *et al.* (2001) con líneas celulares humanas. En cuanto a los puntos finales utilizados para evaluar la citotoxicidad de las toxinas DSP, Draisci *et al.* (1998) utilizan la absorción del rojo neutro, Flanagan *et al.* (2001) la tinción vital y Fladmark *et al.* (1998) la inhibición de la agregación celular y la apoptosis.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad (con hepatocitos o con células KB) parecen satisfactorios para el AO y la DTX1. En la práctica, su utilidad está sujeta a la finalización de los estudios de validación interlaboratorios que se están realizando en la UE. Según Marcaillou-Le Baut *et al.* (1994) los resultados obtenidos con los ensayos de citotoxicidad en células KB guardan una buena correlación con los obtenidos por CL o con el ensayo en ratón (por análisis de regresión lineal).

3.2.2 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Los distintos métodos de inmunodiagnóstico disponibles para la detección de toxinas DSP están configurados como ensayos RIE o ELISA con anticuerpos preparados contra un único agente diarreico del AO (Hallegraef *et al.*, 1995). Levine *et al.* (1988) desarrollaron un radioinmunoensayo (RIE) para el AO (Hallegraef *et al.*, 1995). Los anticuerpos del AO se preparan inmunizando conejos con ácido ocadaico conjugado en la función carboxi para formar un enlace amida con un grupo amino de la albúmina bovina, el portador inmunogénico, (usando carbodiimida). En el sistema de ensayo, el AO compete para unirse al ^3H -AO y se detectan 0,2 pmoles de toxina (aproximadamente 0,2 pg/ml) por contador de centelleo. Las toxinas marinas estructuralmente relacionadas (como por ejemplo el A.O., la maitotoxina, la palitoxina y la brevetoxina) no inhiben la unión del AO marcado con tritio al anticuerpo.

Entre los distintos métodos de inmunodiagnóstico tipo ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) disponibles comercialmente, el DSP-Check®, fabricado por UBE Industries, Tokio, Japón, ha sido utilizado en todo el mundo. Según se afirma detecta la presencia de AO y DTX1 con un límite de detección de 20 ng/g. En la práctica, los resultados son variables, muchas veces se han obtenido resultados inconsistentes, incluyendo falsos positivos, con muestras tanto de fitoplancton como de mariscos. Vale y De M. Sampayo (1999) compararon la CL (método de Lee *et al.*, 1987) con el DSP-Check® y observaron que este último permite detectar cuantitativamente las toxinas DSP en todas las muestras contaminadas analizadas que contenían solamente ácido ocadaico, siempre y cuando la concentración de las toxinas progenitoras esté comprendida en el rango de detección y no se presenten como ésteres. En conclusión, el DSP-Check® es más sensible, más específico y más rápido que la CL. En el DSP-Check®, el grado de reacción cruzada del anticuerpo monoclonal con la DTX1 es comparable al del AO, pero las toxinas PTX y YTX no reaccionan (Hallegraef *et al.*, 1995).

La prueba ELISA Rougier Bio-Tech® utiliza un anticuerpo monoclonal anti-AO y un anticuerpo antiidiotipo que compete con el AO por los sitios de unión en el anticuerpo anti-AO. Este anticuerpo es mucho más sensible (entre 10 y 20 veces más) al AO que a la DTX1 o la DTX2. Los derivados metil, diol y alcohol del AO también se unen al anticuerpo, mientras que no se observan reacciones cruzadas de ningún tipo para la DTX3 y para la brevetoxina-1. Varios estudios compararon exhaustivamente esta prueba con otros métodos analíticos de detección de toxinas DSP, como la HPLC y la CL acoplada a EM. Se concluyó que es un método bastante confiable para la cuantificación del AO en extractos de mejillón y de fitoplancton (Hallegraef *et al.*, 1995).

Morton y Tindall (1996) compararon el **DSP Check**® y el **Rougier Bio-Tech**® con la CL (modificación del método de Lee *et al.*, 1987) y determinaron que ambas ELISA estiman de forma precisa las cantidades de ácido ocadaico en extractos sin ácido metilocadaico. Sin embargo, en extractos que contienen ambos análogos observaron que el **DSP Check**® subestima el ácido

ocadaico total. Considerando que los brotes de DSP se han asociado al ácido ocadaico, al ácido metilocadaico o a una mezcla de estos y otros compuestos relacionados, es necesario tener en cuenta que los ensayos ELISA pueden no ser la herramienta adecuada para evaluar con precisión la toxicidad total de las muestras de mariscos.

Biosense ® desarrolló un nuevo ensayo ELISA para detectar la yesotoxina (ver “Direct cELISA YTX assay”- ensayo para YTX Direct cELISA- en www.biosense.com). Según información interna de la empresa, este ensayo probablemente detecte muchísimos análogos y en 2003 están planificados estudio interlaboratoriales internacionales para evaluar su desempeño (Kleivdal, H. información personal, 2002).

Garthwaite *et al.* (2001) desarrollaron un sistema de análisis de las toxinas ASP, NSP, PSP y DSP (incluida la yesotoxina) con varios ensayos ELISA integrados. El sistema detecta las muestras de mariscos sospechosas que seguidamente se analizan utilizando métodos aprobados por las autoridades reglamentarias internacionales. La extracción con alcohol resultó en una buena recuperación para todos los grupos de toxinas.

La inmunotecnología también se aplicó a biosensores para las toxinas DSP. Según Botrè y Mazzei (2000) un biosensor es “un dispositivo bioanalítico autocompatible que incorpora material activo del punto de vista biológico, ya sea conectado o integrado con un transductor físico-químico adecuado, a los efectos de detectar, de forma reversible y selectiva, la concentración o la actividad de compuestos químicos en cualquier tipo de muestra”. Marquette *et al.* (1999) describen un método para detectar el ácido ocadaico en el mejillón con un inmunosensor quimiluminiscente semiautomático con membrana integrado en un sistema de análisis de inyección de flujo. En el ensayo competitivo, con anticuerpos anti-AO marcados con peroxidasa de rábano picante, el antígeno libre de la muestra compite con el AO, inmovilizado en membranas de polietersulfona disponibles comercialmente. Los autores investigaron la estabilidad del sensor en 38 ciclos de determinación del ácido ocadaico y obtuvieron respuestas uniformes en las primeras 34 medidas. Además, el desempeño de cinco inmunosensores (cinco membranas diferentes) demostró tener buena repetibilidad con muestras de mejillón homogeneizadas, con coeficientes de variación de 12,6 por ciento para las muy contaminadas y de 7 por ciento para las blancas. Cabe esperar que, tanto el desarrollo como la aplicación de biosensores para determinar toxinas del grupo DSP, avance rápidamente en los próximos años.

Las columnas de inmunoafinidad son otra técnica con anticuerpos utilizada en el análisis de las DSP para purificar los extractos de marisco antes de la determinación, generalmente por CL. Puech *et al.* (1999) describen el desarrollo reciente y la caracterización de las columnas de inmunoafinidad, elaboradas con anticuerpos monoclonales anti-AO, para la retención específica de las toxinas del grupo del AO. Los autores examinaron la velocidad de unión y la estabilidad de las columnas, así como su capacidad de eliminación de los compuestos que interferían. Observaron reacciones cruzadas entre los anticuerpos y la DTX1 y DTX2, lo que permitió la detección de varias toxinas en un único análisis. Se analizaron distintas matrices contaminadas naturalmente o enriquecidas (glándula digestiva del mejillón y algas) con recuperaciones entre el 55 y el 95 por ciento, según la matriz. Incluyeron, seguidamente, la purificación con columnas de inmunoafinidad, como un paso más en el método de detección espectrofluorométrica con CL y columnas de inmunoafinidad y evaluaron el desempeño del método. Según los criterios de validación, las estimaciones de la linealidad y de la precisión son satisfactorias (los porcentajes de la presunta respuesta del OA se ubicaron en el rango + 101 y 114 por ciento). Los autores concluyeron que las columnas de inmunoafinidad tienen gran potencial como técnica de limpieza en los métodos analíticos, pero es aún necesario probar su valor práctico con estudios de validación interlaboratoriales.

ensayos con fosfatasa ácida

La actividad de la fosfatasa ácida en el protozooario *Tetrahymena pyriformis* es otra técnica de detección de las toxinas DSP. Consiste en extraer las toxinas del marisco con acetona y éter y limpiarlas por cromatografía con ácido salicílico. Luego se prepara un cultivo de *Tetrahymena* y se

añade el extracto. Al cabo de 24 horas, se determinan las concentraciones inhibitorias del 50 por ciento de la actividad de la fosfatasa y del crecimiento, expresadas en equivalentes de unidades ratón (Van Egmond *et al.*, 1993 y Hallegraeff *et al.*, 1995).

La inhibición específica de la fosfatasa proteica Tipo 1 (PP1) y Tipo 2A (PP2A) causada por algunos análogos de las DSP (el AO y la DTX1) se utilizó para desarrollar un radioensayo con fosfatasa empleando la ^{32}P -fosforilasa. El ensayo se utiliza directamente en extractos de marisco y en las fracciones obtenidas después de la separación por HPLC de las toxinas de extractos de glándula digestiva. Si bien la técnica original, que está acoplada al fraccionamiento de la toxina por CL, no es una herramienta reglamentaria muy común, sí se ha utilizado a menudo para detectar la actividad inhibitoria de la fosfatasa en compuestos y en extractos parcialmente purificados de fitoplancton y de mariscos que se presumían fitotóxicos. El procedimiento de ensayo utilizado actualmente se basa en la inhibición que ejerce el AO sobre la PP1, con un límite de detección de 10 fg de AO/100 g de tejido. Honkanen *et al.* (1996a, b) desarrollaron un ensayo relativamente rápido para detectar el AO en extractos de ostras, *Crassostrea virginica*, utilizando la fosfatasa proteica. Los autores analizaron 320 muestras de ostras enriquecidas. Todas las muestras con $\geq 0,2 \mu\text{g}$ de AO/g dieron resultados positivos. El 16,7 por ciento de las muestras enriquecidas con $0,1 \mu\text{g}$ AO/g dio resultados positivos, mientras que las muestras control y las enriquecidas con $0,02 \mu\text{g}$ AO/g dieron resultados negativos. Los resultados de este ensayo concuerdan con los obtenidos por CL.

Quilliam (1998a) indica que, si bien el uso de radiomarcadores en el ensayo con PP permite obtener límites de detección bajos, los ensayos colorimétricos y fluorométricos desarrollados permiten adoptarlos de forma más generalizada.

Simon y Vernoux (1994) desarrollaron un bioensayo colorimétrico de inhibición de la fosfatasa para determinar cuantitativamente el AO. El ensayo utiliza un sustrato artificial de *p*-nitrofenilfosfato y una fosfatasa proteica PP2A semipurificada con extracto preparado a partir del músculo del conejo. La concentración detectable de AO más baja es de 4 ng/ml en solución acuosa y de 40 ng/ml (es decir, 100 ng de AO por g de tejido de mejillón) en extractos crudos de mejillón en metanol. El método es una manera rápida, precisa, reproducible (en el laboratorio), específica y simple de determinar el AO en soluciones tampones o complejas.

Tubaro *et al.* (1996a) desarrollaron un ensayo PP colorimétrico con *p*-nitrofenilfosfato y una preparación de PP2A disponible comercialmente para detectar el AO en mejillones. El ensayo, que se utiliza en formato de microplacas, es preciso, reproducible (en el laboratorio) y detecta concentraciones de AO de $0,063 \text{ ng/ml}$ en soluciones acuosas y de 2 ng/g en la glándula digestiva del mejillón. Los resultados del ensayo con 30 muestras de mejillón contaminadas naturalmente fueron similares a los obtenidos con los del ensayo de inhibición PP2A, con los de ELISA y con el ensayo de citotoxicidad con MTT. Según los autores, el ensayo es rápido, sensible y no requiere equipos costosos.

Los ensayos fluorométricos con PP permiten trabajar con límites de detección más bajos. Vieytes *et al.* (1997) desarrollaron un ensayo de inhibición enzimática fluorescente para el AO con 4-metilumbeliferil fosfato y difosfato de fluoresceína como sustrato de la enzima PP2A. En extractos de marisco, el límite de detección del AO es de $12,8 \text{ ng/g}$ de hepatopáncreas. Según los autores, este ensayo también puede emplearse con muestras muy diluidas, como por ejemplo las de fitoplancton.

Los ensayos fluorométricos de inhibición de la fosfatasa proteica no solo han tenido mejor desempeño que los colorimétricos, sino que además los resultados concuerdan con los del bioensayo en ratón y con las técnicas de CL (Quilliam, 1998a; Vieytes *et al.*, 1997; Mountfort *et al.*, 1999). Sin embargo, Mountfort *et al.* (2001) modificaron el ensayo fluorométrico para mejorar la falta de sensibilidad a los análogos y derivados éster del ácido ocaidaico y para reducir considerablemente la incidencia de los falsos negativos. A la fecha de esta publicación se está realizando un estudio europeo conjunto del método fluorométrico de inhibición de la fosfatasa proteica para determinar los parámetros de desempeño para el ácido ocaidaico y para la DTX1. Si los resultados son aceptables, el Comité

Europeo de Normalización hará una norma, y es probable que luego se lo apruebe con fines reglamentarios en la UE.

La YTX inhibe la hidrólisis del *p*-nitrofenil fosfato por la PP2A. La IC₅₀ es de 0,36 mg/ml y se observó que la potencia era cuatro órdenes de magnitud menor que la del AO. Por lo tanto en el ensayo de inhibición enzimática para el AO o para la DTX1 puede descartarse la interferencia de la YTX que coexista con el AO en los mariscos (Ogino *et al.*, 1997).

en general

Los métodos de detección inmunológicos (ELISA, RIE) aún no están ni completamente desarrollados ni validados formalmente para todas las toxinas. Según Nunez y Scoging (1997) la precisión de los ELISA para detectar concentraciones bajas de AO y/o DTX1 es menor que la de la CL, que la del ensayo colorimétrico de inhibición de la fosfatasa o que la del bioensayo en ratón. Gucci *et al.* (1994) tampoco encontraron una concordancia cuantitativa clara entre los distintos métodos de ensayo para DSP (bioensayo en ratón, bioensayo en ratas, ensayo ELISA y CL). Draisci *et al.* (1994) también informan que, en comparación con los resultados obtenidos con el bioensayo en ratón o con CL, los de los ensayos ELISA no siempre son cuantitativamente confiables.

Morton y Tindall (1996) compararon la detección del AO y de la DTX1 por CL con detector de fluorescencia con dos ensayos ELISA disponibles comercialmente para células de dinoflagelado (*Prorocentrum hoffmanium* y *P. lima*). Si bien con los ensayos ELISA no se obtuvieron ni falsos positivos ni falsos negativos, es probable que ambas pruebas subestimen el total de toxinas presentes. Los ensayos de inhibición de la fosfatasa ácida también parecen dar buenos resultados para el AO y la DTX1, pero solo se conocerá su valor práctico una vez concluidos los estudios de validación interlaboratoriales que se están realizando en la UE.

3.2.3 Análisis químicos

cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina detecta las toxinas DSP. El procedimiento consiste en limpiar los extractos (cromatografía en columna de gel de sílice o de permeación sobre gel), aplicar las fracciones directamente sobre una placa de gel de sílice y eluir con una mezcla de tolueno, acetona y metanol. Las toxinas DSP ácidas se presentan como manchas poco intensas bajo luz UV, con un R_f de 0,4. Los ésteres diólicos y las toxinas ácidas libres aparecen como una mancha de un color rojo rosado característico luego de rociar la placa con una solución de vanilina en etanol y ácido sulfúrico concentrado y de dejarla en reposo a temperatura ambiente durante varios minutos. Los ácidos libres son de color rojo rosado brillante y los ésteres diólicos del mismo color pero menos brillante. Con material limpio aplicado sobre una placa para cromatografía en capa fina el límite es de 1 µg de toxina, aunque es necesario contar con al menos 2 o 3 µg si se trabaja con fracciones menos limpias (Hallegraeff *et al.*, 1995). Los límites de detección algo altos constituyen una limitante a la utilización de la cromatografía en capa fina para la determinación de las toxinas DSP.

cromatografía de gases

Los métodos con cromatografía de gases detectan y separan también las toxinas del AO. El procedimiento consiste en aislar las toxinas de los extractos de éter dietílico de cultivos de dinoflagelados, posteriormente purificados con cromatografía de partición con fase invertida, cromatografía con permeación sobre gel y ácido salicílico. La cromatografía de gases de los derivados trimetilsilílicos de toxinas y de ésteres metílicos intactos se realiza con detector de ionización de llama (Hungerford y Wekell, 1992). En la práctica esta técnica se utiliza rara vez.

cromatografía líquida

El método original de cromatografía líquida (Lee *et al.*, 1987) es una de las técnicas analíticas más utilizadas en la determinación del AO y de la DTX1. El procedimiento consiste en la extracción secuencial del tejido de marisco con metanol, éter y cloroformo; la derivatización con 9-

antrildiazometano (ADAM), la limpieza con un cartucho de sílice Sep-pak y la determinación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detector de fluorescencia. El método ADAM es muy sensible a las toxinas DSP y permite detectar 10 pg de un derivado del AO inyectado en la columna. Sin embargo, la concentración mínima detectable en el tejido de marisco está limitada, no por la sensibilidad del detector, sino por la composición química de la muestra que puede presentar grandes variaciones. En la práctica, el límite de cuantificación es de aproximadamente 100 ng/g de tejido. Este límite, si solo se analizan glándulas digestivas, equivale a entre 10 y 20 ng/g de tejido entero de mejillones.

Aase y Rogstad (1997) optimizaron el procedimiento de limpieza de la muestra para la determinación del AO y de la DTX1 con el método de derivatización ADAM. Los autores proponen utilizar una columna de sílice de 100 mg para la extracción en fase sólida y utilizar solventes para el lavado con diclorometano en lugar de cloroformo para reducir al mínimo el efecto estabilizador del alcohol.

La naturaleza inestable del ADAM y las restricciones de disponibilidad impulsaron a varios investigadores a buscar otros reactivos de derivatización, incluyendo el 1-pirenildiazometano y el 1-bromoacetil-pireno, N-(9-acridinil)-bromoacetamida, 4-bromometil-7-metoxicumarina, 2,3-(antracendicarboximida) etilfluorometanosulfonato. Se observó que los mejores son los reactivos ADAM tipo hidrocarburo aromático, el 1-pirindiazometano (PDAM) y el 1-bromoacetilpireno (BAP), ya que son los menos propensos a sufrir interferencias del reactivo y de los compuestos de reacción (James *et al.*, 1997). El Laboratorio Federal Alemán de Peces y Productos Pesqueros realizó un estudio conjunto de validación interlaboratorios del método por CL-ADAM (GFL, 2001) para determinar el AO y la DTX1 en mejillones. El Comité Europeo de Normalización está elaborando una norma que cabe esperar sea aprobada como Norma Europea en 2004. Si bien el método por CL-ADAM parece adecuado para el AO y la DTX1, no lo es para otras toxinas del complejo DSP.

El método no puede utilizarse directamente para analizar la DTX3; antes de analizarla es necesario convertirla por hidrólisis alcalina en AO, DTX1 o DTX2. El método por CL-ADAM tampoco puede utilizarse para analizar los ésteres diólicos de las toxinas DSP, ni las YTX ni algunas de las PTX. (Hallegraeff *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993).

Otros procedimientos para determinar las yesotoxinas y la pectenotoxina-2 por CL para el marcado fluorescente utilizan DMEQ-TAD (4-[2-(6,7-dimetoxi-4-metil-3-oxo-3,4-dihidroquinoxalil)etil]-1,2,4-triazolin-3,5-diona), un reactivo dienófilo, (Yasumoto y Takizawa, 1997; Sasaki *et al.*, 1999). Si bien los autores sostienen que estos métodos son mejores que el bioensayo en ratón por su rapidez, sensibilidad y especificidad, no se han realizado aún las validaciones interlaboratorios para determinar sus características de desempeño.

Según Fernández *et al.* (1996), la capa de éter de petróleo, que habitualmente se descarta en todo procedimiento (CL con detector de fluorescencia, CL acoplada a EM) utilizado para caracterizar las toxinas DSP en mariscos, es en algunos casos muy rica en toxinas DSP poco polares.

cromatografía electrocinética micelar

Bouaïcha *et al.* (1997a) determinaron toxinas DSP no derivatizadas por cromatografía electrocinética micelar con detector UV. En muestras de mejillón enriquecidas con 10 ng/g de tejido entero detectaron AO, y en extracto crudo del dinoflagelado *Prorocentrum lima* detectaron AO y DTX2.

espectrometría de masas

Hallegraeff *et al.* (1995) analizaron los ésteres diólicos del AO y las toxinas DTX1 y DTX3. La CL acoplada a EM con ionización por electronebulización es un método sensible y rápido para analizar las toxinas DSP, con un límite de detección de 1 ng/g de tejido de marisco comestible entero. En la actualidad se continúa trabajando en el desarrollo de distintos procedimientos analíticos para la determinación de toxinas DSP y algunos artículos de divulgación recientes describen un amplio espectro de métodos (Quilliam, 2001). Suzuki *et al.* (2000) trabajaron especialmente con el AO, la

DTX1 y la PTX6 utilizando CL acoplada a EM para obtener el perfil de toxinas DSP en bivalvos (vieiras y mejillones). Se determinó que el modo de ionización por electronebulización negativa es mucho más eficiente que el positivo.

Varios autores estudiaron los efectos de la matriz en el análisis de toxinas DSP por CL acoplada a EM con ionización por electronebulización. Suzuki *et al.* (2000) obtuvieron buenos resultados limpiando la muestra con una columna B de alúmina. Hummert *et al.* (2000) utilizaron la cromatografía de exclusión por tamaño para limpiar extractos crudos de algas y de tejido de mejillón con microcistinas o con toxinas DSP. Si bien es probable que los autores hayan obtenido mejores resultados, la publicación no logra demostrar que los efectos de la matriz hayan sido eliminados completamente (no se presenta la información de recuperación y no se utilizó enriquecimiento). Por otra parte, Goto *et al.* (2001) se concentraron en las propiedades químicas de los distintos compuestos DSP, utilizando varios solventes de extracción y particiones del mismo.

Ito y Tsukada (2001) estudiaron específicamente los efectos de la matriz. Los autores obtuvieron mejores resultados con un método de adición de un estándar a cada muestra por separado, aunque implica realizar dos corridas de CL acoplada a EM por análisis. Por el contrario, obtuvieron resultados menos satisfactorios con un método con un factor de respuesta basado en una muestra modelo. El estudio subraya los efectos de la matriz de los extractos de marisco, demuestra en qué medida afectan los resultados y propone distintas formas de salvar el obstáculo para la cuantificación.

Holland y McNabb (2003) publicaron un informe de un estudio interlaboratorio del segundo semestre de 2002 con un nuevo método de CL acoplada a EM para determinar las toxinas ASP y DSP en mariscos. En líneas generales, los ocho laboratorios participantes obtuvieron datos uniformes para el grupo de toxinas analito, incluso en concentraciones bajas (< 5 ng/ml, equivalente a 0,05 mg/kg). También se determinó que la sensibilidad es adecuada para los límites de detección necesarios. La mayoría de los laboratorios detectaron las toxinas analito, aunque se observaron diferencias en cuanto a la cuantificación de algunas de ellas, especialmente en ausencia de estándares analíticos. Los participantes utilizaron distintos modos de detección de EM: algunos utilizaron solo la EM (con modos de control de iones específicos o de reacciones específicas), otros emplearon la detección EM en tándem y un tercer grupo ambas técnicas. Si bien la EM en tándem constituye una opción atractiva por su mayor especificidad, es necesario tomar precauciones adicionales para la cuantificación. En resumen, los resultados del estudio son alentadores para todo interesado en utilizar otro método distinto del bioensayo en ratón; método que no cuenta con validación estadística alguna, que da muchos falsos positivos, que es poco adecuado para detectar algunas toxinas y es inaceptable del punto de vista ético para el control rutinario de alimentos. Además, el método 40.105 (el método probado) detecta de manera confiable las toxinas ASP y varias otras toxinas y metabolitos, como las azaspirácidas y los ácidos pectenotoxina secoicos, no siempre se detectables con el bioensayo en ratón (Holland y McNabb, 2003).

en general

La CL constituye una herramienta útil para identificar y cuantificar ciertas toxinas diarreicas, como el AO o las toxinas DTX. En la actualidad, el Comité Europeo de Normalización está considerando hacer una norma con el primer método validado para el AO y la DTX1. Para las otras toxinas DSP existen algunos métodos de CL que aún no están validados. Las innovaciones en la metodología de la CL acoplada a EM son prometedoras pero es necesario mejorarlas y realizar los estudios interlaboratoriales correspondientes antes de incluirlas, de forma generalizada, como herramienta para los análisis reglamentarios. La escasez o la dificultad para obtener estándares analíticos y materiales de referencia es un problema grave que obstaculiza el desarrollo y la validación de la metodología analítica para las toxinas DSP.

3.3 Organismos fuente y hábitat

3.3.1 Organismos fuente

Los productores de toxinas DSP son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. En condiciones ambientales favorables, estas algas pueden reproducirse rápidamente y causar floraciones.

Según Viviani (1992), siete especies de *Dinophysis* están confirmadas como productoras de toxinas DSP: *D. fortii* (en Japón), *D. acuminata* (en Europa), *D. acuta*, *D. norvegica* (en Escandinavia), *D. mitra*, *D. rotundata* y *D. tripos*, y los dinoflagelados bentónicos *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum* (o *P. maculosum*) y *Prorocentrum redfieldi*. Hallegraeff *et al.* (1995) indican que se sospecha de otras tres especies de *Dinophysis*, *D. caudata*, *D. hastata* y *D. sacculus*. Giacobbe *et al.* (2000) encontraron concentraciones de AO y DTX1 en *D. sacculus* entre 110 y 400 y entre 8 y 65 fg/célula, respectivamente. Las máximas concentraciones de toxinas DSP se encontraron en floraciones ocurridas a principios de primavera (OA+DTX1 455 fg/célula). Los autores indican que, si bien la toxicidad de *D. sacculus* es baja, la participación de la especie en los eventos nocivos en el Mediterráneo está lejos de ser despreciable.

Las toxinas DSP halladas en los dinoflagelados heterotróficos *Protoperdinium oceanicum* y *P. Pellucidum* parecen indicar que se alimentan de *Dinophysis*. La producción de toxinas varía considerablemente según la especie y según los morfotipos regionales y estacionales de una misma especie. En el norte de Japón, *D. fortii* contiene altas concentraciones de toxinas en marzo y junio, hecho asociado a una importante acumulación de toxinas en mariscos. Sin embargo, en el sur de Japón en mayo y julio, la toxicidad de la misma especie es mínima y los mariscos no están libres de toxinas (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Pan *et al.* (1999) observaron que *Prorocentrum lima* produce AO, un éster diólico del AO, DTX1 y DTX4. Caroppo *et al.* (1999) comprobaron el potencial de producir AO, DTX1 y DTX2 de la especie no fotosintética *Phalacroma rotundatum* en el sur del Mar Adriático. También se determinó la capacidad productora de AO del dinoflagelado *Prorocentrum arenarium* aislado de un ecosistema de arrecife, en la Isla Europa, en el Canal de Mozambique (Ten Hage *et al.*, 2000) y de la especie *Prorocentrum belizeanum* de un ecosistema de arrecife coralino en Belice (Morton *et al.*, 1998). Según Tubaro *et al.* (1998), la especie *Gonyaulax polyhedra* fue la responsable de la contaminación con YTX en el mejillón mediterráneo. Satake *et al.* (1997) aislaron la YTX de un cultivo de células del dinoflagelado marino *Protoceratium reticulatum*.

3.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

Los mariscos acumulan toxinas en cantidades suficientes como para afectar al ser humano con tan solo 200 células de *Dinophysis* por litro (Botana *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha observado que en aguas holandesas del Mar de Wadden, solo se asociaron con DSP las floraciones de más de 20 000 células por litro. Un estudio de *Dinophysis* en aguas portuguesas mostró que el tiempo necesario para que el marisco se convierta en tóxico varía, no solo en función de la presencia de algas tóxicas, sino también de la abundancia relativa de las otras especies no tóxicas (Aune y Yndestad, 1993). Según Viviani (1992), no todos los brotes de DSP están acompañados de floraciones macroscópicas de *Dinophysis* spp. o de *Prorocentrum* spp. La toxicidad de cada especie de *Dinophysis* varía espacial y temporalmente y la cantidad de células por litro necesaria para contaminar los mariscos es muy variable. En Noruega, tan sólo 1 000 y 2 000 células de *Dinophysis* spp. por litro de agua de mar son suficientes para que el mejillón común acumule cantidades considerables de células (entre 20 000 y 30 000 células por glándula digestiva), que resultan en una toxicidad elevada (Aune y Yndestad, 1993).

En un fiordo aislado de Suecia se detectaron bajas concentraciones de AO en mejillones (*M. edulis*) con cantidades relativamente altas de fosfato y nitrógeno inorgánicos disueltos (FID y NID). En la misma zona se observó que las aguas profundas eran ricas en silicato disuelto (SiD). A fines de verano se observaron bajas concentraciones de AO en mejillones en las zonas con bajas relaciones FID/SiD y NID/SiD; y altas concentraciones de AO en zonas con agotamiento casi total de SiD en julio y cuya cantidad permaneció baja durante el resto de la estación productiva. La información obtenida muestra que la ausencia de silicatos favorece a los dinoflagelados, incluidas las especies de *Dinophysis* productoras de toxinas DSP (Haamer, 1995).

En marzo de 1993 y, entre abril y mayo de 1994, en el norte del Golfo de California, en México se observaron ciertas condiciones que fomentan la presencia de los dinoflagelados, como la desaparición de las diatomeas, poca presión de pastoreo, un entorno probablemente limitado en nitratos, temperaturas entre 20 y 23 °C y estratificación térmica. En estos períodos las densidades máximas de *D. caudata* estuvieron entre 75 y 90 x 10³ células por litro (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

McLachlan *et al.* (1994) realizaron un estudio con *P. lima*, una especie del bentos y del plancton, de aguas calientes y templadas o frías. Los autores observaron que el crecimiento de los cultivos de esta especie en Nueva Escocia, Canadá, está precedido de largas fases de latencia. En la fase de latencia inicial, con agregado de nitrógeno al medio, las concentraciones de toxina por célula permanecieron relativamente altas. En general, una vez comenzado el crecimiento celular, la concentración total de toxina por célula disminuyó y se mantuvo entre 5 y 10 pg. Las células de *P. lima* sobrevivieron cinco semanas con 0 °C, recuperándose con temperaturas más altas. Durante estas cinco semanas, probablemente hubo daño celular con pérdida concomitante de toxinas, liberadas al medio. La concentración de nitrógeno (NO₃⁻) en el medio se utilizó como factor limitante del crecimiento o para estresar fisiológicamente las células. Se observó que cuando se limita el crecimiento aumentan las toxinas asociadas a las células, registrándose la máxima acumulación de toxinas en la célula en la fase estacionaria. La relación AO/DTX1 fue de aproximadamente 5. Una relación AO/DTX1 baja, se asoció a las células en crecimiento y las altas se a la fase estacionaria.

Según Pan *et al.* (1999), la síntesis de toxinas DSP en *P. lima* está limitada al período luminoso y asociada a eventos en el ciclo de división celular. La síntesis de DTX4 comienza en la fase G1 del ciclo celular y continúa durante la fase S (“la mañana” del fotoperíodo), mientras que la producción de AO y DTX1 ocurre posteriormente, en la fase S y en la fase G2 (“la tarde”). No se obtuvieron medidas de la producción de toxinas durante la citoquinéesis al comienzo de la oscuridad.

3.3.3 Hábitat

La incidencia de DSP, o al menos la presencia de DSP, muestra una tendencia creciente, lo que puede atribuirse en parte, a un mejor conocimiento de la enfermedad y a programas de vigilancia más eficaces. Sin embargo, se informa con frecuencia de la presencia de algas productoras de toxinas y de moluscos tóxicos en zonas nuevas (Aune y Yndestad, 1993). El primer registro de DSP es de 1976, en Japón, donde ocasionó grandes problemas en el cultivo de vieiras. En ese mismo país se registraron aproximadamente 1 300 casos de DSP entre 1976 y 1982; más de 5 000 casos en España en 1981 y, en 1983 aproximadamente 3 300 en Francia. En 1984, la industria del mejillón permaneció cerrada prácticamente todo un año en Suecia por las toxinas DSP. La distribución conocida de las DSP incluye Japón, Europa, Chile, Tailandia, Canadá (Nueva Escocia) y probablemente Tasmania (Australia) y Nueva Zelanda (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Van Egmond *et al.* (1993) y Viviani (1992) indican que el organismo productor de toxinas DSP en Japón es *Dinophysis fortii*. Sin embargo, se halló *Prorocentrum lima*, productora de AO, en Sanriku en la costa norte de Japón, en la superficie de las algas *Sargassum confusum* y *Carpopeltis flabellata*. En medio T1 a 15 °C, temperatura a la cual las cepas tropicales no presentan crecimiento, el

crecimiento de esta cepa de *P. lima* fue bueno, lo que indica que es una cepa local adaptada a entornos más fríos (Koike et al., 1998).

En aguas del Atlántico, en Europa, se observaron otras especies de dinoflagelados: *D. acuminata* y *D. acuta* en España, *D. acuminata*, *D. sacculus* y *P. lima* en Francia; *D. acuminata*, *P. redfieldii* y *P. micans* en los Países Bajos (Van Egmond et al., 1993 y Viviani, 1992); *D. acuta*, *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. caudata* y *P. lima* en Portugal (Van Egmond et al., 1993), *D. acuta*, *D. acuminata*, *P. lima* y *P. concavum* en Irlanda; *D. acuta*, *D. acuminata*, *D. norvegica*, *P. micans*, *P. minimum* y *P. lima* en Escandinavia; y *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. tripos*, *D. caudata* y *D. fortii* en el Mar Adriático (Van Apeldoorn et al., 1998; Ciminiello et al., 1997; Marasović et al., 1998; Giacobbe et al., 2000). El primer informe de PTX2 en Europa es de Draisci et al. (1996a), quienes detectaron la toxina en *Dinophysis fortii* del norte del Mar Adriático.

Van Apeldoorn et al. (1998) informan de la presencia de *D. caudata* en el Golfo de México, *D. fortii*, *D. acuminata* y *P. lima* en la región de Australia y *D. norvegica* y *P. lima* en la región este de Canadá. Entre marzo de 1997 y febrero de 1998 la especie *D. caudata* fue la más frecuente y la más abundante en el Estrecho de Johor, en Singapur. También se observó la presencia de los dinoflagelados *Prorocentrum micans* y *Prorocentrum* spp. (Holmes et al., 1999).

Caroppo et al. (1999) informan de la presencia de *Phalacroma rotundatum*, potencial productora de toxinas del grupo del ácido ocadaico, en aguas japonesas, en el noroeste de España, en la Ría Pontevedra y en la costa de Puglia en el Adriático sur, en Italia.

A lo largo de las costas chinas de los Mares de la China del Este y del Sur se detectó AO en algunas especies de mariscos, lo que implica que existen especies productoras de toxinas DSP en la zona. La frecuencia y la concentración de toxinas en mariscos de las costas del sur fueron superiores a las del norte (Zhou et al., 1999).

Orlova et al. (1998) indican que en 1995 y 1996 se observaron grandes cantidades de *D. acuminata* y *Prorocentrum minimum*, en la Bahía de Pedro el Grande, en el Mar de Japón, Federación Rusa.

También se determinó la capacidad productora de AO en el dinoflagelado bentónico, *Prorocentrum arenarium*, aislado de un ecosistema de arrecife en la Isla Europa en el Canal de Mozambique (Ten Hage et al., 2000) y en la especie *Prorocentrum belizeanum* de un ecosistema de arrecife coralino en Belice. (Morton et al., 1998).

3.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

3.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas DSP en organismos acuáticos

Los mariscos acumulan fácilmente las toxinas diarreicas asociadas a especies de *Dinophysis* y *Prorocentrum*, pero poco se sabe del tiempo de retención (Hallegraeff et al., 1995). Algunos estudios describen la cinética de las toxinas DSP en bivalvos, tanto en condiciones naturales como controladas del laboratorio. Bauder y Grant (1996) estudiaron la cinética de las toxinas DSP en vieiras juveniles y adultas. En un microcosmos de laboratorio con condiciones controladas, alimentaron a las vieiras con células del dinoflagelado epibentónico *Prorocentrum lima*. Las toxinas DSP en las células de los dinoflagelados y en las vieiras se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con electronebulización asistida neumáticamente (CL acoplada a EM). Los autores observaron que la exposición a células de *P. lima* no inhibió las velocidades de eliminación, ni en adultos ni en juveniles, y tampoco causó mortalidad. Los autores observaron que en esta especie, la acumulación de toxinas por encima del límite reglamentario, de 0,2 µg toxinas DSP/g peso en húmedo, puede ocurrir en menos de una hora de exposición a densidades altas de *P. lima*. La saturación de toxinas (2 µg de toxina DSP/g de peso en húmedo) se alcanzó en dos días; sin embargo, la retención de toxinas fue muy baja (menos de 5 por ciento). Si bien la mayoría de las toxinas se acumularon en las vísceras, se observaron altas concentraciones de toxinas específicas según el peso en las gónadas de las vieiras adultas. La pérdida rápida de las toxinas alojadas en las gónadas registradas durante los dos primeros

días de depuración indica que la toxina es un derivado primario de un compuesto lábil (no unido) de la sección de las asas intestinales a través de las gónadas. Sin embargo, la eliminación de toxinas de los tejidos viscerales siguió un patrón bifásico de liberación rápida de toxinas durante los primeros dos días de depuración, seguida de una pérdida más gradual en las dos semanas subsiguientes. Esto sugiere que la deposición de heces puede constituir un mecanismo importante para la liberación rápida de toxinas no asimiladas y de células de dinoflagelado intactas.

Sedmak y Fanuko (1991) también observaron dos fases en la liberación de toxinas DSP durante la descontaminación en mejillones. En la primera fase, el contenido de toxinas disminuye rápidamente, en la segunda lentamente, y la toxicidad permanece por encima del límite de cuarentena de 0,5 UR/g de hepatopáncreas. Los patrones de contaminación y descontaminación son específicos de cada especie de marisco y no parecen guardar relación con el tipo de toxina del dinoflagelado.

En un estudio con vieiras tóxicas, *Patinopecten yessoensis*, cultivadas en cubetas con circulación de agua de mar filtrada y esterilizada y alimentadas con y sin diatomeas planctónicas, el contenido de toxinas DSP disminuyó gradualmente durante el cultivo (método de ensayo microbiano). En un grupo alimentado con cultivos de elevada densidad de *Chaetoceros septentrionelle* el contenido de DSP disminuyó en dos semanas al 30 por ciento del valor inicial. La toxicidad por DSP de los excrementos de las vieiras cultivadas fue relativamente alta. Los autores también observaron que en grupos alimentados con otras diatomeas, por ejemplo *Skeletonema costatum*, *Asterionella japonica*, *Rhabdonema* spp. y *Thalassiosira* spp., la toxicidad disminuyó, pero también disminuyeron las cantidades de glicógeno, de aminoácidos libres y de ácidos grasos libres, que deterioraron la calidad (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Blanco *et al.* (1999) estudiaron la descontaminación del mejillón, *Mitylus galloprovincialis*, de Galicia, en el noroeste español, durante 70 días utilizando distintas variables ambientales (salinidad, temperatura, transmisión de la luz y fluorescencia). Entre las variables estudiadas, los autores observaron que la transmisión de la luz y la fluorescencia parecen ejercer el mayor efecto en la depuración. En la mayoría de los casos se observó una relación inversa entre la depuración y el peso corporal. Sin embargo, no pudieron determinar con certeza si la cinética de la depuración de las DSP es en uno o en dos compartimientos.

Sidari *et al.* (1998) estudiaron el comportamiento alimenticio del mejillón, *Mitylus galloprovincialis*, en un criadero de mejillones del Golfo de Trieste, en Italia, durante un brote de DSP. Los autores observaron que parece alimentarse de forma selectiva, escogiendo más bien los dinoflagelados y no las diatomeas. También observaron una selección en los distintos géneros de dinoflagelados y una marcada preferencia por el género *Dinophysis*. Aparentemente los mejillones son capaces de abrir las tecas de las células de *Dinophysis* y digerirlos más fácilmente que otros dinoflagelados.

3.4.2 Mariscos con toxinas DSP

En Japón, los mariscos que causan DSP son los mejillones, *Mitylus edulis* y *M. corcum*, las vieiras, *Patinopecten yessoensis* y *Chlamys nipponensis akazara*, y las almejas, *Tapes japonica* y *Gomphina melaegis*. En las costas atlánticas de Europa se encontró que estaban contaminadas con DSP especialmente *M. edulis*, y también ciertas especies del género *Ostrea*, (Viviani, 1992).

En Japón y en las costas españolas y francesas del Atlántico, la infestación ocurre desde abril hasta setiembre y entre mayo y agosto se registra la mayor toxicidad, con variaciones locales en algunos casos. En Escandinavia, por el contrario, las ostras han causado DSP en febrero y los mejillones en octubre. La información del primer episodio de DSP en el Mar Adriático, en 1989 indica que en algunas áreas costeras el período de infestación ocurre entre mayo y noviembre (Viviani, 1992).

El análisis comparativo de la toxicidad de distintos mariscos provenientes de una zona en Japón mostró que el más tóxico es el mejillón común (*Mitylus edulis*), seguido de las vieiras y por último las

ostras muy poco tóxicas. La toxicidad de los mejillones también varía según la profundidad del cultivo, con concentraciones que difieren en factores de dos o tres (Viviani, 1992). Botana *et al.* (1996) determinaron que los mejillones del nivel superior (entre 3 y 6 m) son los más tóxicos, mientras que entre 6 y 8 m y entre 8 y 12 m la toxicidad se reduce a la mitad. En mejillones adyacentes de la misma zona se detectaron concentraciones de 0,63 y 4,2 µg de AO/g de hepatopáncreas y en mejillones del mismo encordado ubicados a distintas profundidades 0,63 y 10 µg de AO/g de hepatopáncreas (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Fernández *et al.* (1996) determinaron que en los mejillones españoles de las Rías de Galicia, la toxina principal es el AO, aunque también encontraron otras toxinas DSP de menor polaridad. La concentración de las toxinas DSP de menor polaridad no superó en ningún caso la de AO. Por otra parte, observaron que altas concentraciones de toxinas DSP menos polares se corresponden con altas concentraciones de AO. Los autores creen que las toxinas DSP menos polares que se encuentran en la capa de hexano, y que generalmente se descartan, pertenecen al grupo de los derivados acilo.

La acumulación y la concentración de enterotoxina en los tejidos de las distintas especies de moluscos bivalvos del Mar Adriático difieren según la especie, aunque estas compartan el mismo hábitat infestado con microalgas. EL control de toxinas DSP por bioensayo en ratón de *Mitylus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*, *Tapes decussata* y *Venus verrucosa*, mostró que solo los mejillones contenían DSP, aunque todas ellas fueron recolectadas en el mismo hábitat, en el Mar Adriático. Esta falta de uniformidad en la distribución de las DSP incide en la elaboración de los planes de muestreo de mariscos para los programas de seguimiento (Viviani, 1992). Ciminiello *et al.* (1997) detectaron AO, DTX1 y YTX en *M. galloprovincialis* del norte del Mar Adriático. Viviani (1992) menciona que la cocción no alteró la toxicidad de los mariscos contaminados, pero la intoxicación sí se evitaba eliminando previamente las glándulas digestivas.

Suzuki y Mitsuya (2001) determinaron la presencia de homólogos del AO por cromatografía líquida con detector de fluorescencia en muestras del alga *D. fortii*, en vieiras *Patinopecten yessoensis* y en mejillones *Mitylus galloprovincialis* recolectados en la misma zona, en la Bahía de Mutso, Japón. Los autores encontraron que en mejillones y vieiras, las toxinas dominantes son respectivamente DTX3 y DTX1, mientras que en *D. fortii* solo detectaron DTX1. También observaron que los contenidos de toxinas en mejillones son bastante más altos que en las vieiras, lo que indica que los mejillones cuentan con más potencial de acumular homólogos del AO que las vieiras.

En el mejillón verde, *Perna viridis*, del Estrecho de Johor en Singapur, se observaron concentraciones bajas pero persistentes de toxinas DSP. Se detectaron seis isómeros del AO y cinco de la DTX1 y se observó que, en general, la concentración de los isómeros es más alta que la de AO y DTX1. La concentración máxima encontrada, de 97 ng/g de tejido digestivo del mejillón (peso en húmedo), correspondió a un isómero de la DTX1 (DTX1a), mientras que la concentración máxima de AO fue de 24 ng/g. Estos valores son inferiores al límite de consumo (Holmes *et al.*, 1999).

Las DSP están ampliamente distribuidas en distintas especies de mariscos a lo largo de la costa china. En 26 de las 89 muestras analizadas se detectó DTX1 o AO, pero solo seis tenían concentraciones superiores al límite reglamentario para consumo humano (20 µg/100 g de tejido). La concentración más alta se encontró en la especie *Perna viridis* de Shenzhen con 84 µg/100 g (Zhou *et al.*, 1999).

3.4.3 Otros organismos acuáticos con toxinas DSP

El mejillón se alimenta filtrando plancton y así acumula las toxinas DSP. Pero este proceso no selectivo, también es característico de algunos peces que acumulan toxinas. Por otro lado, los predadores pueden acumular fácilmente cantidades considerables de toxinas en una sola comida ya que muchos bivalvos concentran las toxinas en sus glándulas digestivas. Es así que en algunos peces predadores se detectó AO debido a que ingirieron mejillones o peces con la toxina.

Un estudio con bacalao en cautiverio, alimentados con mejillones tóxicos demostró que las concentraciones de AO más altas se registraron especialmente en el hígado (0,7 µg/g) y en las gónadas y las más bajas en el músculo. Los autores determinaron que, si bien la concentración de DTX1 en los mejillones que se utilizaron como alimento era más alta que la de AO, la DTX1 estaba prácticamente ausente en el tejido de los peces. También observaron que al alimentar a los peces con alimento no tóxico, el AO desaparecía en uno o dos meses, aunque en los testes el proceso fue menos rápido. No se detectó AO entre enero y febrero de 1992 en peces (bacalao, tiburón y arenque) de aguas escandinavas, cuando el contenido de AO y DTX1 de los mejillones en los alrededores era bajo. Tampoco se encontró AO en aceite de hígado de bacalao refinado (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

En los programas de seguimiento solo se incluye tradicionalmente a los moluscos que se alimentan por filtración. Sin embargo, Shumway (1995) recaló la importancia de incluir en los programas de control rutinario a otros órdenes superiores que se alimentan de esta manera, como crustáceos y gastrópodos carnívoros, especialmente en regiones donde se recolectan especies no tradicionales. No existen registros de la presencia de toxinas DSP en gastrópodos o crustáceos falta que, sin lugar a dudas, se debe a que no se han obtenido. Según lo expuesto, no puede excluirse la acumulación de toxinas DSP en animales de órdenes superiores que se alimentan de esta manera.

3.5 Toxicidad de las toxinas DSP

3.5.1 Mecanismo de acción

La primera clave para elucidar el mecanismo de acción de las toxinas DSP fue descubrir que el AO provoca una contracción de larga duración del músculo liso de las arterias humanas. Una subunidad de la miosina activa la contracción del músculo liso, por lo que se asumió que el efecto del AO se debía a la inhibición de la fosfatasa de la miosina de cadena pequeña. Con posterioridad, se demostró que el AO es un potente inhibidor de las fosfatasas PP1 y PP2A serina/treonina y que la inhibición de la PP2A es aproximadamente 200 veces superior a la de la PP1. Las fosfatasas proteicas son un grupo de enzimas muy importantes y estrechamente relacionadas con muchos procesos metabólicos esenciales de la célula. La fosforilación y la desfosforilación de proteínas son uno de los principales procesos de regulación en células eucariotas. Estos procesos versátiles regulan entre otros el metabolismo, el transporte y la secreción en la membrana, la contractilidad y la división celular. Algunos autores indican que las fosfatasas, enzimas sensibles al AO, como por ejemplo la PP1 y PP2A, participan en el inicio de la mitosis. Según otros autores, la causa de la diarrea en el ser humano es la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio de las células intestinales o un aumento de la fosforilación de las proteínas citoesqueléticas o de unión, responsables de regular la permeabilidad a los solutos; lo que ocasiona una pérdida pasiva de fluidos (Van Egmond *et al.*, 1993; Hallegraeff *et al.*, 1995). El estudio exhaustivo de la actividad y de la estructura midiendo la inhibición de la actividad de la fosfatasas proteicas indica que un grupo carboxilo libre de la molécula DSP es esencial para la actividad ya que los ésteres diólicos y metílicos no inhiben la fosfatasa. Sin embargo, la actividad de los derivados de la amida y del carboxil reducido (ocadaol) es la mitad que la del AO, al igual que la de los compuestos DTX3 naturales (Hallegraeff *et al.*, 1995).

3.5.2 Farmacocinética

estudios con animales de laboratorio

estudios en ratones con ácido ocadaico (AO)

Matias y Creppy (1996a) estudiaron la circulación enterohepática del AO en ratones. El estudio consistió en administrar a ratones suizos una única dosis oral por cebado de 50 o 90 µg AO[³H]/kg de pc, disuelto en 0,2 ml de agua estéril y metanol (50:50 [v/v]). Recogieron las heces y la orina durante 24 horas y sacrificaron los animales. Con 50 µg/kg de pc no observaron signos clínicos de toxicidad, pero con 90 µg/kg de pc observaron diarrea pasadas ocho horas de la administración. No hubo mortalidad. Determinaron la radioactividad en el cerebro, pulmón, bazo, corazón, hígado, vesícula biliar, estómago, tejido intestinal, contenido intestinal, piel, sangre, músculo, orina y en las heces.

Derivatizaron el AO con 9-antrildiazometano (ADAM) y lo analizaron por CL (con detector de fluorescencia). Los resultados obtenidos por ambos métodos son similares, lo que indica que la velocidad de metabolización del AO es baja. Los autores determinaron que el AO se absorbe del tracto gastrointestinal ya que se encontró luego de 24 horas especialmente en los tejidos y contenidos intestinales (49,2 por ciento de la dosis) y en la orina (11,6 por ciento). Las altas concentraciones en los tejidos y en los contenidos intestinales luego de transcurridas 24 horas prueban que la eliminación del AO es lenta. Los autores determinaron que con una dosis de 50 µg/kg de pc, la cantidad de AO total en los órganos es baja, en comparación con la cantidad excretada por la orina y las heces (11,6 y 6,6 por ciento de la dosis, respectivamente); y es considerablemente menor que la cantidad en los tejidos y en los contenidos intestinales. El aumento de la dosis de 50 a 90 µg/kg de pc ocasionó un aumento proporcional de las concentraciones de AO en los tejidos, contenidos intestinales y en las heces. Con dosis más elevadas, la diarrea aumenta proporcionalmente al aumento de AO en el tejido intestinal. La circulación enterohepática quedó confirmada con el AO en el hígado, en la bilis y en todos los órganos, incluida la piel y los fluidos; y con el aumento entre dos y siete veces de las concentraciones en los contenidos intestinales, en comparación con los contenidos en las heces luego de 24 horas. El estudio también demuestra que en la intoxicación aguda con AO, el grado de concentraciones citotóxicas en el tejido intestinal concuerda con la diarrea observada (Matias *et al.*, 1999a). En estudios recientes con ratones usando el anticuerpo anti-AO, se detectó AO en el pulmón, hígado, corazón, riñón y en los intestinos delgado y grueso luego de transcurridos tan solo cinco minutos de la administración oral. También se detectó AO en los vasos sanguíneos y en el hígado durante las dos semanas posteriores a la administración de la dosis y en los intestinos durante las cuatro semanas siguientes (EU/SANCO, 2001).

Matias y Creppy (1996a) realizaron otro estudio con ratones suizos macho y hembra adultos a los que administraron una única inyección intramuscular de 25 µg AO[³H]/kg de pc, disueltos en 0,1 ml de una mezcla de agua estéril y metanol (50:50 [v/v]). Los autores detectaron AO en la bilis y en los contenidos intestinales una hora después de la inyección. El patrón de eliminación reveló la excreción biliar y la circulación enterohepática. También observaron que la administración de colestiramina, que impide la circulación enterohepática, causa cambios en el perfil de la eliminación cíclica del AO.

observaciones en seres humanos

No hay información.

3.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

estudios con extracto de mejillón

La toxicidad de las DSP se mide generalmente en ratones con una inyección intraperitoneal de extracto de mejillón contaminado. Si bien es una comparación burda, es la base de los métodos de control de calidad y de análisis más utilizados.

Según Yasumoto *et al.* (1978), la letalidad de las toxinas DSP es 16 veces más alta por vía oral que por vía intraperitoneal, aunque los síntomas son los mismos.

Hamano *et al.* (1986) estudiaron la enteropatogenicidad de las DSP en modelos intestinales. Administraron a grupos de tres y cinco ratones (de 4 o 5 días de edad), por cebado, una única vez, 0,1 ml de extracto crudo de vieiras contaminadas con 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 o 0,8 UR de toxinas DSP y una gota de solución de Azul Evans al 1 por ciento por ml. Los ratones se observaron durante 4 horas a 25 °C y se sacrificaron. Retiraron el intestino íntegro y determinaron la acumulación de fluidos como la relación entre el peso del intestino y el peso del resto del cuerpo (relación AF). Las relaciones AF en el control y en los grupos 0,05; 0,1; 0,2; y 0,4 UR eran respectivamente 0,072; 0,073; 0,09; 0,108 y 0,112. Los autores observaron mortalidad con 0,8 UR. En cuanto a la diarreogénicidad (expresada como la relación AF) de los componentes de la mezcla cruda (OA, DTX1, DTX3, PTX1) en ratones de cuatro o cinco días de edad observaron que el AO y la DTX1 tienen la misma potencia, se observó

diarrea con dosis $\geq 0,1$ UR; la DTX3 produce diarrea con dosis $\geq 0,05$ UR y no se observó diarreogenicidad (entre 0,025 y 0,4 UR), con las dosis de PTX1 utilizadas en el estudio.

estudios en ratones con administración oral de AO

En un estudio con ratones adultos con administración oral de 75 μg AO/kg de pc, se observó que en una hora el peso del intestino delgado apenas aumenta (por acumulación de fluidos), mientras que el del hígado disminuye ligeramente. Se dedujo que en ratones, el nivel mínimo con efecto adverso observable de una dosis aguda administrada por vía oral es de 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc (EU/SANCO, 2001).

Luego de transcurrida una hora de la administración oral de AO a ratones, se observaron varias lesiones graves en las mucosas intestinales. El proceso por el que ocurren estas lesiones tiene tres etapas consecutivas (Matias *et al.*, 1999a):

- extravasación del suero a la lámina propia de las microvellosidades;
- degeneración del epitelio de absorción de las microvellosidades ilíacas;
- descamación del epitelio degenerado de la lamina propia.

El intestino delgado de la rata es el órgano más sensible y de mayor reproducibilidad para estudiar los efectos diarreicos de las toxinas marinas. A los 15 minutos de una inyección de AO en las asas ligadas del duodeno medio de ratas macho (de 200 g) se observaron los cambios siguientes: los enterocitos de la parte superior de las microvellosidades se hincharon y se desprendieron de la membrana basal. Con las dosis utilizadas (entre 1 y 5 μg de AO) no se observaron cambios en las células calciformes. Luego de transcurridos entre 60 y 90 minutos, la mayoría de los enterocitos de las microvellosidades se habían vertido al lumen y grandes partes de las microvellosidades aplanadas estaban cubiertas de células calciformes. El daño depende de la dosis: 3 μg de AO solo afectan la parte superior de las microvellosidades, mientras que con 5 μg se desintegra la estructura de las microvellosidades. Los cambios observados con una inyección intravenosa fueron similares pero menos extensos (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

estudios en ratones con administración oral de toxinas DTX

Ogino *et al.* (1997) estudiaron los efectos de la administración oral a ratones. Dosis orales de 100, 200, 300 o de 400 μg DTX1 causaron la muerte de 1/5, 0/5, 2/4 y 3/4 de los animales, respectivamente.

estudios en ratones con administración oral de toxinas PTX

Ogino *et al.* (1997) observaron que la administración de dosis orales de 25, 100, 200, 300 o de 400 μg PTX2 a ratones causó la muerte de 1/4, 0/4, 1/5, 2/5 y 1/4 de los animales, respectivamente. El estudio no demostró una relación de respuesta a la dosis, pero permitió determinar que la toxicidad oral de la PTX2 es comparable a la intraperitoneal (en ratones, la dosis intraperitoneal letal de PTX2 es 260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc).

En ratones, dosis orales de 1,0; 2,0 y 2,5 mg de PTX2/kg de pc causaron diarrea en 1/5, 2/5 y 2/5 de los animales, respectivamente. No se observó diarrea con una dosis de 0,25 mg/kg de pc, pero el intestino delgado se hinchó y se llenó de fluidos (EU/SANCO 2001). Las dosis orales entre 0,25 y 2,0 mg de PTX2/kg de pc ocasionaron cambios histopatológicos en el hígado, en el estómago y en todo el intestino. En ratones, una dosis oral de 0,25 mg de PTX2/kg de pc se considera el Nivel mínimo con efecto adverso observable (EU/SANCO, 2001).

estudios en ratones con administración oral de toxinas YTX

Ogino *et al.* (1997) no observaron letalidad en ratones con una dosis oral máxima de 1,0 mg de yesotoxina (YTX)/kg de pc. Yasumoto y Satake (1998) observaron los ratones durante tres días y registraron un aumento de peso con la administración de esta misma dosis. Aune *et al.* (2002) no registraron mortalidad en ratones hembra (sin ayuno) con dosis orales de hasta 10,0 mg de YTX/kg de pc. La observación con el microscopio óptico mostró que dosis entre 10 y 7,5 mg/kg de pc, solo

causaron cambios moderados en el corazón (edema intercelular leve). Las dosis de 5; 2,5 y 1 mg/kg de pc no causaron cambios. Por ultramicroscópica se observó hinchazón de las células del músculo cardíaco resultante en la separación de los organelos y que los efectos son más pronunciados en las proximidades de los capilares. Los efectos son proporcionales a la dosis y con 2,5 mg/kg de pc, la dosis más baja examinada por ultramicroscópica, son muy leves.

Ogino *et al.* (1997) estudiaron los resultados de una dosis oral de 0,1; 0,2 y 0,4 µg de YTX/ ratón, en suspensión al uno por ciento en solución de Tween 60, por cebado a ratones de la cepa ddY de cuatro días de edad. Luego de transcurridas cuatro horas no observaron acumulación de fluido intestinal, acumulación si observada con todas las dosis de AO o de DTX1.

estudios intraperitoneales

La inyección intraperitoneal de toxinas DSP en ratones causa inactivación y debilidad generalizada entre 30 minutos y pasadas varias horas de la administración. Concentraciones suficientemente altas causan la muerte de los ratones entre una hora y media y 47 horas luego de administradas. Considerando los efectos de la administración oral, es interesante comparar la toxicidad intraperitoneal de las distintas DSP (ver el Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Toxicidad aguda (dosis letal) de la administración intraperitoneal de las DSP en ratones

Toxina	toxicidad (µg/kg de pc)	efectos patológicos
Ácido ocaidaico (AO)	200	diarrea
Dinofisistoxina 1 (DTX1)	160-200 ^{##}	diarrea
Dinofisistoxina 3 (DTX3)	500	diarrea
Pectenotoxina 1 (PTX1)	250	hepatotóxica
Pectenotoxina 2 (PTX2)	230-260 ^{##}	hepatotóxica*
Pectenotoxina 3 (PTX3)	350	hepatotóxica*
Pectenotoxina 4 (PTX4)	770	hepatotóxica*
Pectenotoxina 6 (PTX6)	500	hepatotóxica*
Yesotoxina (YTX)	100 ^{**} 100-214 ^{***} 286 ^{***} (DL ₅₀)	cardiotóxica [#]
45-OH yesotoxina (OH-YTX)	100	hepatotóxica [@]

Fuente: Van Egmond *et al.*, 1993 y Ritchie, 1993 (salvo si se indica otra fuente).

* inferida de la toxicidad de la PTX1

** ratones macho de pocos días de edad en ayunas, con 80 µg/kg de pc muere 1/3 de los ratones, con 100 µg/kg de pc mueren los 3 ratones (Ogino *et al.*, 1997)

*** ratones macho en ayunas (Aune *et al.*, 2002)

la información obtenida indica daños en el corazón

Ogino *et al.* (1997)

@ la información obtenida indica daños en el hígado

Van Egmond *et al.* (1993) observaron diarrea ininterrumpida en ratones con una inyección intraperitoneal de 160 µg de DTX1/kg de pc y muerte en 24 horas.

En ratones de pocos días de edad (entre 7 y 10 g), la inyección intraperitoneal entre 50 y 500 µg de DTX1/kg de pc causa distensión del duodeno y de la porción superior del intestino delgado, observándose fluidos mucoides pero sin sangre. Con concentraciones más altas se observó congestión grave de los vasos submucosos y de las microvellosidades. Salvo en los intestinos, no se observaron cambios discernibles en órganos y tejidos. Al igual que con una administración oral, los cambios en la

ultraestructura de las microvellosidades intestinales ocurren en tres etapas secuenciales (ver el subtítulo estudios en ratones con administración oral de AO) (Van Apeldoorn *et al.*, 1998. Según Van Apeldoorn *et al.* (1998), la dilatación marcada o la destrucción del aparato de Golgi sugiere que la DTX1 ataca directamente el organelo.

El AO y la DTX1 inducen daños en el hígado de ratas y ratones tanto con administración oral como intraperitoneal. Los cambios en el hígado se expresan como una degeneración de las células de revestimiento endotelial en el sinusoides. Además, se observó la disociación de los ribosomas del retículo endoplasmático grueso; vacuolas autofágicas en los hepatocitos en la zona media de los lóbulos hepáticos y hemorragia en la región subcapsular del hígado. También se determinó que tanto la administración oral como la intraperitoneal de AO, DTX1 y DTX3 inducen daños en el epitelio del intestino delgado (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

El mismo estudio demostró que la administración intraperitoneal de PTX1 a ratones de pocos días de edad no causó cambios patológicos en los intestinos grueso y delgado, pero sí congestión marcada del hígado y superficies con granulación fina. Entre los 30 y 60 minutos siguientes a la administración de 1 000 µg/kg de pc intraperitoneal, se observaron múltiples vacuolas en la región periportal de los lóbulos hepáticos. Se observó un efecto similar en ratones, en las dos horas siguientes a la administración intraperitoneal de 500 o 700 µg/kg de pc. El microscopio electrónico confirmó lo observado con el microscopio óptico: varias porciones de las microvellosidades de los hepatocitos se aplanaron y se observó la invaginación de la membrana plasmática hacia el citoplasma. Luego de 30 minutos, las vacuolas aumentan de tamaño y la mayoría de los organelos se comprimen. Luego de 24 horas, casi todos los hepatocitos presentan gran cantidad de vacuolas y gránulos y se vuelven necróticos. En ratones, luego de transcurrida una hora de la administración intraperitoneal de dosis entre 150 y 200 µg/kg de pc solo se observaron lesiones hepáticas leves (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Por otro lado, una dosis intraperitoneal de 100 µg YTX/kg de pc causa la muerte de ratones de pocos días de edad, pero, incluso con una dosis letal, no hay acumulación de fluidos intestinales. En ratones macho de cinco semanas de edad (entre 23 y 25 g de pc) se observó un comportamiento normal durante cinco horas luego de la administración intraperitoneal de dosis superiores a 300 µg YTX/kg de pc, pero padecieron disnea y murieron repentinamente. No se observaron cambios discernibles en el hígado, páncreas, pulmones, glándulas suprarrenales, riñones, bazo, ni timo. En ratones, una dosis intraperitoneal de 500 µg YTX/kg de pc provocó lesiones graves en el corazón, con hinchazón y degeneración de las células de revestimiento endotelial en los capilares del ventrículo izquierdo. No se observaron cambios en ratones con dosis orales de 500 µg YTX/kg de pc (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Aune *et al.* (2002) estudiaron los efectos de dosis intraperitoneales entre 0,1 y 1,0 mg YTX/kg de pc en Tween 60 al 1 por ciento, en grupos de tres ratones blancos hembra. Con dosis de 1,0 mg/kg de pc, los tres ratones murieron y con 0,75 mg/kg de pc, dos de los tres ratones murieron. El microscopio óptico reveló que ambas dosis causaron efectos en el miocardio (edema intercelular leve) y por ultramicroscopía observaron que 1,0 mg/kg de pc provocó hinchazón de las células del músculo del miocardio y separación de los organelos, más pronunciada en las proximidades de los capilares (los efectos de las otras dosis no se estudiaron con ultramicroscopía). Los efectos letales que se observaron con dosis de 0,75 mg/kg de pc y superiores indican que la toxicidad intraperitoneal aguda es menor que la mencionada en el Cuadro 3.1. Una posible explicación es que en este estudio se utilizaron ratones hembra sin ayuno, mientras que en los otros se utilizaron ratones de una cepa diferente, machos y con ayuno.

En otro estudio, los ratones macho con una dosis de 300 µg de YTX desulfatada (preparada químicamente)/kg de pc sobrevivieron 48 horas. La YTX desulfatada solo causó deposición leve de gotitas de grasa en el músculo del corazón. Por otra parte, se observaron efectos en el hígado y páncreas. Dentro de las 12 horas de la administración, el hígado se vuelve pálido y se dilata. En todos los hepatocitos, en los lóbulos, se encontraron pequeñas gotitas de grasa. Casi todas las mitocondrias estaban ligeramente hinchadas y con menor densidad de electrones. Se observó degeneración de las

células pancreáticas acinosas. A las seis horas se observó un marcado desarreglo de la configuración del retículo endoplasmático grueso. En ratones, una dosis oral de 500 µg de YTX desulfatada/kg de pc provoca una degeneración grasa del hígado (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

administraciones repetidas

No hay información.

teratogenicidad/reproducción

Matias y Creppy (1996b) administraron una dosis oral de 50 µg de AO radiomarcado con [³H]/kg de pc (disuelto en agua y metanol 50:50), a ratones hembra en el día 11 de la gestación. Midieron el compuesto radiomarcado 24 horas luego de la administración y probaron que el AO atraviesa la placenta. El tejido fetal contiene más AO que el hígado o el riñón materno: 5,60 por ciento del compuesto radiomarcado en comparación con 1,90 y 2,55 por ciento, respectivamente, determinados por contador de centelleo y CL con detector de fluorescencia luego de la derivatización con ADAM.

actividad mutagénica del ácido ocadaico

Los estudios con *Salmonella typhimurium* TA 98 o TA 100 demostraron que el AO no induce mutaciones, ni en ausencia ni en presencia de un sistema de activación metabólica. Sin embargo, se determinó que es un mutágeno potente en células de pulmón del hamster chino sin activación metabólica (la actividad mutagénica es comparable a la de 2-amino-N⁶-hidroxiadenina, uno de los más potentes mutágenos conocidos). La resistencia a la toxina diftérica (DT^r) se utilizó como marcador de la mutagénesis. Los resultados obtenidos indican que el AO aumentó el número de células DT^r induciendo una mutación del fenotipo de la DT^r y no por selección de células DT^r inducida espontáneamente. Los autores del estudio sugieren que la inducción de la mutación de la DT^r no se debe a la formación de un aducto del ADN-AO, sino que opera probablemente modificando el estado de fosforilación de las proteínas que participan en la reparación o replicación del ADN (Aune y Yndestad, 1993).

La formación de un aducto del ADN-AO se estudió utilizando el método de postmarcado con ³²P en dos líneas celulares (fibroblastos BHK21 C13 y queratinocitos HESV) tratados con AO durante 24 horas (con dosis entre 0,01 y 5 nM). Los autores del estudio determinaron que con dosis bajas no hay formación de aducto. Con dosis intermedias encontraron la mayor cantidad de aductos y con las dosis elevadas observaron que el número de aductos disminuyó en función de la dosis. En células BHK21 C13 se observaron 19 aductos y 15 en células HESV. Diez aductos son similares en las dos cepas, nueve específicos de la línea BHK21 C13 y cinco de la HESV (Fessard *et al.*, 1996).

actividad promotora de tumores del ácido ocadaico y de la dinofisistoxina 1

Los experimentos en dos etapas realizados con piel de ratón probaron que tanto el AO como la DTX promueven los tumores. A diferencia de los ésteres de forbol, estas dos sustancias no activan la proteína quinasa C, sino que inhiben la actividad de la fosfatasa proteica 1 y 2A, causando una rápida acumulación de proteínas fosforiladas. Los efectos del AO en la fosforilación de proteínas en los sistemas celulares resaltan el potente efecto supresor de tumores de las PP1 y PP2 en células normales. La diferencia entre los promotores ésteres de forbol y el AO y la DTX radica en que no se unen a los mismos receptores. Tanto el AO como la DTX1 se unen a fracciones específicas de la piel de ratón. Los sitios de unión del AO también se encuentran en el estómago, en el intestino delgado y en el colon, así como en otros tejidos (Fujiki *et al.*, 1988). Fujiki *et al.* (1989) determinaron que el AO, la DTX1 y la PTX2 inducen la ornitina decarboxilasa (ODC) en la piel de ratón. Además, Suganuma *et al.* (1992) determinaron que en el estómago de la rata, el AO induce la ODC y realza los cambios neoplásicos (adenocarcinomas e hiperplasia adenomatosa) en la región glandular del estómago de la rata luego de la iniciación con N-metil-N'-nitro-N-nitrosguanidina.

Por otra parte, el AO promueve la transformación morfológica de células BALB/3T3 iniciadas con (3-metil-colantreno) carcinogénicas. Además, Sheu *et al.* (1995) demostraron que el AO induce la transformación morfológica de células BALB/3T3, incluso en ausencia de un iniciador.

El ácido ocadaico induce los aductos del ADN en células de Riñón de Hamster Bebé (BHK, por sus siglas en inglés), en queratinocitos (HESV) Humanos, en células del epitelio bronquial humano y en embriones de peces cebra. También se observó que en concentraciones bajas e intermedias (no citotóxicas) la formación de aductos del ADN aumenta en función de la dosis, mientras que las concentraciones altas causan estrés tóxico (Huynh *et al.*, 1998).

inmunotoxicidad del ácido ocadaico

EL efecto del AO en monocitos de sangre periférica humana se estudió *in vitro*, mediante el efecto en la síntesis de la interleuquina-1 (IL-1). Las concentraciones entre 0,1 y 1,0 µg de AO/ml indujeron una reducción notoria de la producción de IL-1 en los monocitos. Las concentraciones de AO más elevadas ocasionaron la muerte de las células. El efecto supresor del AO en la IL-1 se revierte fácilmente con un anti-AO monoclonal específico, pero se desconoce el modo de acción de este efecto del AO (Aune y Yndestad, 1993).

toxicidad in vitro

La toxicidad del AO de las DTX1, PTX1 e YTX se estudió en hepatocitos de rata frescos con microscopía óptica y electrónica (Van Apeldoorn, *et al.*, 1998). El AO es el más tóxico. Con 1 µg/ml se observaron burbujas de aire en la superficie de la célula y el aumento de la concentración ocasionó un aumento en el número y tamaño de las burbujas. También se observó que con concentraciones elevadas las células perdieron su aspecto circular, volviéndose irregulares. Con 2,5 µg DTX1/ml se observaron efectos similares a los del AO, aunque en menor grado. Por otra parte, los resultados de la PTX1 fueron bien distintos: del punto de vista morfológico se observaron pequeños surcos en la superficie de la célula y aparición de vacuolas en el citoplasma en función de la dosis, a partir de 7,5 µg/ml. Con el microscopio electrónico se observó invaginación de la membrana celular y la aparición de vacuolas. Según el estudio, la YTX es bastante menos tóxica ya que con concentraciones entre 25 y 50 µg/ml se observaron burbujas de aire muy pequeñas en la superficie celular y ningún cambio en el aspecto esférico. Ninguna de las toxinas DSP purificadas que se examinaron en el estudio causó la pérdida de enzimas (lactato deshidrogenasa) de la célula.

Matias *et al.* (1996) constataron que según la concentración (CI₅₀ 3,3 x 10⁻⁸ y 5,3 x 10⁻⁸ M, respectivamente) el AO inhibe la síntesis de ADN y de proteínas en células Vero (de riñón de mono). La síntesis del ARN se inhibe con una CI₅₀ de 8,2 x 10⁻⁸ M. El tiempo transcurrido hasta la inhibición de la síntesis de ADN y ARN fue más prolongado (ocho horas) que el tiempo hasta la inhibición de la síntesis de proteínas (de cuatro horas). Esto indica que probablemente la síntesis de proteínas constituye el objetivo primordial y el primer efecto citotóxico del AO.

Matias *et al.* (1999b) estudiaron el efecto del AO en la producción de radicales que reaccionan con oxígeno como posibles inductores del deterioro de la síntesis proteica, con y sin predadores de los radicales de oxígeno (SOD+catalasa, vitamina E y/o vitamina C). Los autores observaron que la peroxidación de los lípidos parece ser un marcador precoz de la exposición al AO. Los predadores de radicales impidieron (parcialmente) la peroxidación de los lípidos, pero la inhibición de la síntesis proteica inducida por el AO no se redujo al mismo grado. Esto apunta a la posible existencia de un mecanismo más específico responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas.

En el lisado de reticulocitos de conejo sin células, el ARNm específico se convierte en globina, utilizado para garantizar que la síntesis proteica constituya un objetivo directo del ácido ocadaico. Efectivamente, el AO inhibe la síntesis de proteínas del sistema según la concentración (Matias *et al.*, 1996).

Matias y Creppy (1998) estudiaron el efecto del AO en los cinco nucleósidos (deoxicitosina, 5-metildeoxicitosina, desoxitimidina, deoxiguanidina y deoxiadenina) en el ADN de células Vero. Los autores observaron que con 7,5 ng de AO/ml, la síntesis del ADN no se inhibe significativamente, pero se induce la hipermetilación del ADN. La cantidad de 5-metildeoxicitosina aumentó de 3,8 a 7,9 por ciento, indicando una posible interferencia en la expresión, replica y regulación del ADN.

También se observó que concentraciones más altas de AO inhiben la síntesis de ADN, pero no provocan un aumento de la tasa de metilación del ADN. El AO participa en la producción de tumores, por lo que los efectos más amenazadores son aquellos que están posiblemente conectados a la modificación del ADN y/o regulación de la expresión génica, como por ejemplo la tasa de metilación. En otras palabras, se cree que los riesgos para el ser humano y para los animales están más asociados a la exposición repetida a concentraciones bajas de AO en mariscos, que afectan el ADN de un individuo repetidamente en el transcurso de su vida.

Zhou *et al.* (1994) estudiaron por microscopía fluorescente los efectos de la exposición a PTX1 de cultivos primarios de células del hígado de embriones de pollo de 11 días. La PTX1 reduce el tamaño de las células y el número de microtúbulos, los que pierden su disposición radial. Los haces de filamentos de actina, conocidos como fibras de estrés, desaparecen y la actina se acumula en la periferia celular. Los efectos causados por una exposición inferior a cuatro horas a concentraciones $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ son reversibles dentro de las 24 horas.

Tripuraneni *et al.* (1997) estudiaron los efectos del AO en cultivos monocapa de células T₈₄ del epitelio intestinal humano, midiendo los parámetros electrofisiológicos, la liberación de lactato deshidrogenasa y las tasas de flujo de manitol [³H] y ²²Na⁺. También estudiaron la fosforilación de las proteínas para identificar cuáles son las proteínas participantes. Los autores observaron que el AO no estimula directamente la secreción de Cl⁻, pero aumenta la permeabilidad paracelular de los epitelios intestinales. Se cree que esta alteración contribuye a la diarrea en la intoxicación con DSP.

De la Rosa *et al.* (2001) concluyeron que la YTX afecta las cantidades cistólicas de Ca²⁺ en linfocitos humanos recién aislados. Los autores observaron que en los linfocitos humanos, la YTX modula el Ca²⁺ intracelular, produciendo una ligera entrada de calcio no capacitativa e inhibiendo la entrada de Ca²⁺ mediante el vaciado del calcio interno. El AO no produce estos efectos. Los autores sugieren la existencia de una interacción entre la YTX y los canales de calcio de la membrana plasmática.

3.5.4 Toxicidad en seres humanos

Los mariscos que contienen más de 2 μg de AO/g de hepatopáncreas o más de 1,8 μg de DTX1/g de hepatopáncreas no se consideran aptos para el consumo humano (Hallegraeff, 1995). Los síntomas principales en el ser humano incluyen diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Los síntomas, que nunca son letales, comienzan a aparecer entre 30 minutos y un par de horas luego de la ingestión de los mariscos contaminados, y se observa una recuperación completa en un lapso de tres días. La intensidad de los síntomas varía según la cantidad de toxinas ingerida y generalmente no es necesario hospitalizar al paciente. El AO, la DTX1 y la DTX3 son las toxinas más importantes del grupo DSP del punto de vista de la diarrea en el ser humano (Aune y Yndestad, 1993). Por otra parte, Carmody *et al.* (1996) mencionan que en un episodio de DSP prolongado, en Irlanda, se constató que la DTX2 fue la toxina DSP diarreica predominante. La información epidemiológica de Japón (1976 – 1977) muestra que tan solo 12 UR alcanzan para inducir síntomas de intoxicación leve en el ser humano (EU/SANCO, 2001). Una UR es la cantidad de toxina (más adelante definida como DTX1 en el estudio japonés) inyectada intraperitonealmente, que causa la muerte de un ratón en 24 horas. Doce UR equivalen a 43,2 μg , el nivel mínimo con efecto adverso observable para la DTX1 (EU/SANCO, 2001). Según Yasumoto *et al.* (1998), sin embargo, la dosis mínima de DTX1 que induce síntomas tóxicos en adultos es de 32 μg . Según Fernandez y Cembella (1995), una UR corresponde a aproximadamente 3,2 μg de DTX1 y a 4 μg de AO. Es decir, la dosis mínima que produce efectos tóxicos en el ser humano es 38,4 y 48 μg de DTX1 y de AO, respectivamente. Aún no hay estudios sobre los efectos mutagénicos e inmunosupresores del AO y de la DTX1 constatados en animales y en sistemas experimentales.

La situación no es satisfactoria para el caso de las toxinas PTX e YTX, los otros dos grupos químicos del complejo DSP. El potencial diarreico de las PTX es bajo y las YTX no inducen diarrea en roedores, pero la inyección intraperitoneal de cualquiera de ellas es letal para ratones. En roedores son tóxicas para el hígado y el corazón, respectivamente. No está claro si las PTX e YTX constituyen una

amenaza para la salud de los consumidores de mejillones contaminados (Aune y Yndestad, 1993). Se cree que en un evento de DSP con cholgas (con 56 casos de hospitalización) en Nueva Gales del Sur, Australia, ocurrido en diciembre de 1997 (ANZFA, 2001); los ácidos PTX-2 secoicos contribuyeron a los síntomas gastrointestinales, vómitos o diarrea observados en seres humanos (Quilliam *et al.*, 2000 en Aune, 2001). Según Burgess y Shaw (2001), los pacientes consumieron aproximadamente 500 g de cholgas con 300 µg de PTX-2SA/kg (~150 µg de PTX-2SA/persona~2,5 µg/kg de pc para una persona de 60 kg).

En Noruega durante un episodio de DSP en 1984, algunas personas fueron hospitalizadas con los síntomas habituales de DSP, además de calambres y agotamiento grave. Estos pacientes se recuperaron en unos días, luego de una inyección intravenosa de una mezcla de electrolitos (Aune y Yndestad, 1993). Recientemente, durante la inauguración de un criadero de mejillones en Noruega, 70 personas ingirieron mejillones comunes. El 54 por ciento de los invitados se intoxicaron y presentaron los síntomas típicos de DSP. La concentración en los mejillones restantes fue entre 55 y 56 µg eq de OA/100 g de carne de mejillón (Aune, 2001).

3.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

Windust *et al.* (1996) determinaron que concentraciones micromolares de AO inhiben el crecimiento de varias microalgas no productoras de DSP. La DTX1 afecta el crecimiento de las microalgas de forma equivalente al AO. Los efectos de una mezcla de ambos son una simple suma. Sin embargo, no afectan el crecimiento de *P. Lima*, un dinoflagelado productor de toxinas DSP.

Las concentraciones mayores o iguales a 3 µM de AO y del éster AO-diol inhiben casi completamente el crecimiento de la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, (CE₅₀ 2,2 y 1,0 µM para AO-diol y AO, respectivamente). Este resultado contradice la creencia que solo las toxinas ácidas libres, como por ejemplo el AO y la DTX1, son inhibidores potentes de la fosfatasa. En cuanto a la DTX4, solo afecta el crecimiento en concentraciones bastante más altas. El éster AO-diol se hidroliza parcialmente a AO (7 por ciento hidrolizado, 20 por ciento de éster AO-diol incambiado y 73 por ciento sin identificar). Este fenómeno sugiere que las células expuestas a los ésteres de toxinas DSP inactivos, pueden activarlos metabólicamente. En otro experimento se observó que tanto la DTX4 como el éster AO-diol se hidrolizan (2,0 y 2,7 por ciento, respectivamente, en un plazo de cinco días) a AO de forma espontánea y no por intermedio de la presencia de *T. weissflogii*.

Windust *et al.* (1997) observaron que la DTX4 inactiva se hidroliza, por intermediarios lipófilos sin carga, a AO, es decir la toxina ácida libre activa.

Ogino *et al.* (1997) estudiaron la ictiotoxicidad de la yesotoxina (YTX) y de la YTX bisdesulfatada (dsYTX) en *Oryzias latipes*. La YTX se diluyó en 0,1 ml de metanol y la solución obtenida se diluyó con agua hasta 50 ml para preparar 1,0 o 0,5 mg/l de una solución de prueba. Se colocó un ejemplar de *Oryzias latipes* en un vaso de precipitación con solución de prueba y se observó durante 24 horas. El ensayo se realizó por triplicado. La dsYTX se analizó de forma similar con solo 0,5 mg/l. En 24 horas no murió ninguno de los peces expuestos a 1 y a 0,5 mg/l de YTX, mientras que tres de los peces expuestos a 0,5 mg/l de dsYTX lo hicieron en seis horas.

3.6 Prevención de la intoxicación por DSP

3.6.1 Depuración

La velocidad de eliminación de las toxinas DSP varía con la estación. Se observó que la baja temperatura del agua retarda la eliminación de toxinas, aunque se desconoce en qué medida este factor afecta su absorción o eliminación. La tasa de eliminación está estrechamente relacionada al lugar donde se acumulan las toxinas, es decir que la eliminación de las toxinas del tracto gastrointestinal (por ejemplo en *Mitylus*) es más rápida que la de las alojadas en los tejidos. Los datos obtenidos de moluscos bivalvos de cultivo revelan que en *Mitylus edulis*, el tiempo de retención de las toxinas varía

entre una semana y seis meses. Otros estudios con mejillones de cultivo en estanques de acuicultura y con mejillones en el laboratorio, mostraron que la reducción de contenidos elevados de toxinas DSP (3 UR) a concentraciones aceptables es más rápida en los primeros que en los segundos. Se cree que la calidad del alimento disponible para los mejillones durante la eliminación afecta la velocidad de eliminación de toxinas (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Probablemente la tasa de depuración (de eliminación de las toxinas DSP del marisco) varía según la especie y es afectada por factores interrelacionados, como la alimentación o bombeo del marisco, la temperatura, salinidad y la concentración de partículas y de algas no tóxicas. En Japón se observó una disminución en una semana de las toxinas DSP de 4,4 a 2,5 UR/g (por bioensayo en ratón), y luego a 0,5 UR/g la semana siguiente. En los Países Bajos, luego de cuatro semanas con temperaturas del agua entre 14 y 15 °C, no se detectó toxicidad en mejillones por bioensayo en ratas (Hungerford y Wekell, 1992). Los mejillones de la costa de Suecia (con temperaturas del agua entre 1,4 y 3 °C) se analizaron por CL con detector de fluorescencia. Se observó que luego de una floración, las concentraciones de AO disminuyen en una semana de 7,2 a 1,8 µg/g hepatopáncreas (Edebo *et al.*, 1988b). Salvo el método utilizado para reducir las concentraciones de PSP en berberechos del Mediterráneo, no existen métodos útiles para reducir eficazmente las concentraciones de ficotoxinas en mariscos contaminados. Hasta la fecha, los métodos probados (en general para reducir el contenido de toxinas PSP, como por ejemplo transferir los mariscos a aguas sin organismos tóxicos para autodepurarse, desplazar verticalmente los mejillones en la columna de agua para reducir al mínimo la acumulación de toxinas, tratar el agua con ozono, estrés de sal o temperatura, tratamientos de choque eléctrico, disminución del pH o cloración, cocción) no parecen seguros. Algunos son demasiado lentos, otros no son viables económicamente o resultan en productos de aspecto o sabor inaceptables (Hallegraeff *et al.*, 1995). Según Scoging (1991), la toxina se desnaturaliza solamente por ebullición estricta (163 minutos a 100 °C).

Blanco *et al.* (1999) estudiaron la depuración en mejillones, *Mitylus galloprovincialis*, de Galicia, en el noroeste español, contaminados con toxinas DSP. Trasladaron los distintos grupos de mejillones a ambientes con distintas condiciones (salinidad, temperatura, transmisión de la luz y fluorescencia) y observaron la cinética de la depuración del AO en cada grupo, durante 70 días. La transmisión de la luz y la fluorescencia parecen ejercer el mayor efecto en la depuración. En la mayoría de los casos observaron una relación inversa entre la depuración y el peso corporal. Sin embargo, no pudieron determinar con certeza si la depuración de las DSP ocurre con una cinética de uno o dos compartimientos.

González *et al.* (2002) realizaron un estudio cuyos resultados preliminares indican la inestabilidad del ácido ocaído libre en una atmósfera supercrítica de dióxido de carbono con ácido acético. El 90 por ciento de la toxina se eliminó y la actividad biológica contra la fosfatasa se vio afectada gravemente (una reducción de hasta 70 por ciento). La eliminación de las toxinas de los mariscos contaminados se obtuvo por deshidratación parcial y el rendimiento de la eliminación fue más bajo que el obtenido con la toxina libre. También determinaron una reducción entre 51 y 57 por ciento del contenido de toxina del hepatopáncreas de mejillón parcialmente liofilizado con 1 µg de AO/g tras una exposición de 190 minutos a la mezcla supercrítica.

3.6.2 Medidas preventivas

La prevención de las enfermedades transmitidas por los mariscos se efectúa controlando el ambiente marino y la carne de los mariscos. Según Wright (1995), cada día más países inspeccionan más frecuentemente el agua de mar en los alrededores de los emprendimientos acuícolas o de los criaderos de mariscos para detectar cepas de fitoplancton productoras de toxinas. Menciona además, que desde el descubrimiento que las algas productoras de toxinas se trasladan en el agua de lastre de los buques a nuevos puntos geográficos en todo el mundo, este tipo de control gana popularidad.

Los datos sobre la presencia de especies de algas tóxicas, el tipo de alga y las concentraciones se pueden utilizar para predecir qué toxinas pueden aparecer en épocas de floración y qué productos

marinos controlar analíticamente. Si bien algunas especies de algas nunca observadas en una zona en particular aparecen repentinamente y causan problemas rápidamente, muchos países cuentan con programas de control para verificar las especies de fitoplancton (tóxicas) en los lugares donde se cultivan mariscos. Algunos países solo controlan la presencia de una o dos especies de algas, mientras que otros cuentan con una larga lista de especies. En algunos países, las zonas de cultivo de mariscos se cierran cuando el número de células de una especie de algas en particular supera las concentraciones estipuladas para esa especie, mientras que otros solo cierran las zonas de recolección cuando detectan toxinas en los mariscos. En Italia, por ejemplo, las zonas de recolección se cierran cuando se observa la presencia simultánea de algas tóxicas y de toxinas en los mariscos (Hallegraeff *et al.*, 1995).

La principal estrategia para prevenir la intoxicación con DSP es impedir que los mariscos contaminados ingresen al mercado controlando sus contenidos de toxinas DSP. Sin embargo, según lo expuesto, en áreas endémicas el muestreo semanal es insuficiente para asegurar la máxima protección de la salud humana. No solo es necesario contar con un plan de muestreo confiable, sino que se necesitan medios de detección eficaces. Sin embargo, existen varios factores que dificultan el control (Aune y Yndestad, 1993):

- la variabilidad del número de células de algas productoras de toxinas resultantes en mejillones tóxicos;
- el período de toxicidad que varía según la región y el episodio;
- las algas y las toxinas en cuestión que varían según la región;
- la presencia simultánea de toxinas DSP y PSP dificulta el control;
- incluso en el mismo lugar de muestreo, la toxicidad de los mejillones contaminados puede variar en varios órdenes de magnitud según la profundidad; y
- aunque con concentraciones menores, otros productos marinos, como por ejemplo las ostras, también pueden estar contaminados.

3.7 Casos y brotes de DSP

3.7.1 Europa

La Figura 3.3 ilustra la presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM entre 1991 y 2000.

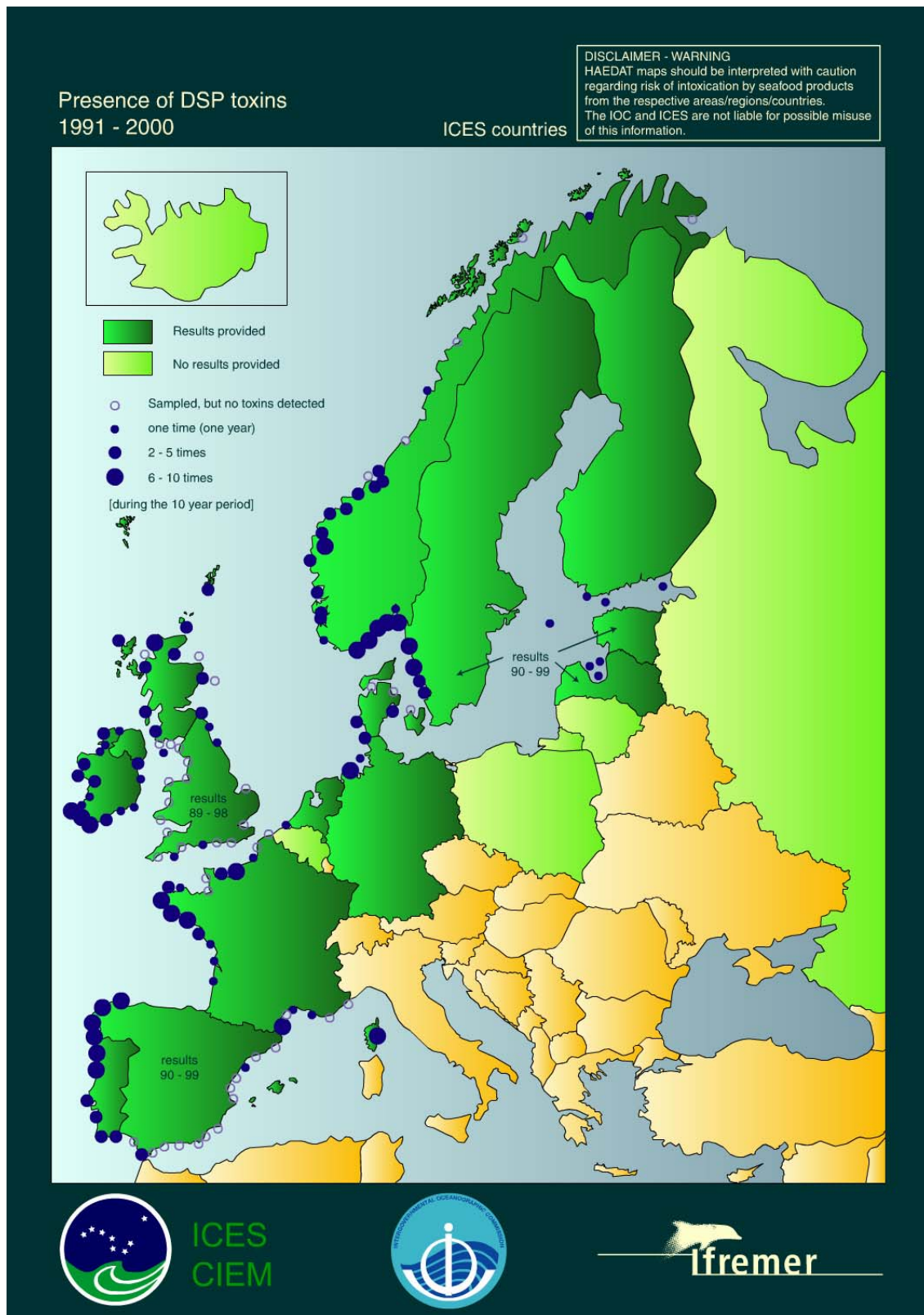
Bélgica

En 1999, una de las 350 muestras analizadas por bioensayo en ratón dio resultados positivos para DSP (EU-NRL, 2000). De Schrijver *et al.* (2002) describen 403 casos de DSP ocurridos en febrero de 2002, en Amberes, por consumo de mejillones comunes importados de Dinamarca. El bioensayo en ratones para determinar la presencia de ácido ocaidaico, toxinas dinofisis, yesotoxina, pectenotoxinas y azaspiracida dio resultados positivos. Estos resultados se confirmaron por CL acoplada a EM con resultados de 5,9 µg AZA/kg de carne (inferior al límite reglamentario), 229 µg AO libre/kg de carne y 300 µg eq de AO (diol éster o AO conjugado)/kg de carne. Por espectrometría se observó un pico importante correspondiente al ácido pectenotoxina-2-secoico (PTX2SA) que no pudo cuantificarse. El resto de los mejillones importados fueron retirados del mercado.

Croacia

En el verano de 1994 se detectó por bioensayo en ratón y CL, la presencia de AO y de DTX1 en muestras de *Mytilus galloprovincialis* provenientes de la Bahía de Kastela, en el Adriático central, aunque no se registraron problemas de salud por consumo de mariscos contaminados (Orhanovic *et al.* 1996). El bioensayo en ratones de especímenes de *M. galloprovincialis* recogidos en la Bahía de Kastela durante una floración masiva en el verano de 1995 dio resultados positivos para toxinas DSP. El análisis de las muestras por CL reveló la presencia de AO, la ausencia de DTX1 y DTX2, y sugirió la presencia de un compuesto derivado desconocido en concentraciones muy altas. La toxicidad de los mejillones se atribuyó a *D. sacculus*. (Marasović *et al.*, 1998).

Figura 3.3 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de los países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Dinamarca

En 1990 se detectaron concentraciones de 170 µg AO/100 g en mejillones de la costa norte del país. Estos mejillones se exportaron también a Francia donde se registraron 415 casos de intoxicación (Van Egmond *et al.*, 1993). En 1999 ocurrieron tres eventos tóxicos. En los dos primeros, la presencia de toxinas DSP en el mejillón común resultó en el cierre de las zonas de producción locales durante algunas semanas. El tercer evento ocurrió con mejillones provenientes del Mar del Norte. Dos empleados del personal de una empresa productora enfermaron por ingerir los mejillones antes de que se realizara el bioensayo en ratón (EU-NRL, 2000). En 2000 se detectaron concentraciones de AO inferiores al límite de 160 µg/kg de mejillón entero en muestras tomadas en la costa este de Jutlandia. En esa misma época, se detectaron densidades altas de *Dinophysis acuminata*, que restringieron la cosecha o provocaron el cierre de las áreas de producción (EU-NRL, 2001). En 2001 se detectaron concentraciones de toxinas DSP superiores al límite reglamentario en mejillones comunes destinados a la venta, provenientes de tres zonas de cultivo. En 2002, las toxinas DSP se presentaron con más frecuencia que lo habitual y varias zonas de producción permanecieron cerradas durante semanas o meses. En Limfjord, en la costa este de Jutlandia; en el fiordo Roskilde, en Isefjorden y en el Mar de Wadden, en el Mar del Norte se detectaron concentraciones de DSP superiores al límite reglamentario. En noviembre y diciembre de 2002 se registraron varios casos en Alemania por ingerir mejillones con AO provenientes del área de producción de Isefjorden, al igual que en Bélgica (ver *Bélgica*) donde también se registraron casos por ingerir mejillones importados de Dinamarca (EU-NRL, 2002).

Francia

Desde 1978 se han registrado varios casos de intoxicación por DSP en consumidores de mariscos de distintas regiones (como por ejemplo Normandía, Loira Atlántico, el sur y oeste de Bretaña y en las costas mediterráneas). En 1984 y 1985 se registraron 10 000 y 2 000 casos, respectivamente con síntomas de DSP por ingerir mejillones cultivados en el país (Durborow, 1999). En las costas atlánticas y mediterráneas las densidades máximas de algas ascienden a varios miles de células por litro, mientras que en el este del Canal de la Mancha (al norte del estuario del Sena) se han registrado densidades de hasta 100 000 células por litro. Generalmente la toxina en cuestión es el AO (Van Egmond *et al.*, 1993). Tanto en las costas del Mediterráneo como en las del Atlántico se ha observado la presencia de especies *Dinophysis* (EU-NRL, 1998) y dos y 27 áreas de producción, respectivamente, permanecieron cerradas debido a la presencia de DSP (EU-NRL, 2000). A fines de 1998 se detectaron concentraciones de *A. tamarensis* de hasta 350 000 células por litro y algunas áreas de producción de almejas, ostras y mejillones permanecieron cerradas durante dos meses. En 1999 se detectó la presencia de DSP en mariscos de Irlanda y Túnez (EU-NRL, 2000). En 2000 se cerraron varias zonas de producción de la costa del Atlántico y una en la costa del Mediterráneo debido a la presencia de toxinas DSP (EU-NRL, 2001). En 2002 se observaron varios eventos tóxicos con DSP: hacia fines de otoño se detectaron toxinas DSP en mariscos a lo largo de la costa sur de Bretaña y de la costa cercana al río Loira y algunas zonas permanecieron cerradas hasta diciembre. Fue la primera vez que se registraron tantos eventos de DSP a lo largo de las costas francesas del Atlántico (EU-NRL, 2002).

Alemania

En 1987 se detectó la presencia de AO en mejillones del Mar de Wadden. En la costa de la Bahía Alemana se detectó regularmente la presencia de *Dinophysis acuminata*. Entre 1986 y 1989, los mejillones que causaron DSP provenían generalmente de Frisia Oriental y Septentrional. En estas mismas zonas se detectaron densidades superiores a 1 000 células de *Dinophysis* por litro (con un máximo de 25 000 células por litro) en 1990. Los bancos de mejillones permanecieron cerrados y no se registraron casos de intoxicación por DSP en seres humanos (Van Egmond *et al.*, 1993). En setiembre de 1998 se detectó la presencia de AO (EU-NRL, 1998). En 1999 se detectaron toxinas DSP en dos muestras aunque con concentraciones inferiores al límite reglamentario (EU-NRL, 2000). En 2000 se registró un caso de intoxicación por DSP en dos mujeres de edad avanzada (EU-NRL, 2001). En octubre de 2001 se observó un aumento de la densidad celular de *D. acuminata* ($5,9 \times 10^3$ células por litro) en la costa de Frisia Oriental. La concentración de toxinas DSP en los mejillones aumentó y se decretó una veda para la recolección del marisco en la zona contaminada (Anonymous, 2001b).

Grecia

Diez muestras dieron resultados positivos para DSP en 1999 y se detectó una concentración de *D. acuminata* de 1 500 células por litro (EU-NRL, 2000). Desde abril hasta junio de 2000, una zona de producción permaneció cerrada debido a la presencia de toxinas DSP (EU-NRL, 2001).

Irlanda

Los primeros eventos de intoxicación con DSP ocurrieron en la década de 1980. En 1984 y desde 1987 hasta 1991 se detectó una toxicidad variable en mejillones. En 1988 se detectó la presencia de *D. acuminata* (1 500 células por litro) y de *D. acuta* (240 células por litro) en la costa sudoeste de las bahías de Dingle, Kenmare, Bantry, Dunmanus y Roaring Water, y concentraciones de hasta 200 µg AO/100 g y 25 µg DTX1/100 g de carne de mejillón. En 1990, en Glengariff, se determinó que un isómero del AO contribuyó a la toxicidad residual detectada en mejillones luego de la completa desaparición del AO y, por primera vez, se detectó toxicidad en invierno (Van Egmond *et al.*, 1993). En un episodio de DSP ocurrido en 1991 se observó la presencia de AO y de DTX2 en mejillones. En 1994, la observación de zonas de cultivo de mejillones similares reveló que las cantidades de DTX2 superaban ampliamente las de las otras toxinas (las concentraciones de AO fueron inferiores a 0,7 µg/g y la concentración máxima de DTX2 de 6,3 µg/g de hepatopáncreas). La toxicidad en los mariscos se observó poco tiempo después de obtenerse recuentos elevados de células de *Dinophysis acuta* (Carmody *et al.*, 1996). Por otro lado, en extractos de mejillones irlandeses se aisló e identificó un nuevo isómero de la DTX2, conocido como DTX2B, (James *et al.*, 1997). En mariscos recolectados en aguas irlandesas también se detectó la presencia de derivados acilo del AO y de la DTX2 (EU-NRL, 1996). La ingestión de mejillones de Killary, en Irlanda provocó la inexplicable intoxicación de seres humanos con síntomas de DSP. Como resultado de este episodio, se aisló una toxina nueva (C₄₇H₇₁NO₁₂), denominada provisoriamente KT3, que constituye una nueva clase de toxinas de mariscos tipo poliéter, conocida hoy en día como azaspirácidas (Satake *et al.*, 1997) (ver también el Capítulo 6).

El cinco por ciento de las 1 800 muestras analizadas por bioensayo en ratón en 1999 dieron resultados positivos para DSP y/o AZP (EU-NRL, 2000). En agosto de 2000 se cerraron 30 zonas de recolección de mariscos bivalvos y se observaron síntomas de DSP en humanos (Anonymous, 2000a). El 17 por ciento de las muestras analizadas por bioensayo en ratones en 2001 dio resultados positivos, en comparación con tan solo un 3,4 por ciento en 2002. La concentración más alta de toxinas DSP (AO y DTX2), en 2002 se detectó en ostras, con 30 µg/kg. El 7 por ciento de los mejillones muestreados contenían concentraciones de AO o de DTX2 superiores al límite reglamentario (EU-NRL, 2002).

Italia

Desde 1989 se observa la presencia de *Dinophysis* spp. en las costas del norte y centro del Mar Adriático y se han registrado casos de DSP. Ese mismo año comenzó un programa de control de los bancos de mariscos italianos. Las especies encontradas fueron *D. sacculus*, *D. fortii* y *Dinophysis* spp., en concentraciones máximas de 4 000 células por litro (Tubaro *et al.*, 1992). Las muestras de mejillones tóxicos y de algas del género *Dinophysis* tomadas durante floraciones en la costa de Cesenato se analizaron por CL acoplada a EM con nebulización iónica (CL acoplada a EM-ISP) para detectar la presencia de toxinas DSP. Todas las muestras de mejillones dieron resultados positivos para el AO con concentraciones entre 0,178 y 0,286 µg por g de tejido comestible, superiores al límite reglamentario de 0,16 µg por g de tejido comestible. Si bien nunca se detectó la presencia de DTX1 en fitoplancton tóxico, algunas muestras dieron resultados positivos con concentraciones iguales o inferiores a 0,076 µg por g de tejido comestible, inferiores a la que se suponía causaba efectos tóxicos en ratones (0,13 µg por g de tejido comestible). Por primera vez, el análisis por CL acoplada a EM-ISP de las células de algas permitió determinar, sin ambigüedad alguna, que *Dinophysis fortii* produce o transmite el AO a los mariscos (Draisci *et al.*, 1996b). *Dinophysis* spp., y especialmente *D. sacculus*, son especies comunes en las costas italianas. Las grandes floraciones del verano de 1988 (de 40 000 células por litro) en las lagunas salinas del noreste de Sicilia pueden constituir una restricción potencial a la expansión de la acuicultura en la zona (Van Egmond *et al.*, 1993). Según Salati y Meloni (1994), *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. son especies comunes en los mares

italianos, tal es así que en 1989, 1990 y 1991 se registraron casos de DSP en Italia. En el Mar Adriático se ha registrado la presencia de toxinas PTX (EU-NRL, 1996). En mares italianos también se registró la presencia de especies productoras de DSP, como por ejemplo *Dinophysis* spp., *Lingulodinium polyedra* y *Protoceratum reticulatum*. En mariscos y en el fitoplancton se encontró una mezcla de AO y de pequeñas cantidades de DTX1, YTX y de PTX (EU-NRL, 1998).

Ciminiello *et al.* (1997) informan que en la glándula digestiva de los mejillones del mar Adriático, además de YTX, se identificaron dos análogos nuevos, la homoyesotoxina y la 45-hidroxihomoyesotoxina. Según Tubaro *et al.* (1998), la *Gonyaulax polyhedra* se identificó como la especie responsable de la contaminación con YTX.

En 1999 se detectó la presencia de toxinas DSP en 350 de las 900 muestras de *Mitylus galloprovincialis* provenientes del norte del Adriático. La zona de Emilia Romagna fue la más problemática y se observó que las cantidades de YTX fueron siempre superiores a las de AO (EU-NRL, 2000). En 2000, el 13 por ciento de las muestras de *M. galloprovincialis* analizadas por bioensayo en ratón dieron resultados positivos para DSP. Varias zonas de producción permanecieron cerradas: en la región de Emilia Romagna desde fines de agosto hasta fines de diciembre, en la región del Veneto desde fines de octubre hasta fines de diciembre y en Friuli Venecia Giulia a fines de diciembre. En la mayoría de los casos, las toxinas YTX ocasionaron los cierres. En 2001, el 18 por ciento de las muestras de *M. galloprovincialis* analizadas por bioensayo en ratón dieron resultados positivos para DSP. En la región de Emilia Romagna se cerraron varias zonas de producción durante enero, febrero y principios de marzo, una extensión de los cierres de 2000, y también en el período comprendido entre mediados de junio y fines de octubre. En Veneto, las áreas de producción se cerraron en julio, en Friuli Venecia Giulia desde enero hasta mediados de febrero y luego desde principios de julio hasta principios de agosto (EU-NRL, 2001). En 2002 se detectó la presencia de DSP en el norte del Adriático (en la costa de Emilia Romagna, Veneto y Friuli Venecia Giulia) y se estableció una veda para la recolección. En julio se detectó la presencia de DSP en muestras de *Pecten maximus*, de Escocia (EU-NRL, 2002).

Países Bajos

Los primeros casos de DSP en los Países Bajos datan de la década de los años 1960 (Fleming, 2003). Las DSP se observan desde 1961 en las costas del Mar de Wadden. La concentración máxima de *D. acuminata*, de 10 000 células por litro se registró en 1981 y disminuyó a tan solo 80 células por litro en 1986 y 1987 pero con los mismos efectos tóxicos. Parecería que la toxicidad en mejillones y la temperatura están estrechamente relacionadas, ya que con apenas 30 células por litro a 10 °C los mejillones mantienen una toxicidad elevada. En las costas del Mar de Wadden, las densidades máximas de *D. acuminata* se registran todos los años en agosto y setiembre, con una salinidad de 30 ‰ y cierta correlación con la velocidad del viento. Solo se observan densidades de más de 10 000 células por litro cuando la velocidad del viento es igual o menor a dos en la escala de Beaufort (Van Egmond *et al.*, 1993). En 1998 se registró la presencia de especies productoras de toxinas DSP en aguas holandesas, pero no se detectó la presencia de toxinas DSP en bivalvos (EU-NRL, 1998). En el verano de 2001 se observaron mejillones contaminados y proliferaciones de *D. acuminata* en aguas holandesas del Mar de Wadden, causadas por la estratificación de la sal y el clima cálido (Peperzak *et al.*, 2002). En Grevelingen ocurrió un evento tóxico en la primavera de 2002, con toxinas DSP determinadas por bioensayo en ratas. Durante el otoño de 2002 se detectaron toxinas DSP en mejillones del Mar de Wadden (entre 160 y 320 µg AO/kg determinadas por ensayo en ratas) (EU-NRL, 2002).

Noruega

La *D. acuminata* se observa a menudo en las costas del país. En 1979, durante un brote de DSP, la densidad en una floración de *Prorocentrum minimum* en el Fiordo de Oslo fue de 1 900 células por litro. En ese mismo fiordo, ocasionalmente, se observan floraciones de *P. lima* (Van Egmond *et al.*, 1993). Todos los años desde 1984, se detectan toxinas DSP en mejillones del sudeste y de algunas zonas de la costa oeste de Noruega. En ostras no se han detectado toxinas DSP. Regularmente se

detectan densidades altas de *Dinophysis* spp. durante períodos prolongados. En 1984 y 1985, las intoxicaciones por DSP ocurrieron en una extensa área geográfica (Underdal, 1989).

En el período comprendido entre octubre de 1984 y abril de 1985 se registraron densidades de 30 000 células por litro de *D. acuta* y *D. norvegica*, con una toxicidad de aproximadamente 7 µg eq de AO/100 g de hepatopáncreas que causaron entre 300 y 400 casos de DSP en 1984, en el sudeste de Noruega. En Skagerrak se observaron floraciones de *D. acuminata* y *D. acuta* en 1985 y 1986. En 1989 y 1990 la concentración de DSP en mejillones superó el umbral tóxico. La composición del perfil de toxinas en 1985 y 1986 no fue la misma: se detectó AO en los mejillones de Arendal y DTX1 e YTX en los de Sognefjord (Van Egmond *et al.*, 1993). También se detectaron toxinas YTX en mariscos noruegos (EU-NRL, 1996). En Sognefjord, la DTX1 es la principal toxina DSP, mientras que en el resto de la costa es el AO (EU-NRL, 1998). En 1994 se cerraron varias zonas de producción por DSP, en los años subsiguientes se observó el mismo patrón (EU-NRL, 1998).

Los resultados del análisis por bioensayo en ratón de las muestras de mejillones tomadas en cuatro sitios a lo largo de la costa noruega revelaron concentraciones de toxinas muy elevadas, con síntomas que indicaban la presencia de toxinas no diarreicas (calambres). El análisis químico determinó la ausencia de AO y DTX1 en dos sitios de muestreo y detectó la presencia de estas toxinas en otro, aunque solo se les atribuyó una parte pequeña de la toxicidad total. Los extractos de las muestras de los cuatro sitios se incubaron con una preparación fresca de hepatocitos de rata y se determinó la presencia de una o más toxinas no identificadas. La administración intraperitoneal y oral de muestras de mejillón purificadas a ratones de corta edad demostró que la toxicidad oral era entre 25 y 50 veces menor que la intraperitoneal. Los resultados preliminares indican que existe un amplio margen de seguridad entre la cantidad de mejillones que ingiere un ser humano y las grandes cantidades de extracto de mejillón necesarias para causar efectos tóxicos en el intestino y en el hígado de los ratones por exposición oral (Aune *et al.*, 1998). De las 473 muestras analizadas en 1999, 135 dieron resultados positivos para DSP. En muchos casos se observó que la toxina dominante era la YTX, causante de aproximadamente el 33 por ciento de los cierres (EU-NRL, 2000). El 45 por ciento de las 414 muestras analizadas por bioensayo en ratón en 2000 dio resultados positivos para DSP. A fines de julio, la presencia de DSP causó el cierre de varias zonas de producción en el sur de Noruega, cierres que se prolongaron hasta la Pascua de 2001. Hasta octubre de 2001, de 915 muestras analizadas por bioensayo en ratón, el 26 por ciento dio resultados positivos para DSP (EU-NRL, 2001). Las altas concentraciones de yesotoxina observadas en mejillones de cultivo indican que probablemente la *Gonyaulax grindleyi* es otra de las especies responsables del problema ocurrido en el sur de Noruega (en Lysenfjorden) en 2000 y 2001. Sin embargo, a la fecha, no se ha podido determinar a ciencia cierta si esta fue la especie responsable (Hufnagl, 2001).

Portugal

Las toxinas DSP se detectan desde 1987, aunque sin intoxicar a los seres humanos. Se han observado mariscos contaminados luego de un período de latencia corto, con densidades de *D. sacculus* y *D. acuta* de 200 células por litro. En 1988 se detectaron moluscos contaminados con toxinas DSP en la costa norte de Portugal y se determinó que la especie responsable fue la *D. acuta*. En 1988 también se detectaron toxinas DSP en la Laguna de Ría Formosa, después de una floración de *Prorocentrum lima*. En 1989, en la costa del Algarve, se observó la presencia de *D. acuminata*, *D. sacculus* y *D. caudata* (con una densidad de aproximadamente 1 600 células por litro) que causaron contaminación por DSP (Van Egmond *et al.*, 1993). Según Gago-Martinez *et al.* (1993), el AO es la principal toxina responsable de los casos de DSP en el país; aunque también se detectó la presencia de DTX2 en mariscos y fitoplancton, y de derivados acilo del AO y DTX2 en mariscos (EU-NRL, 1996).

En el sur de Portugal se registró un aumento de la frecuencia de los episodios de DSP. La especie *D. acuta* se asoció a la presencia de DTX2 y los cierres cautelares fueron por DSP (EU-NRL, 1998). En 2000, en la Laguna Aveiro se detectaron concentraciones elevadas de AO y DTX2 y también se observó la acumulación de toxinas en el cangrejo verde, un predador de mariscos. Se registraron varios casos en seres humanos (EU-NRL, 2001). En el verano de 2001 ocurrió un brote de DSP por ingerir navajas, *Solen marginatus*, con 50 µg eq de AO/100 g, recolectadas en la laguna Aveiro.

Todas las muestras de especies analizadas en la región (salvo las ostras) contenían AO y sus ésteres en concentraciones superiores al límite reglamentario (entre 57 y 170 µg/100 g). Se cree que un paciente se intoxicó con DSP por ingerir una gran cantidad de cangrejos verdes, *Carcinus maenas*, un predador de mariscos, con al menos 32 µg eq de AO/100 g (Vale y De Sampayo, 2002). En 2002, una proliferación de *D. acuminata* ocasionó cierres prolongados de zonas de recolección intermareales naturales de bivalvos bentónicos y de mejillones no cultivados, ubicadas a lo largo de toda la costa noroeste. La recolección de mejillones de roca y de berberechos por aficionados ocasionó varios eventos de intoxicación en seres humanos. En setiembre se detectó una concentración máxima de 1 860 µg AO total/100 g de carne entera en mejillones no cultivados de Pava de Varzim, asociada a una docena de casos de gastroenteritis grave. El 18 por ciento de las 738 muestras analizadas por bioensayo en ratón dio resultados positivos y por primera vez se detectó la presencia de toxinas PTX. Hasta la fecha, las concentraciones de PTX1 y PTX2 no han superado los 160 µg/kg determinadas por CL acoplada a EM y la contaminación se atribuye principalmente a la PTX2SA (EU-NRL, 2002).

España

En las rías españolas, la mayoría de los brotes de DSP se asociaron a *D. acuminata*, salvo en algunos años (1989 y 1990) en que la especie causante fue la *D. acuta*. El primer evento de DSP confirmado ocurrió en 1978. En los estuarios se ha observado ocasionalmente la presencia simultánea de *Gymnodinium catenatum* y *Dinophysis acuta*, causantes de contaminaciones mixtas con PSP y DSP. En 1981, la presencia de *D. acuminata* y *D. acuta* se asoció a eventos de DSP que causaron 5 000 casos de gastroenteritis en toda España. En 1982 y 1984 se registraron otros casos de contaminación con DSP. Se observó que el fenómeno de 1989 se prolongó hasta 1990 cuando se detectó *D. acuta* desde julio hasta diciembre, en lugar de en setiembre y en octubre, con densidades máximas entre 7 000 y 22 000 células por litro. Se cree que la *Prorocentrum lima* podría estar asociada a la contaminación con DSP observada en los mejillones cultivados en sistemas de encordado ya que esta especie produce AO, además de DTX1 y otros compuestos, como por ejemplo la palitoxina (Van Egmond *et al.*, 1993).

En 1993 ocurrió otro episodio muy grave en Galicia, que se prolongó durante un período más extenso que lo habitual. El perfil de toxinas de las muestras de mejillones fue muy complejo y reveló la presencia de toxinas PSP y DSP (el AO y la DTX2) (Gago-Martinez *et al.*, 1996). La gravedad de los episodios de DSP resultó en cierres prolongados en Galicia, que se extendieron de abril hasta diciembre de 1995. En 1996, los cierres solo ocurrieron en enero, una extensión de los de 1995. En 1997 se decretaron cierres por DSP en primavera, en verano y/o en otoño según la ubicación (EU-NRL, 1998). Fernández *et al.* (1996) informan que en fitoplancton o en los mariscos españoles, además del AO y de la DTX2 se registró la presencia de dos derivados polares del AO y de las DTX: 7-O-acilésteres que contienen un grupo acilo graso unido al grupo 7-OH y diol ésteres en los que el grupo carboxílico de las toxinas está esterificado. En 1999 y 2000, varios eventos tóxicos con DSP resultaron en la imposición de una veda para la recolección de bivalvos en ciertas zonas de producción (EU-NRL, 2000; EU-NRL, 2001). En 2002 se observaron eventos tóxicos en Galicia (*D. acuminata* y *D. acuta*) y en Andalucía (*D. acuminata*), que causaron cierres prolongados. En Cataluña se decretó un cierre de corta duración (EU-NRL, 2002).

Suecia

El cultivo experimental de mejillones data de 1971. Desde 1971 hasta 1980, la etapa experimental, la recolección de mejillones se realizaba durante de todo el año. En 1983 se observaron síntomas de DSP en los consumidores de mejillones, motivo por el cual en 1986 se puso en práctica un sistema de vigilancia para detectar la presencia de estas toxinas en mejillones. Se determinó que en mejillones suecos la toxina DSP es el AO producido por la *Dinophysis* spp. y que las concentraciones en mejillones provenientes del archipiélago exterior son superiores a las de los mejillones de aguas más protegidas. Las altas concentraciones de AO observadas en el invierno de 1989 y 1990, atribuidas a la afluencia de aguas de alta mar con plancton tóxico, provocaron la suspensión prolongada de la recolección de mejillones de cultivo. En mar abierto frente al Skagerrak se detectaron concentraciones significativas de dinoflagelados tóxicos. Las pocas veces que se detectó un aumento de las

concentraciones de AO en mejillones de los fiordos protegidos al norte de Orust coincidieron con el aumento de la afluencia de aguas de mar abierto (Haamer, 1995). En 1997 se detectó la presencia de AO y de DTX2, aunque limitada a casos de menor importancia (EU-NRL, 1998). En junio y julio de 1999 se observó un pico de toxicidad por DSP. Los cierres de las zonas de producción suecas ocurren habitualmente entre setiembre y marzo (EU-NRL, 2000).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

En 1997 se registró por primera vez la presencia de DSP en el Reino Unido, cuando 49 pacientes presentaron síntomas, 30 minutos luego de haber ingerido mejillones en dos restaurantes londinenses (Durborow, 1999). En 1999, los eventos de DSP parecían ser más frecuentes y de mayor duración (EU-NRL, 2000). A comienzos de 2000, aún se detectaba la presencia de toxinas DSP en mejillones de Cornwall y más tarde ese mismo año, en berberechos del sudeste de Inglaterra y del sur de Gales. Se impusieron restricciones a la recolección (EU-NRL, 2001). Desde julio de 2001 hasta agosto de 2002, la presencia de toxinas DSP ocasionó la imposición de una veda recurrente para la recolección de berberechos en el sur de Gales (Anonymous, 2002d).

En marzo de 2002 se estableció una veda para la recolección de mariscos en varias regiones de Inglaterra (Hatchett, 2002). En setiembre la presencia de toxinas DSP obligó a establecer una veda para los berberechos provenientes de un área de la costa oeste de la Isla de Man (Anonymous, 2002c). En 2000 y 2001, en Escocia se detectó la presencia de toxinas DSP, primero en la costa oeste y luego, a fines de marzo, en mejillones de las Shetland. El brote fue de corta duración, aunque las toxinas volvieron a aparecer a fines de mayo, detectándose en el hepatopáncreas de vieiras y mejillones provenientes de varias zonas de la costa oeste. Hacia mediados de junio se detectaron toxinas DSP en mejillones de varias zonas, aún presentes a mediados de octubre. Se impusieron restricciones a la cosecha en todas las zonas afectadas (EU-NRL, 2001).

En el período comprendido entre el 1 de abril de 2002 y el 31 de marzo de 2003, en Escocia se recolectaron y analizaron 5 409 muestras de moluscos de 76 zonas costeras de producción primaria y de 36 zonas secundarias en mar abierto. De las muestras recolectadas, 931 se analizaron para detectar la presencia de DSP y 66 dieron resultados positivos (Anonymous, 2003c). En 2001, en Irlanda del Norte, 25 muestras de ostras, 10 de mejillones, una de berberechos y 23 de vieiras dieron resultados positivos para DSP (EU-NRL, 2001). En consecuencia, el Organismo de Normas Alimentarias del Reino Unido decretó una veda para la recolección de vieiras en los mares de Irlanda del Norte (Anonymous, 2001a).

3.7.2 África

Sur África

En el otoño de 1991 se identificó DSP en la costa oeste y en el otoño de 1992 tanto en la costa oeste como en la costa sur de Sudáfrica. El organismo causante fue *Dinophysis acuminata* (Pitcher *et al.*, 1993).

3.7.3 América del Norte

La Figura 3.4 ilustra la presencia de toxinas DSP en América del Norte entre 1991 y 2000.

Canadá

En 1989 se aisló la DTX1 en mejillones de la Isla Príncipe Eduardo, con una concentración de 0,15 µg/100 g de glándula digestiva (Todd, 1997). En agosto de 1990, en la región este de Nueva Escocia, 13 de 17 personas presentaron síntomas de gastroenteritis, entre una y ocho horas después de ingerir mejillones de cultivo locales cocidos al vapor o por ebullición. La *Dinophysis norvegica* se encontró en la glándula digestiva de algunas de las muestras de mejillones, así como en la columna de agua de la zona de cosecha, aunque en menor cantidad. Se cree que la toxina causante fue la DTX1 (Todd *et*

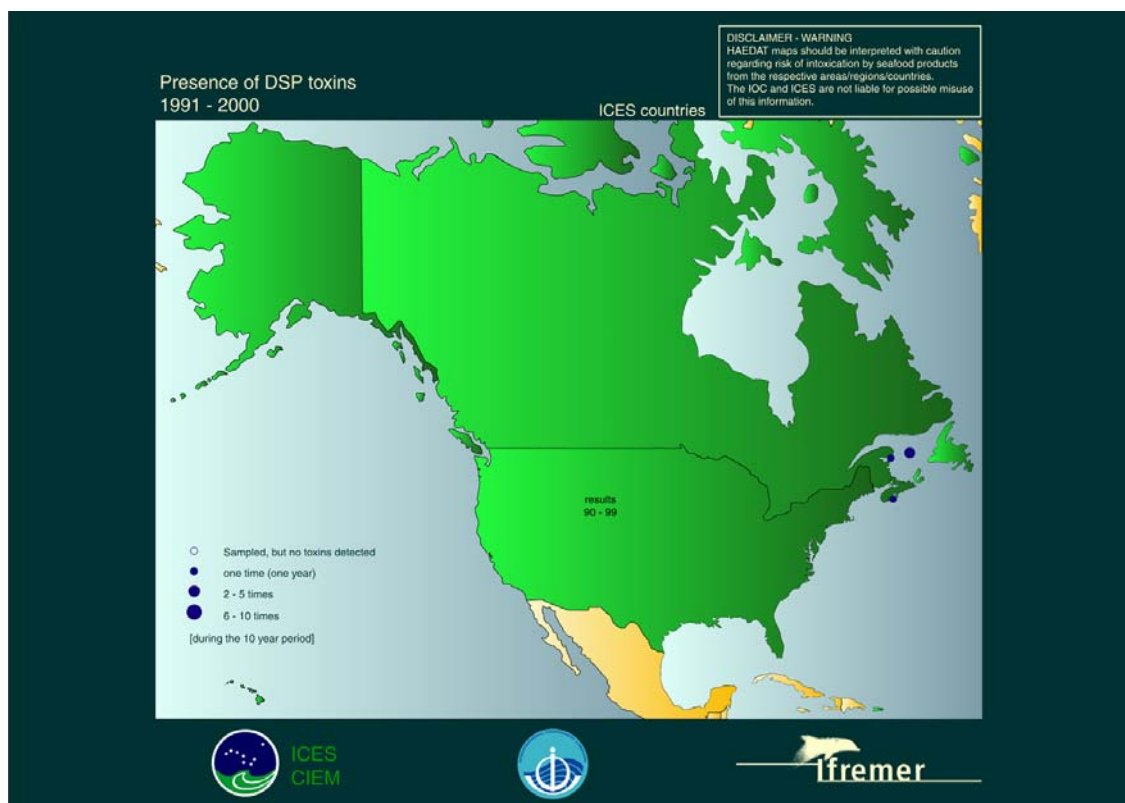
al., 1993). Sin embargo, en la misma zona tóxica se aisló otro dinoflagelado, *Prorocentrum lima*, que también se identificó como productor de toxinas DSP en un cultivo unialgal (Marr *et al.*, 1992).

Partiendo de la base que los mejillones contenían 100 µg DTX1/100 g de tejido, las víctimas ingirieron entre 1,4 y 6,0 µg DTX1/kg de pc (Todd, 1997).

En octubre de 1993 varias personas en la Bahía de Bonavista, en Terranova presentaron síntomas de intoxicación diarreica por mariscos luego de ingerir mejillones con DTX1. En las muestras de agua, la densidad de *Dinophysis norvegica* ascendió a 2 000 células por litro y en el tejido digestivo se encontraron hasta 40 000 células por mejillón (McKenzie *et al.*, 1994). En mejillones se encontraron hasta 4 µg DTX1/100 g de glándula digestiva (Todd, 1997).

Lawrence *et al.* (1998) estudiaron las poblaciones de microalgas en un área de cultivo de mejillones cercano a Indian Point, en Nueva Escocia, para determinar cuál era la fuente local de las toxinas DSP acumuladas en los mariscos. No se detectó la presencia de toxinas DSP en muestras ricas en *Dinophysis*, ni por CL acoplada a EM, ni por ensayos con anticuerpos de las toxinas DSP. Sin embargo, se encontraron células de *Prorocentrum lima*, productora de toxinas, como epifitas de *Pilayella littoralis*, una macroalga que daña las mallas de los sistemas de cultivo.

Figura 3.4 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Estados Unidos de América

Hasta 1980 solo se informó de casos esporádicos de DSP en la región de Nueva York y Nueva Jersey. La incidencia aumentó a 31 casos en 1980, 210 casos en 1981, 1 332 casos en 1982 y 1 951 casos en 1983 (Stamman *et al.*, 1987). Entre 1983 y 1985 se registraron cuatro episodios tipo DSP en Filadelfia

y en Long Island, Nueva York, por ingerir mejillones y almejas. Los episodios se asociaron a especies de *Dinophysis* o *Prorocentrum*, aunque no se realizaron análisis químicos (Todd *et al.*, 1993).

En 1989 se observaron altas densidades de *D. acuta* en aguas decoloradas de Long Island. Los análisis efectuados para determinar la presencia de AO mostraron que los mejillones de dos estaciones contenían concentraciones superiores a 0,5 UR por 100 g, pero no se informó de casos de intoxicación en seres humanos (Aune y Yndestad, 1993).

Entre junio y setiembre, a menudo se observan altas densidades de *Dinophysis acuminata* y *Dinophysis norvegica*, en la costa de Maine. La especie *Prorocentrum lima* solo se encontró en la región de las bahías Frenchman y Eastern. La actividad tipo AO detectada en los mejillones no alcanzó la magnitud necesaria para causar problemas de salud en seres humanos (Van Dolah *et al.*, undated). En 1998 se registró la presencia de *P. lima* a lo largo de las costas de Maine (Stancioff, 2000).

El análisis de los extractos de mariscos y fitoplancton provenientes del Golfo de México reveló la presencia de AO (0,162 µg/g de marisco) y de ácido domoico (2,1 pg por célula de fitoplancton). El ácido domoico es el agente causante de la intoxicación amnésica por mariscos (ASP). En esta zona no se ha registrado intoxicación en seres humanos (Dickey *et al.*, 1992a).

3.7.4 América Central y del Sur

Argentina

Hasta 1999 no se había detectado toxicidad a pesar de la presencia de *D. acuminata* y *D. fortii*. En 1999, 40 personas se intoxicaron en la Patagonia. En el plancton se confirmó la presencia de *P. lima* y de toxinas DSP en mejillones (Ferrari, 2001).

Brasil

En 1990, varias personas en Florianópolis presentaron trastornos gastrointestinales y diarrea por ingerir mejillones. Los resultados obtenidos del análisis del plancton y por bioensayo en ratones indicaron la presencia de toxinas DSP y de *D. acuminata* (Ferrari, 2001).

Chile

En 1970 y 1971 se observaron casos de trastornos gastrointestinales, que se cree que estuvieron asociados a floraciones de *Dinophysis* spp. (IPCS, 1984). En enero de 1991, aproximadamente 120 personas se intoxicaron con DSP luego de ingerir mejillones frescos. Se identificó la presencia de *D. acuminata* en bivalvos frescos y en mejillones enlatados. También se detectó la presencia de AO y DTX1 en las muestras tóxicas (Aune y Yndestad, 1993). Zhao *et al.* (1993) determinaron que la toxina más significativa en los mejillones chilenos es la DTX1 y la menos significativa es el AO. Quilliam (1998a) informa que recientemente se detectó en Chile la presencia de toxinas YTX y de compuestos relacionados en mariscos y fitoplancton.

Lagos (1998) también informa de la presencia, muy documentada, de la DSP en Chile. Hasta 2001, las toxinas PSP y DSP tuvieron graves consecuencias para la salud pública y economía chilenas. Todos los bancos naturales de peces situados al sur de los 44° S se cerraron por la presencia de toxinas. A causa de estos cierres, las autoridades resolvieron poner en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001). En marzo de 1998, Uribe *et al.* (2001) también detectaron toxinas DSP en los fiordos del estrecho de Magallanes (53°19'S, 72°30'W), en el sur de Chile. En *Mitylus chilensis* se detectó una concentración de DTX1 entre 6,5 y 58 µg/100 g de glándula digestiva. No se detectó AO y el alga causante se identificó como *D. acuminata*.

México

En las primaveras de 1992, 1993 y 1994 el análisis por bioensayo en ratón de extractos de mariscos de muestras tomadas en la Bahía Concepción, en el Golfo de California dio resultados positivos para las toxinas DSP. Las muestras tomadas en abril de 1994, analizadas por CL contenían AO y DTX1,

aunque no se informó de intoxicación en seres humanos. A menudo, las muestras de agua de esta zona contienen especies de dinoflagelados productoras de DSP (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

En marzo de 1993 y abril de 1994, las densidades del dinoflagelado *D. caudata* en el Golfo de California (Punta Arena, Playa Escondia, Amolares y San Ignacio) alcanzaron máximos entre 74 y 90 x 10³ células por litro. Sin embargo, no se informó de contaminación en mariscos, ni de intoxicación en seres humanos (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

Uruguay

En 1990 varias personas presentaron trastornos gastrointestinales y diarrea luego de ingerir mejillones. Los resultados obtenidos del análisis del plancton y por bioensayo en ratones indican la presencia de DSP y de *Dinophysis acuminata* (Ferrari, 2001). En enero de 1992 se detectó la presencia de DSP en mariscos recogidos en las costas uruguayas. En la misma época se observó una concentración de *D. acuminata* de 6 000 células por litro en La Paloma, lo que resultó en el establecimiento de una veda parcial para la recolección de mariscos (Aune y Yndestad, 1993).

3.7.5 Asia

China

Las DSP se encuentran en distintas especies de mariscos y están ampliamente distribuidas a lo largo de la costa china. En 1996 y 1997, 26 de las 89 muestras analizadas contenían DTX1 o AO, pero solo seis contenían concentraciones superiores al límite reglamentario para consumo humano (20 µg/100 g de tejido). La concentración máxima, de 84 µg/100 g, se encontró en la especie *Perna viridis* de Shenzhen, aunque en ese período no se informó de intoxicaciones por DSP en seres humanos (Zhou *et al.*, 1999)

Japón

A fines de junio de 1976 y en 1977 se registró por primera vez la presencia de DSP, cuando 164 personas presentaron síntomas de diarrea y vómitos graves. La información epidemiológica indica que tan solo 12 unidades ratón (UR) alcanzaron para provocar intoxicación leve en el ser humano (Yasumoto *et al.*, 1978). Una UR se definió como la cantidad de toxina (que más adelante se definió como DTX1), administrada por vía intraperitoneal, necesaria para causar la muerte de un ratón en 24 horas (EU/SANCO, 2001). El *D. fortii* fue el primer dinoflagelado asociado. Entre 1976 y 1982 ocurrieron en el país aproximadamente 1 300 casos de DSP (Hallegraeff, 1993).

India

Un estudio de dos años de duración (desde 1984 hasta 1986) reveló la presencia de toxinas diarreas en varios de los mariscos analizados, con cantidades que oscilaron entre 0,37 y 1,5 UR/g hepatopáncreas. Sin embargo, no se conocen episodios de DSP que hayan afectado a la población en general (Aune y Yndestad, 1993).

Las Filipinas

Recientemente se detectó la presencia de cinco especies de *Dinophysis* aunque no se ha informado de casos de intoxicación en seres humanos (Corrales y Maclean, 1995).

Federación Rusa

En aguas costeras del este de la Federación Rusa se identificó la presencia de *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii* y de *D. norvegica* aunque no se ha informado de intoxicaciones en seres humanos (Aune y Yndestad, 1993).

3.7.6 Oceanía

Australia y Nueva Zelanda

El dinoflagelado *P. Lima*, productor de AO y de AO metflico, se aisló en tres zonas de la Isla Heron, Australia, aunque no se informó de ningún caso de DSP (Morton y Tindall, 1995). Rhodes y Syhre (1995) mencionan la presencia de *P. lima* en aguas neocelandesas (en los canales Northland y Marlborough), que aparentemente producía AO. Recientemente se detectaron toxinas YTX y compuestos relacionados en mariscos y fitoplancton en Nueva Zelanda (Quilliam, 1998a).

En diciembre de 1997 se registraron 56 casos de hospitalización por intoxicación luego de ingerir pipi australes, *Donax delatoides*, en Nueva Gales del Sur, Australia (ANZFA, 2001). Según Quilliam *et al.* (2000), es probable que los ácidos PTX 2-secoicos hayan contribuido a los síntomas gastrointestinales, vómitos o diarrea en seres humanos (Aune, 2001). Según Burgess y Shaw (2001), los pacientes ingirieron aproximadamente 500 g de pipi australes con 300 µg de PTX2SA/kg (~150 µg PTX2SA/persona ~2,5 µg/kg de pc para una persona de 60 kg).

En marzo de 2000, en la Isla North Stradbroke (Queensland), una señora de edad avanzada enfermó gravemente luego de ingerir pipi de las playas locales. Se determinó que el marisco contenía altas concentraciones de PTX2SA (Burgess y Shaw, 2001).

En mejillones de Tasmania se detectaron toxinas DSP (AO y DTX1) producidas por los dinoflagelados *Dinophysis fortii* y *D. acuminata*. Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado la presencia de toxinas DSP en mariscos comercializados de Tasmania y no se conocen casos de intoxicación en seres humanos (Hallegraeff, 1992).

En el 0,7 por ciento de las muestras de mariscos recogidas semanalmente a lo largo de las costas neocelandesas desde setiembre de 1994 hasta julio de 1996 se detectaron concentraciones de toxinas DSP superiores al límite reglamentario (concentración máxima de 96 µg/100 g de mejillón), en nueve eventos de DSP. Durante el período de muestreo ocurrieron tres brotes de intoxicación con DSP en seres humanos con 13 casos (Sim y Wilson, 1997).

3.8 Reglamentación y seguimiento

3.8.1 Europa

En 1996, durante el transcurso de la primera Reunión de Laboratorios Nacionales de Referencia para Biotoxinas Marinas y Métodos de Análisis y Criterios de Toxicidad de la UE, el grupo UE-LNR (EU-NRL por sus siglas en inglés) acordó que el método recomendado para la detección de toxicidad grave causada por toxinas DSP solubles en acetona es el bioensayo en ratón según la técnica de Yasumoto *et al.* (1978), con un período de observación de 24 horas. En función de los efectos tóxicos, el grupo acordó fijar el límite de tolerancia para las toxinas DSP, incluidas las toxinas no diarreicas solubles en acetona, entre 80 y 160 µg de eq de AO/kg de carne de marisco entera o entre 20 y 40 UR/kg de carne de marisco entera para los países miembro de la UE (EU-NRL, 1996).

En marzo de 2002 la Comisión Europea dispuso (EC, 2002a):

- La concentración máxima de la suma de AO más las toxinas DTX y PTX, en tejidos comestibles (cuerpo entero o cualquier parte comestible aislada) de moluscos, equinodermos, tunicados y gastrópodos marinos es de 160 µg eq de AO/kg.
- La concentración máxima de toxinas YTX en tejidos comestibles (cuerpo entero o cualquier parte comestible aislada) de moluscos, equinodermos, tunicados y gastrópodos marinos es de 1 mg eq de YTX/kg.
- Los métodos recomendados, excepto para la yesotoxina, para el análisis de las toxinas mencionadas son el bioensayo en ratón o en ratas. Los métodos analíticos, como por ejemplo CL con detección fluorométrica, CL acoplada a EM, inmunoensayos y ensayos funcionales

como el ensayo de inhibición de la fosfatasa, se pueden utilizar como métodos alternativos o complementarios del ensayo biológico, siempre y cuando cada uno de ellos, de forma independiente o combinada, resulte igual o más eficiente que los métodos biológicos, que su utilización garantice un grado equivalente de protección a la salud pública y que detecten como mínimo los análogos siguientes:

AO y toxinas DTX: puede ser necesario agregar un paso de hidrólisis para detectar la presencia de la DTX3

Toxinas PTX: PTX1 y PTX2

Toxinas YTX: YTX, 45 OH YTX, homo YTX y 45 OH homo YTX.

- Si hubiera discrepancias entre los resultados obtenidos con los distintos métodos, prevalecerán y se consideraran como referencia los obtenidos con el bioensayo en ratón.

Irlanda

El Programa de Control de Biotoxinas comenzó a funcionar en 1984 analizando las muestras por bioensayo para detectar la presencia de toxinas DSP. El control se intensificó en los últimos años, en la medida en que se detectaron otras toxinas como el AD y especialmente las azaspirácidas. Actualmente, el programa prevé la realización de análisis semanales, tanto de fitoplancton como de mariscos, por bioensayo en ratón para detectar toxinas DSP, por CL acoplada a EM para detectar el ácido ocaidaico, la DTX2 y las azaspirácidas; y por CL para detectar el AD. Las autoridades reglamentarias, el personal de la salud y los productores y procesadores de mariscos reciben regularmente los informes elaborados con los resultados del análisis de las muestras y se está trabajando en un sistema de información por internet para facilitar el acceso a la información (McMahon *et al.*, 2001).

Turquía

La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón. No se dispone de más información (Fernández, 2000).

3.8.2 América del Norte

Canadá

Hallegraeff *et al.* (1995) informan que en Canadá se controlan las especies *Dinophysis* y *Prorocentrum*. Las zonas de recolección de productos pesqueros se cierran cuando las concentraciones de toxinas DSP en mariscos, determinadas por bioensayo en ratón (no oficial) superan los límites tolerables (es decir superiores a 0,2 µg/g de carne = 5 UR/100 g de carne).

Estados Unidos de América

No se realiza el control de DSP porque aún no se ha confirmado su presencia. La Administración para el Control de Alimentos y Medicamentos (FDA) es el organismo competente en temas de inocuidad de los productos y de las biotoxinas marinos. En lo que atañe a la inocuidad de los alimentos en el país, la entidad participa en varios programas de cooperación con los estados individualmente, mediante acuerdos enmarcados según lo dispuesto por el Programa Nacional de Higiene de los Mariscos. En la esfera internacional, la FDA es la entidad encargada de firmar memorandos de entendimiento con distintos países para reglamentar la importación de productos marinos. Por otro lado, el Servicio Nacional de Pesquerías Marinas (NMFS) de la Agencia Nacional de la Atmósfera y el Océano (NOAA) cuenta con varios programas de biotoxinas marinas, especialmente en peces y fauna silvestre.

3.8.3 América Central y del Sur

Argentina

Argentina cuenta con un programa nacional de seguimiento de la toxicidad en mejillones en cada una de las provincias costeras, en el que participan los laboratorios regionales y una estación en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

Brasil puso en práctica un programa de control piloto de un año de duración, pero no cuenta con un programa nacional de control (Ferrari, 2001).

Chile

En el país se realizan dos tipos de control. El Servicio Nacional de Salud analiza por bioensayo la toxicidad de muestras recolectadas mensualmente en 40 estaciones. Además, el Instituto de Investigación Pesquera, en colaboración con las universidades, cuenta con programas de control de la toxicidad. Estos programas incluyen también el análisis del fitoplancton, de manera de seguir el fenómeno en su totalidad y no solo la toxicidad. Sin embargo, los métodos utilizados presentan problemas, ya que a menudo las PSP y DSP ocurren simultáneamente. El Ministerio de Salud, a través del Servicio Regional de Salud, está a cargo del cierre de las zonas de recolección contaminadas, y de la cuarentena de los mariscos cuando los resultados del bioensayo son positivos para DSP. El Servicio Nacional de Pesca supervisa los mariscos para exportación y actualmente cuenta con un memorando de entendimiento con EEUU y la UE que permite la exportación de mariscos. No existe reglamentación para los mariscos importados que hasta ahora no tienen un gran mercado (APEC, 1997). Hasta 2001, las toxinas PSP y DSP tuvieron graves consecuencias para la salud pública y la economía chilenas. Todos los bancos naturales de peces situados al sur de los 44° S se cerraron por la presencia de toxinas. A causa de estos cierres, las autoridades resolvieron poner en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001). La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

Uruguay

Uruguay cuenta con un programa nacional de control de la toxicidad en mejillones y en el fitoplancton tóxico (Ferrari, 2001). La reglamentación está basada en el bioensayo en ratones (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

Venezuela

La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

3.8.4 Asia

China

El país no cuenta con un programa de seguimiento reglamentario de toxinas en mariscos, ni tampoco con reglamentación referente al contenido de biotoxinas de algas en productos marinos. Sin embargo, existe un proyecto sobre mareas rojas que dispone el seguimiento regular en dos zonas, una en el sur y otra en el norte del país, mediante el análisis de muestras bisemanales de plancton y de mariscos (APEC, 1997).

Japón

El control se realiza tanto en el fitoplancton, como en los mariscos. En las principales zonas productoras de mariscos, los investigadores de las Estaciones Pesqueras Experimentales de las Prefecturas realizan el muestreo periódico de plancton y los conteos celulares de las especies clave de *Dinophysis*. Las muestras de mariscos se toman al menos una vez al mes durante las estaciones críticas. En cuanto se detectan toxinas, aumenta la frecuencia del control y se muestrea en más estaciones. El límite de tolerancia para las toxinas DSP en bivalvos es de 5 UR/100 g de carne entera

determinado por bioensayo en ratón (~0,2 µg/g). La información sobre la toxicidad de los mariscos se distribuye por medio de una red bien definida que conecta a los organismos gubernamentales, pesquerías, cooperativas, pescadores, a los medios y al público en general. La veda para la recolección de mariscos se levanta luego de transcurridas tres semanas con toxicidades inferiores a los límites de cuarentena (APEC, 1997 y Hallegraeff *et al.*, 1995).

República de Corea

El Instituto Nacional de Desarrollo e Investigación Pesquera toma y analiza bisemanalmente muestras de fitoplancton de zonas clave, en más de 200 estaciones, durante el período comprendido entre febrero y octubre. Las muestras se analizan para detectar ASP así como también PSP y DSP, aunque estas dos últimas no constituyen un problema grave. La determinación de las toxinas DSP se realiza por CL (APEC, 1997). También se controla la presencia de especies de *Prorocentrum* y las zonas de recolección de productos pesqueros se cierran cuando la densidad supera las 10⁵ células por litro. El límite de tolerancia para toxinas DSP en mariscos es de 5 UR/100 g determinado por bioensayo en ratón (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Tailandia

La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

3.8.5 Oceanía

Australia

La reglamentación para toxinas DSP recomienda entre 16 y 20 µg eq de AO/100 g de carne de marisco, salvo en 1995 cuando las concentraciones máximas permitidas de DSP fueron entre 20 y 60 µg AO/100 g de carne de marisco o 2 µg AO/100 g de hepatopáncreas. No se especifica si estos límites son valores obligatorios o recomendaciones, ni tampoco de donde se obtuvieron estos valores (Burgess y Shaw, 2001).

Nueva Zelanda

El Programa de Control de Biotoxinas Neocelandés combina los análisis de mariscos comunes y el control del fitoplancton. El límite reglamentario en mariscos es de 20 µg AO eq/100 g de carne de marisco (Sim y Wilson, 1997). En la actualidad, el análisis de mariscos se realiza mediante bioensayo selectivo en ratones con pruebas de confirmación aprobadas para AO y DTX1 (DSP ELISA Check Kit, PP2A, CL acoplada a EM), y para las toxinas PTX e YTX (CL acoplada a EM) (Busby y Seamer, 2001).

El proyecto de Programa de Control de Biotoxinas está diseñado para suministrar información sumamente precisa, en tiempos más cortos y mediante técnicas de CL acoplada a EM que sustituyan al bioensayo en ratón y provean información analítica y química, en lugar de resultados de análisis por bioensayo. En la actualidad se está trabajando en el desarrollo y la puesta en práctica de nuevos métodos de ensayo, se estudian las distintas alternativas de financiamiento, la validación de los métodos, la reglamentación de los análisis y la disponibilidad de estándares analíticos. Además se realiza la comparación con las pruebas existentes, se evalúan las distintas estrategias para ponerlo en práctica y se exploran las posibilidades de cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

4. Intoxicación amnésica por mariscos (ASP)

La intoxicación amnésica por mariscos (ASP), conocida también como intoxicación por ácido domoico (DAP), ya que la amnesia no siempre se manifiesta, fue reconocida por primera vez en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá. La ASP, entonces, como consecuencia de ingerir cholgas, causó tres muertes y 105 casos de intoxicación aguda en seres humanos. Los síntomas eran calambres abdominales, vómitos, desorientación y pérdida de memoria (amnesia). La toxina causante (el amino ácido domoico o DA, un estimulante) fue producida por la especie de diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriens* (= *Nitzschia pungens* f. *multiseriens*) (Hallegraeff, 1995).

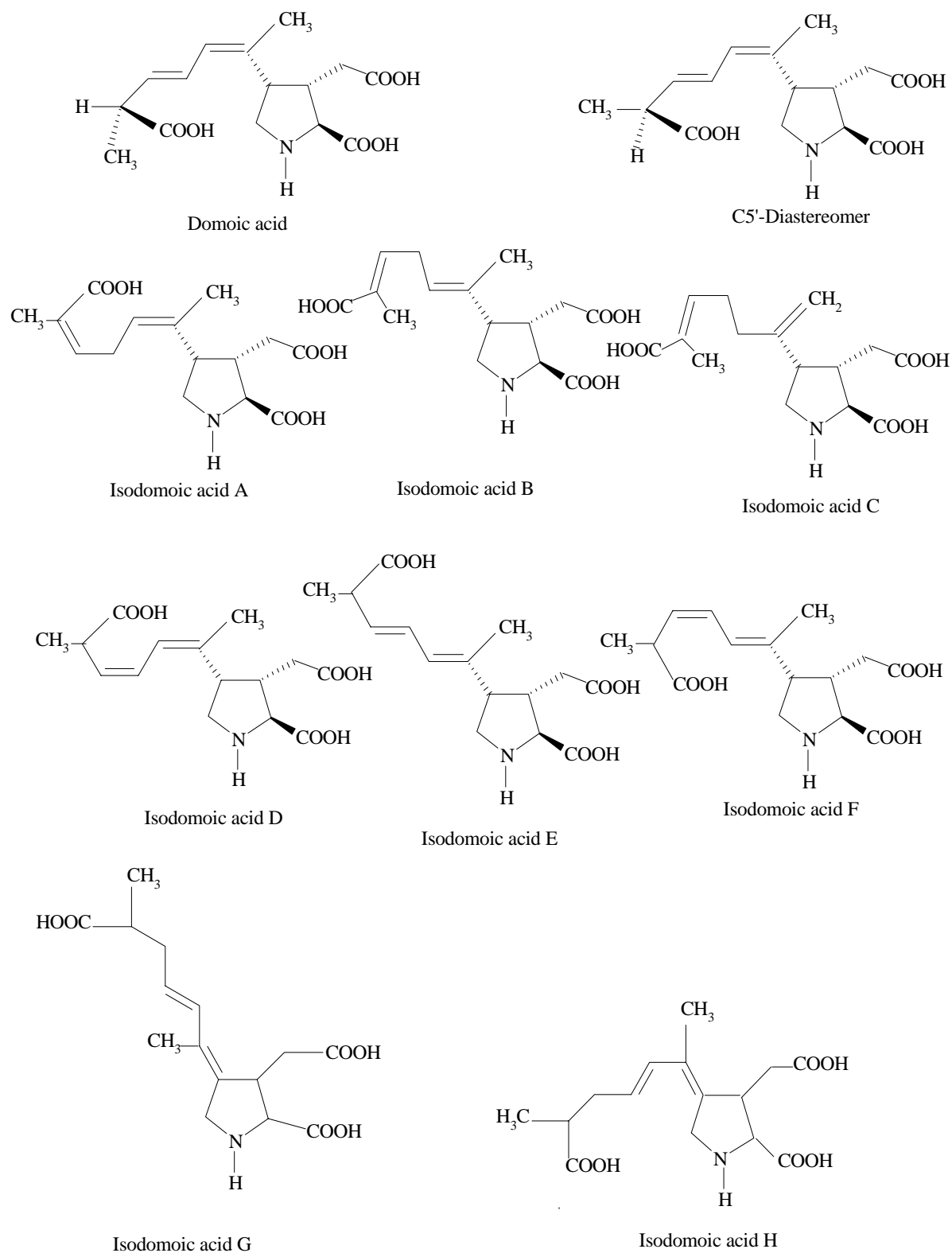
En setiembre de 1991, se atribuyeron las muertes inexplicables de pelícanos y cormoranes en la Bahía Monterrey, en California, a un brote de intoxicación por DA producido por *Pseudo-nitzschia australis*, una diatomea de la misma familia; ingerida por anchoas y a su vez ingeridas por aves. En octubre de 1991, se encontró que las navajuelas de la costa de Oregon, inducían síntomas semejantes a los del DA en ratones. Estos incidentes hicieron que las autoridades reglamentadoras de los Estados Unidos realizaran relevamientos masivos de muchas especies marinas en busca del DA. La toxina se encontró en extensas zonas desde California a Washington, e inesperadamente en cangrejos, en crustáceos por primera vez. Desde estos incidentes, hay una conciencia global del DA y sus fuentes (Wright y Quilliam, 1995).

4.1 Estructuras químicas y propiedades

La intoxicación amnésica por mariscos es causada por el ácido domoico (DA), ver la Figura 4.1, un compuesto natural perteneciente a la categoría de los cainoides aislados de diversas fuentes marinas, incluidas las macro y microalgas (Wright y Quilliam, 1995). El DA es un amino ácido cristalino, soluble en agua. Puede purificarse por diversos métodos cromatográficos y su detección se facilita por espectroscopia UV por poseer un cromóforo fuerte. Originalmente, el DA fue descubierto como un producto de una macroalga roja, *Chondria armata*, y aislado posteriormente de otras varias microalgas rojas. Sin embargo, estas no eran la fuente del DA en el primer incidente informado en 1987, de ASP, en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá. El origen del DA en este brote de ASP era la diatomea *Pseudo-nitzschia* (antes *Nitzschia*) *pungens* forma *multiseriens*. El DA es una potente neurotoxina de la clase de los compuestos cainoides, neurotransmisores estimulantes, que se unen a proteínas receptoras específicas en las neuronas, causando su despolarización continuada hasta la ruptura celular (Wright, 1995).

La investigación de los cainoides presentes en *Chondria armata* resultó en el descubrimiento, en cantidades pequeñas, de los isómeros geométricos del ácido isodomoico A, B y C (ver Figura 4.1), así como de domoilactonas. Ninguno de estos isómeros, encontrados en algas, se detectó en extractos de plancton o de tejido de mariscos. Sin embargo, se aislaron otros tres isómeros geométricos (ácidos isodomoico D, E y F) y el diastereómero C5' (ver Figura 4.1) tanto de células de plancton como de tejido de mariscos (Wright y Quilliam, 1995; Ravn, 1995). Los isómeros geométricos pueden prepararse en el laboratorio exponiendo brevemente soluciones diluidas a la luz UV, siendo por tanto considerados como productos *de novo* del plancton. Los estudios farmacológicos indican que estos fotoisómeros se unen menos fuertemente con las proteínas receptoras del cainato que el propio DA, sugiriendo que no son tan tóxicas como el amino ácido padre. El calentamiento acelera la formación del diastoisómero C5', que posee casi la misma capacidad de unión con el receptor cainato que el propio DA (Wright y Quilliam, 1995). Zaman *et al.* (1997b) informaron de la separación de dos nuevos isómeros de DA del alga roja *Chondria armata*, el ácido isodomoico G y H, (ver Figura 4.1).

Figura 4.1 Estructuras químicas del ácido domoico y sus isómeros



4.2 Métodos de análisis

4.2.1 Bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

El bioensayo en ratón para las toxinas PSP de la AOAC, también permite detectar DA en concentraciones de aproximadamente 40 µg/g tejido (AOAC, 1990). El ensayo en ratón para las PSP impone la extracción con agua en medio ácido del tejido (animal entero u órganos seleccionados), seguido de inyección intraperitoneal de 1 ml del extracto en ratones. Se registra el tiempo transcurrido (en general menos de 15 minutos) desde la inyección inicial a la muerte del ratón. Este fue el procedimiento empleado al detectarse por primera vez intoxicaciones con ASP en extractos de mariscos en Canadá. Los primeros indicios de toxicidad asociada con el síndrome ASP se evidenciaron en el transcurso de bioensayos AOAC de evaluación rutinaria de PSP en ratones. Laboratoristas expertos en bioensayos percibieron que podían distinguirse los síntomas aberrantes de la ASP, de los clásicos de intoxicación por PSP y muerte subsiguiente. El éxito de la aproximación durante el primer incidente de ASP se debió en parte a los altos niveles de toxinas en los mariscos contaminados de la Isla Príncipe Eduardo. La señal típica de la presencia de DA es un síndrome característico en el que los hombros se rascan con la pata trasera, seguido de convulsiones. El periodo de observación debió prolongarse de 15 minutos a cuatro horas. Aunque el procedimiento de extracción de la AOAC da recuperaciones elevadas de DA, su límite de detección no es lo suficientemente bajo como para emplearse con confianza en la cuantificación de esta toxina con fines reglamentarios. El valor guía para almejas fijado en Canadá, y adoptado posteriormente por la mayoría de los países con límites para la ASP es de 20 µg DA/g de tejido de almeja. Para la detección de rutina de las toxinas ASP, el método de ensayo en ratón de la AOAC ha sido sustituido por métodos de CL con detector fluorométrico o diodo/UV, que resultan herramientas más sensibles y confiables (Fernandez y Cembella, 1995).

Tasker *et al.* (1991) pretendieron haber desarrollado una escala de comportamiento comparativa desde cero (normal) a siete (muerte), que sostenían era consistentemente reproducible en ratones inyectados intraperitonealmente. Según lo autores, la escala comparativa podía utilizarse, además, para cuantificar de manera confiable concentraciones de DA del orden de 20 µg/ratón (~0.8 mg/kg pc).

ensayos in vitro

ensayos de enlace con receptores

Se desarrolló, para el DA, un ensayo de enlace competitivo con receptores de micro placa que emplea sinaptosomas de cerebro de rana (*Rana pipiens*). El análisis del DA estaba basado en la competencia con el ácido cainico radiomarcado-[³H] por el enlace con el receptor de cainato/quisqualato glutamato. El método parecía ser sensible (IC₅₀ 0.89 nM ~ 0.3 µg) y muy prometedor como ensayo automatizado y rápido para determinar DA en muestras de mariscos contaminados y de fitoplancton. Los resultados preliminares indicaron una buena correlación cuantitativa con el método del fluorenilmetoxicarbonilo-HPLC, con extractos de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (Van Dolah *et al.*, 1994). En 1995, se informó que el método se encontraba aun en las últimas etapas de las pruebas farmacológicas (Wright y Quilliam, 1995). En 1997, Van Dolah *et al.* informaron un desarrollo posterior con sustitución del cerebro de rana con un receptor de glutamato de rata clonada GLUR6 de manera de prescindir de animales vivos en los ensayos. Se optimizaron el límite de detección y la selectividad del ensayo incluyendo un tratamiento previo con glutamato decarboxilasa para eliminar interferencias potenciales resultantes de las altas concentraciones de glutamato endógeno en mariscos. El ensayo de Van Dolah *et al.* (1997) es adecuado para determinar DA en extractos de algas en agua de mar y en mariscos.

ensayo con cortes hipocampales

Se estudio la eficacia de las preparaciones de cortes hipocampales *in vitro*, como una manera de detectar, rápida y específicamente el DA. Se registraron las respuestas neuronales extracelulares de la región CA1 de cortes de rata adulta Sprague-Dawley completamente sumergidos y perfusados, con patrones de referencia en el rango 50 a 1000 nM. El DA produjo un aumento rápido y reversible en la amplitud del pico de la población ortodrómica y una disminución en el EPSP (potencial extra-celular desde *stratum radiatum*). Los resultados de este experimento indicaron que los preparados de cortes hipocampales son una herramienta viable para detectar DA (Kerr *et al.*, 1999; Saba *et al.*, 1997).

4.2.2 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Se desarrolló un ELISA para detectar la presencia de DA en suero y orina de mamíferos, empleando anticuerpos policlonales producidos en conejos. El método fue eficaz para determinar concentraciones de DA en orina de rata, con un límite inferior informado de cuantificación de 40 ng/ml. Los niveles de DA en plasma de rata y mono no se pudieron determinar con precisión con este anti suero en el ELISA. Este sistema de detección no ha sido sometido a ensayos colaborativos extensos para su uso como técnica de rutina (Cembella *et al.*, 1995 y Smith y Kitts, 1994). El método anterior comprendía varias etapas y carecía del límite de detección deseado. Además, dependía de la inmovilización física del DA en la micro placa mediante el portador proteico. Actualmente, se han desarrollado micro placas CovaLink NH[®] en las que un grupo amino secundario se ha proyectado en los ELISAs para enlazar péptidos, esteroides, oligonucleótidos, y DNA a la superficie del pozo de la micro placa, directa y químicamente. El uso de estas micro placas CovaLink para simplificar y mejorar el anterior método ELISA, ha resultado en dos versiones diferentes, basadas respectivamente en un inmovilización física y otra química del DA (Osada *et al.*, 1995).

Smith y Kitts (1994) y Smith y Kitts (1995), desarrollaron respectivamente, ELISAs para determinar DA en fluidos del cuerpo humano y en extractos de mejillón. Los ensayos empleaban un anti suero policlonal producido en ratones frente a un conjugado de ovalbumina-DA. El ensayo se utilizó para cuantificar el DA presente en fluidos humanos inoculados con domoato puro. Los límites de cuantificación inferiores fueron de 0,2 µg/ml en orina, 0,25 µg/ml en plasma y 10 µg/ml en leche. El límite relativamente alto en leche era debido posiblemente al elevado contenido graso de ésta. Los autores sugirieron que las muestras de leche humana pueden requerir una extracción previa al análisis (Smith y Kitts, 1994). Las experiencias de recuperación, demostraron, tanto para extractos acuosos como ácidos de tejidos de mejillón, que la concentración de DA podía medirse con precisión al 8 por ciento del valor real. El límite de detección era de 0,25 µg/ml de extracto. Este valor representa, cuando se analizan extractos ácidos (AOAC), 0,5 µg DA/g de tejido de mejillón (Smith y Kitts, 1995). Las determinaciones de DA mediante CL y ELISA correlacionaron bien ($r = 0,96$) al compararse directamente, aunque el ELISA resultó en valores superiores para la mayoría de las muestras. Se ha indicado que esto era debido posiblemente a una pérdida de DA durante la extracción en fase sólida previa al HPLC o a la posible presencia de isómeros de DA. La CL rutinariamente no determina los isómeros de DA que no co-eluden con éste. Sin embargo, el método ELISA mide el contenido total de DA incluyendo un diastereoisómero y al menos dos isómeros *cis-trans* (Smith y Kitts, 1995)

Para desarrollar un ELISA competitivo indirecto en mariscos y agua de mar, Garthwaite *et al.* (1998) emplearon anticuerpos ovinos producidos contra conjugados enlazados a través del grupo amino secundario del DA, junto con conjugados activados derivados de ésteres de DA como cobertura de la placa. El ELISA tiene un límite de detección inferior a 0,1 ng/ml, un límite de cuantificación (LDC) de 0,15 ng/ml y un rango de trabajo de 0,15-15 ng DA/ml. El límite de cuantificación equivale a 38 µg DA/kg de carne de marisco, 500 veces menos que el límite reglamentario de 20 mg/kg carne. Se demostró también que este ELISA resultaba adecuado para analizar DA en cultivos de algas y en agua de mar recogida del campo en Nueva Zelanda, teniendo en consecuencia el potencial de ser un alerta temprano del desarrollo de floraciones de algas. Los compuestos análogos en agua de mar, como el ácido canaico, no interfieren con este ensayo.

El ELISA como lo desarrolló Garthwaite *et al.* (1998) ha sido comercializado bajo forma de kit, por Biosense®, destinado al seguimiento rutinario de los niveles de DA en moluscos bivalvos de cultivo para verificar su concordancia con los límites reglamentarios. Según el fabricante también puede usarse para cuantificar DA en otras matrices (ver www.biosense.com “Direct cELISA ASP assay”, 2003). Comparado con el procedimiento original de 1998, se ha reducido el LDC del kit a 10 µg/kg marisco. Al momento de escribir esta monografía se estaba validando el método Biosense® ELISA, aunque trabajos preliminares en esa dirección entre laboratorios de Escocia, Chile y Nueva Zelanda indicaron un comportamiento excelente (Kleivdal, 2002)

En tanto que los anticuerpos desarrollados por Garthwaite eran policlonales, Kawatsu *et al.* (1999) produjeron anticuerpos monoclonales contra el DA y los aplicaron en un inmunoensayo competitivo indirecto. Se estimaron respectivamente los rangos para la determinación cuantitativa de ácido domoico y LDC en mariscos, en 0,15-10 ng DA/ml y < 40 ng DA/g, muy comparable con el comportamiento del ELISA de Garthwaite *et al.* (1998). Los informes de los autores indican una recuperación del DA al 103 por ciento (C.V. 4,5 por ciento) para DA agregado a extractos de mariscos con niveles de toxinas de 0,02–0,2 ng/ml. El mismo grupo de investigadores empleó también los monoclonales como ligandos en cromatografía de inmunoafinidad, que combinada con CL, fue usada exitosamente para confirmar la presencia de DA en muestras comerciales de cholgas (*Mytilus edulis*) (Kawatsu *et al.*, 2000).

Garthwaite *et al.* (2001) desarrollaron un ELISA grupal para toxinas ASP, NSP, PSP, DSP y yesotoxina como un sistema de selección para muestras de mariscos contaminados. El sistema detectó muestras de mariscos sospechosas, las que desde entonces deben analizarse con métodos aprobados por autoridades reglamentadoras internacionales. La extracción con alcohol permitió una buena recuperación para todos los grupos de toxinas.

Los biosensores ofrecen un nuevo enfoque basado en anticuerpos. Traynor *et al.* (2002) han descrito la detección de residuos de DA en moluscos bivalvos con un inmunobiosensor. En esta aplicación el DA se une a la superficie del sensor y se emplea el anticuerpo policlonal producido a un conjugado DA HAS. Los autores indicaron que el ensayo era adecuado para análisis rápidos en berberechos, mejillones, ostras y vieiras. Se encontró un límite de detección a 0,8 µg/g, y un C.V. entre ensayos de 8 por ciento a un nivel de 20 µg/g, el actual límite legal para el cuerpo entero. Al momento de escribirse este trabajo estaba en marcha una comparación en gran escala con CL. Es de esperar que la tecnología de los biosensores se aplique en el futuro más extensamente para analizar ASP.

4.2.3 Ensayos químicos

cromatografía de capa fina

El DA puede determinarse por cromatografía de capa fina con un punto de absorción UV débil que se vuelve amarillo luego de nebulizarlo con ninhidrina al 1 por ciento (Quilliam *et al.*, 1998). Interfieren los amino-ácidos normales presentes en los extractos crudos, que deben separarse. Esto se logra para las muestras de plancton con dos cromatografías en capa fina bidimensionales. No pueden analizarse directamente, por ser muy complejos, los extractos crudos de tejidos de mariscos. Un procedimiento de limpieza (una extracción fuerte, ligeramente modificada, de intercambio aniónico en fase sólida [SAX-SPE]) permite obtener fracciones directamente utilizables o concentrarlas al vacío antes de aplicarlas sobre una placa de sílica-gel. La cromatografía de capa fina unidimensional, con esta forma de limpieza es suficiente, al ser retirados casi todos los amino-ácidos que interfieren. El límite de detección por este método, para el DA, es de alrededor de 0,5 µg, lo que permite la detección en tejidos de marisco a alrededor de 10 µg/g. Es también posible detectar el DA sobre la placa utilizando otros reactivos para la nebulización. Por ejemplo, luego de nebulizar con vainillina, primero se colorea de amarillo con el ácido domoico (o cainico) para luego pasar, con el tiempo, a rosado (Wright y Quilliam, 1995).

Quilliam *et al* (1998) estudiaron, además, la cromatografía en capa fina como una técnica de separación para detectar el DA, luego de extracción con metanol en agua seguida por una limpieza SAX-SPE. El método fue exitosamente aplicado a muestras de vieiras, navajuelas y anchoas contaminadas con DA, concluyéndose que resultaría exitoso para los análisis de rutina de tejidos de mariscos en los laboratorios que no cuentan con sistemas de CL. Debiera también ser útil como un método para confirmar químicamente la presencia de DA en muestras positivas con, por ejemplo, inmunoensayos.

análisis de amino ácidos

Los extractos acuosos crudos de plancton, pueden analizarse directamente mediante un sistema de análisis de amino ácidos empleando las soluciones tampón y columnas de intercambio iónico habitualmente usadas para analizar hidrolizados proteicos, elutos de DA similares a la metionina. Las medidas de absorbancia a 440 nm permiten detectar amino ácidos con grupos amina primarios, en tanto que a 570 nm se detectan selectivamente imino ácidos como la prolina y el DA. El límite de detección del DA por este método es de alrededor de 1 µg/ml, con unos 50 µl de extracto inyectados por la columna. Aunque el límite de detección del método de análisis de amino ácidos es próximo al de los métodos CL-UV, no resulta tan efectivo para muestras con una concentración alta de amino ácidos libres y el análisis es en sí más prolongado. Los extractos de mariscos pueden analizarse de esta manera luego de las necesarias limpiezas y concentración de material (Wright y Quilliam, 1995).

cromatografía líquida (CL)

El DA puede analizarse y aislarse, por CL o por cromatografía de intercambio iónico con detector UV. Las separaciones más rápidas y eficientes se logran con CL-UV de fase revertida. Se recomienda emplear una fase móvil ácida para suprimir la ionización de las funciones carboxilo, en tanto que se logra de la mejor manera la separación selectiva del DA y sus isómeros con fases octadecilsilica “tipo polímero”. La CL-UV es actualmente la técnica analítica preferida para analizar DA en mariscos disponiéndose de un método, validado formalmente para mejillones por un estudio colaborativo de la AOAC (Lawrence *et al.*, 1991b). La detección del DA se facilita por su fuerte absorbancia a 242 nm. El límite de detección CL-UV para el DA es de unos 10-80 ng/ml, dependiendo de la sensibilidad del detector UV empleado. El límite de detección en los tejidos depende del método de extracción y limpieza. El DA se extrae, en el método de Lawrence *et al.* (1989a), de tejido homogeneizado de mejillones hirviendo durante cinco minutos con HCl 0,1 M, de forma similar al procedimiento de extracción del ensayo en ratón de la AOAC para PSP. La mezcla se enfría y centrifuga, diluyéndose, filtrándose y analizándose una alícuota del sobrenadante por CL isocrática con detector UV a 242 nm.

Si se analizan extractos crudos sin limpiar (sea ácidos o en metanol acuoso), el límite práctico para la cuantificación es de unos 1 µg/g (Lawrence *et al.*, 1989a). Esto es adecuado para la mayoría de los laboratorios de control que trabajan con niveles de contaminación superiores a 20 µg/g. Sin embargo, habitualmente se encuentran interferencias capaces de dar falsos positivos con extractos crudos. Se ha demostrado, por ejemplo, que el triptofano y algunos de sus derivados se encuentran a menudo presentes en concentraciones importantes en tejidos de mariscos y de peces con escamas y que estos compuestos aparecen como elutos próximos al DA. Puede usarse un detector foto-con dispositivo de diodo para examinar espectros UV y para poder confirmar el DA. Un enfoque alternativo es preparar un derivado químico y analizar la muestra comparándola con un estándar conocido que experimentó el mismo proceso. Con estos fines se han desarrollado técnicas de derivatización por reacción con fenil- o butil-isotiocianato o por esterificación con isopropanol (Lawrence *et al.*, 1989b; Lawrence y Ménard, 1991). Una técnica confirmatoria más sofisticada resulta de sustituir el detector UV por espectroscopía de masas con electronebulización y control selectivo de iones (Lawrence *et al.*, 1994). Esta técnica ofrece la posibilidad de confirmar la presencia de DA a niveles bajos, del orden de 0,1 µg/g, sin tratamiento adicional de las muestras.

Quilliam *et al.* (1995) desarrollaron un procedimiento analítico mejorado por CL-UV. Se hace una extracción con metanol acuoso combinado con limpieza por SAX (intercambio aniónico fuerte)-SPE (extracción en fase sólida), resultante en cromatogramas libres de interferencias. Otras ventajas del método de Quilliam *et al.* (1995) sobre el de Lawrence *et al.* (1989a) parecen ser los extractos más

estables, las recuperaciones mayores y un nivel de detección menor (20-30 ng/g). Hatfield *et al.* (1994) modifican ligeramente la etapa de limpieza SPE (extracción en fase sólida) en el método de Quilliam *et al.* (1995). Sustituyen el lavado normal con acetonitrilo al 10 por ciento y solución tampón de citrato de amonio 0,5 M en la solución de elusión de acetonitrilo al 10 por ciento con cloruro de sodio 0,1 M en un lavado con acetonitrilo al 10 por ciento y una solución de elusión de cloruro de sodio 0,5 M en acetonitrilo al 10 por ciento. Este método modificado permite el análisis de muestras de matrices complejas, como las vísceras de cangrejos. Además, el DA es más estable en elutos de cartuchos SAX SPE, que permiten almacenar las muestras en caso que los análisis no puedan realizarse inmediatamente

Son hasta ahora pocos los métodos de análisis de ASP por CL validados por estudios colaborativos. Solamente el de Lawrence *et al.* (1989a) ha sido así considerado por la AOAC.

Si bien el método de Quilliam *et al.* (1995) fue planeado para un estudio colaborativo de la AOAC, limitantes de tiempo no han hasta ahora permitido hacerlo. En cambio, el Laboratorio Comunitario de Referencia para Biotoxinas Marinas de la UE realizó en 2002/2003 un estudio interlaboratorio de validación, en dos fases, para diversas muestras de mariscos y pescados en Europa. Se ha completado exitosamente la primera fase de familiarización. La segunda fase debiera estar redondeada en 2003. En este estudio de validación participan los Laboratorios Nacionales de Referencia para Biotoxinas Marinas de UE. Si del estudio surgen resultados aceptables, el Comité Europeo de Normalización (CEN) hará del método una norma.

Un grupo de trabajo del CEN en biotoxinas ha normalizado el método de Lawrence *et al.* (1989a) que se encuentra actualmente en la etapa de aprobación como Norma Provisional Europea prEN 14176 (CEN, 2002c).

Se ha informado de un método automático rápido y sensible para determinar DA con CL empleando, un sistema de sustitución de columna con detector UV. Los picos de interferencia resultantes de componentes de la matriz proteica se separan mediante una columna con CL de fase inversa expresamente diseñada para una separación previa. El método es adecuado para extractos de almejas y algas. La muestra se extrae con agua pura y el extracto crudo se inyecta directamente. El sistema de sustitución de columnas eliminó la necesidad de cualquier otra limpieza de la muestra luego de la extracción (Hummert *et al.*, 1997).

Se ha desarrollado un procedimiento muy sensible, basado en la reacción con 9-fluorenilmetilcloroformato para formar un derivado de fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC) y análisis CL con detector de fluorescencia, para seguir el DA en matrices marinas como agua de mar y fitoplancton. El límite de detección es bajo, del orden de 15 pg/ml para DA en agua de mar (Pocklington *et al.*, 1990). Se ha adaptado también este procedimiento para extractos de mariscos (Wright y Quilliam, 1995).

Otras técnicas que producen derivados fluorescentes analizados luego de una separación con CL, incluyen el método de Sun y Wong (1999), que utiliza 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato y el de James *et al.* (2000a), que produce un derivado del DA con 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F). Estos métodos, basados en detección de fluorescencia con CL, no son aun de uso difundido.

electroforesis capilar (EC)

Este método relativamente simple permite separaciones rápidas y de alta resolución de compuestos polares complejos. Se conecta un tubo capilar delgado de sílice fundido conteniendo una solución tampón entre dos contenedores de líquido. Luego de inyectar en el capilar un volumen pequeño de extracto de muestra (usualmente 1-10 nL), se aplica una diferencia de voltaje de 20-30 kV a los extremos del capilar. Las sustancias iónicas migran hacia abajo como bandas delgadas, pasando por un detector (absorbancia UV, fluorescencia) (Wright y Quilliam, 1995). Nguyen *et al.* (1990) informaron un límite de detección de 2 µg/g (relación señal-ruido 5:1) para un extracto tratado de tejido de almeja. De tenerse la precaución de limitar el ingreso de líquido, durante el procedimiento de extracción y de tratamiento del extracto, el extracto tratado resultaba cinco veces menos concentrado que los tejidos. El límite de detección en los tejidos húmedos fue de 10 µg/g. En 10 minutos se separaba fácilmente el DA de los componentes de la matriz de muestra de almejas. Con excelentes límites de detección de masa, el método EC requiere solamente muestras de 3 a 15 nl pudiendo emplearse cuando el tamaño de las muestras está severamente limitado. Zhao *et al.* (1997) estudiaron métodos basados en electroforesis capilar combinada con detector UV. El DA podía analizarse mediante capilares de sílice, en modo catiónico o aniónico, respectivamente con sistemas tampón ácidos o básicos. El mejor comportamiento, por la eficiencia de la separación y duración del análisis, se obtuvo con tampones de fosfato o borato a un pH 9 aproximadamente. El agregado de β-ciclodextrina al buffer de borato permitió una separación del DA y de varios de sus isómeros (ácidos isodomoicos) superior a la obtenida por cromatografía líquida. Además, se desarrolló un procedimiento de extracción y lavado, probado con mejillones, almejas y anchoas. Podía obtenerse un límite de detección de masa de 3 pg de DA inyectado y un límite de detección del método en tejidos de 150 ng/g. La comparación con CL indicó que las dos técnicas ofrecían precisión y exactitud comparables. Las condiciones para la EC desarrolladas por Zhao *et al.* (1997) las aplicaron Piñeiro *et al.* (1999) con algunas pequeñas modificaciones. En sus estudios para optimizar la EC combinada con detector UV/dispositivo de diodo, los autores podían identificar claramente la presencia de DA en algunas muestras contaminadas de navajuelas y en material de referencia: tejido de almeja (NRC CRM-ASP-MUS-b) (ver Capítulo 4.2.4.).

espectrometría de masas

La electronebulización se ha convertido en la técnica predominante para las interfaces entre CL y EM, volviendo obsoletos métodos mencionados anteriormente, como (flujo continuo) Bombardeo Atómico Rápido (FAB por sus siglas en inglés) y termospray. Quizás sea, el retiro del contenido de lípidos en los homogenatos, el punto más importante para resolver el problema de la supresión de la señal tan a menudo encontrada en los análisis de extractos de mariscos empleando CL-ESI-EM (ESI= ionización electronebulización).

Hess *et al.* (2001), informaron de experiencias de limpieza y de determinación con CL-EM tanto en el ácido domoico (DA) como en muestras reales. Concluyeron que el lavado de tejidos de mejillón y de vieira mediante cartucho SAX, permitía un seguimiento validado de rutina del DA en mariscos, tanto con CL-UV como con CL-EM, evitando falsos positivos. Afirman “..parece prudente emplear la limpieza SAX para evitar falsos negativos.” (SAX = Intercambio Aniónico Intenso). Por otra parte, Powel *et al.* (2002) concluyeron que un paso adicional con un cartucho SAX SPE no mejoraba significativamente la recuperación del ácido domoico de muestras de cangrejo de arena, y Furey *et al.* (2001) hicieron una limpieza mínima de muestras sin mencionar, para nada, efectos de la matriz.

Furey *et al.* (2001) informaron de un ejemplo de uso extenso de CL-EM múltiple al usar para análisis cuali- y cuantitativo de DA un espectrómetro de masa de captura iónica. En una figura, se indica un camino de fragmentación para el ácido domoico. Se ha demostrado una buena linealidad para CL-EM¹⁻³ para curvas de calibración durante 2-3 décadas obtenidas usando extractos inoculados de tejido de vieira; sin embargo EM⁴ y EM⁵ ofrecieron una linealidad pobre.

En el segundo semestre de 2002, se realizó un estudio interlaboratorio con el nuevo método CL-EM para determinar toxinas ASP y DSP en mariscos (Holland y McNabb, 2003). Los ocho laboratorios participantes en general obtuvieron conjuntos de datos consistentes para el amplio grupo de toxinas analitos, hasta niveles bajos ($< 5\text{ng/ml}$, equivalente a $0,05\text{ mg/kg}$). Generalmente, la sensibilidad es la adecuada para los LODs requeridos. La mayoría de los participantes pudieron detectar las toxinas analitos; se observaron mayores diferencias para cuantificar algunas toxinas, especialmente en ausencia de normas analíticas. Los participantes han empleado diferentes modos de detección por EM: detección EM simple (SIM/SIR), detección en tandem (MRM), o ambas. Aunque resulte atractivo usar el modo MRM para mejorar la especificidad, requiere cuidados adicionales en la cuantificación. Resumiendo, el estudio resultó muy estimulante para los interesados en métodos alternativos a los bioensayos en ratón, no apoyados por datos de validación estadísticos, que es bien sabido dan un número relativamente alto de falsos positivos, con una capacidad de detección inadecuada para algunas toxinas y que resultan éticamente inaceptables para el seguimiento rutinario de los alimentos. Además, el método 40.105 (el ensayo) detecta confiablemente toxinas ASP y una gama de otras toxinas y metabolitos, por. ej. azaspirácidas y ácidos seco pectenotoxina que pueden no responder a los ensayos en ratón (Holland y McNabb, 2003).

4.2.4 Materiales de referencia

Los materiales certificados son instrumentos útiles para el aseguramiento analítico de la calidad, desarrollados para las ASP y disponibles mediante el Programa de Materiales de Referencia Certificados del Consejo Nacional de Investigación (NRC por sus siglas en inglés) del Canadá (NRC, 2003). El NRC suministra soluciones certificadas de DA para calibración (NRC CRM-DA-d) y material de referencia de tejido de almejas para el DA (NRC CRM-ASP-MUS-b). La NRC CRM-DA-d, es una solución certificada para calibrar instrumentos, que apoya al analista en las determinaciones del DA. Está disponible como un juego de cuatro ampollas, cada una con una solución $0,5\text{ mL}$ de DA disuelta en acetonitrilo/agua ($1:9\text{ v/v}$), con una concentración de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$. Es adecuada para calibrar experiencias de cromatografía líquida y para inocular muestras de marisco de control para pruebas de recuperación. La NRC CRM-ASP-MUS-b es una pasta homogeneizada de tejido de mejillón (*Mytilus edulis*) con $36 \pm 1\text{ }\mu\text{g/g}$ de DA, así como varios compuestos relacionados. La NRC CRM-ASP-MUS-b se distribuye también en ampollas, cada una con $8,1 \pm 0.1\text{ g}$ de homogenato de mejillón.

4.3 Organismos fuente y habitat

4.3.1 Organismos fuente

En 1997, la ASP fue sindicada por primera vez en la Isla Príncipe Eduardo en Canadá, siendo el DA la toxina responsable del síndrome (Bates *et al.*, 1989). El DA fue aislado originalmente en la década de los años 1950 de la macroalga roja *Chondria armata* (Ravn, 1995). Dos décadas más tarde, fue detectado en la macroalga roja del Mediterraneo *Alsidium corallinum* (Todd, 1993). Otra diatomea, *Amphora coffaeiformis*, produce también DA (Lundholm *et al.*, 1994).

Se ha supuesto que el origen del DA, en el primer incidente con ASP de 1987, fue el alga roja *Chondria baileyana*, una especie encontrada en aguas de la Isla Príncipe Eduardo. No obstante, la diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* era señalada como productora del DA y el brote de intoxicación en seres humanos se rastreó hasta cholgas de cultivo (*Mytilus edulis*) contaminados con fragmentos identificables de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (Bates *et al.*, 1989).

El DA es producido por *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* tanto en condiciones de cultivo como de campo (Hasle y Fryxell, 1995). En la Bahía de Fundy en el sudoeste de Canadá, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* pareció ser el organismo productor del DA responsable de niveles inaceptables en mariscos para consumo humano (Martin *et al.*, 1993).

Extrañamente, no produjeron DA los aislados de *P. pseudodelicatissima* de la Bahía de Galveston (Texas), de la Bahía de Massachusetts (Massachusetts), de la Bahía de Monterey (California) y también de Dinamarca y Australia (Bates, 2000).

El ASP apareció también en la Costa Oeste de los Estados Unidos causando muerte de pelícanos y cormoranes, luego de alimentarse con anchoas contaminadas con DA. En esa zona, la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* pareció ser el organismo fuente (Wright y Quilliam, 1995). También *Pseudo-nitzschia australis* produjo DA tanto en condiciones de cultivo como de campo (Hasle y Fryxell, 1995).

Se encontró que *Pseudo-nitzschia delicatissima* (syn. *Nitzschia actydropbila*) y *Pseudo-nitzschia seriata* producían DA bajo condiciones de cultivo (Hasle y Fryxell, 1995). *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia multiseries* (syn. *P. pungens* f. *multiseries*) son ahora considerados especies separadas en razón de diferencias morfológicas y genéticas (Wright y Quilliam, 1995).

Rhodes *et al.* (1998) informaron la presencia de DA en cultivos de *Pseudo-nitzschia fraudulenta* y *Pseudo-nitzschia turgidula* originarios de Nueva Zelanda. Originalmente se encontró *P. multistriata* en aguas japonesas (Bates, 2000), aunque se demostró recientemente que aislados del Golfo de Nápoles producen DA (Sarno y Dahlmann, 2000). Se informó haber aislado una diatomea productora de DA (Kotaki *et al.* (2000)), de un estanque de langostinos de cultivo en VietNam, posteriormente identificado como *Nitzschia navis-varingica* (Lundholm y Moestrup, 2000). Kotaki *et al.* (2000) compararon los niveles celulares de DA de *Nitzschia navis-varingica* con los de otra especie productora, *Pseudo-nitzschia*. Los niveles celulares de DA en *Nitzschia navis-varingica* eran comparables a los presentes en *P. multiseries* y *P. seriata*, menores que en *P. australis*, pero mayores que en *P. turgidula* y *P. pungens*.

4.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

Las floraciones tóxicas de *Pseudo-nitzschia* pueden convertirse en un fenómeno recurrente, y resulta importante determinar si existe alguna predictabilidad estacional o espacial. Desde el primer incidente con ASP en Canadá en 1987, se ha estudiado intensamente la auto ecología de *P. pungens* f. *multiseries*. Aunque se ha informado porque domina con temperaturas más frías, es capaz de sobrevivir hasta 30 °C (Villac *et al.*, 1993a). Se concluyó que el crecimiento y la fotosíntesis óptimos de *P. pungens* f. *multiseries* se daban en rangos de temperatura entre 15-20 °C. Sin embargo, se han observado floraciones mono-específicas de *P. pungens* f. *multiseries* a fines de otoño o en invierno, con bajas temperaturas prevalentes del agua (-1 a 3 °C). Como la temperatura óptima de crecimiento es muy superior a ésta, es evidente que otros factores han de haber iniciado el desarrollo de las floraciones (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Se observaron las velocidades de crecimiento más altas para *P. pungens* f. *multiseries* a 20° y 25°C (Lewis *et al.* (1993)). Las concentraciones más altas de células estacionarias tuvieron lugar entre 5° y 15°C, disminuyendo entre 20° a 25°C.

Los movimientos verticales de agua fría con concentraciones de nitrógeno elevadas (como las encontradas en la Bahía de Monterey, California) pueden haber estimulado el crecimiento de las poblaciones de *P. pungens* f. *multiseries* (Villac *et al.*, 1993b). Se ha informado de aumentos de la cantidad de células, aun con pequeños movimientos verticales de agua. Desde 1991 a 1994 en la Costa Oeste de los Estados Unidos las floraciones de *P. australis* eran muy comunes, persistiendo por más tiempo durante fines del verano y otoño, cuando las condiciones hidrográficas se asocian con el final de la estación de los movimientos verticales de aguas, usualmente caracterizadas por temperaturas superficiales mayores, estratificación térmica y menores concentraciones de nutrientes. Los nutrientes pueden resultar aun más importantes para el crecimiento del fitoplancton que los efectos directos de los cambios estacionales de temperatura. *P. seriata*, otra productora de DA de la especie *Pseudo-nitzschia*, se encontró desde el Mar de Barents cerca de Spitsbergen al norte, a

Alemania en el sur (Bahía de Kiel en el Báltico) y en el Atlántico occidental desde las costas oeste y este de Groenlandia a los 45°N en Canadá. Sólo durante el invierno alcanzaba latitudes bajas la *P. seriata*, limitada a aguas frías. Es conocida en el Pacífico desde Alaska a la Columbia Británica/Washington y también puede presentarse en el norte de Japón.

La producción de DA varía ampliamente de una especie a otra dentro del género *Pseudo-nitzschia*, y es vital poder distinguir las especies. No está aun clara la relación entre la producción de DA por *Pseudo-nitzschia* spp. y las condiciones ambientales.

Las condiciones en zonas poco profundas con circulación restringida pueden favorecer el estrés requerido para iniciar la producción de DA, junto con el necesario exceso de nitrógeno inorgánico (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Aun la producción de toxina de la misma especie puede variar con la zona. Por ejemplo, *P. pseudodelicatissima* de la Bahía de Fundy, New Brunswick, Canadá, causó niveles altos de DA en mariscos tipo molusco, en tanto que no lo produjeron aislados de la especie de la Bahía de Galveston (Texas), Bahía de Massachusetts (Massachusetts), Bahía de Monterey (California), Dinamarca y Australia (Bates, 2000).

El pico de la floración de *P. pungens* f. *multiseries* en Canadá en 1987 sucedió luego de un periodo inusualmente seco a fines del verano, seguido de una intensa tormenta con lluvias a comienzos de setiembre. Se encontró una relación entre pulsos de disponibilidad de nitratos y picos de *P. pungens* f. *multiseries*, atribuida fundamentalmente a desbordes de agua dulce luego de las lluvias (Villac *et al.*, 1993a; Villac *et al.*, 1993b). Los estudios de densidad poblacional en el estuario del río Cardigan (Isla Príncipe Eduardo, Canadá) indicaron que podrían requerirse densidades celulares de aproximadamente 3×10^5 por litro antes que los mariscos superasen el nivel de tolerancia de DA para consumo por seres humanos de 20 mg/kg (Dickey *et al.*, 1992a). El incidente con DA en el otoño de 1991 en aguas del estado de Washington en la costa oeste de los Estados Unidos, ocurrió también luego de un periodo muy caluroso y seco de 45 días de duración, seguido de lluvias a mediados de octubre (Horner y Postel, 1993).

En estudios en cubeta de cultivos *P. multiseries*, la producción de DA tuvo sólo lugar en la fase estacionaria, no resultando evidente durante la fase de crecimiento exponencial (Bates *et al.*, 1991). Sin embargo, en estudios posteriores con cultivos (Bates, 2000), se encontró que la producción de DA por *P. multiseries* y *P. seriata* comenzaba a fines de la etapa exponencial para continuar con mayor rapidez durante la fase estacionaria. En cambio, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima* produjeron DA durante la mayor parte de la fase exponencial y no durante la estacionaria. Para la *P. pseudodelicatissima* la información no es del todo consistente, pues un aislado de aguas de Washington produjo DA tanto durante el final de la fase experimental como en la estacionaria (Bates, 2000). La dinámica de la producción de DA por *Nitzschia navis-varingica* fue estudiada por Kotaki *et al.* (2000), encontrando la misma dinámica que para *P. multiseries* y *P. seriata*, es decir, comienzo de la producción de DA durante el final de la fase exponencial, acelerándose en la estacionaria.

La producción de DA por *P. seriata* parecía también depender de la temperatura, produciéndose cantidades mayores a 4°C que a 15°C (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Lewis *et al.* (1993) demostraron que la velocidad de producción de DA por *P. pungens* f. *multiseries* durante la fase estacionaria de crecimiento podía reducirse de manera importante disminuyendo ligeramente la temperatura. Sin embargo, aunque las concentraciones y velocidades de producción de DA eran bajas a temperaturas bajas, altos rendimientos celulares podían permitir una producción de DA suficiente como para volver tóxicos a los mariscos tipo molusco. Los estudios de Lewis *et al.* (1993) además demostraron que las densidades experimentales de flujo de fotonos no tenían efecto evidente sobre la velocidad inicial de producción de DA o sobre la de crecimiento de *P. pungens* f. *multiseries*.

Bates *et al.* (1991) afirmaron que se requería disponer de nitrato extra-celular o de otra fuente de nitrógeno y de luz para producir DA durante la fase estacionaria. También se ha señalado como favoreciendo la producción de DA el estrés de en *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*.

La producción de DA se vio muy favorecida al aplicarse a la población de algas un estrés severo luego de un periodo de crecimiento activo. La producción se aceleró unas tres veces durante el periodo de transición desde el estado estacionario al de cultivo en cubeta, donde se enlenteció, disminuyendo la absorción de silicato o fosfato (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Pseudo-nitzschia especie *P. australis*, fue identificada en el incidente con DA de 1991 en la Bahía de Monterey (California) en la costa oeste de los Estados Unidos, siendo un habitante frecuente de estas aguas. Al momento de la floración de *P. australis* en 1991, en la zona de la Bahía de Monterey culminaba la estación seca anual; las aguas estaban con estratificación moderada, la temperatura superficial del agua era de 13-14 °C, la salinidad 30-33 ‰ y relativamente agotados los nutrientes. Este agotamiento era común hacia fines del verano y en otoño, luego del periodo estacional de movimiento vertical de las aguas (Villac *et al.*, 1993a). La relativamente confinada Bahía de Monterey ha sido caracterizada como una zona bajo “la sombra de persistentes movimientos verticales de agua”; una región en que el agua está atrapada por un frente a lo largo de la costa que limita el flujo desde las zonas próximas a la costa. Se ha sugerido que los niveles celulares de DA en *P. australis* correlacionan con las concentraciones de silicatos (Bates *et al.*, 1991). Se examinaron, en estudios sobre cultivos en cubeta y continuos, los efectos limitantes sobre la producción de DA de silicatos y fosfatos por *P. multiseries*. Se probó que una mayor producción de DA tenía lugar con poco silicato, aun con la misma velocidad de crecimiento. Es muy posible que las floraciones naturales de *P. multiseries*, causantes de importantes cantidades de DA, estuvieran con un severo estrés de silicatos. Una fluoración anterior de otra diatomea o una fluoración prolongada de *P. multiseries* pueden agotar el silicato en el agua de mar. En el pico de la fluoración de *P. Multiseries*, tóxica, en la Bahía de Cardigan, Canadá en diciembre de 1987, la concentración de silicato era baja, del orden de 0,62 µM. el pico del DA ocurrió 10 días después. Se demostró que era favorecida también la producción del DA por limitantes en la cantidad de fosfatos en el medio de cultivo. La competencia entre velocidades de producción del DA altas en estado estacionario, con velocidades bajas de absorción de nutrientes y con niveles elevados de trifosfato de adenosina (ATP) indica además, que la síntesis del DA requería cantidades importantes de ATP como fuente de energía biogénica (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

La producción de DA por *P. multiseries*, según un estudio de Pan *et al.* (1998), parecía verse favorecida al estresarse el metabolismo primario limitando el Si, P y quizás otros nutrientes esenciales como vitaminas y metales traza. Al limitárselos, estos nutrientes esenciales pueden:

- disminuir el metabolismo primario, haciendo disponibles los precursores necesarios, compuestos de elevada energía y cofactores, y
- favorecer la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del DA. La síntesis del DNA y la progresión a lo largo del ciclo de división celular, que limitaciones de Si y P, endentecen, quizás prolongando o deteniendo las células en la etapa del ciclo de división mas propicio para producir DA.

Sin embargo, la limitación de nitrógeno resulta en una cantidad insuficiente de N celular libre, que restringe la síntesis de esta toxina nitrogenada. Se necesita para la síntesis del DA una provisión continuada de intermediarios fotofosforilados de alta energía (por ej. ATP y NADPH).

Subba Rao *et al.* (1998) informaron que cultivos de *P. multiseries* producían niveles sustancialmente más elevados de DA (230 fg/célula) al ser enriquecidos con litio (385,6 µM) que los cultivos de control (135 fg/célula). El nitrógeno, fosfato o silicato no eran limitantes en los cultivos.

Se ha especulado que los eventos con DA podrían limitarse a estaciones en las que la estratificación y agotamiento de los nutrientes ocurrían o estaban limitados a zonas costeras en las que el desarrollo de floraciones agotaba los nutrientes disueltos. Sin embargo, las observaciones de campo en la Bahía de

Monterey demostraron que el DA era producido por *P. australis*, de células grandes, a bajas densidades celulares y concentraciones de nutrientes moderadas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Se ha informado que los cultivos axénicos de *Pseudo-nitzschia multiseriis* producen menos DA que los cultivos bacterianos originales. Se volvieron a introducir individualmente las cepas bacterianas aisladas de dos clones no axénicos de *P. multiseriis*, en cultivos de tres cepas axénicas de *P. multiseriis*. La bacteria no afectó sustancialmente las velocidades de división o los rendimientos celulares. Sin embargo, mejoraron de 2 a 95 veces la producción de DA (por célula) en relación al cultivo axénico, dependiendo de la *P. multiseriis* y de la cepa bacteriana empleadas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Para comprender mejor los mecanismos de producción de DA por *P. multiseriis*, se requieren más estudios que aclaren:

- los detalles del camino biosintético
- la regulación de las enzimas involucradas en el camino
- la relación entre síntesis de DA y el ciclo de división celular
- la compartimentalización celular de la biosíntesis del DA
- otros factores ambientales que pueden desencadenar la producción de DA

Además, estos estudios debieran ampliarse a otras especies *Pseudo-nitzschia* productoras de DA diferentes de *P. multiseriis*, para confirmar estos mecanismos comunes (Pan *et al.*, 1998).

4.3.3 Hábitat

Pseudo-nitzschia son diatomeas ampliamente distribuidas y según Hasle y Fryxell (1995; a menos que se indique otra cosa) las diferentes especies mencionadas en el Capítulo 4.3.1 se encuentran en las aguas siguientes:

P. multiseriis:

Atlántico: aguas de Norte América, Europa, y Sur América.

Pacífico: aguas de Norte América y nordeste del Asia, Japón (Kotaki *et al.* 1999).

P. pseudodelicatissima:

Atlántico: aguas de Europa y África (Estrecho de Dinamarca a África del noroeste, incluyendo las aguas costeras noruegas y danesas, Skagerrak, Bahía de Kiel), Canadá y EEUU (Ártico al Golfo de México) y América del Sur (Argentina) (Ferrario *et al.*, 1999).

Pacífico: aguas de California y Columbia Británica, aguas costeras de Penn Cove, Washington (Trainer *et al.*, 1998a).

P. australis

Atlántico: aguas costeras de España, Portugal, África del suroeste y Argentina.

Pacífico: aguas costeras de Perú, Chile, Nueva Zelanda, México (Golfo de California) (Hernández-Becerril, 1998), costa oeste de América del Norte desde San Diego (California) a Puget Sound, Washington, Columbia Británica.

P. delicatissima

Atlántico: aguas costeras noruegas, aguas danesas, Skagerrak, África del noroeste, Rhode Island y Argentina (Negri y Inza, 1998) y aguas costeras de los Estados Unidos (Louisiana) (Parsons *et al.*, 1998).

Pacífico: California.

P. pungens

Atlántico: aguas costeras de Argentina (Ferrario *et al.*, 1999) y aguas costeras de EEUU (Louisiana) (Parsons *et al.*, 1998).

Pacífico: aguas costeras de los Estados Unidos (Penn Cove, Washington) (Trainer *et al.*, 1998a) y México (Golfo de California) (Hernández-Becerril, 1998)

Aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998)

Mar del Japón, Bahía de Pedro el Grande, la Federación Rusa (Orlova *et al.*, 1998).

P. seriata

Mar de Barents (ca. 80°N), Mar Noruego, Mar del Norte, aguas costeras noruegas, Skagerrak, Bahía de Kiel, Canal de la Mancha, Groenlandia hasta Terranova (45°N), Alaska, Columbia Británica.

Aguas costeras de Argentina (Negri y Inza, 1998).

P. multistriata

Aguas costeras japonesas y en el Golfo de Nápoles, Italia (Bates, 2000).

P. turgidula

Aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998).

P. fraudulenta

Aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998).

Aguas costeras de Argentina (Negri e Inza, 1998)

Nitzschia navis-varingica

Aislado de un estanque de cultivo de mariscos en VietNam (Kotaki *et al.*, 2000; Lundholm y Moestrup, 2000).

4.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

4.4.1 Absorción y eliminación de toxinas ASP en organismos acuáticos

Los mariscos (moluscos bivalvos, gastrópodos, cangrejos, langostas y otros) acumulan ficotoxinas por filtración directa de las células del plancton o al alimentarse directamente con organismos contaminados (por ej. carnívoros y necrófagos). Deben evitarse las generalizaciones relativas a la absorción y retención de ficotoxinas por mariscos. La velocidad de acumulación de algas tóxicas (o toxina) por mariscos que se alimentan por filtración es específica para cada especie y en la mayoría de los casos esta relacionada directamente con la cantidad de células disponibles a los animales. La velocidad de acumulación de algas tóxicas es muy variable para una zona dada. La velocidad de eliminación de la toxina depende de la estación, retardando las bajas temperaturas la pérdida de toxina; sin embargo, no está bien entendido el grado en que la temperatura afecta la absorción y liberación de toxinas. Además, la velocidad de eliminación depende mucho del lugar donde esté almacenada la toxina en el animal, por ej. las toxinas del tracto gastrointestinal son eliminadas mucho más fácilmente que las toxinas unidas a tejidos. En la cholga (*Mytilus edulis*) y la ostra (*Crassostrea virginica*) el grueso del DA reside en los intestinos.

La mayor parte de la información disponible es relativa a moluscos bivalvos. Se ha demostrado que el DA depura de los mejillones bastante rápido (Villac *et al.*, 1993a).

El nivel de DA en mejillones en ausencia de *Pseudo-nitzschia* es menor a 1 µg/g. Se necesitó una concentración mínima de 2-4 x 10⁵ *Pseudo-nitzschia* células por litro durante por lo menos tres a cuatro semanas para producir 20 µg DA por g mejillones en la Isla Principe Eduardo, al este de Canadá (Todd, 1993). Cuando a los cholgas (*Mytilus edulis*) se les ofreció DA disuelto, durante 24 horas, (125 nM; a 5°C; salinidad 28 •) o como alimento encapsulado en liposomas, <1% de DA disuelto y hasta un 6 por ciento del DA contenido en el alimento se incorporó a los tejidos de mejillón. El DA absorbido de la solución estaba más concentrado en agallas y riñones, en tanto que el DA

ingerido como alimento lo estaba en glándulas digestivas y riñones. Las concentraciones más bajas de toxina eran retenidas en gónadas, músculo, pie y tejido conectivo. Los niveles de DA en los tejidos de mejillón no disminuyeron de manera consistente en un periodo de depuración de 48 horas, ni pareció que el DA se transfiriese a tejido alguno para su almacenamiento. Se eliminaron cantidades pequeñas de DA en las heces y disueltas otras más grandes (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Estudios preliminares de alimentación con el mejillón Greenshell (*Perna canaliculus*) de Nueva Zelanda, al que se proporcionó *P. pungens* f. *multiseries* mostraron contaminación de los mejillones con DA aunque la toxina fue eliminada rápidamente al cesar la alimentación. Bajo algunas condiciones las velocidades de excreción e ingestión eran equivalentes, no acumulándose en los tejidos (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Al exponerse continuamente durante 40 horas a la diatomea productora de DA *P. pungens* f. *Multiseries*, seguidas de un periodo de liberación de 120 horas, ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y mejillones californianos (*Mytilus californianus*), la carga tóxica era superior en la ostra del Pacífico luego de cuatro horas de exposición (36,3 µg/g; con los niveles más altos en tejido blando 32,9 µg/g). Sin embargo, con una exposición de cuatro horas la ostra del Pacífico cerró su caparazón disminuyendo la carga tóxica del cuerpo. Las agallas, músculo y tejido blando aun presentaban niveles detectables de DA pasadas las 120 horas del periodo de liberación. La carga de DA en el mejillón californiano alcanzó también un máximo pasadas las cuatro horas de exposición (3,6 µg/g; nivel más alto en el tejido de las agallas 2,5 µg/g). Pasadas las 24 horas del periodo de liberación, no se observaron niveles detectables en el manto, agallas o tejido blando. Sólo de encontraron trazas en el tejido muscular luego de 24 horas de depuración (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

La depuración de navajuelas no es muy rápida. En éstas, se encontraron niveles superiores de DA concentrados en los tejidos musculares comestibles y otros menores en partes de tejidos no edibles. Cuando las velocidades de depuración son lentas, valores bajos de DA pueden resultar en intoxicaciones, como con navajuelas. En consecuencia, la presencia continua de diatomeas productoras de DA con densidades bajas, puede resultar en concentraciones elevadas a largo plazo en la almeja.

En anchoas, se encontró el DA en las vísceras y en el músculo del pescado (Villac *et al.*, 1993a). Se informó que la vieira (*Argopecten irradians*) absorbe hasta 60 µg/g del DA en la glándula digestiva pasadas unas 84 horas de exposición a *P. multiseries* tóxica. Los niveles de DA disminuyeron a 5 µg/g luego de una depuración de 48 horas (Douglas *et al.*, 1997).

Al alimentar vieiras (*Placopecten magellanicus*) con células de *P. multiseries* con alto contenido de DA (4-6,6 pg/célula) durante 22 días, seguidos de 14 días de alimentación con microalgas no tóxicas, el DA fue incorporado dentro de las 24 horas con absorciones incrementadas pasados seis días. El orden de concentración del DA concentrado en tejidos era: glándula digestiva >> restante tejido blando >> músculo aductor. En la glándula digestiva se registró un máximo de 3 108 µg/g; sin embargo, sólo se encontraron cantidades traza (0,7-1,5 µg/g) en el músculo aductor. Al final de la exposición, se había incorporado a los tejidos el 50,9 por ciento del DA proporcionado. El nivel de DA en la glándula digestiva, 14 días después de finalizada la dieta tóxica permaneció elevado, 752 µg/g durante la experiencia; no hubieron de enfermedad o mortalidad de las vieiras marinas señales atribuibles a una carga elevada de DA. Sin embargo, el muestreo destructivo de las vieiras no permitió evaluar los efectos de largo plazo (Douglas *et al.*, 1997). El mejillón (*Modiolus modiolus*) retuvo también DA por periodos prolongados (Stewart *et al.*, 1998).

Se estudió la distribución anatómica del DA en vieiras (*Pecten maximus*). En un estudio, solamente se analizaron hepatopáncreas, músculo y gónadas. En un segundo, se analizaron combinados hepatopáncreas, músculo y gónadas y los restantes tejidos blandos. En el primer estudio el 98,8 por ciento del contenido de DA total (en hepatopáncreas, gónada y músculo) estaba localizado en el hepatopáncreas y, en el segundo (que incluía el total de tejido), el 79,3 por ciento del contenido total

de DA se localizaba en el hepatopáncreas; cantidades despreciables se encontraron en las gónadas y músculo y alrededor del 14,5 por ciento en los restantes tejidos blandos (Arévalo *et al.*, 1998).

Stewart *et al.* (1998) apuntaron a la alta posibilidad de que las bacterias autóctonas podrían resultar un factor significativo en la eliminación de DA en especies de moluscos que lo depuran fácilmente. Esto se demostró con cholgas *Mytilus edulis* y almejas *Mya arenaria*. Stewart *et al.* (1998) sugirieron diferentes mecanismos utilizados por diferentes mariscos con el DA, fácilmente disponible en cholgas y algunos tipos de almejas, pero retenido probablemente en las glándulas digestivas de sea vieiras y mejillones rojos y en consecuencia, no disponible en gran medida para uso bacteriano.

Se dispone de pocos datos sobre tiempos de retención de toxinas en cangrejos y gastrópodos carnívoros; la tendencia general en estos organismos apunta a retenciones prolongadas. Se informó un periodo de retención superior a los dos años para *Siliqua patula*, con una especie no identificada de *Pseudo-nitzschia* como fuente de la toxina (Shumway *et al.*, 1995).

Se observó una disminución del contenido de DA de 50 µg/g a 5 µg/g en 72 horas en cholgas del incidente de 1987 en Canadá (fuente de toxina *P. pungens* f. *multiseriis*), en tanto que en navajuelas del incidente de 1991 en la Bahía de Monterey (California) 1991 (fuente de toxina *P. australis*) la disminución de 47,9 µg/g a 44,3 µg/g se procesó en tres meses (Villac *et al.*, 1993a). Cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) acumularon la toxina principalmente en las vísceras, aunque durante la cocción pueden penetrar la carne de no haber sido los cangrejos eviscerados previamente (Villac *et al.*, 1993a). Cuando cangrejos Dungeness se alimentaron con DA por medio de carnes contaminadas de navajuela, durante seis o nueve días, los análisis de los cangrejos crudos indicaron que el DA se acumulaba rápidamente, confinándose a las vísceras, principalmente en el hepatopáncreas (22 µg/g). No se detectó DA ni en carnes del cuerpo o patas del cangrejo crudo (Hatfield *et al.*, 1995). Los estudios de Lund *et al.* (1997) muestran también que los cangrejos Dungeness absorbieron DA rápidamente (por carne contaminada de almeja) y acumularon el DA sólo en el hepatopáncreas. El DA fue eficazmente depurado del hepatopáncreas (por las heces) en un periodo de tres semanas, finalizada la alimentación toxica. La depuración se aceleró más cuando los cangrejos se alimentaron con raciones libres de toxinas que cuando se los privó de alimento.

Arévalo *et al.* (1998) informaron que la disminución media de la toxicidad de las muestras de tejido total estándar de vieira (*Pecten maximus*), homogeneizadas de 100 g de tejido total) sin incluir el hepatopáncreas fue del 94 por ciento (variando entre 82,3 a 100 por ciento).

4.4.2 Mariscos con toxinas ASP

Mejillones de cultivo (*Mytilus edulis*) muestreados durante el primer brote de intoxicación por ASP en el este del Canadá (Isla Príncipe Eduardo) en el otoño de 1987, contenían hasta 790 µg DA/g tejido húmedo (mejillón entero) (hasta 1 280 y 1 500 µg/g en tejido blando y glándula digestiva, respectivamente) (Bates *et al.*, 1989; Todd, 1997). En agosto-octubre de 1988, se detectó también DA en cholgas y en *Mya arenaria* del sudoeste de la Bahía de Fundy, Canadá (Martin *et al.*, 1993).

Se detectó DA en octubre de 1991 en navajuelas (*Siliqua patula*) de los estados de Oregon y Washington en los Estados Unidos. Los valores más elevados ocurrieron en la primera semana de diciembre de 1991 (el nivel máximo en la parte edible era de 147 µg/g y el nivel promedio de 106 µg/g para todas las playas del estado de Washington). Los tenores de DA en las almejas permanecieron por encima de los niveles de cierre reglamentarios de 20 µg/g por al menos seis meses. Los niveles de DA disminuyeron a menos de 10 µg/g a fines de la primavera de 1992. Desde la primavera de 1992 hasta la de 1993, los niveles de DA eran menores a 5 µg/g en la mayor parte de las zonas de muestreo costeras. El DA parecía distribuirse en las diversas partes del cuerpo de la navajuelas. El nivel superior se encontró en el pie, seguido del cuerpo, vísceras y sifón (o cuello). El nivel de DA en el pie de la navajuela alcanzó 230 µg/g (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Se informó que las vieiras (*Argopecten irradians*) absorben DA hasta niveles de 60 µg/g en la glándula digestiva luego de una exposición de 84 horas al *P. multiseriis* tóxico. Los niveles de DA disminuyeron a 5 µg/g luego de una depuración de 48 horas (Douglas *et al.*, 1997). Una mortalidad inexplicada de sea vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*), en el otoño de 1993, ocurrió en la Bahía de Fundy, Canadá. La glándula digestiva de los vieiras parecía contener 93,4 µg DA/g. Aunque se ha informado que algunos moluscos bivalvos contienen niveles elevados de DA, sin síntomas, *Chlamys hastata* murió rápidamente, dentro de las 12 horas, luego de una exposición a cultivos tóxicos de *P. multiseriis*, (Douglas *et al.*, 1997). Rutinariamente se encuentran cantidades importantes de DA en las glándulas digestivas, pero no en los músculos aductores de vieiras, en zonas próximas a la costa en Canadá en Georges Bank, Browns Bank y la Bahía de Fundy (Stewart *et al.*, 1998).

4.4.3 Otros organismos marinos con toxinas ASP

Se detectó DA sólo en las vísceras de cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) de los estados de Washington y Oregon en los Estados Unidos. Los niveles de DA en las vísceras crudas de cangrejos individuales del estado de Washington en diciembre de 1991 promediaron 13 µg/g con una variación de 0,8 a 90 µg/g. los niveles promedio más elevados de DA en cangrejos del estado de Washington se encontraron en muestras de Grays Harbor y de la Bahía de Willapa, respectivamente 32 y 31 µg/g. En 1992, los niveles promedio de DA eran menores a 5 µg/g en muestras pre-estacionales de cangrejos Dungeness retirados a lo largo de las costas de Oregon y Washington, con variaciones de 0 a 71 µg/g. Se registraron los mayores niveles de DA en 1992 (36-71 µg/g) en muestras retiradas desde enero a abril (Wekell *et al.*, 1994a, b). No estaba clara la fuente inmediata de DA para cangrejos Dungeness, considerados predadores y necrófagos oportunistas en el bentos marino. Es posible que se alimenten con navajuelas submareas tóxicas, aunque algunos habitan en zona de oleaje y otros persisten en regiones submareas. Por otra parte, se observaron también niveles elevados de DA en cangrejos provenientes de zonas con pocas o ninguna navajuela. Deben en consecuencia considerarse otras fuentes de DA béntico (Wekell *et al.*, 1994a).

Se encontró también DA en crustáceos bénticos, aunque no se han fijado las fuentes y caminos de transferencia a la comunidad béntica y no hay estudios realizados para determinar como la toxina acumulada podría afectar a los consumidores secundarios (Horner *et al.*, 1997).

En setiembre de 1991, murieron aves acuáticas, (pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*)) en la Bahía de Monterey, California, luego de consumir anchoas (*Engraulis mordax*) contaminadas con DA. En las vísceras de las anchoas se detectaron hasta 485 µg/g DA. Muestras de anchoas congeladas recogidas en abril de 1991, parecían contener en sus vísceras 270 µg/g de DA. En mayo, los niveles de DA en muestras de anchoas de la misma zona contenían menos de 1 µg/g. Las anchoas son primariamente carnívoras, aunque consumen fitoplancton de no haber otras fuentes de alimentación disponibles (Wekell *et al.*, 1994a). McGinness *et al.* (1995) demostraron que el estómago de las anchoas del norte (*Engraulis mordax*) de la Bahía de Monterey, California, (agosto de 1992) contenía nueve especies diferentes de *Pseudo-nitzschia*, inclusive cuatro productoras de DA, tanto en condiciones naturales como de laboratorio. El estudio demostró que las anchoas del norte son capaces de filtrar diatomeas emplumadas del agua de mar próxima a la superficie.

En enero de 1996, se atribuyó la muerte de pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) en el Cabo San Lucas en el extremo de la Península de Baja California (México) a la alimentación con caballa (*Scomber japonicus*) contaminado con *Pseudo-nitzschia* spp., productor de DA (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

Más de 400 leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) murieron a lo largo de la costa central de California en mayo y junio de 1998. El probable agente causante es el DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos por las anchoas septentrionales planctívoras (*Engraulis mordax*). Las mayores concentraciones de DA se encontraron en las vísceras (223 µg/g), con valores

siete veces superiores a los de los tejidos del cuerpo. Los niveles de DA analizados por CL en las heces de los leones marinos variaron de 136, 5 a 152 $\mu\text{g/g}$ (que necesita corregirse por interferencias de un compuesto no identificado; el ensayo de enlace con receptor correspondía con los valores por CL con un factor de dos) (Lefebvre *et al.*, 1999).

4.5 Toxicidad de las ASP

4.5.1 Mecanismo de acción

Se conoce el mecanismo de acción del DA en receptores de amino ácidos excitables y en transmisión sináptica. Los amino ácidos excitables, notoriamente L-glutamato y L-aspartato, son considerados desde hace tiempo como los neurotransmisores más probables. Se sabe que actúan sobre varios tipos de receptor, los mejor caracterizados reciben los nombres de los estimulantes exógenos selectivos N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato y quisqualato.

El DA es un análogo de glutamato que se une con alta afinidad a receptores glutamato del tipo quisqualato. El glutamato y también la subclase NMDA abriendo los canales de membrana permeables al Na^+ , resultando en entrada de Na^+ y despolarización de la membrana. Sólo el canal abierto por un receptor NMDA accesible al cainato, quisqualato y al DA, es además, altamente permeable al Ca^{2+} e induce la entrada del Ca^{2+} celular con efectos letales. Las acciones sobre los receptores NMDA pueden antagonizarse selectivamente mediante concentraciones micromoleculares de iones magnesio; antagonistas orgánicos como el D-2-amino-5-fosfonovalerato (APV) y anestésicos disociativos, como la fenciclidina (Viviani, 1992). El ácido cinurenico, administrado intraperitonealmente a ratones, resultó un protector poderoso y significativo contra la neurotoxicidad inducida con extractos de mejillón (Pinsky *et al.*, 1989). Se ha considerado el uso como antídoto, para la intoxicación con domoato, de drogas que bloquean el receptor sensible al domoato (Lavery, 1993). El DA es un neuroexcitante dos a tres veces más potente que el ácido cainico, con el que está estructuralmente relacionado y hasta 100 veces más potente que el ácido glutámico. Es posible un efecto sinérgico entre el DA y otros amino ácidos neurotóxicos habitualmente presentes en mejillones (Ravn, 1995). El DA tiene dos blancos primarios en el sistema nervioso central: la formación hipocampal y sus regiones asociadas involucradas en los procesos de la memoria y, la región de la región peduncular del área postrema y núcleo del tracto solitario asociado con la función visceral (Peng *et al.*, 1994).

4.5.2 Farmacocinética

estudios en animales de laboratorio

La absorción del DA administrado oralmente a ratas es pobre, como lo demostrara la recuperación casi completa en las heces, sugiriendo que, comparado con seres humanos, la absorción de DA puede reducirse en roedores. Todo el DA se recuperó en la orina en 160 minutos y la excreción no se vio afectada por co-administración de probenecida, inyectada por vía intravenosa, para eliminar el impacto de la absorción. Los resultados de este estudio indican que el DA fue liberado del plasma por los riñones y, más específicamente por el proceso de filtración glomerular. La vida media del plasma en ratas fue de 21,6 minutos comparada con 114,5 minutos en monos. La eliminación seis veces más rápida del DA en ratas es al menos parcialmente responsable por su falta de sensibilidad comparada con monos (ver también el Capítulo 4.5.3) (Iverson y Truelove, 1994). No hubo evidencia de ninguna biotransformación del DA por el roedor o el primate ya que siempre se ha recuperado incambiado (Todd, 1993).

En ratones ICR hembra, la liberación del DA del suero fue mayor del 95 por ciento, luego inyectada i.p. una única vez con dosis entre 0,25 a 4,0 mg/kg pc a las dos horas; pasadas cuatro horas la liberación era completa (Peng y Ramsdell, 1996).

El DA no penetra bien la barrera sangre-cerebro en ratas adultas, ratones, monos y seres humanos. Se ha encontrado, sin embargo, que el DA es muy tóxico para ratones recién nacidos y ratones fetales *in utero*, dónde el DA claramente induce excitotoxicidad hipocampal. Se ha informado recientemente, que el DA era extremadamente neurotóxico para las ratas neonatas a niveles de exposición 40 veces inferiores en base peso corporal que los indicados para animales adultos. Una barrera sangre-cerebro no aun completa durante el neurodesarrollo, puede explicar la alta sensibilidad de los neonatos al DA (Mayer, 2000).

4.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

Se han estudiado los efectos tóxicos del DA en ratones, ratas y monos *Cynomolgus*. La toxina induce síntomas muy característicos al inyectarse intraperitonealmente en ratones y ratas, un rascado peculiar de los hombros con la pata trasera, seguido de convulsiones y, a menudo, la muerte. Efectos más sutiles son hipoactividad, sedación-aquinesia, rigidez, esterotipía, perdida de control postural y temblores (Wright y Quilliam, 1995).

En una serie de publicaciones sobre los efectos neurotóxicos causados por el DA, se muestra que el agonista produjo pérdida de neuronas en la zonas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo, edema y degeneración neuronal en el núcleo arcuato y células vacuolizadas y picnotadas en la capa interior de la retina. Las lesiones hipocampales eran idénticas a las encontradas en víctimas humanas de ASP (Iverson y Truelove, 1994).

ratones

Se informó un valor intraperitoneal LD₅₀ en ratón de 3,6 mg DA (vía extractos de mejillón)/kg pc. (Todd, 1993). Se observó la hiperactividad como el primer efecto neuroexcitatorio sobre el comportamiento de ratones hembra ICR con una única dosis i.p. de 0,5 mg/kg pc. El comportamiento con rascado estereotípico se observó con dosis ≥ 1.0 mg/kg pc. A 2,0 mg/kg pc y superiores, tenían lugar convulsiones y ataques. A 4,0 mg/kg pc, se observaron convulsiones y ataques prolongados, muriendo 4/9 ratones dentro de las 24 horas. Se detectó la inducción de *c-fos* mRNA en el cerebro a 1,0 mg/kg pc, en tanto que se localizó en las células dentadas granulares del cerebro y en las piramidales de la formación hipocampal, un aumento de la inmuno-tintura Fos a 0,5 mg/kg pc. Estos resultados indican que el Fos en el hipocampo era un biomarcador sensible para los efectos neuroexcitatorios del DA, siendo inducido a dosis inferiores a las que promueven el comportamiento de rascado estereotípico (Peng y Ramsdell, 1996).

Se midió la toxicidad del DA a diferentes pHs en ratones CD hembra inyectados i.p., como el tiempo que demoraban en manifestarse los comportamientos de rascado, los ataques y la muerte. A pH 3,7 los tiempos eran de 12, 40 y 55 minutos, respectivamente. La toxicidad DA fue más baja a pH 7,4. El tiempo de comienzo del comportamiento de rascado no fue afectado por el pH a tres dosis diferentes (8,5; 11,5 y 14,5 mg/kg pc), pero si y claramente los tiempos para ataques y muerte. El efecto del pH disminuyó al aumentar la dosis de DA (a 14,5 mg/kg pc la toxicidad era la misma a pH 3,7 y 7,4) (Nijjar y Madhyastha, 1997).

Estudios en ratones indican que las acciones tóxicas del DA son generalmente insensibles a los receptores antagonistas NMDA (*N*-metil-d-aspartato), aunque el inicio de algunas respuestas podría demorarse con el CPP (ácido 3-(2-carboxipiperazina-4-il) propil-1-fosfónico). Las toxicidades debidas a domoato y cainato fueron reducidas con drogas (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona=DNQX y 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoi-benzo[*F*]quinoxalina=NBQX) que interactúan preferentemente con posiciones de enlace no receptoras de NMDA, pero que no distinguen entre diferentes posiciones de enlace de los cainatos. La recién desarrollada isatinoxima NS-102 antagonizaba selectivamente tanto

las toxicidades patológicas como de comportamiento del DA relativa al ácido canaico (Tasker *et al.*, 1996).

ratas

Se requería oralmente más de 10 veces la toxina necesaria para alcanzar los mismos efectos que con dosis i.p. Los ratones y ratas toleraban, oralmente, 30-50 mg DA/kg pc sin efectos observables (Todd, 1993).

Ratas a las que se administró oralmente DA, como extractos tóxicos de mejillón, con dosis de DA equivalente de ≥ 70 mg /kg pc, desarrollaron masticación y ataques y murieron con dosis ≥ 80 mg/kg pc. A 60 mg DA equivalentes/kg pc las ratas mostraban algunos síntomas clínicos (flacidez, cabeza apoyada en el piso e inactividad) pero no excitación. Sólo se observaron lesiones histopatológicas del sistema nervioso central a 80 mg/kg pc (Tryphonas *et al.*, 1990a). Su incapacidad de vomitar evitaba lo que parecía ser un síntoma clínico muy sensible de intoxicación por DA en seres humanos.

Las ratas se rascaban, caminaban a lo cangrejo, tenían “actitudes de oración”, pérdida de balance y ataques luego de una única dosis i.p. de 2,0-7,5 mg/kg pc de DA crudo (85 por ciento puro) (uno a cuatro animales por grupo). A 1 mg/kg pc los animales no estaban afectados. Eran evidentes lesiones histopatológicas luego de administrarles ≥ 2 mg/kg pc, en amígdalas, cortex, hipocampo, hipotálamo, sistema olfativo y retina (Tryphonas *et al.*, 1990b).

Sobotka *et al.* (1996) informan que dosis i.p. inferiores a 1 mg DA/kg pc ya producían efectos sobre el comportamiento, medibles en ratas adultas sin señales evidentes de disfunción neurológica o neuropatologías. Dosis ligeramente superiores a 1 mg/kg pc, de 1,32 mg/kg pc y 2,25 mg/kg pc, producían además de efectos, señales clínicas de neurotoxicidad y morbidez ocasional, con daños hipocampales. El DA indujo convulsiones a 2,25 mg/kg pc y afectó la función cerebral, aun con manifestaciones pasadas entre seis a ocho días, por un metabolismo alterado de los ácidos grasos y gliosis (Appel *et al.*, 1997).

En ratas adultas Sprague-Dawley se incrementaron significativamente los niveles T3 y T4 en el suero (analizados mediante inmunoensayo enzimático) al administrárseles i.p. 1 mg DA/kg pc en medio salino a los 30, 45 y 60 minutos (fin del estudio) luego de la inyección. Los niveles de T3 y T4 en el suero no disminuyeron durante los 60 minutos siguientes a la inyección. Pasados cinco minutos los animales mostraban niveles muy incrementados de TSH en el suero (analizados por radioinmunoensayo), que permanecieron elevados durante los 60 minutos posteriores a la inyección (Alfonso *et al.*, 2000).

Xi *et al.* (1997) informaron, que una inyección intraperitoneal hacía a las ratas neonatas unas 80 veces más sensibles al rascado inducido por el DA y, aproximadamente 40 veces más sensibles a ataques y efectos letales que las adultas. Las LD₅₀ i.p. para los días postnatales dos y diez eran respectivamente de 0,25 y 0,7 mg/kg pc. Mayer (2000) sostuvo que durante el neuro desarrollo en neonatos la barrera sangre-cerebro es incompleta, lo que puede explicar la mayor sensibilidad al DA.

También Doucette *et al.* (2000) informaron que el DA era una neurotoxina muy potente en ratas recién nacidas, con una potencia que progresivamente decrecía con edades mayores (ED₅₀ interpolada = 0,12; 0,15; 0,30 y 1,06 mg/kg pc al día post-natal 0, 5, 14 y 22, respectivamente).

Se compararon, los efectos inducidos con extractos de mejillones contaminados, con los inducidos por DA puro y por extractos de mejillones sin contaminar. El extracto de mejillones contaminado parecía ser la fórmula más potente, atribuido a una potenciación del efecto de excitación del DA por glutamato y aspartato; ambos amino ácidos con capacidad de excitación que se encuentran en los extractos de mejillón (Mariën, 1996).

monos

Los monos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) recibieron una única dosis oral de 0,5 a 10,0 mg DA/kg pc como extracto de mejillón o como extractos crudos o purificados de DA aislados de mejillones. Todos los animales a los que se administró estos extractos (~5,89-6,62 mg DA/kg pc) desarrollaron anorexia, salivación, arcadas, vómitos, diarrea y postración entre las dos horas y las 70 horas siguientes a la inyección. Se recuperaron todos los monos. Excepto por la diarrea y la postración, todos los monos a los que se les administró DA crudo o purificado (5 a 10 mg/kg pc) desarrollaron señales clínicas similares. Se mojaban, además, los labios y hacían sonidos con ellos, masticando en seco. Un mono al que se le administró 10 mg/kg pc de DA purificada, vomitó una hora después de la dosificación. No se apreciaron con 0,5 mg/kg pc de DA purificada señales clínicas. Se observaron lesiones histopatológicas suaves a moderadas del sistema nervioso central consistentes con neuroexcitación con dosis de 5 a 10 mg/kg pc (Tryphonas *et al.*, 1990a).

Además, Iverson y Truelove (1994) informaron que con dosis orales de 0,5 mg DA/kg pc no hubieron efectos en los monos *Cynomolgus*, pero que 5,0 mg/kg pc causaron vómitos, masticación y bostezos. Una única dosis oral de 1,0 mg DA ácido/kg pc resultó en vómitos, atoramiento y bostezos, aunque dosis únicas de 0,75 o 0,5 mg/kg pc no causaron efectos manifiestos. A 5,0 mg/kg pc oral no había evidencia de neurotoxicidad a nivel de microscopio óptico, pero sí a 10 mg/kg pc oral (Todd, 1993).

Al administrar a monos *Cynomolgus* (un animal por dosis) por vía intravenosa (i.v.) 0,025; 0,05; 0,2 o 0,5 mg/kg pc o intraperitonealmente (i.p.) 4 mg/kg pc de DA de mejillones de cultivo, las señales clínicas de neurotoxicidad fueron precedidas por un corto periodo pre-sintomático (dos a tres minutos) y un aun más corto periodo prodromal (0,5 a un minuto). El periodo sintomático estaba caracterizado por masticación persistente con babeo, diversos grados de atoramiento y vómitos. Con las dosis superiores se observaban posiciones anormales de cabeza y cuerpo, rigidez de movimientos, pérdida de balance y temblores. La duración de los síntomas dependía de la dosis. En el área postrema, en el hipotálamo y en las capas interiores de la retina se detectaron las lesiones excitotóxicas de vacuolación del neuropil, hinchazón astrocítica, contracción neuronal e hiper cromasia con una dosis i.v. de 0,5 mg/kg pc y una i.p. de 4 mg/kg pc. Podía concluirse que el DA es neuroexcitotóxico y fuertemente emético con dosis i.v. únicas de 0,025-0,2 mg/kg pc. El DA es fuertemente excitotóxico a dosis mayores (0,5 mg/kg pc i.v. y 4 mg/kg pc i.p.) (Tryphonas *et al.*, 1990c).

Administrado i.v. a dosis bajas, del orden de 12,5 µg/kg pc, indujo señales clínicas fácilmente observables en monos (respuesta tipo arcada). Sobre base mg/kg pc, este nivel es 1 000 veces menor al observado en el bioensayo en ratón usando la respuesta clínica como punto final (Iverson y Truelove, 1994).

Para evidenciar la degeneración en los cerebros de monos *Cynomolgus* a los que se les administró DA (i.v. 0-4 mg/kg pc), Schmued *et al.* (1995) aplicaron una técnica histoquímica de degeneración específica (método de de Olmos de plata cúprico). Este método revela la presencia de cuerpos celulares y de terminales neuronales en proceso de degeneración no solo en el hipocampo, sino también dentro de varias estructuras "límbicas", como el cortex entorinal, el subiculum, el cortex piriforme, el septum lateral y el núcleo lateral dorsal del tálamo. El padrón degenerativo correlacionaba generalmente con las regiones con densidades de receptores de cainatos altas. Slikker *et al.* (1998) midieron los granos de plata que continuamente proveían datos dosis-respuesta. Los autores aplicaron los enfoques histoquímico cuantitativo, seguido del de factor de seguridad (FS, en este caso con un FS 300) y del comparativo, para estimar dosis aceptables de DA. Suponiendo una absorción oral de DA del 5 por ciento y un peso del cuerpo humano de 70 kg, la dosis aceptable se lograría si los individuos ingiriesen 200 g de frutos del mar con, respectivamente, 10, 12 y 6 mg DA/kg.

toxicidad de dosis repetida

ratones

Ratones de dos cepas (respectivamente interespecie e intraespecie sensible a ataques) recibieron una o cuatro inyecciones intraperitoneales (día por medio durante siete días) con dosis sub-sintomáticas (0,5 mg/kg pc) o sintomáticas sub-letales (2,0 mg/kg pc) de DA, para investigar la posibilidad de una toxicidad incrementada (respuestas de comportamiento observables) luego de exposición repetida. Los niveles de DA en el suero no diferían con exposiciones únicas o repetidas. Ambas cepas mostraron respuestas dependientes de la concentración comparables. El estudio no proporcionó evidencias de que exposiciones reiteradas de corta duración alterasen la liberación del DA del suero o resultasen en una respuesta más sensible o más neurotóxica que una única exposición (Peng *et al.*, 1997)

Se ha demostrado dosis únicas de DA inyectadas intraperitoneales en ratones, alteran la capacidad de aprendizaje medida por las tareas del laberinto de agua de Morris y del laberinto de ocho brazos radiales. En este estudio se examinó la capacidad de memoria de trabajo espacial en una tarea diferida de identificación de muestras, posterior a las inyecciones i.p. simples y repetidas a grupos de nueve a diez ratones macho DBA que recibieron una o cuatro inyecciones intraperitoneales (con intervalos de 48 horas) de 0; 1,0 o 2,0 mg DA/kg pc, usando como vehículo una solución salina estéril tamponada con fosfato. Los animales en los grupos de una dosis recibieron tres inyecciones con el vehículo adicionales en intervalos de 48 horas. Luego de la última inyección fue evaluada la toxicidad sintomática de los ratones: hipoactividad, sedación, hiperactividad, rascado, pérdida del control de balance, temblores-convulsiones, muerte. Las clasificaciones de toxicidad mostraron ser dependientes de la dosis, que no difería después de exposiciones simples y repetidas. En los grupos con dosis única, aparece alterada la memoria de trabajo espacial en la prueba de identificación de muestras; la mayor alteración fue con la dosis única de 2,0 mg/kg pc. Esto se traduce en que los animales fueron incapaces de formar una memoria persistente durante 24 horas y por tanto incapaces de usar las experiencias del día anterior. Los grupos sometidos a exposición repetida no tuvieron un comportamiento tan pobre como los tratados con una dosis única. Esto apunta a que para las tareas de la memoria de trabajo se utilizan caminos múltiples y que los animales parecen capaces de adaptarse por procesos desconocidos luego de exposiciones repetidas al DA (Clayton *et al.*, 1999).

ratas

Tres grupos de 10 ratas macho y de 10 ratas hembra recibieron diariamente y durante 64 días, por cebado, 0; 0,1 o 5,0 mg DA/kg pc disuelto en agua. No se observaron anormalidades clínicas. La hematología, la química clínica y los pesos de los órganos no indicaron anormalidades. No presentaban particularidades la histopatológica de diversos tejidos (incluyendo ojos y cerebro) y la inmuno-histoquímica de secciones seleccionadas del hipocampo y retina. Las determinaciones de DA en la orina y heces mostraron que la absorción era de aproximadamente el 1,8 por ciento de la dosis administrada (Truelove *et al.*, 1996).

monos

Tres monos *Cynomolgus* recibieron diariamente, por cebado, 0,5 mg DA/kg pc disuelto en agua, primero por 15 días y luego por otros 15, 0,75 mg/kg pc. Pasado el periodo de tratamiento de 30 días fueron sacrificados. Se registraron el peso y el consumo de agua y alimento; se hicieron observaciones clínicas, determinaciones químicas en el suero, hematología, histopatológica de todos los principales órganos (incluyendo cerebro y retina) e inmunohistoquímica de las glial-proteínas ácidas fibrilares. Todos los parámetros estudiados permanecieron normales. Se midieron en varios puntos las concentraciones de DA en orina y suero. La absorción en monos pareció ser de 4 a 7 por ciento (comparado con 1,8 por ciento en ratas) y la vida media del plasma fue de 114,5 minutos (comparada con 21,6 minutos en ratas) (Truelove *et al.*, 1997).

reproducción/teratogenicidad

Grupos de cinco ratones CD-1, grávidos, recibieron por inyección intravenosa 0 o 0,6 mg DA/kg pc (25 por ciento de la dosis convulsiva) al día 13 de la gestación permitiéndoles tener espontáneamente las crías. Se controló la progeñe con EEG durante los días postnatales 10, 20 y 30 en busca de efectos residuales de exposición intrauterina al DA. Parecía que la excitotoxicidad hipocampal fuese inducida como consecuencia del aporte creciente de calcio neuronal por activación de los receptores de cainato. Los cambios histológicos apuntan a daños progresivos del hipocampo, aunque sin obvios ataques clínicos. La progeñe mostró umbrales de ataque significativamente reducidos ante una dosis adicional, postnatal, de DA (Dakshinamurti *et al.*, 1993).

Se administró intraperitonealmente a nueve de 15 ratas preñadas por grupo, durante los días 7 a 16 de la gestación respectivamente 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 1,75 o 2,0 mg DA/kg pc. En el día 22 de la gestación, se sacrificaron las madres y se examinaron los fetos en busca de cambios de desarrollo y anomalías viscerales. No se observaron señales de toxicidad materna hasta dosis de 1,25 mg/kg pc. Con una dosis de 2 mg/kg pc, murieron seis de nueve madres con dos dosis. Las tres madres restantes, en este nivel, abortaron luego de tres dosis. A 1,75 mg/kg pc, seis de doce madres abortaron antes de la cesárea. Se apreció a 1,0 y 0,5 mg/kg pc una reducción en fetos vivos/camada. Este efecto, sin embargo, no estaba relacionado con la dosis, ni asociado con una mayor incidencia de resorciones más fetos muertos. Se observó con 1,25 mg/kg de pc, una incidencia aumentada y estadísticamente significativa de osificación retardada del *sternbrae*, pero no se observó este efecto a ningún otro nivel. Al nivel más bajo de 0,25 mg/kg pc no se apreció toxicidad materna o fetal. No se observaron en el estudio efectos teratogénicos (Khera *et al.*, 1994).

mutagenicidad

Rogers y Boyes (1989) investigaron la mutagenicidad del DA en un ensayo mediado con hepatocitos usando fibroblastos de pulmón de hámster chino V79. Los puntos finales genéticos medidos fueron: mutación a la resistencia a la 6-tioguanina en el punto HPRT; mutación a la resistencia a la ouabaina en el punto Na⁺, K⁺-ATPase; intercambios cromátidos y frecuencia micronucleica. No se apreció citotoxicidad significativa. Ninguno de los puntos finales genéticos fue afectado significativamente por exposición al DA a niveles de dosis de 27,2 y 54,4 µg/ml con o sin activación metabólica por hepatocitos de rata recién aislados.

estudios in vitro

Un estudio *in vitro* con cardiomiocitos aislados de ratas mostró que el DA inhibió la acción del ATP extra celular, un neurotransmisor putativo que eleva la Ca²⁺ intracelular en los cardiomiocitos y que se considera regula la función cardíaca (Nijjar *et al.*, 1999)

El DA indujo la muerte de neuronas cultivadas de retina de embrión de pollo, así como la acumulación del trifosfato de isositol (ip₃) de 4 a 7x encima niveles básicos, tanto en forma de concentración, como Ca²⁺-dependiente (Duran *et al.*, 1995).

4.5.4 Toxicidad para los seres humanos

Las anécdotas señalan que en otras épocas los isleños japoneses apreciaban los extractos de algas con DA como un tónico muy útil. El alga roja *Chondria armata* con DA ha sido usada para tratar ascárides durante siglos y como insecticida (Higa y Kuniyoshi, 2000). Aparentemente se hicieron pruebas para ensayar las propiedades antihelmínticas del DA, administrándose, sin efectos perjudiciales, dosis únicas de 20 mg de pureza desconocida a adultos y niños (Iverson y Truelove, 1994).

Sin embargo, el DA es tóxico tanto para el sistema nervioso central como para el periférico. El DA es un emético que provoca arcadas y vómitos, posiblemente por su efecto sobre el centro del vómito en la zona postrema del cerebro. Produce un síndrome de neuropatía axonal sensoriomotora, amnesia, ataques, coma y muerte. Debido a su impacto sobre la memoria, entre otros efectos perjudiciales, la intoxicación ha sido llamada intoxicación amnésica por mariscos (ASP) (Todd, 1993 y Watters, 1995).

Se informaron 107 casos, en el primer brote de ASP en 1997 en la Isla Príncipe Eduardo en Canadá. Los primeros síntomas se notaron entre los 15 minutos y las 38 horas (mediana 5,5 horas) luego de consumidos los mejillones. Los síntomas más comunes eran náusea (77 por ciento), vómitos (76 por ciento), calambres abdominales (51 por ciento), dolor de cabeza (43 por ciento), diarrea (42 por ciento) y pérdida de memoria (25 por ciento). La pérdida de memoria y la edad correlacionaban bien; aquellos con menos de 40 años eran más susceptibles a diarreas y los mayores de 50 años a pérdida de memoria. La pérdida de memoria era fundamentalmente de corto plazo. Los más seriamente enfermos fueron hospitalizados, 12 de ellos en unidades de cuidado intensivo (UCI). Ocho de ellos eran mayores de 65 años y los otros cuatro tenían enfermedades anteriores (diabetes, problemas renales crónicos o hipertensión). Los pacientes en UCI presentaron confusión, coma, mutismo, ataques, movimientos de masticación, muecas, hipo, falta de respuesta a estímulos dolorosos, llanto descontrolado o agresividad, profusa secreción respiratoria, y presión sanguínea inestable o arritmias cardíacas. Catorce pacientes mostraron persistentes defectos neurológicos. Se notaron en varios de ellos problemas en los ojos, incluyendo miradas disconjugadas, diplopia y oftalmoplegea, los que se resolvieron en 10 días (Todd, 1993). Sufrían además ataques, mioclonus, déficit de memoria anterior, metabolismo de la glucosa disminuido en los lóbulos temporales mediales bajo escaneo con tomografía de emisión de positrones (PET), y cambios EMG de axonopatías motoras puras o sensorimotoras. Cuatro de los 14 pacientes permanecieron en coma y fallecieron. La autopsia reveló necrosis y pérdidas neuronales, básicamente en el hipocampo y amígdalas (Teitelbaum *et al.*, 1990). Las cantidades de DA consumidas, iban de 15 a 20 mg/persona para un individuo no afectado a 295 mg/persona para un caso con síntomas neurológicos severos. Suponiendo un peso promedio de 50 a 70 kg la persona de sexo masculino no afectada ingirió 0,2-0,3 mg DA/kg pc. Algunas personas mostraron síntomas leves (principalmente gastrointestinales) después de consumir 60 a 110 mg de DA, equivalente de 0,9 a 2,0 mg/kg pc. Los casos más serios (déficit neurológico severo) consumieron de 135 a 295 mg, equivalentes de 1,9 a 4,2 mg DA/kg pc (Todd, 1993).

Se desconocen los efectos debidos a la exposición de largo plazo en seres humanos a concentraciones bajas de DA en mejillones o peces (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Un hombre de 84 años presentó un cuadro epiléptico seguido a una intoxicación aguda con DA. Luego de un año “silencioso”, desarrolló epilepsia temporal del lóbulo. Tres años después falleció de pulmonía. La autopsia mostró esclerosis bilateral severa del hipocampo. Esto indicó que el hipocampo humano es vulnerable a excitotoxicidad por receptores cainato (Cendes *et al.*, 1995).

4.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

En un estudio de laboratorio, el DA resultó tóxico para el copépodo marino (*Tigriopus californicus*) a concentraciones bajas. La LC_{50} (24 horas) resultó ser de 8,62 μ M (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). En el otoño de 1993, tuvo lugar en la Bahía de Fundy en Canadá una mortalidad inexplicada de vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*). La glándula digestiva de los vieiras parecía contener 93,4 μ g DA/g. Aunque se ha informado que algunos moluscos bivalvos contienen niveles altos de DA sin ningún síntoma, *Chlamys hastata* murió rápidamente, dentro de las 12 horas, luego de la exposición a cultivos de *P. multiseriis* tóxica (Douglas *et al.*, 1997).

Chlamys hastata podría originar la toxicidad en cangrejos. Las vieiras nadadoras *Chlamys hastata*, al exponerse al DA alimentándolos con *Pseudo-nitzschia multiseriis*, perdió respuestas motoras o de fuga resultando presa fácil para depredadores como los cangrejos (Whyte *et al.*, 1997).

En un estudio de laboratorio, se alimentaron vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*) con *P. multiseriis* con una alto tenor de DA (4-6,6 pg/célula) por 22 días, seguido de 14 días de alimentación con microalgas no tóxicas. No se observaron en este estudio signos de enfermedad o mortalidad a pesar de la fuerte carga de DA. Sin embargo, el muestreo destructivo de las vieiras no permitió evaluar los efectos de largo plazo (Douglas *et al.*, 1997).

Se investigaron los efectos fisiológicos del DA en los invertebrados marinos, ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y mejillón de California (*Mytilus californianus*), conocidos por acumular esta neurotoxina. Las ostras y los mejillones se expusieron continuamente por 48 horas a la diatomea productora de DA *P. pungens* f. *multiseriis*, seguidos de un periodo de liberación de 120 horas. La ostra del Pacífico acumuló rápidamente cargas de DA en tejidos suaves, resultantes en una respuesta de estrés generalizada por el cierre de la caparazón cuatro horas después de introducir las algas, acidosis hemolínfica e hipoxia transitoria aguda. El mejillón de California pareció incrementar su flujo ventilatorio resultante en una suave alcalosis respiratoria no compensada (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

El DA en *Pseudo-nitzschia multiseriis* inhibió la alimentación del rotífero, *Brachionus plicatilis*, con una condición nutricional posterior reducida y pérdida de fecundidad (Whyte *et al.*, 1997).

Más de 400 leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) murieron a lo largo de la costa central de California durante mayo y junio de 1998. Fue identificado como el posible agente causante el DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos por las anchoas planctónicas del norte (*Engraulis mordax*) (Levebvre *et al.*, 1999).

4.5.6 Toxicidad en aves acuáticas

En setiembre de 1991 murieron en la Bahía de Monterrey, California aves acuáticas (pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*)) después de consumir anchoas (*Engraulis mordax*) contaminadas con DA (Horner *et al.*, 1997). En enero de 1996 murieron pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) en el Cabo San Lucas en el extremo de la Península de Baja California, México. La muerte de estas por alimentarse con caballa (*Scomber japonicus*) contaminada por el productor de DA *Pseudo-nitzschia* spp. (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

4.6 Prevención de la intoxicación por ASP

4.6.1 Depuración

No se han diseñado aun métodos útiles para reducir eficazmente las ficotoxinas en mariscos contaminados. Todos han resultado poco seguros, muy lentos, económicamente inviables o en productos inaceptables por su aspecto y gusto (Shumway *et al.*, 1995). Se ha informado que las almejas absorbieron rápidamente el DA, depurándolo también con rapidez, en tanto otros bivalvos lo retuvieron por periodos más prolongados. La depuración del DA por navajuelas es un proceso largo (Horner *et al.*, 1997). La depuración del DA de almejas y almejas privadas de alimento fue relativamente rápida (43 a 15 µg/g a 13 °C en 24 horas, con trazas remanentes por hasta seis días en la Bahía Passamaquaddy, Canadá, y 130 a 20 µg/g a 15 °C en cuatro a seis días en el río Cardigan, Canadá). La depuración completa, sin embargo, puede llevar más tiempo en el hábitat natural. La concentración de DA en la zona de la Bahía Cardigan, al este de la Isla Príncipe Eduardo, descendió a niveles despreciables entre los 40 y 50 días (Todd, 1993).

Las vieiras enteras (*Pecten maximus*) con carne contaminada con DA, mostraron una disminución del 43 por ciento (mayormente en el hepatopáncreas) del DA total pasados 180 días de almacenamiento congelado (-20 °C). Durante el almacenamiento, hubo transferencia de DA del hepatopáncreas al resto del cuerpo, con disminución neta en todo el producto. No continuaron disminuyendo el contenido de DA, el encurtido posterior de la carne o el envasado en salmuera y enlatado. Durante el enlatado hubo una notoria transferencia de toxina de las vieiras a la salmuera o al medio de encurtido (más del 30 por ciento del total de DA en el producto enlatado) (Leira *et al.*, 1998). Se ha informado que las vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*) y mejillones rojos (*Modiolus modiolus*) retienen el DA por periodos prolongados (Stewart *et al.*, 1998). Se encontró que el nivel de DA en la glándula digestiva de vieiras marinas era sólo ligeramente inferior al cabo del estudio de depuración de 19 meses que a su inicio (Stewart *et al.*, 1998). Cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) acumularon la toxina principalmente en las vísceras, aunque, de no habérselos eviscerados previamente, puede penetrar en

la carne durante la cocción (Villac *et al.*, 1993a). Cuando se cocinaron cangrejos enteros contaminados (22 µg DA/g confinados al hepatopáncreas) en agua limpia o salada, el DA de las vísceras se redujo entre el 67 al 71 por ciento. Luego de cocidos, el DA se detectó en el hepatopáncreas (6,4 µg/g) y en carnes del cuerpo (1,9 µg/g) y pata (1,1 µg/g). La mayor parte del DA se extrajo y se diluyó en el agua usada para la cocción. Al permanecer los cangrejos cocidos entre uno a seis días a 1 °C, se detectó DA en el hepatopáncreas (6,1 a 8,2 µg/g) y en carnes del cuerpo, pero no en la de las patas. Las carnes del cuerpo vecinas a las vísceras tenían niveles más elevados de DA (1,5 a 2,1 µg/g) que las distales (0,57 a 0,92). Al mantenerse los cangrejos cocidos por 90 días a -23 °C, se detectó DA en las vísceras (7,6 µg/g), carnes del cuerpo (0,67 a 0,79 µg/g) y pata (0,38 µg/g). Las condiciones de almacenamiento de los cangrejos cocidos de alguna manera afectaron la distribución, pero no el contenido total de DA en cada cangrejo (Hatfield *et al.*, 1995).

En estudios de laboratorio, Lund *et al.* (1997) demostraron que el DA era depurado eficazmente del hepatopáncreas de cangrejos Dungeness en tres semanas, una vez dejado de alimentar con carne de almeja contaminada. La depuración progresó más rápidamente cuando se alimentaron los cangrejos con carne de almeja libre de toxinas que cuando se los mantuvo sin alimento.

Los estudios de depuración con cangrejos Dungeness de la costa oeste de Canadá, indican que si los cangrejos se colocaban en agua de mar filtrada, los niveles de DA caían rápidamente en pocas semanas, aunque en jaulas con aguas del puerto (sin acceso a mariscos contaminados), los tenores de DA fluctuaban, pero no descendían (Todd, 1993).

Arévalo *et al.* (1998) informaron que la disminución media en la toxicidad era del 94 por ciento, (variando entre 82,3 a 100 por ciento), para muestras estándar del tejido completo de *Pecten maximus*, (homogeneizadas de 100 g de tejido total), luego de retirado el hepatopáncreas.

4.6.2 Medidas preventivas

Las floraciones tóxicas afectan adversa y a menudo imprevisiblemente las zonas de cosecha comerciales y la infraestructura de acuicultura. Un problema, es que algunas especies de algas, nunca antes habían estado presentes en una zona, pueden aparecer súbitamente causando dificultades con rapidez. Las medidas preventivas son, por tanto, difíciles de adoptar. Será necesario para prevenir incidentes de contaminación de mariscos y peces, una extensa vigilancia del ambiente marino y de los productos pesqueros posiblemente contaminados, unido a reglamentos (ver Capítulo 4.8). Las informaciones sobre la presencia de especies de algas tóxicas pueden indicar que toxinas son de esperar en periodos de floraciones de algas y que productos pesqueros debieran someterse a un control analítico. Para productos domésticos, varios países detienen su cosecha si los niveles de toxinas superan los límites, con un tiempo de espera que permita a las concentraciones situarse por debajo del nivel de aceptación (Shumway *et al.*, 1995). La producción de DA, dentro del género *Pseudo-nitzschia*, puede variar mucho con la especie, siendo vital poder distinguir entre especies (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Las concentraciones de toxina en productos pesqueros pueden variar también con la especie y con la zona de cosecha. Habitualmente se destruyen los productos cosechados con tenores de toxinas elevados. Las dosis tóxicas se estiman a menudo, de restos de frutos del mar, los que pueden no ser siempre representativos de los alimentos ingeridos (Shumway *et al.*, 1995).

El análisis directo del DA en muestras de fitoplancton seguirá siendo probablemente el método mas confiable para confirmar la presencia de DA (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Aunque se ha enfatizado frecuentemente la necesidad de vigilar rutinariamente el fitoplancton, sólo se ha implementado en unas pocas zonas (Horner *et al.*, 1997).

Resulta relativamente fácil identificar por microscopía común *Pseudo-nitzschia* en mezclas de plancton. Es sin embargo difícil y lleva tiempo, la identificación y enumeración en poblaciones naturales, de diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* al ser necesarias observaciones morfológicas detalladas que frecuentemente requieren microscopía electrónica de barrido o transmisión. Se

desarrollaron, en consecuencia, grandes sensores del tipo subunidad ribosomal RNA (LSU rRNA)-marcados con DNA fluorescente para distinguir entre una variedad de especies de *Pseudo-nitzschia*, a.o. colecciones de la Bahía de Monterey, California. Los sensores se aplicaron utilizando tanto técnicas de célula entera como de hibridización sandwich (Miller y Scholin, 1998, 2000; Parsons *et al.*, 1999; Scholin *et al.*, 1997, 1999).

En Nueva Zelanda, se identificaron especies de *Pseudo-nitzschia* tóxicas con lectinas FITC-conjugadas. Se ha demostrado que la unión de lectinas FITC-conjugadas a azúcares específicos permite distinguir adecuadamente entre algunas especies de microalgas. La unión diferencial de las distintas lectinas FITC-conjugadas permitió discriminar aislados de especies neozelandesas de *P. multiseriata*, *P. pungens* y *P. australis* empleando microscopía de epifluorescencia, que no permitió, sin embargo, discriminar entre *P. delicatissima* o *P. pseudodelicatissima*. Los resultados eran distintos de los informados para especies de *Pseudo-nitzschia* en aguas gallegas (España) apuntando a una variabilidad en la producción de azúcares superficiales por aquellas diatomeas dependientes del origen geográfico y/o de las condiciones ambientales. En consecuencia, aun se prefieren los sensores RNA ribosomales- oligonucleótidos marcados como método para identificación de especies de *Pseudo-nitzschia* (Rhodes, 1998).

La vigilancia de mariscos entre mareas puede no ser un método particularmente sensible para detectar niveles bajos, pero significativos, de DA en plancton, dejando pasar todos excepto los eventos más extremos (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Esto es motivado por diferencias en la absorción y depuración en especies de mariscos. Se ha informado, por ejemplo, que las almejas, absorben el DA rápidamente, depurándolo también velozmente, en tanto que otros bivalvos retienen el DA por periodos más prolongados. La depuración del DA por navajuelas es un proceso largo (Horner *et al.*, 1997). Sin embargo, Whyte *et al.* (1997) sostienen que los estudios de absorción y depuración de DA por el mejillón *Mytilus californianus* han demostrado que esta especie era adecuada como organismo sentinela en un programa semanal de ensayos, a pesar de la eliminación relativamente rápida que hace del DA.

4.7 Casos y brotes de ASP

4.7.1 Europa

La Figura 4.2 ilustra la presencia de toxinas ASP en aguas costeras europeas.

Bélgica

Durante 2000 y 2001, se analizó ASP en 151 y 154 muestras respectivamente. No se detectaron episodios tóxicos en mariscos producidos en Bélgica (EU-NRL, 2001).

Dinamarca

Investigaciones realizadas en aguas danesas han demostrado que *P. seriata*, una especie ampliamente distribuida en las zonas más frías del hemisferio norte, produjo DA en concentraciones similares a las encontradas en Canadá con *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* (1-20 pg/célula). La encuesta, encontró en aguas danesas, cinco especies y una subespecie de *Pseudo-nitzschia*: *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. pungens* f. *multiseriata* y *P. seriata*. Los aislados de *P. seriata* parecían contener DA. No había DA en aislados de otras tres especies de *Pseudo-nitzschia* detectadas por esta encuesta, *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* y *P. pungens*. *P. seriata* es una de las especies más comunes de *Pseudo-nitzschia* en el Atlántico norte. Estos datos apoyan la idea de que en la misma especie de diatomea coexisten cepas tóxicas y no tóxicas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Una floración importante fue detectada en 1992, causada por *P. pseudodelicatissima* (alrededor de 16×10^6 células/litro). No se detectó DA. Otra floración, en 1993, con una menor densidad (unas 5×10^5 células/litro) presentaba concentraciones pequeñas de DA (EU-NRL, 1996).

Francia

Se encontraron, en la costa francesa en mayo de 2000, niveles de DA en *Donax trunculus* superiores a los límites reglamentarios (27 a 53 µg/g (occidente de Bretaña). Las especies de algas responsables eran *P. pseudodelicatissima* y *P. multiseriis* (Amzil *et al.*, 2001). En 2002, se observó, a fines de abril y comienzos de mayo, un episodio sobre una zona de la costa del Mediterráneo de corta duración. Los niveles de toxina eran menores a 50 µg DA/g de carne (EU-NRL, 2002).

Irlanda

Se encontraron en Irlanda concentraciones muy elevadas de DA, hasta 3000 µg/g en el hepatopáncreas de vieiras, en diciembre de 1999. El DA estaba presente en todas las zonas de producción de las costas irlandesas. No se encontró DA en otras especies (EU-NRL, 2000).

Se analizaron, respectivamente, 738 y 500 muestras en 2000 y 2001 buscando toxinas ASP. En el 83 por ciento de los hepatopancreas de las vieiras se encontraron toxinas ASP por encima del límite reglamentario, pero sólo 8 por ciento y 1 por ciento, respectivamente, en las gónadas y el músculo aductor (EU-NRL, 2001). En 2002 se hicieron 620 análisis de ASP. Se encontraron por primera vez, niveles de toxina ASP superiores a los límites reglamentarios en almejas de una zona de producción al noroeste de Irlanda. Las toxinas ASP, en las muestras de vieira, se hallaron en diversos lugares. El nivel máximo de DA en el músculo aductor era de 33,8 µg/g con un 2 por ciento de las muestras de músculo aductor con niveles de DA superiores a los límites reglamentarios. El tenor máximo de A en la gónada era de 79,9 µg/g y un 10 por ciento de las muestras de gónadas tenían niveles de DA superiores a los límites reglamentarios. El nivel máximo en el tejido total era de 574 µg/g y el 31,7 por ciento del total de las muestras de tejido total mostraban niveles superiores de DA a los límites reglamentarios (EU-NRL, 2002).

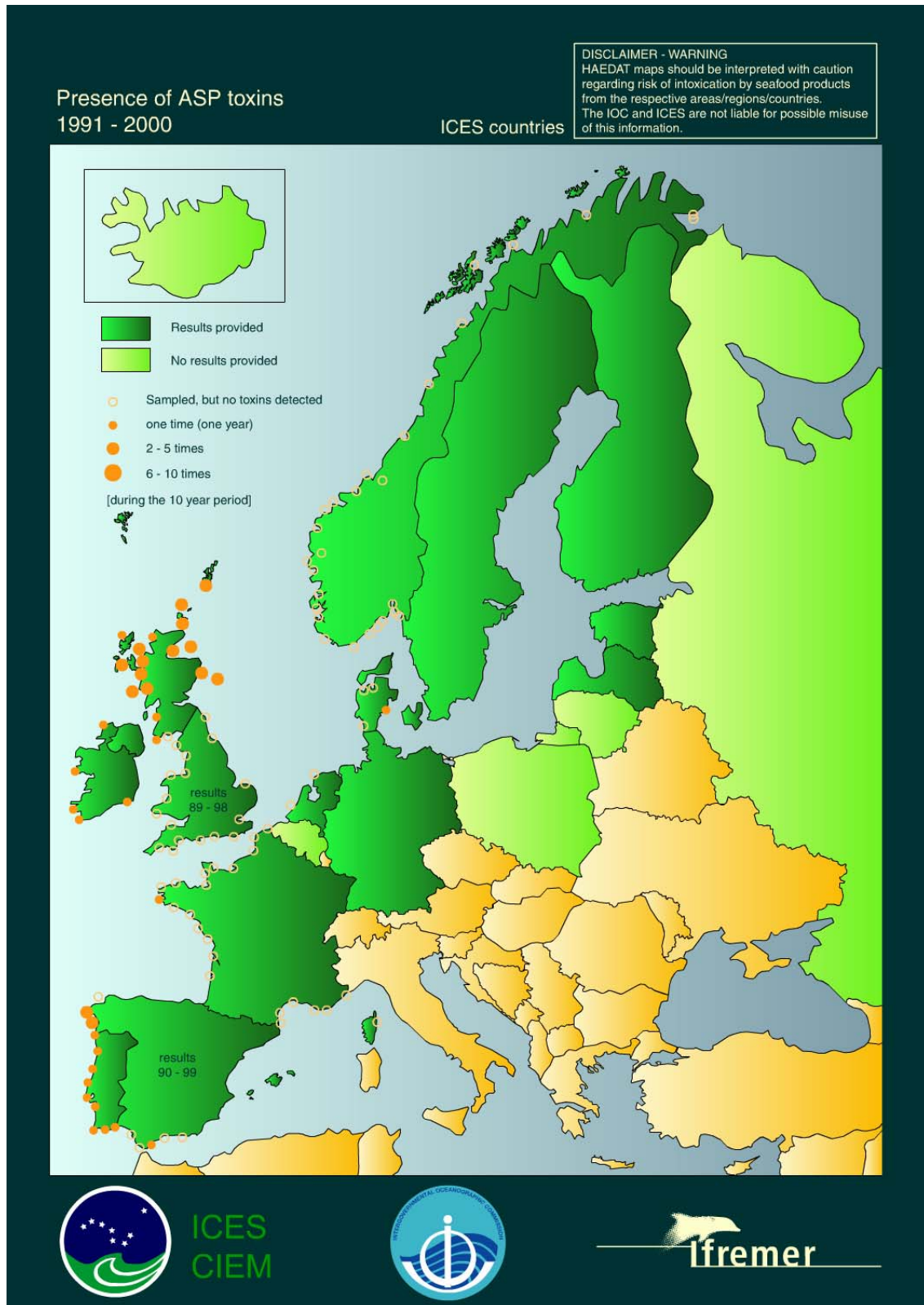
Italia

Ocasionalmente aparecen concentraciones altas (hasta 4×10^6 células/litro) de especies *Pseudo-nitzschia* (*delicatissima* y *pseudodelicatissima*) en el Golfo de Nápoles (Montesor *et al.*, 2000). Se encontró en julio de 2002, DA superior a los límites reglamentarios en *Pecten maximus* de Escocia (EU-NRL, 2002).

Países Bajos

En el Mar de Wadden holandés, entre noviembre de 1993 y julio de 1994 se encontraron especies de diatomeas del tipo *Pseudo-nitzschia*, formadoras de cadenas con cantidad de células entre 10^2 y 10^5 por litro. La microscopía electrónica de aislados cultivados y de muestras de campo mostraron que la mayoría pertenecía a *Pseudo-nitzschia pungens*. A comienzos de junio de 1994 se encontraba presente también, *P. fraudulenta* y ocasionalmente *P. delicatissima*. Un aislado mostraba la morfología característica de *P. multiseriis*. El aislado de *P. multiseriis* produjo DA; se encontraron 19 pg/célula luego de 55 días de crecimiento. La especie *Pseudo-nitzschia* encontrada en aguas costeras holandesas no ha sido aun relacionada con intoxicaciones por mariscos (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). En 2001, se encontraron algas productoras de DA, aunque no toxinas ASP, en mariscos (EU-NRL, 2001). Una única muestra de *Spisula*, en la primavera de 2002, contenía hasta 5 mg DA/kg (método CL-UV). No se encontró DA en un nuevo muestreo realizado tres días después DA (EU-NRL, 2002).

Figura 4.2 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Noruega

No se ha informado de brotes de ASP a pesar de la gran abundancia de especies de *Pseudo-nitzschia* (EU-NRL, 1998). Se detectó DA, en 2000 y 2001, en mejillones y vieiras, aunque nunca por encima del límite reglamentario, aun durante una floración de *Pseudo-nitzschia* (>4 000 000 células/litro) (EU-NRL, 2001).

Portugal

En 1996, se encontró DA en cantidades muy pequeñas (<20 µg/g) en casi todas las especies de bivalvos a lo largo de toda la costa portuguesa, por periodos cortos y espaciados, coincidiendo con la aparición de *Pseudo-nitzschia* spp., principalmente *P. australis* en concentraciones por debajo de 10⁵ células/litro. En 1995, en chione liso de Callista (*Callista chione*), se encontró por primera vez DA en bivalvos por encima de 20 µg/g (EU-NRL, 1998). En 1999, se analizaron un total de 960 muestras buscando toxinas ASP. El DA se detectó en 102 muestras, superándose sólo en dos el límite reglamentario (EU-NRL, 2000). En 2000 y 2001, se encontró DA en vieiras de pesquerías naturales (EU-NRL, 2001). El DA, es en los mariscos portugueses un suceso recurrente que afecta diversos recursos varias veces al año, fundamentalmente en primavera y otoño. Son frecuentes niveles dos veces superiores al límite reglamentario. Cunado varias especies de mariscos se explotan en la misma zona restringida, se encuentran entre las más tóxicas el berberecho común (*Cerastoderma edule*), un tipo de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), surco de Peppery, almeja, mejillón, ostra y navajuela. En las sardinas enteras, el DA se detectó en niveles que ocasionalmente superan el límite reglamentario. Afortunadamente, la toxicidad se limita a los intestinos, no acumulándose en el tejido muscular (Vale y De Sampayo, 2001)

España

Se encontró, en octubre de 1994, por primera vez DA en almejas de cultivo (≤ 20µg/g) en Galicia noroeste de España, en coincidencia con una floración de *P. australis*. Otras cuatro, en aguas gallegas, *Pseudo-nitzschia* spp. (*P. fraudulenta*, *P. cuspidata*, *P. pungens*, *P. delicatissima*) eran de cultivo y no produjeron DA. Otras especies identificadas en estas aguas, aunque no aun cultivadas eran *P. multiseriis*, *P. subpacifica* y *P. pseudodelicatissima* (Fraga et al., 1998). Nuevamente se detectó DA en abril de 1995, en almejas (> 20 µg/g) (en las rías gallegas) coincidentemente con la aparición de *Pseudo-nitzschia australis*. Se encontró DA en almejas coincidiendo con la aparición de *Pseudo-nitzschia* spp, en agosto y octubre de 1995 y, en setiembre y noviembre de 1996 en las rías gallegas. En 1996 las almejas se detoxificaron rápidamente.

Desde setiembre a diciembre de 1995 y durante todo 1996, se encontró DA en vieiras (rías gallegas) en coincidencia con la aparición de *Pseudo-nitzschia* spp. Tuvo lugar una detoxificación lenta.

Se ha informado que unos pocos sucesos fueron muy virulentos, produciendo niveles de toxinas en mejillones y otros mariscos cercanos al valor guía y presentándose habitualmente en zonas restringidas. Desde 1995, está prohibida la cosecha de vieiras en la mayoría de las zonas de Galicia por la presencia de toxinas ASP (EU-NRL, 1998).

Se hicieron en 1999, 4 953 análisis de ASP por CL. En 1999, hubieron diferentes sucesos tóxicos que fueron vinculados con a.o toxinas. Esto determinó la prohibición de cosechar bivalvos en algunas de las zonas de producción (EU-NRL, 2000). En 2000 y 2001, hubieron muchos cierres por la presencia de toxinas DSP y ASP (EU-NRL, 2001). Ocurrieron en 2002, episodios tóxicos causados por ASP en Galicia y Andalucía (salvo las vieiras). Las zonas de producción fueron cerradas por la presencia de *Pseudo-nitzschia* spp. (EU-NRL, 2002).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Se encontraron por primera vez en 1997, trazas de DA en Escocia (Shetland). No hubo detalles disponibles (EU-NRL, 1998). En julio de 1999, se cerró como consecuencia de la aparición de toxinas ASP, una zona de pesca de vieira de 8 000 millas cuadradas en la costa oeste de Escocia (Wyatt, 1999). Se encontró que *P. australis* originó en 1999 y en 2000 la presencia de DA en *Pecten maximus* y *Chlamys opercularis* (Bates, 2000). El principal suceso tóxico de 1999 fue el cierre de 8 000 km² de zonas de pesca de vieiras al encontrarse DA. En almejas se encontraron niveles bajos de DA, que alcanzaron valores de hasta 250 µg/g en las gónadas de vieira y de hasta 500 µg/g en el tejido total (EU-NRL, 2000). Se encontraron en 2000 y 2001, toxinas ASP por encima del límite reglamentario en vieiras enteras y en tejido de gónadas de vieira provenientes de todas las principales zonas de pesca de vieiras escocesas. Se fijaron restricciones a las actividades pesqueras en todas las zonas afectadas (EU-NRL, 2001).

En el periodo del 1 de abril de 2002 al 31 de marzo de 2003, se examinaron mariscos de 76 zonas de producción cercanas a la costa, de 36 zonas secundarias y zonas pesqueras próximas a la costa en Escocia. Se analizaron un total de 5 409 muestras de moluscos. De este total, se analizó ASP en 2 788 muestras, encontrándose positivas 115 (Anonymous, 2003c).

Se encontraron en vieiras en 2001, en Irlanda del Norte, toxinas ASP que superaban el límite reglamentario (EU-NRL, 2001). La Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido, seguidamente anunció una veda para la pesca de vieiras en el mar adyacente a Irlanda del Norte (Anonymous, 2001a).

4.7.2 América del Norte

La Figura 4.3 ilustra la presencia de toxinas ASP en aguas costeras norteamericanas.

Canadá

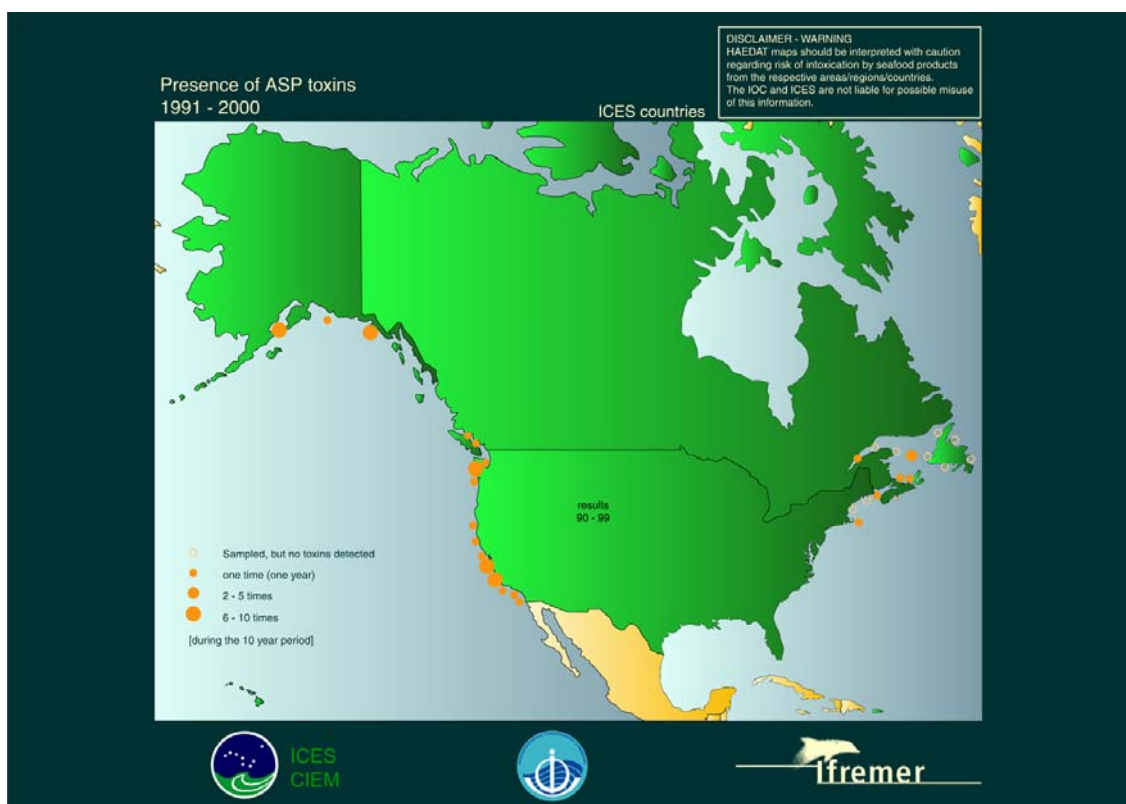
El primer informe de ASP en Canadá es de 1987. Un brote de intoxicación alimentaria en noviembre y diciembre de 1987 pudo rastrearse a cholgas de cultivo (*Mytilus edulis*) de la región de la Bahía Cardian en la Isla Príncipe Eduardo, al este de Canadá. Como consecuencia de ingerir almejas de la zona se registraron tres muertes y 105 casos confirmados de intoxicación aguda. La toxina fue identificada como DA y el organismo fuente pareció ser la diatomea emplumada *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*. Una floración de plancton coincidente con el brote, estaba formada casi únicamente por esta diatomea, encontrándose una correlación positiva entre la cantidad de células de *P. pungens* f. *multiseries* y la concentración de DA en el plancton. Este suceso tóxico causado por mariscos fue el primer brote conocido de intoxicación humana debida a ingestión de DA (Bates *et al.*, 1989). Se desconoce si antes de 1987 había aparecido la ASP, pero antes de 1980, la industria de las almejas estaba en su infancia. Un incidente tuvo sin embargo, lugar en 1984 en Calgary, Alberta, en el que 12 personas que habían ingerido almejas de la Isla Príncipe Eduardo presentaron vómitos, diarrea y visión borrosa entre la hora y media y tres horas después; persistiendo los síntomas entre uno y siete días. No se identificó ningún agente etiológico (Todd, 1993). En los años posteriores al incidente de 1987, las floraciones fueron menos intensas. Sólo en otoño, los niveles de DA en mariscos a veces alcanzaron el valor guía de cierre por un periodo corto de las zonas de cosecha. En octubre de 1991, se registró una floración limitada al norte de la Isla Príncipe Eduardo (Todd, 1997).

Desde 1988, se han recogido muestras de fitoplancton en cuatro estaciones al occidente de la Bahía de Fundy. Las floraciones de *P. pseudodelicatissima* en esta bahía suelen presentarse a fines del verano, con las concentraciones observadas más altas en 1988 y 1995 a fines de agosto y comienzos de setiembre (> 1.0x10⁶ células/litro), provocando el cierre de las zonas de cosecha mariscos (Martin *et al.*, 2001).

Se detectaron en un tipo de almejas (*Mya arenaria*) y cholgas (*Mytilus edulis*), provenientes del sudoeste de la Bahía de Fundy, New Brunswick, durante agosto a octubre de 1988, niveles de DA mayores que los aceptables para consumo humano (20 µg/g) determinando el cierre de algunas zonas de cosecha de mariscos. Se encontró que *P. pseudodelicatissima* era el origen del DA, detectándose en todo el plancton recogido (recogidos desde 1987). Durante todo el año se encontró *P. pseudodelicatissima* con concentraciones mayores en junio/julio, seguidas por las más elevadas concentraciones en setiembre, cuando las temperaturas del agua eran elevadas. La mayor concentración de *P. pseudo-delicatissima* (1.2×10^6 células/litro) fue medida en 1988 persistiendo en la columna de agua por un periodo mayor que en 1987, 1989 y 1990. El análisis de los nutrientes (clorofila a, salinidad, nitrato, fosfato, silicato superficial, a 10 y a 1 m por encima del fondo; medido, sin embargo, durante 1989 y 1990 pero no en 1988) no indicó una correlación evidente entre *P. pseudodelicatissima* y las concentraciones de nutriente (Martin *et al.*, 1993).

No se encontró DA en los músculos aductores de vieiras marinas próximas a la costa de Georges Bank, Browns Bank y la Bahía de Fundy, aunque en las glándulas digestivas, rutinariamente se encontraban cantidades importantes (10-200 µg/g). Solamente estaban disponibles para la venta los músculos aductores por contener habitualmente las glándulas digestivas toxinas paralíticas (PSP). En abril y mayo de 1995, un tipo de vieiras de Georges Bank tenían niveles de DA en sus glándulas digestivas por encima de 1 300 µg/g y de hasta 150 µg/g en las huevas, mientras las vieiras de Brown Bank contaban con más de 2 500 µg/g en sus glándulas digestivas. El valor individual más alto registrado en Brown Banks fue de 4 300 µg/g de glándula digestiva de vieiras en 1995. No se ha descubierto la fuente del DA en el episodio de 1995 (Stewart *et al.*, 1998). En setiembre de 2000, se hallaron almejas contaminados con DA en la costa este (Mos, 2001).

Figura 4.3 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Estados Unidos de América

Alaska

En Alaska, no han habido problemas severos con el DA, aunque se haya identificado el *Pseudo-nitzschia* spp, potencialmente tóxico en sus aguas. Se han ensayado, aproximadamente desde 1992, 3 000 muestras, básicamente de mariscos y peces de escama con valor comercial. El mayor valor de DA fue de 11,1 µg/g (para una navajuela) con sólo 17 valores superiores a 2 µg/g (Horner *et al.*, 1997)

Costa Oeste

A fines de octubre y en noviembre de 1991, los navajuelas (*Siliqua patula*) que habitaban en la zona de oleaje de las playas costeras sobre el Pacífico en Washington y Oregon contenían niveles de DA del orden de 154 µg/g (peso mojado) en sus partes comestibles (pie, sifón y manto). En consecuencia se prohibió la cosecha comercial y deportiva de las almejas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Se informaron veinticuatro casos de seres humanos enfermos en el estado de Washington con síntomas gastrointestinales leves y un caso de falta de memoria, aunque nunca se confirmó la presencia de ASP. Los niveles de DA estaban aun por encima del valor de clausura de cosecha de 20 µg/g, al menos hasta mayo de 1992. Nunca se volvieron tóxicos otros mariscos del tipo molusco, incluso ostras comerciales en bahías costeras y almejas (Horner *et al.*, 1997).

Seguidamente, se encontró DA en las vísceras de cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) en aguas costeras de California, Oregon y Washington. Como consecuencia, esta importante pesquería comercial fue cerrada por varias semanas mientras los investigadores decidían la limpieza correcta de los cangrejos antes que por cocción la carne comestible se mantenga libre DA (Horner y Postel, 1993). No se ha determinado la fuente de DA en navajuelas y cangrejos Dungeness en estos incidentes (Horner *et al.*, 1997).

Trainer *et al.* (1998b) sugirieron que *P. pungens* puede ser la especie responsable, al menos en parte, de la acumulación de DA en navajuelas a niveles por encima de 20 µg/g en aguas costeras del estado de Washington en 1991. Como los navajuelas depuran el DA lentamente de sus tejidos, la exposición crónica a niveles bajos de DA puede alcanzar para su acumulación.

En el Canal Hood, en el occidente de Washington en el otoño de 1994, persistió por más de seis semanas una floración de *P. pungens*, *P. multiseriis* y *P. australis*. Las almejas, organismo sentinela es este estado para las toxinas de algas, contenían aproximadamente 10 µg DA/g (peso mojado) y el fitoplancton alrededor de 14 µg/g (peso mojado), (Horner *et al.*, 1997).

En julio y agosto de 1997 se observó una floración de *Pseudo-nitzschia* spp. en Penn Cove, Washington. Se midieron niveles de DA en las almejas de hasta 3 µg/g. en el agua de mar, los niveles de DA iban desde 0,1 a 0,8 µg/L. se detectaron cuatro especies de *Pseudo-nitzschia*, a saber *P. pungens*, *P. multiseriis*, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima*. La mayor concentración de *Pseudo-nitzschia* fue de 13×10^6 células/litro el 28 de julio de 1997 (Trainer *et al.*, 1998a).

En el otoño de 1998, los niveles elevados de DA clausuraron la recolección de navajuelas a lo largo de la costa de Washington. En abril de 2001, un pico en los niveles de toxinas marinas determinó la suspensión de la recolección de navajuelas en la zona de Twin Harbours, aunque cedió lo suficiente como para reasumirla en un mes. En octubre de 2002, las tres playas oceánicas al norte de Grays Harbour, Washington, que se pensaba abrirían a comienzos de octubre, permanecieron cerradas hasta nuevo aviso al detectarse DA en navajuelas por encima de la norma federal de 20 µg/g (Ayres, 2002). A fines de diciembre de 2002, los niveles de toxinas habían disminuido, aunque seguían por encima de 20 µg/g. Esto quiere decir que la recolección de navajuelas no se permitió en las playas de Washington durante la estación, hasta la primavera de 2003 (Ayres, 2003).

A comienzos de setiembre de 1991 (18 al 27 de setiembre de 1991), murieron o experimentaron síntomas neurológicos poco frecuentes más de 100 pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*) en la Bahía de Monterey, California Central, atribuidos a la neurotoxina DA. La fuente fue una floración de la diatomea emplumada *P. australis* (Horner *et al.*, 1997).

Los niveles de DA en las aguas costeras durante el pico de este incidente, eran de 10 µg/l, con *P. australis* en exceso de 10⁶/litro. En el *P. australis* se encontraron aproximadamente 100 µg DA/g (peso mojado). Se encontraron en los contenidos estomacales de las aves afectadas restos de frústulas de *P. australis* y niveles altos de DA (40-50 µg/g). Se encontró DA en las vísceras (hasta 190 µg/g) y en la carne (hasta 40 µg/g) de anchoas locales, una de las principales fuentes de alimento de las aves marinas. Algunos autores informan contenidos de DA en las vísceras de las anchoas de hasta 485 µg/g (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

En el otoño de 1991, además de *P. australis* en la Bahía de Monterey, California, había presente otros *Pseudo-nitzschia* spp. En diversos lugares de la costa oeste de los EEUU, desde California del Sur hasta la desembocadura del Río Columbia (Newport, Coos Bay, Ilwaco). En el otoño de 1992, además del *P. australis*, estaban presentes en la Bahía de Monterey otros *Pseudo-nitzschia* spp. (*P. delicatissima*, *P. pungens* f. *multiseries* y *P. pseudodelicatissima*) productores potenciales de DA, aunque no se informó de ningún brote del mismo.

En la literatura hay evidencias claras que señalan a las especies *Pseudo-nitzschia* encontradas en 1991 y 1992, con excepción del *P. australis*, como parte de la comunidad de diatomeas de la costa oeste al menos desde la década de los años 1940 (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Más de 400 leones marinos (*Zalophus californianus*) de California murieron a largo de la costa central del estado entre mayo y junio de 1998. Se identificó al DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos a través de las anchoas septentrionales (*Engraulis mordax*) como el posible agente causante. Contrariamente a los pescados, la cholga (*Mytilus edulis*) recogido durante el periodo de mortalidad de los leones marinos no contenía DA o sólo cantidades traza (Lefebvre *et al.*, 1999; Scholin *et al.*, 2000).

A lo largo de la costa de California (Bahía de Montera), a fines de agosto y principios de setiembre de 2000, tuvo lugar una gran floración de *Pseudo-nitzschia* asociada a muy altos niveles de toxinas ASP. En las floraciones anchoas, sardinas y krill acumularon suficiente DA como para resultar perjudiciales para los animales que los consumían (Anonymous, 2001c).

En mayo de 2002, sardinas, anchoas, cangrejos y mariscos a lo largo de la costa de California tenían niveles altos de DA, por lo que las autoridades aconsejaron no recolectarlos ni ingerirlos (Anonymous, 2002e). Morían, durante abril y mayo, un número creciente de mamíferos marinos y pájaros a lo largo de costa californiana. Unos 70 delfines terminaron sobre las playas del estado, en tanto que más de 200 leones marinos y 200 aves enfermaron o murieron. Se encontraron hasta 380 µg/g de DA en almejas de las aguas de Santa Bárbara. No se ha informado de seres humanos enfermos (Anonymous, 2002f).

Costa Este

Se aisló de las aguas de la Bahía de Massachusetts, cerca de Boston, la diatomea productora de DA, *P. pungens* f. *multiseries*. Produjo niveles de DA entre lo no detectable a 0,21 pg/célula. Se aisló también, *P. pseudodelicatissima* que no produjo niveles detectables de DA. Estos hechos ofrecieron al menos una fuente probable para la acumulación de DA en almejas de Nantucket en enero-febrero de 1991. El hecho es que nunca pudo atribuirse a organismo alguno la aparición, con valores la mitad de los reglamentarios, de DA en mariscos de Nantucket (Villareal *et al.*, 1994).

A menudo hay presentes y en gran abundancia especies de *Pseudo-nitzschia* en las aguas costeras de Louisiana, incluyendo zonas con ostras. Un estudio de varios años en aguas de plataforma y de estuarios de Louisiana mostró la presencia de *Pseudonitzschia* spp. En el 73 por ciento de las muestras de la plataforma y en el 20 por ciento de las muestras de estuarios, había, al menos, seis especies de *Pseudonitzschia*, teniendo *P. multiseriata* el mayor potencial para causar un brote de intoxicación por DA (Parsons *et al.*, 1998). Posiblemente debido a que no se han individualizado casos aislados o porque las ostras no se volvieron tóxicas, es que no han habido brotes conocidos de ASP en Louisiana (Dortch, 2002).

Golfo de México

El DA en fitoplancton apareció en extractos de mariscos y de fitoplancton del Golfo de México (2.1 pg/célula). En primer lugar se observó a la diatomea marina *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* como la especie dominante en el estudio de barrido del plancton de Offats Bayou, Bahía de Galveston, Texas del 25 de febrero de 1989, con microscopio electrónico. En las aguas alrededor de esta bahía, *P. pungens* f. *pungens* parece ser más dominante en los meses cálidos, siendo reemplazada gradualmente por *P. pungens* f. *multiseriata* con las tormentas de otoño e invierno. Se han obtenido cultivos viables, sin embargo, de ambas formas en aguas con temperaturas tan elevadas como 29,5 °C (Dickey *et al.*, 1992a).

No se cuenta con evidencias directas de la acumulación de toxinas ASP en mariscos del Golfo. Se han observado sólo *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* con densidades bajas en la Bahía de Galveston. La producción de DA del aislado de esta bahía (célula vs. cultivo entero) de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* es equivalente al informado de aislados canadienses. Todos los clones de cultivo de esta forma aislada de la Bahía de Galveston han producido DA en las fases de crecimiento estacionarias y senescentes. No fueron consideradas como un riesgo a la salud pública las concentraciones de toxinas ASP en el fitoplancton del Golfo de México (Dickey *et al.*, 1992a).

En las plataformas continentales de Louisiana y Texas, desde 1990 a 1994, *Pseudo-nitzschia* spp. era en extremo abundante (hasta 10⁸ células/litro; presentes en el 67 por ciento de 2 159 muestras); y moderadamente abundante (hasta 10⁵ células/litro, (presentes en el 18 por ciento de 192 muestras) en cultivos de ostras en el estuario de Terrebonne Bay en Louisiana en 1993 y 1994. En la plataforma había un marcado ciclo estacional con máximos cada primavera durante 5 años y a veces en otoño, posiblemente vinculados al flujo del río, la estabilidad de la columna de agua y la disponibilidad de nutrientes. En cambio, en el estuario, no se observó ningún ciclo estacional de abundancia. En este estudio la *Pseudo-nitzschia* spp. no se identificó rutinariamente. Se han, sin embargo, identificado con microscopía electrónica de barrido, *P. multiseriata* productoras de toxinas de la Bahía de Galveston, en Texas (ver parágrafo anterior), y células de una floración en la plataforma de junio de 1993, como *P. pseudodelicatissima*, a veces tóxica. No se conocen brotes de ASP en esta zona (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

4.7.3 América Central y del Sur

Argentina

Se detectó ASP en Mar del Plata en el invierno del año 2000. La especie dominante era *P. australis*, con la toxina registrada en mejillones y peces (*Engraulis anchoita*) informándose también de dos episodios con mortalidad masiva de aves marinas (Ferrari, 2001).

Chile

La ASP posiblemente resulte una amenaza en Chile, ya que la diatomea *Nitzschia pseudoseriata* (*Pseudo-nitzschia australis*), uno de los organismos causantes propuestos productor de DA, ha sido frecuentemente descrito en las muestras de fitoplancton de aguas chilenas (Lagos, 1998).

El porcentaje de muestras de mariscos con niveles de DA superiores al límite reglamentario de 20 µg/g ha aumentado de forma sostenida desde 1997. Hasta 2001, no había registrado ningún caso de

intoxicaciones en seres humanos con ASP, pero la situación constituye una amenaza potencial para la salud pública (Suárez-Isla, 2001).

México

En enero de 1996, se encontraron 150 pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) muertos en un lapso de cinco días en el Cabo San Lucas en el extremo de la Península de Baja California. La muerte fue causada por alimentarse con caballa (*Scomber japonicus*) contaminado con *Pseudo-nitzschia* spp. productora de DA (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

Ochoa *et al.* (1997) informaron que la Península de Baja California había sido testigo de varias floraciones de algas tóxicas de 1991 a 1996, entre ellas *Pseudo-nitzschia* spp. La Bahía Magdalena fue considerada como un sitio ideal para explotaciones de acuicultura y hay varios proyectos de envergadura en camino. En Bahía Magdalena se sugirió la presencia de DA en mariscos durante el invierno de 1994 a 1995. Se recomendó una vigilancia continua, aunque los niveles de DA estaban bien por debajo del valor guía. También se observó en febrero de 1996, una floración de *Pseudo-nitzschia* spp., pero sin detectarse toxinas.

En enero y febrero de 1997, tuvieron lugar intoxicaciones masivas y mortalidad de organismos marinos en el Golfo de California, afectando 766 loons comunes (*Gavia immer*) y 182 mamíferos marinos pertenecientes a cuatro especies diferentes. Se encontró en el estómago de los delfines comunes (*Delphinus capensis*), un resto de frústulas *Pseudonitzschia* y sardinias (*Sardinops sagax*). El análisis con CL de los tejidos probó la presencia de DA y de algunos de sus isómeros. También fueron detectados el DA y sus isómeros en muestras de diatomeas del estómago de sardinias. Se identificó *P. australis* como productor de toxinas (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

4.7.4 Asia

Japón

En el Japón se realiza desde 1991 un monitoreo de la toxina ASP en bivalvos de cultivo y en diatomeas. No ha sido detectado el DA en mariscos con importancia industrial desde 1991 a 1994, ni en diatomeas excepto en una muestra de *Pseudo-nitzschia pungens* (0,01 pg de DA por célula) recogidas de una marea roja producida en agosto de 1994, en la Bahía de Hiroshima. Por otra parte se detectaron grandes cantidades de DA en el alga roja *Chondria armata* presente en la Prefectura de Kagoshima, al sur del Japón. En esta zona el cangrejo xántido *Atergatis floridus* tenía 10 mg DA/kg. Como el cangrejo se alimenta de algas, se sugiere que el DA puede haber tenido su origen desde la red alimentaria (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

4.7.5 Oceanía

Australia, Tasmania y Nueva Zelanda

Se realizó una encuesta taxonómica cubriendo toda Australia de especies del género *Pseudo-nitzschia*, una diatomea potencialmente tóxica. Las especies dominantes, causantes de floraciones *Pseudo-nitzschia* en aguas costeras australianas eran *P. fraudulenta* (Nueva Gales del Sur), *P. pungens* f. *pungens* y *P. pseudodelicatissima* (aguas de Tasmania y de Victoria). Sólo en una ocasión se detectó *P. pungens* f. *multiseriis*, y solamente como un componente menor (5 por ciento de la biomasa total) de una densa floración de *P. pungens* f. *pungens* en un estuario de Nueva Gales del Sur. Nunca se detectó *P. australis* en aguas australianas. Las poblaciones de diatomeas cultivadas de *P. pseudodelicatissima* de aguas costeras de Tasmania y Victoria eran consistentemente no tóxicas. Tampoco resultaron tóxicos los cultivos de *P. pungens* f. *pungens* de Australia (Hallegraeff, 1994) y Tasmania (Hallegraeff, 1994). Resultó también no tóxico *P. fraudulenta* (Hallegraeff, 1994). Se han detectado trazas de DA en algunas vísceras de vieiras tanto por CL como por EM, pero las concentraciones en productos de mariscos comestibles estaban todas bien por debajo de 20 µg/g de carne de marisco (Hallegraeff, 1994). En Nueva Zelanda, no se identificó el DA en 150 muestras de

mejillón Greenshell (*Perna canaliculus*) ni en muestras de plancton retiradas durante periodos de floración de *Pseudo-nitzschia* (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Durante los veranos de 1992 y 1993, el programa de biotoxinas marinas de Nueva Zelanda halló niveles bajos de DA en muestras de fitoplancton desde Otago a Northland. Se han encontrado cantidades bajas (hasta 3 000 células por litro) de *P. pungens* en la Bahía de las Islas, el Golfo Hauraki y la Bahía de Plenty (Smith *et al.*, 1993). Tanto *P. pungens* como *P. pseudoseriata* han sido encontradas en aguas de Nueva Zelanda, pero el ASP no se ha asociado nunca claramente con mariscos del Océano Pacífico. Se han identificado niveles bajos de DA por análisis químico de muestras de mariscos. El nivel más alto (16,5 µg/g) se encontró en Manukau Harbour. Otros niveles detectables estaban muy por debajo de 20 µg/g (Bates *et al.*, 1993).

Durante el periodo de enero de 1993 a julio de 1996, un 0,3 por ciento de las muestras de mariscos retiradas semanalmente de las costas de Nueva Zelanda, tenían toxinas ASP en exceso del límite reglamentario en un total de ocho eventos ASP (nivel máximo de 600 µg/g vieira). En el periodo de muestreo no hubo brotes de intoxicaciones en seres humanos (Sim y Wilson, 1997).

Los niveles más altos de DA encontrados en Nueva Zelanda hasta principios de 2003 fueron 187 µg/g en un tipo de almejas de Marlborough Sounds (diciembre de 1994), 72,4 µg/g en vieiras M&R de Tauranga Harbour (diciembre de 1994), 210 µg/g en vieiras enteras de la Bahía Whangaroa (noviembre de 1993) y 600 µg/g en intestinos de vieiras de la Bahía Doubtless (diciembre de 1994) (Anonymous, 2003b).

4.8 Reglamentación y seguimiento

4.8.1 Europa

En Estados Miembro de la Unión Europea, es válido un valor guía de 20 mg/kg para el total de toxina ASP en las partes edibles de moluscos (todo el cuerpo o cualquier parte comestible por separado). El método analítico a emplearse requiere de CL. Si una muestra, tal como se define en el Anexo, contiene más de 20 mg DA/kg, deberá destruirse toda la tachada (EC, 2002b).

Para los moluscos bivalvos de las especies *Pecten maximus* y *Pecten jacobus*, los estudios científicos han demostrado que con un DA total en el cuerpo entre 20 y 250 mg/kg, bajo ciertas condiciones restrictivas, el nivel de DA en el músculo aductor y/o en las gónadas destinadas a consumo humano normalmente es inferior al límite de 20 mg/kg. A la luz de estos estudios recientes, es apropiado fijar, sólo para la etapa de cosecha y sólo para los moluscos bivalvos de las especies antes mencionadas, un nivel de toxina ASP respecto al total cuerpo superior que el límite de 20 mg/kg. No debe permitirse la cosecha de *Pecten maximus* y *Pecten jacobus* durante un episodio tóxico con ASP activa en las aguas de las zonas de producción (EC, 2002b).

Puede darse inicio a un régimen restringido de cosecha de moluscos con concentraciones superiores a 20 mg/kg en todo el cuerpo si dos análisis consecutivos de las muestras tomadas entre uno y no más de siete días, indican concentraciones de DA en los moluscos enteros inferiores a 250 mg/kg y que la concentración de DA en partes para consumo humano, que deben analizarse por separado, resulte inferior a 4,6 mg/kg. Los análisis del cuerpo entero se harán en un homogenato de 10 moluscos. El análisis de las partes comestibles se hará sobre un homogenato de 10 partes individuales (EC, 2002b).

Dinamarca

El seguimiento de los mariscos por medio de reglamentos se realiza desde 1993 (Ravn, 1995). Se sigue el *Pseudo-nitzschia pungens*. Las zonas de cosecha se cierran con aproximadamente 5×10^5 células/litro (Shumway *et al.*, 1995).

Irlanda

El Programa de Vigilancia de Biotoxinas comenzó en Irlanda en 1984, basado inicialmente en la búsqueda de toxinas DSP por bioensayos. Recientemente, el esfuerzo volcado a la vigilancia se ha incrementado al agregarse otras toxinas, el DA y en particular las azaspirácidas, mediante análisis semanales empleando el bioensayo en ratón para DSP, la CL-EM (ácido ocaidaico, DTX2, azaspirácidas) y la CL para el DA y el análisis de fitoplancton. Las autoridades reglamentadoras y sanitarias y los productores y procesadores reciben regularmente por fax o teléfono celular informes de las muestras analizadas. Para aumentar el acceso se está desarrollando un sistema de información por Internet (McMahon *et al.*, 2001).

4.8.2 América del Norte

Canadá

En 1998 entró en vigencia en Canadá, un reglamento con un valor guía de 20 mg DA/kg de mejillón. Las zonas productoras de productos de la pesca se cierran cuando los niveles de toxinas en mariscos son superiores al valor guía. La CL es el procedimiento analítico empleado. Se vigila la presencia de *Pseudo-nitzschia pungens* (Shumway *et al.*, 1995). Desde 1988, se recogen de cuatro estaciones en la Bahía de Fundy, al oeste del país, muestras de fitoplancton. La base de datos recopila más de 70 000 registros entre 1988 y 2001. Los planes futuros son continuar mejorando el sistema y el control de calidad y explorar mejor la variabilidad temporal y espacial de los patrones (Martin *et al.*, 2001).

Estados Unidos de América

En los EEUU se aplica un valor guía no oficial de 20 mg DA/kg para bivalvos. El método analítico emplea CL. El valor guía para cangrejos cocidos (vísceras y hepatopáncreas) es de 30 mg DA/kg. El método analítico emplea CL (Shumway *et al.*, 1995). El Departamento de Recursos Marinos realizó un programa limitado de muestreo del DA. Se dispone de información permanentemente actualizada del vecino Canadá. Se procede a los cierres una vez que los niveles alcanzan 20 mg/kg. Los mariscos exportados a la UE deben ir acompañados de un certificado sanitario (Shumway *et al.*, 1995).

4.8.3 América Central y del Sur

Argentina

La Argentina cuenta con un programa nacional de vigilancia de toxicidad en almejas en cada una de las provincias costeras, con laboratorios regionales y, un estación fija en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

Tuvo durante un año, una iniciativa de vigilancia piloto, pero no se ha establecido aun un programa nacional de vigilancia (Ferrari, 2001).

Chile

Están vigentes programas nacionales de vigilancia para mariscos y fitoplancton (Suárez-Isla, 2001).

Uruguay

El Uruguay tiene un programa nacional regular de vigilancia de almejas y fitoplancton tóxicos (Ferrari, 2001).

4.8.4 Oceanía

Australia

Desde 1993 existen programas de vigilancia basados en reglamentos para almejas y algas (Ravn, 1995).

Nueva Zelanda

Desde 1993 hay, para mariscos, vigilancia basada en reglamentos. El método analítico emplea CL (Ravn, 1995). El límite reglamentario es 20 mg DA/kg de carne de marisco (Sim y Wilson, 1997).

El Programa de Vigilancia de Biotoxinas de Nueva Zelanda combina ensayos regulares de mariscos y vigilancia del fitoplancton. Actualmente, los análisis de ASP en mariscos hacen una selección con bioensayo en ratón, seguido de análisis confirmatorios (CL y CL-EM) (Busby y Seamer, 2001).

Está en desarrollo un nuevo programa de seguimiento de biotoxinas que proporcionará datos muy precisos en menor tiempo y sin recurrir a bioensayos en ratón. Implementará métodos de ensayo basados en CL-EM, produciendo datos analíticos químicos sustitutivos de los bioensayos en ratón. Se discute el desarrollo e implementación de nuevos métodos de ensayo, incluidos sus fondos, la validación, los protocolos de ensayo, la disponibilidad de normas analíticas, la comparación con ensayos disponibles, los tipos de instrumentos y la cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

5. Intoxicación neurológica por mariscos (NSP)

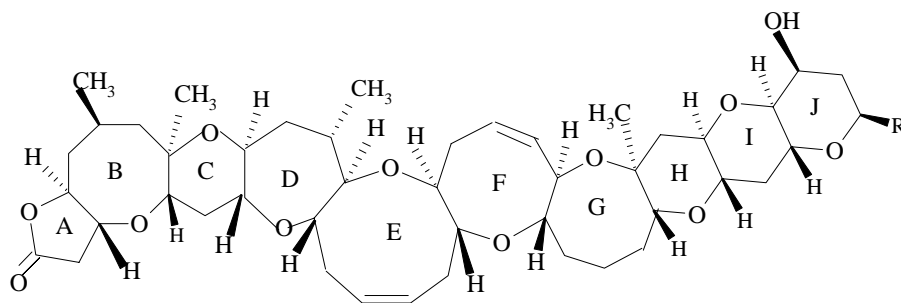
La intoxicación neurológica o neurotóxica por mariscos (NSP) es causada por brevetoxinas poliéteres producidas por un dinoflagelado sin blindaje, *Gymnodinium breve* (también llamado *Ptychodiscus breve*, y desde 2000 llamado *Karenia brevis*). Las brevetoxinas son tóxicas para peces, mamíferos marinos, aves y seres humanos, aunque no para los mariscos. Hasta 1992/1993, la intoxicación neurológica por mariscos era considerada endémica en el Golfo de México y la costa este de la Florida, de donde se han informado “mareas rojas” desde la temprana fecha de 1844. Una característica poco común del *Gymnodinium breve* es la formación por acción de las olas de aerosoles tóxicos que pueden resultar en síntomas similares al asma en los seres humanos. En 1987 la Corriente del Golfo dispersó hacia el norte un importante evento de floración, a aguas de Carolina del Norte, donde está presente desde entonces. A comienzos de 1993, se informaron más de 180 intoxicaciones en seres humanos por mariscos desde Nueva Zelanda causadas por un organismo similar al *G. breve*. Muy probablemente, este era un integrante de la flora oculta del plancton (presente previamente en bajas concentraciones), que se desarrolló convirtiéndose en una floración desencadenada por condiciones climáticas poco comunes (lluvias más abundantes y temperaturas inferiores a las habituales) coincidentes con el fenómeno de El Niño (Hallegraeff, 1995).

5.1 Estructuras químicas y propiedades

Las toxinas NSP, denominadas brevetoxinas, son neurotoxinas poliéter cíclicas insípidas, incoloras, estables al calor y a los ácidos, solubles en lípidos y producidas por el dinoflagelado marino *G. breve* (o *P. brevis*). Estructuralmente las brevetoxinas son moléculas con anillos, con 10 a 11 anillos transfundidos y con pesos moleculares de alrededor de 900. Se han aislado e identificado diez brevetoxinas en floraciones de campo y cultivos de *G. breve* (Benson *et al.*, 1999) (ver Figura 5.1). Estas brevetoxinas muestran enlaces específicos en la posición 5 de canales de Na⁺ sensibles al voltaje que conducen a su activación al potencial normal de reposo. Esta propiedad de las brevetoxinas es causante de los efectos tóxicos (Cembella *et al.*, 1995). La PbTx-2 es la principal toxina aislada del *G. breve*.

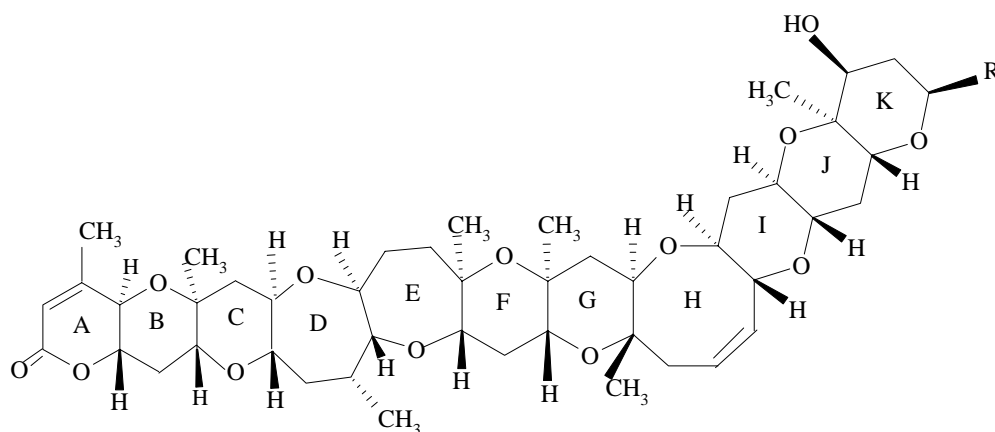
De los mariscos contaminados se aislaron cuatro análogos de las brevetoxinas (ver Figuras 5.2 y 5.3). El marisco resultó de incidentes de NSP en Nueva Zelanda. Se analizaron los análogos de las brevetoxinas en berberechos (*Austrovenus stutchburyi*) (BTX-B1) (Ishida *et al.*, 1995) y en un tipo de mejillones (*Perna canaliculus*) (BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4) (Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998), las que diferían de las brevetoxinas aisladas de los cultivos de dinoflagelados. Aparentemente las BTX-B1, BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 son metabolitos formados por el propio marisco, pues no se encontraron en las floraciones o en los cultivos de *G. breve*. La presencia de BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 en *Perna canaliculus* sugiere que los caminos metabólicos en esta especie son más complicados que los de los berberechos (*Austrovenus stutchburyi*). Debido a las dificultades extremas para aislarlas, las principales toxinas de los mariscos permanecen, sin embargo, sin aclarar (Morohashi *et al.*, 1999).

Figura 5.1 Estructuras químicas de las brevetoxinas de tipo A y B (Hua et al., 1996)



Brevetoxinas Tipo 1 (A):

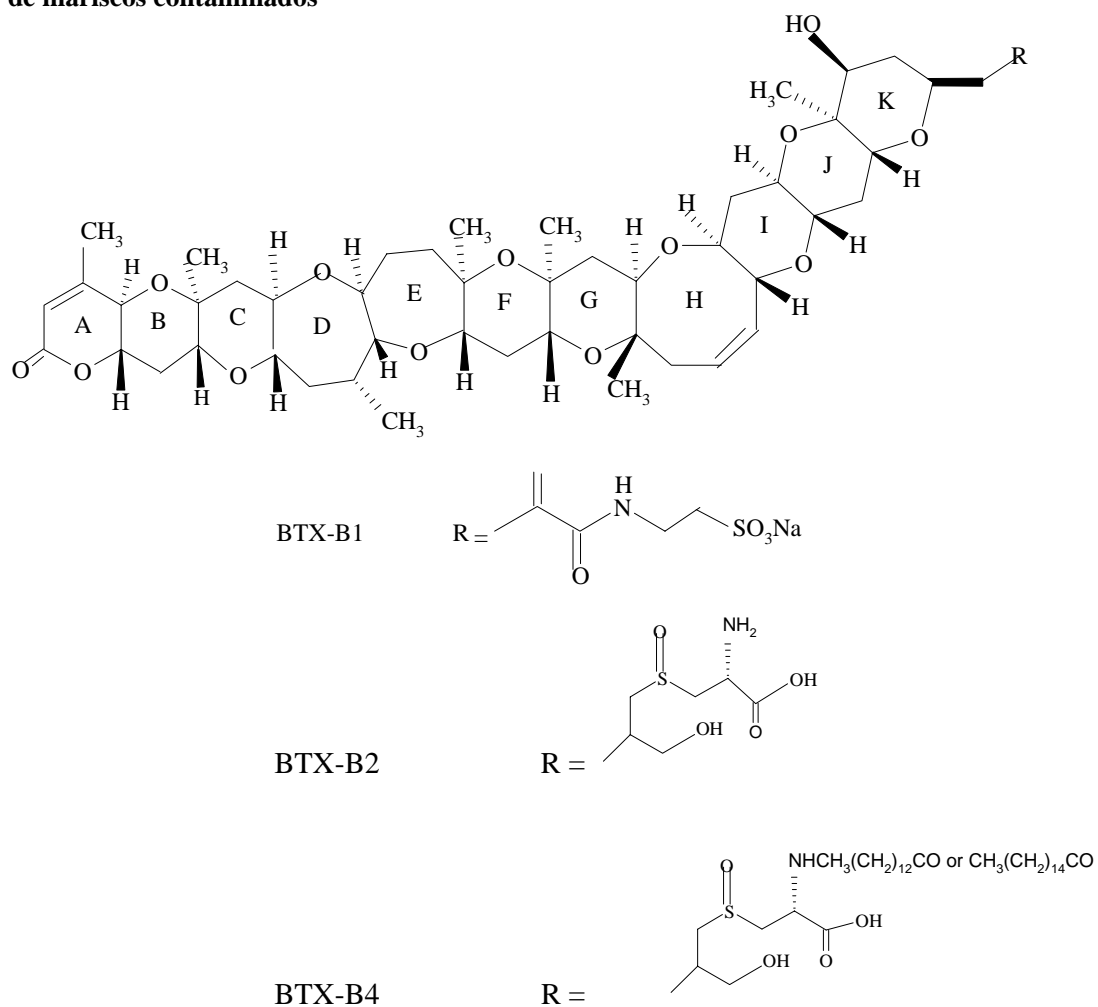
PbTx-1,	R = CH ₂ C(=CH ₂)CHO
PbTx-7,	R = CH ₂ C(=CH ₂)CH ₂ OH
PbTx-10,	R = CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ OH



Brevetoxinas Tipo 1 (B):

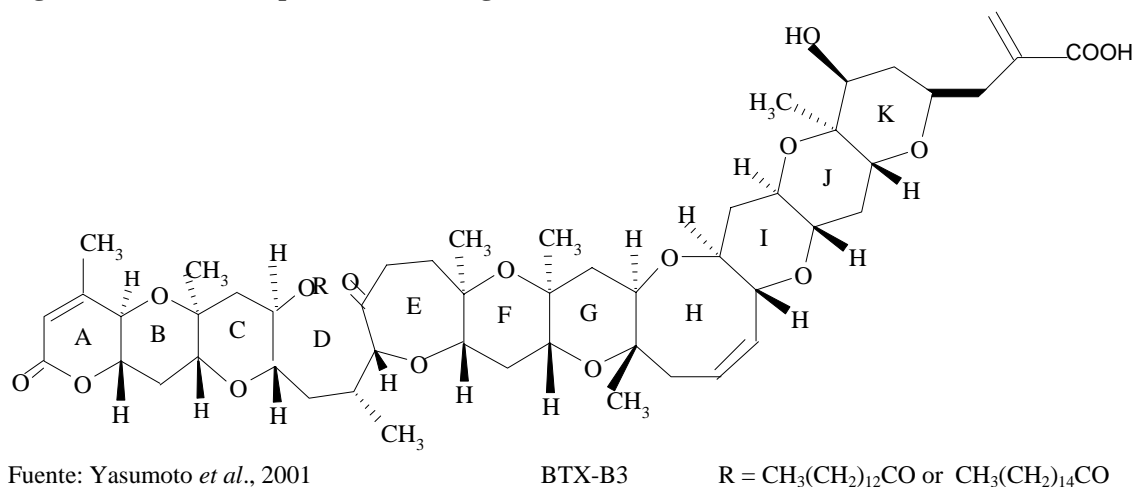
PbTx-2	R = CH ₂ C(=CH ₂)CHO
oxidada PbTx-2	R = CH ₂ C(=CH ₂)COOH
PbTx-3	R = CH ₂ C(=CH ₂)CH ₂ OH
PbTx-8	R = CH ₂ COCH ₂ Cl
PbTx-9	R = CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ OH
PbTx-5	anillo-K acetato de PbTx-2
PbTx-6	anillo-H epóxido de PbTx-2

Figura 5.2 Estructuras químicas de los análogos de las brevetoxinas BTX-B1, -B2 y -B4 aisladas de mariscos contaminados



Fuente: Yasumoto *et al.*, 2001

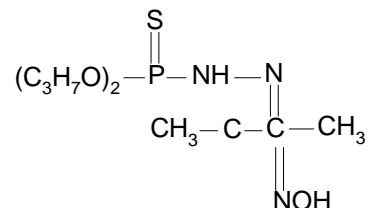
Figura 5.3 Estructura química del análogo de la brevetoxina aislada de mariscos contaminados



Fuente: Yasumoto *et al.*, 2001

Además de las brevetoxinas, se han aislado del *G. breve* algunos compuestos ictiotóxicos fosforados, que recuerdan a las anticolinesterasas. Un ejemplo, es un compuesto acíclico fosforado con un grupo oximino, y un grupo tiofosfato, la *O,O*-dipropil(*E*)-2-(1-metil-2-oxopropilideno) fosforohidrazidatoato-(*E*)oxima (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Figura 5.4 Toxina ictiotóxica fosforada aislada del *G. breve*.



5.2 Métodos de análisis

5.2.1 bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

En el bioensayo en ratón se evalúa la toxicidad inyectando intraperitonealmente extracto lípido en bruto de mariscos en ratones. Los resultados se expresan en unidades ratón (UR), (Hokama, 1993). Una UR se define como la cantidad de residuo tóxico en bruto que promedialmente matará al 50 por ciento de los animales de laboratorio (ratones de 20 g) en 930 minutos (Dickey *et al.*, 1999). El método aceptado actualmente es el procedimiento de la American Public Health Association (APHA) de 1985 basado en la extracción del tejido de mariscos con éter dietílico. Con posterioridad a la detección en Nueva Zelanda de NSP en 1983, la Autoridad Reglamentaria del MAF desarrolló una estrategia de gestión para controlar la NSP. El método de preparación de muestras empleado estaba basado en la extracción con acetona de estos componentes lipófilos seguido por separación con diclorometano. Este procedimiento permitía extraer eficazmente toxinas desconocidas solubles en lípidos de mariscos con toxinas NSP y presentaba algunas ventajas frente al protocolo de la APHA (más simple y más adecuado para la separación rápida y cuantitativa de las fases orgánica y acuosa del extracto y con una mayor eficiencia de extracción). Sin embargo, como resultado del descubrimiento de un nuevo compuesto bioactivo (la gimnodimina) producida por el dinoflagelado *Gymnodinium mikimotoi*, una especie común en aguas de Nueva Zelanda durante los eventos neurotóxicos, se volvió al procedimiento de la APHA de extracción con éter dietílico. La gimnodimina no es extraíble con éter dietílico, pero causa la muerte muy rápida de los ratones al usarse el procedimiento con diclorometano. Como no se considera que la gimnodimina presente riesgos a la salud humana, el programa de seguimiento emplea ahora la extracción con éter dietílico como forma de distinguir la actividad de la gimnodimina de la toxicidad NSP (Fernandez y Cembella, 1995).

Básicamente, cualquier nivel detectable de brevetoxinas por 100 g de tejido de marisco era considerado como potencialmente inseguro para consumo humano. En la práctica, se adoptó una toxicidad residual de ≥ 20 UR por 100 g de tejido de marisco, que permanece como el valor guía para prohibir la cosecha de mariscos (Dickey *et al.*, 1999).

Como dificultades, el bioensayo en ratón requiere cantidades grandes de animales y de extractos de tejido y los resultados son interpretados subjetivamente, no siendo específicos (Hokama, 1993).

bioensayo en pescados

Los ensayos con el pez *Gambusia affinis* se hacen en 20 ml de agua de mar (3,5 por ciento de salinidad) empleando un pez por recipiente con la toxina incorporada en 0,01 ml de etanol. Se determinaron cada una de las LD₅₀ preparando diluciones por triplicado al doble de cada toxina. La letalidad se determinaba pasados 60 minutos y la dosis letal media se determinaba con las tablas de Weil de 1952 (Baden *et al.*, 1988). El bioensayo con peces se emplea generalmente para determinar o la potencia del agua de mar contaminada o de extractos de toxinas en bruto o purificados (Viviani, 1992).

ensayos in vitro

ensayo con célula de neuroblastoma

Las toxinas causantes de la NSP ejercen sus efectos tóxicos uniéndose a determinados tipos de receptores biológicos sensibles al voltaje, los denominados canales de sodio. La base del ensayo con neuroreceptores es esta interacción altamente específica con receptores naturalmente presentes. Cualquier modificación de una molécula de toxina, que interfiere con su enlace con el receptor y consecuentemente con su detección en un ensayo basado en receptores, comprometería también su habilidad para fomentar una respuesta tóxica. La detección se basa entonces más en su habilidad funcional que en el reconocimiento de un componente estructural, como en los ensayos con anticuerpos. Más aun, la afinidad de una toxina con su receptor es directamente proporcional a su potencia tóxica. Para una mezcla de congéneres, un ensayo basado en los receptores dará una respuesta representativa de las potencias integradas de aquellas toxinas presentes (Cembella *et al.*, 1995).

Se ha desarrollado una técnica de cultivo de tejidos que emplea una línea de células establecida de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a) para el ensayo de las toxinas que activan la posición 5 del canal de Na⁺, a.o. brevetoxinas. Este método de detección se basa en la determinación del punto final de la dehidrogenasa mitocondrial. El límite de detección para las PbTx es de 0,25 ng/10 µl de extracto de tejido. La PbTx puede detectarse dentro de las cuatro a seis horas, pero el límite de detección puede reducirse mediante un periodo de incubación de 22 horas. El método fue modificado y simplificado adicionalmente, incorporando un procedimiento colorimétrico basado en la capacidad de las células metabólicamente activas de reducir un compuesto de tetrazolio, el MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a un producto de color azul oscuro de formazan (Manger *et al.*, 1993; 1995).

La brevetoxina más potente, la PbTx-1, podía detectarse en el bioensayo con células MTT a niveles sustancialmente inferiores a la LD₅₀ intraperitoneal en ratones luego de una exposición de cuatro a seis horas. Con fines comparativos la LD₅₀ para la PbTx-1 en ratones es de 0,01 mg/20 g animal, por inyección intraperitoneal, que correlaciona con 0,1 mg/100 g extracto de tejido o equivalente a 1 ng/10 µl de muestra en células de neuroblastoma (Manger *et al.*, 1993).

Otros métodos han utilizado el XTT (un reactivo soluble de formazan) para determinaciones colorimétricas (Yasumoto *et al.*, 1995). El ensayo con células de neuroblastoma puede utilizarse para detectar brevetoxinas en tejido contaminado de mariscos, aunque no puede distinguir entre las brevetoxinas individuales (Hua *et al.*, 1995).

Fairey *et al.* (1997) informaron de otra modificación del ensayo con receptores en las células de neuroblastoma de Manger *et al.* (1995), con un ensayo de gen indicador, que emplea generación de luz catalizada por la luciferasa como punto final y cuantificado mediante un luminómetro de microplaca. Un constructo de gen indicador *c-fos*-luciferasa se expresó de manera estable en el clon N2A de células de neuroblastoma de ratón, se optimizaron los parámetros del ensayo y se evaluó la sensibilidad al mismo de gen indicador a varias toxinas de algas que activan o inhiben los canales de sodio. La PbTx-1 causó un incremento de actividad de la luciferasa dependiente de la concentración y saturable. Aunque este ensayo aun requiere de una caracterización adicional para evaluar su comportamiento con diferentes matrices de pescados, mariscos, pigmentos de algas y otras clases de toxinas de algas, tal como se lo presenta tiene o supera la sensibilidad de los bioensayos disponibles para toxinas de algas mediante canales de sodio activos.

Los canales de sodio activables por voltaje son proteínas integrales, de membranas neuronales. Una proteína de membrana purificada, puede incorporarse a una doble capa lipídica formando en su presencia una vesícula, un proceso conocido como “reconstitución”. Una vez que se han aclarado cuales son los fosfolípidos adecuados para la reconstitución funcional de los canales de sodio, el canal reconstituido puede usarse como una herramienta para medir las uniones específicas de las toxinas de algas. Se probó la unión específica de la PbTx-3 a los canales de sodio purificados del cerebro de ratas, reconstituidos a vesículas de fosfolípidos. La demostración de una unión específica de canales de sodio allana el camino para el desarrollo de un ensayo funcional muy específico para determinar la presencia de estas toxinas en tejidos biológicos (Trainer *et al.*, 1995).

ensayo de enlaces competitivos con sinaptosomas

Es un ensayo de enlaces competitivos en el que una toxina NSP radio marcada y/o sus derivados compiten con una toxina NSP sin marcar por una cantidad dada de sitios receptores disponibles en un preparado de sinaptosomas de cerebro de ratas. La reducción porcentual en las uniones NSP radiomarcadas es directamente proporcional a la cantidad de toxina sin marcar presente en una muestra desconocida (Poli *et al.*, 1986). Como en el inmunoensayo (ver Capítulo 5.2.2), tanto la PbTx-2 como la PbTx-3 desplazaron a la ³H-PbTx-3 de manera equivalente. Sin embargo la PbTx-2 oxidada no reemplazó a la ³H-PbTx-3 como sucedía en el inmunoensayo (Baden *et al.*, 1988).

Van Dolah *et al.* (1994) desarrollaron para las brevetoxinas un ensayo de enlaces competitivos de alta capacidad empleando tecnologías de centelleo con microplaca. Este ensayo puede concluirse en tres horas, con un límite de detección inferior a 1 ng y con capacidad de analizar simultáneamente docenas de muestras. El ensayo es como útil para evaluar la toxicidad total de las algas, para purificar las brevetoxinas y para detectar brevetoxinas en frutos de mar.

Está en curso una prueba de evaluación entre pares, por parte de la AOAC, del método de Van Dolah *et al.* (1994) de la toxina en las ostras (Quilliam, 1999).

Whitney *et al.* (1997) informaron del complejo comportamiento de los tejidos de animales marinos en el ensayo con sinaptosoma de cerebro de ratas. Los extractos de tejidos de vacas de río, tortugas, pescado y almejas parecían contener componentes que interferían por inhibición cooperativa, no-competitiva del enlace específico ³H-PbTx-3 e incrementaban el enlace no específico a las sinaptosomas. Whitney *et al.* (1997) desarrollaron un método correctivo para estos problemas.

ensayo con cortes hipocampales

Kerr *et al.* (1999) investigaron preparaciones con cortes hipocampales de rata *in vitro* como forma de detectar rápida y específicamente las toxinas STX de algas marinas, la brevetoxina y la DA en tejido de mariscos y peces de escamas identificando señales electrofisiológicas específicas de cada toxina. Se concluyó que los cortes hipocampales son útiles para detectar y analizar biotoxinas marinas en tejido contaminado de mariscos.

5.2.2 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Se desarrolló, cuando sólo eran conocidas las estructuras de las PbTx-2 y las PbTx-3, un inmuno ensayo competitivo (RIE) para las PbTx-2 y PbTx-3 con una detectabilidad de 2 nM. Esta se ha posteriormente mejorado en aproximadamente 1 nM (Trainer y Baden, 1991). Se ha producido un antisuero en cabras empleando albúmina de suero bovino (=BSA) unido a la PbTx-3 como antígeno completo. La técnica RIE para la PbTx se basa en el desplazamiento competitivo de la ³H-PbTx-3 por formación de un complejo con el anticuerpo. Las toxinas PbTx-2 y PbTx-3 se detectaron de forma aproximadamente equivalentes. No obstante, la PbTx-2 oxidada, no tóxica en los bioensayos en pescado o ratón, también desplazó la PbTx-3 en el RIE, señal que la potencia no se reflejaba en ensayos de desplazamiento competitivos empleando este anticuerpo (Trainer y Baden, 1991).

Han avanzado también los trabajos para preparar un ensayo ELISA confiable con anticuerpos monoclonales. Trainer y Baden (1991) desarrollaron un método ELISA empleando brevetoxina acoplada a peroxidasa de rábano picante o con ureasa con un anticuerpo de cabra a brevetoxina purificada. Se ha fijado un sistema potencialmente utilizable para detectar brevetoxina en extractos de dinoflagelados o pescados con un límite de detección de 0,04 pM. La toxina puede cuantificarse linealmente desde 0,04 a por lo menos 0,4 pM de brevetoxina. En las pruebas iniciales se utilizó PbTx-3 unida a BSA como antígeno con antisuero producido en cabras, que se encontró se unía competitivamente a la PbTx-2 y a la PbTx-3 (Cembella *et al.*, 1995). Como el ensayo es más estructural que funcional, el anticuerpo une también los derivados no tóxicos de la PbTx que posean una actividad de enlace similar. Cuando se utilizó hemocianina de lapa californiana (*Megathura crenulata*) (KLH) en lugar de BSA, se produjeron anticuerpos más eficientemente (Baden *et al.*, 1988). Estudios recientes de reconocimiento epitópico con derivados de las brevetoxinas naturales y sintéticas con dos sueros anti-PbTx diferentes, indican que los ensayos con anticuerpos simples pueden no resultar adecuados para detectar los metabolitos de las toxinas NSP. Se están desarrollando ensayos empleando más de un anticuerpo para el reconocimiento específico de diferentes zonas de la escalera de poliéteres (Baden *et al.*, 1988; Levine y Shimizu, 1992; Poli *et al.*, 1995; Trainer y Baden, 1991). En un estudio posterior (Baden *et al.*, 1995), se informan de otras modificaciones del método ELISA que mejoraron la especificidad y la detectabilidad. El ELISA no pudo emplearse hasta 1995 para determinar el contenido de brevetoxina en tejido de pescado por estar covalentemente conjugada mediante bien conocidos caminos de detoxificación citocroma P450-monooxigenasa y son también inducidas las actividades glutatona-S-transferasa. La extracción común de tejidos no libera las toxinas retenidas en los tejidos de pescado. El ELISA resultó completamente satisfactorio para detectar y cuantificar las brevetoxinas en las células de dinoflagelados, con tan solo 10 a 50 células. Si bien los mariscos pudieron analizarse con ELISA, lo fue a expensas de la detectabilidad. Las modificaciones y técnicas alternativas informadas por Baden *et al.* (1995) hicieron posible emplear el ELISA para detectar brevetoxinas en células de dinoflagelados, en muestras de mariscos y pescados, en agua de mar y medios de cultivo y en muestras de suero humano.

Naar *et al.* (1998) informaron del desarrollo mejorado para la producción de anticuerpos contra las brevetoxinas de tipo PbTx-2 con un nuevo radioinmunoensayo. El límite de detección para la PbTx-3 era de 0,33 picomoles con un rango de detectabilidad entre 0,01 y 1100 picomoles. En un estudio posterior, Naar *et al.* (2001) describieron la producción y caracterización de anticuerpos poli y monoclonales de ratón (MAbs) específicos para las toxinas de tipo PbTx-2, empleando conjugados portadores de PbTx-3 preparados a nivel nanomolar en un medio micelar invertido. Los autores consideraron muy prometedor este primer informe sobre la producción de MAbs para PbTxs para el desarrollo de ensayos basados en Mab para las potentes neurotoxinas marinas del tipo poliéteres escasamente disponibles. In 2002, Naar *et al.* informaron del desarrollo de una prueba ELISA competitiva para detectar brevetoxinas en agua de mar, extracto de marisco u homogenato y fluidos del cuerpo de mamíferos (orina y suero sin tratamiento previo, dilución o purificación) empleando anticuerpos de cabra anti-brevetoxinas obtenidos después de una inmunización con conjugados de hemocianina-brevetoxina de lapa californiana (*Megathura crenulata*), combinados con un proceso de amplificación de señal de tres etapas. El límite de detección para las brevetoxinas en ciertas ostras era de 2,5 µg/100 g de carne de marisco.

Garthwaite *et al.* (2001) desarrollaron un método ELISA grupal para las toxinas ASP, NSP, PSP y DSP incluyendo la yesotoxina como un sistema de selección para muestras de mariscos contaminadas. El sistema detecta muestras de mariscos sospechosas. Seguidamente las muestras sospechosas deben analizarse por métodos aprobados por autoridades reglamentadoras internacionales. La extracción con alcohol dio buenas recuperaciones para todos los tipos de toxinas.

5.2.3 Análisis químicos

detección con MEKC

Se empleó la cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC por sus siglas en inglés) con detector de fluorescencia inducida con láser (LIF por sus siglas en inglés) para medir cuatro brevetoxinas (PbTx-2, PbTx-3, PbTx-5, PbTx-9) a niveles sub-attomol. Las brevetoxinas fueron aisladas de cultivos celulares y de tejidos de pescado con un límite de detección del método de aproximadamente 4 pg/g (Shea, 1997).

CL/EM con electronebulización

Se empleó exitosamente la cromatografía líquida de fase invertida con espectroscopia de masas de ionización con electronebulización para la separación e identificación de brevetoxinas asociadas con algas de marea roja. Los límites de detección para las PbTx-9, PbTx-2 y PbTx-1 fueron respectivamente de 600 fmol, 1 pmol y 50 fmol. Además se detectaron una cantidad de compuestos desconocidos (seis componentes en total) entre los cuales posiblemente un isómero de la PbTx-9. Una ventaja de este método es que los compuestos que co-eluden pueden notarse mucho más fácilmente siendo posiblemente identificables mediante datos de espectros de masa (Hua *et al.*, 1995).

En una continuación del estudio, se extendió el uso del método CL-ESI-EM por primera vez para investigar la distribución de compuestos de brevetoxinas en las floraciones de marea roja recogidos de la Bahía de Sarasota, en la Florida. Se detectaron, respectivamente, las PbTx-2, PbTx-1 y PbTx-3 a niveles de 60, 10 y 5,7 µg/litro en muestras al natural de floraciones de marea roja. Esta distribución difería cualitativamente de la encontrada en muestras de extracto de marea roja de cultivo. No se detectó la PbTx-9 ni en extractos de floraciones de marea roja ni en extractos de cultivo de marea roja (Hua *et al.*, 1996).

CL/EM de nebulización iónica

Quilliam en 1996 desarrolló un método de spray de iones CL-EM. Pueden alcanzarse límites de detección de masa tan bajos como 10 pg (10 femtomol) empleando control de ión selectivo de los iones (M+H)⁺. Se detectaron, con este método, todas las toxinas principales así como algunos componentes menores nuevos en un extracto crudo de *G. breve*. Recientemente el método se extendió para los metabolitos más polares identificados en mariscos de Nueva Zelanda. Los análisis con CL-EM pueden ser muy rápidos (menos de dos minutos en algunos casos) y automatizarse completamente (Quilliam, 1998b).

CL/EM/EM

Se empleó, basado en una CL de gradiente de fase invertida en tandem con espectrometría de masas, un procedimiento sobre tejidos de pescado (CL/EM/EM) para detectar PbTx-2 en éste. El límite de detección en la carne de pescado fue de al menos 0,2 ng/g (Lewis *et al.*, 1999).

5.2.4 En general

Las brevetoxinas conforman una familia con muchos componentes. Además de 10 brevetoxinas, se han identificado cuatro metabolitos en berberechos y algunas almejas en el caso de Nueva Zelanda. A pesar de no ser ictiotóxicos, los metabolitos son también capaces de activar los canales de Na. Según el método analítico usado pueden afectar sensiblemente los resultados analíticos y en consecuencia la comparación entre diversos métodos. Se comprobó también la presencia de metabolitos en caracoles marinos y almejas de una zona contaminada de la Florida, EEUU (Poli *et al.*, 2000). Los análisis RIE y de enlace con receptores tienen sensibilidades diferentes a los metabolitos. Dickey *et al.* (1999) informaron que el ensayo de citotoxicidad con neuroblastomas parece estimar por exceso la toxicidad compuesta, debido a una sensibilidad comparativamente incrementada a los metabolitos de la brevetoxina con el bioensayo en ratón. Los solventes empleados en los diferentes métodos de ensayo podrían haber influido en los resultados debido posiblemente a una mayor polaridad de los metabolitos

de las brevetoxinas que los de la toxina madre (comunicación personal de S. Hall). Por ejemplo Dickey *et al.* (1999) demostraron que, en un ensayo de citotoxicidad (en células de neuroblastoma de ratón), se obtenía una toxicidad PbTx-3 equivalente de 2,5 a 4 veces con muestras extraídas respectivamente con metanol y acetona que con las muestras extraídas con éter dietílico. La discrepancia en las estimaciones de la toxicidad equivalente de la PbTx-3 y la moderada correlación de los diferentes ensayos parecen resultar en parte de: a) la presencia y distribución en el tiempo de metabolitos en los mariscos; b) la eficiencia de los diferentes solventes empleados en las extracciones; y c) la diferente sensibilidad de los métodos de ensayo a los metabolitos de las brevetoxinas. En conjunto, esto puede traer consecuencias importantes sobre la inocuidad y las reglamentaciones de los frutos del mar pues los metabolitos activos probablemente sean la verdadera causa de la NSP (Poli *et al.*, 2000).

Cada uno de los métodos de análisis usados con las brevetoxinas tiene alguna desventaja (ver también Hannah *et al.*, 1998):

- El bioensayo en ratón, aunque habitualmente usado, no es específico y requiere animales de laboratorio.
- El ELISA emplea anticuerpos desarrollados solamente contra la PbTx-2, no es capaz de ensayar tejido de pescado y tiene solamente una limitada sensibilidad a los tejidos de mariscos.
- El ensayo con células de neuroblastoma, aunque sensible, tiene interferencias.
- El ensayo de enlace con receptor es rápido, sensible y específico, pero requiere compuestos radio-marcados.
- Aunque la CL/e es sensible y específica y detecta componentes individuales, requiere equipos muy costosos.

Hay además carencias crónicas de materiales de referencia para las brevetoxinas y sus metabolitos (tanto para calibrar como matrices).

5.3 Organismos fuente y habitat

5.3.1 Organismos fuente

La forma móvil de *G. breve* produce varias neurotoxinas, denominadas colectivamente brevetoxinas (Viviani, 1992). Se han aislado e identificado diez brevetoxinas de floraciones de campo y de cultivos de *G. breve* (ver Figura 5.1) (Benson *et al.*, 1999). Se consideraron como metabolitos formados de brevetoxinas en el marisco, a cuatro solamente análogos de brevetoxinas (ver Figuras 5.2 y 5.3) aislados de mariscos contaminados y no de floraciones en el campo o cultivos de *G. breve* (Ishida *et al.*, 1995; Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998). Además de las brevetoxinas neurotóxicas la *G. breve* produce también toxinas hemolíticas aunque en menor cantidad que brevetoxinas. La mortandad masiva de peces observada durante las mareas rojas en la Florida se debe principalmente a exposiciones a brevetoxinas neurotóxicas con una posible contribución de la fracción hemolítica. El organismo de *G. breve* es relativamente frágil y se rompiéndose rápidamente por acción de las olas en las playas liberando las toxinas. Durante una marea roja activa en playas, el aerosol contaminado de las olas contiene las toxinas y fragmentos de organismo tanto en las gotitas como agregadas a las partículas salinas pudiendo ser arrastrado tierra adentro según el viento y otras condiciones ambientales (Fleming y Baden, 1999).

Cuatro especies de algas de la clase *Raphidophyceae* además produjeron toxinas semejantes a las brevetoxinas. Se aislaron tres compuestos neurotóxicos de cultivos de *Chattonella antiqua*, los CaTx-I, CaTx-II y CaTx-III, que parecían corresponder a las brevetoxinas PbTx-2, PbTx-3 y a la PbTx-2 oxidada (iguales valores de Rf en cromatografía de capa fina e iguales tiempos de retención en HPLC). La cantidad de cada toxina variaba según la edad y la fase de crecimiento del cultivo.

Se identificaron provisoriamente cinco componentes neurotóxicos de cultivos de *Fibrocapsa japonica*, una especie responsable de la marea roja, los FjTx-I, FjTx-II, FjTx-IIIa, FjTx-IIIb y FjTx-IV. Estos componentes neurotóxicos se correspondían respectivamente con las PbTx-1, PbTx-2, PbTx-9, PbTx-

3 y la PbTx-2 oxidada. La cantidad de cada componente variaba también con la edad y la fase de crecimiento del cultivo.

En 1995 tuvo lugar una marea roja inusualmente grande de *Heterosigma akashiwo* en la Bahía de Kagoshima, Japón, causando una mortandad masiva de peces. Se aislaron cuatro componentes neurotóxicos, HaTx-I, HaTx-IIa, HaTx-IIb y HaTx-III correspondientes respectivamente a las PbTx-2, PbTx-9, PbTx-3 y la PbTx-2 oxidadas. Se aislaron cuatro componentes neurotóxicos de *Chattonella marina* identificados como PbTx-2, PbTx-3, PbTx-9 y la PbTx-2 oxidada (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

En la costa occidental de la Florida tienen lugar floraciones de *G. breve* de invierno a verano, y con más frecuencia en otoño. Los cambios en la aparición de las floraciones se correlacionan con las temperaturas del viento y de la superficie del agua. En verano las floraciones se originan en la costa cuando los vientos son más débiles. Sin embargo, también aparecen y continúan durante el otoño, una época de fuertes vientos marinos del este (Stumpf *et al.*, 1998).

Las corrientes pueden arrastrar las floraciones de *G. breve* también hacia la costa por las corrientes. Las floraciones de *G. breve* consumen niveles bajos de nutrientes y en las bahías costeras, pueden prolongarse, de contar con nutrientes adicionales de origen humano. En algún momento se creyó que la *G. breve* permanecía casi exclusivamente en el Golfo de México desde Yucatán a la costa de Texas (se la ha observado también en aguas de Alabama, Misisipi y Luisiana). Los investigadores han trazado una gigantesca “zona muerta” de aguas pobres de oxígeno en el Golfo de México a profundidades de 0,5 a 20 m. Luego de la Gran Inundación de Misisipi de 1993, que vertió en el Golfo grandes cantidades de nutrientes agrícolas de granjas del Medio Este, se duplicó el área de la zona muerta de 3 500 a 7 000 millas cuadradas. Recientemente, se ha documentado el transporte de dinoflagelados del Golfo. En 1987 y 1988, la Corriente del Golfo arrastró la *G. breve* a la costa este de la Florida, llevándola hacia el norte a Carolina del Norte. En enero de 1998, la *G. breve* fue trasladada nuevamente del Golfo de México al condado de Palm Beach en la costa este de la Florida (Tibbetts, 1998).

La *C. marina*, también productora de brevetoxinas, y perteneciente a las *Raphidophytes*, apareció en aguas costeras estancadas y ricas en materia orgánica (Hallegraeff y Hara, 1995). El crecimiento óptimo tuvo lugar a temperaturas de 20 a 25 °C, salinidades del 20-30 ‰, intensidades de luz de 60 a 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con pH 7,5 a 8,5. A temperaturas inferiores a 15 °C o superiores a 30 °C y salinidades inferiores a 10 ‰ no hay crecimiento (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

H. akashiwo, que pertenece también a las *Raphidophytes* y que produce toxinas semejantes a las brevetoxinas, ha sido encontrada en aguas costeras y estancadas del Pacífico y del Atlántico (Hallegraeff y Hara, 1995). Las floraciones de *H. akashiwo* requieren metales, como hierro y manganeso, además de nitrógeno, fósforo y vitamina B₁₂. Estas sustancias nutritivas fueron suministradas por desbordes, formación de aguas de fondo de bajo contenido de oxígeno y turbulencias de los sedimentos del fondo inducidas por los vientos.

El *H. akashiwo* tiene un elevado potencial de crecimiento (de hasta cinco divisiones diarias) causantes de mareas rojas en un corto período. Las *Raphidophytes* aparecieron en aguas costeras japonesas con una temperatura mínima del agua de unos 16 °C. Por primera vez, en 1991 también se encontraron en aguas costeras holandesas las *Raphidophytes*, *C. antiqua*, *C. marina* y *F. japonica*, donde, excepto en verano, la temperatura está muy por debajo de la de las aguas costeras japonesas. Durante los periodos cálidos, las mismas condiciones que en Japón se dan en el Mar de Wadden en Holanda y en el estuario al sur del río Rin. Pueden haber presente especies adaptadas al ambiente más fresco del Mar del Norte. El crecimiento óptimo de las *Raphidophytes* tuvo lugar en Japón con salinidades entre 11 a 20 ‰, el mismo rango medido en el Mar de Wadden en Holanda y en el estuario al sur del río Rin. Por tanto no

era esperable la pequeña floración de *Chattonella* de mayo de 1993 al sur del Mar del Norte central con salinidades de 25 a 28‰. En las aguas costeras holandesas aun puede haber quistes de *Raphidophytes*. Las investigaciones indicaron que el enquistamiento tuvo lugar frecuentemente cuando las condiciones ambientales son poco favorables para un crecimiento “normal”. Ocasionalmente se dan en las aguas costeras holandesas los factores que estimulan el enquistamiento, como el agotamiento de nutrientes, la presencia de superficies sólidas a las que puedan adherirse los quistes y bajas intensidades de luz (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

La *C. marina* y la *C. antiqua* poseen un ciclo de vida diplóntico en el que se han observado, junto con los quistes, células mas pequeñas previas al enquistamiento. Sin embargo, estas células y quistes son desconocidos en las aguas costeras holandesas, quizás por falta de un muestreo adecuado. La *C. antiqua* tenía un crecimiento máximo a 25 °C, con salinidades entre 25 y 41‰ y con intensidades luminosas superiores a 0,04 ly min⁻¹ (1 ly=700W). En el rango de pH ensayado (7,6 a 8,3) no se apreciaron efectos significativos sobre el crecimiento de la *C. antiqua*, aunque se observó el crecimiento máximo.

La temperatura y la salinidad también afectaron la forma y motilidad de las células de *C. antiqua*. La intensidad de la luz no influenció la morfología en el rango de intensidades ensayado (20-180 µE/m²/s) en tanto que una buena motilidad se apreció a 60-180 µE/m²/s. El crecimiento de la *C. antiqua* fue beneficiado por nitratos y amonio, y hasta cierto punto por la urea, pero no por la glicina, alanina y glutamato. El ortofosfato sirvió como una buena fuente de P aunque no el glicerofosfato. El Fe³⁺ y la vitamina B₁₂ promovieron el crecimiento. La glucosa, el acetato y el glicolato no mejoraron el crecimiento con o sin luz (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.3.3 Hábitat

La *G. breve* aparece regularmente en el Golfo de México, aunque también se ha informado su presencia o de especies similares en el Atlántico occidental, España, Portugal, Grecia, Japón y Nueva Zelanda. No es seguro si las especies similares a la *G. Breve* deben atribuirse a ella misma o si representan especies diferentes, muy relacionadas (Smith *et al.*, 1993; Taylor, *et al.*, 1995). Se encontró una forma atóxica de la *G. breve* en el Mar Interior del Japón (Viviani, 1992).

En Nueva Zelanda, en 1993 la *G. breve* se identificó en las aguas de la costa al norte de Auckland después de un incidente de NSP en Orewa y en la Bahía de Plenty. También se encontraba en la región de Coromandel (conteos celulares de hasta 70 000 por litro) y en la Bahía Bream (conteos celulares de hasta 100 000 por litro) en enero de 1993. Los conteos celulares descendieron en febrero y marzo; en abril en la región de Coromandel había menos de 300 células por litro (Smith *et al.*, 1993).

En el verano de 1995 a 1996, se informó de un serio problema con toxinas en aerosol en Sud África en la Bahía False, que se extendió luego a Hermanus en la Bahía Walter, un lugar de vacaciones. La toxina en aerosol fue asociada a una floración de una especie de dinoflagelado tóxico, la *Gymnodinium*, informada por primera vez en 1988 en la Bahía False. A pesar de que estas especies han florecido varias veces desde entonces, los efectos nocivos sobre los seres humanos no fueron nunca antes tan evidentes como en 1995-96. La mortandad de la fauna fue sin embargo pequeña, con excepción de la sufrida por las larvas de varios criadores de abalone en tierra firme en la zona de la Bahía Walker. A lo largo de la costa sudafricana, comúnmente se vio implicado el dinoflagelado *Gymnodinium nagakiense* en casos de NSP. La mayor parte de los brotes han sido informados de Bahía False, donde son responsables de la decoloración verde-oliva, durante el otoño, del agua de mar (Van der Vyver, 2000).

Se demostró en 1986-87 la presencia de *Heterosigma akashiwo* y de *Fibrocapsa japonica* en las aguas costeras de las bahías de Tampa y Florida en la Florida. Se informó, además la presencia en 1990, de especies de *Chattonella* (*subsalsa* y *marina*). Se sabe que todas estas especies producen toxinas del tipo de las brevetoxinas. La presencia de estas especies en las aguas de la Florida se extendió a aguas

de temperatura templada a menores salinidades (menores de 32‰) y temperaturas mayores (mayores de 28 °C) que las previamente informadas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se informaron en mayo-setiembre de 1995-1996, en la Bahía de Pedro el Grande (Mar del Japón, Federación Rusa), floraciones masivas de *Heterosigma akashiwo* y *Chattonella* sp. (Orlova *et al.*, 1998). En el Japón, en 1972, *Fibrocapsa japonica* formó mareas rojas intensas en las zonas costeras de la Prefectura de Ehime y se informó posteriormente la presencia de este *Raphidophyte* en la Bahía Atsumi, en el Mar Interior Seto y Harima Nada. Se ha informado también la presencia de *F. japonica* en la zona holandesa del Mar del Norte y en las costas este y oeste de la Isla del Norte y en la costa este de la Isla del Sur de Nueva Zelanda (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Además, Hallegraeff y Hara (1995) informaron que la *F. japonica* aparecía en las aguas costeras de Australia, California, América del Norte y Francia.

F. japonica y *Heterosigma akashiwo*, ambas causantes de muerte de peces, en la cercanía de las costas del Golfo de Hauraki en Nueva Zelanda, parecían dominantes en las floraciones rojas informadas en octubre y noviembre de 1992. La *F. japonica* persistió en bajas cantidades en el Golfo de Hauraki y en la Bahía Plenty hasta mediados de enero de 1993 (Smith *et al.*, 1993).

En bahías templadas y subtropicales del Japón, la República de Corea, Singapur, Canadá, Nueva Zelanda, Inglaterra, zonas occidentales y orientales de América del Norte y en Bermuda hubieron mareas rojas causadas por *H. akashiwo* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Según Hallegraeff y Hara (1995) el *H. akashiwo* es un organismo que causa problemas para la acuicultura de peces de escamas en Columbia Británica, Chile, Nueva Zelanda y posiblemente Singapur.

Se ha informado de fuertes mareas rojas causadas por *Chattonella antiqua* en regiones costeras de Japón (Khan *et al.*, 1996). También en el sudoeste asiático, la *C. antiqua* causó mortandad masiva de peces (Hallegraeff y Hara, 1995).

En la Bahía Boston, Australia Meridional, se encontraron niveles elevados de brevetoxinas en los hígados de atunes de cultivo (*Thunnus maccoyii*) muestreados en diversas épocas, durante un episodio de mortalidad. En la columna de agua se encontró *Chattonella marina* (Munday y Hallegraeff, 1998). Según Hallegraeff y Hara (1995) la *C. marina* apareció en aguas costeras estancadas en la India, Australia y Japón, ricas en sustancias orgánicas. Varias floraciones tóxicas extensas causadas por las células potencialmente tóxicas de *Chattonella* spp. tuvieron lugar desde la Bahía Alemana hasta casi el norte de Skagen entre fines de marzo y la primera mitad de mayo de 1998, 2000 y 2001 (Douding y Göbel, 2001)

5.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

5.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas NSP en los organismos acuáticos

Se dispone de pocos datos cuantitativos sobre las velocidades de acumulación y depuración de las brevetoxinas en bivalvos. En presencia de 5 000 células/ml las ostras incorporan las toxinas en menos de cuatro horas y las depuran en 36 horas (60 por ciento). La potencia de la depuración depende de la especie y es muy variable, aun bajo condiciones controladas de laboratorio (Viviani, 1992).

Crassostrea virginica depuró las brevetoxinas entre las dos y las ocho semanas siguientes a una floración. La biotransformación es específica de cada especie y puede resultar en derivados más potentes. 72 horas después de administrar oralmente ¹⁴C- PbTx-3 en una pasta de carne de pescado al *Opsanus beta*, su sistema hepatobiliar contenía 40 por ciento de la contaminación, confirmando el papel clave de este sistema en la detoxificación y eliminación de las brevetoxinas. El tejido muscular contenía 27 por ciento, seguido del tracto gastrointestinal con el 25 por ciento. Cuando el pez del Golfo *Opsanus beta* recibió por vía intravenosa (mediante una cánula implantada en la vena caudal) 0,5 µg de ³H-marcada PbTx-3/kg pc, la radioactividad en la sangre cayó rápidamente con una T_{1/2} de 29 minutos. Un modelo abierto de tres componentes con compartimiento central representando la

sangre describió adecuadamente la tóxica-cinética. La distribución a los tejidos fue rápida. Una hora después de administrar la dosis se detectó radioactividad en todos los tejidos examinados, con las proporciones más elevadas en músculos, intestinos e hígado (40,2, 18,5 y 12,4 por ciento de contaminación). Hasta las 96 horas la radioactividad en el hígado permaneció constante (7,8 por ciento), en tanto que los niveles en la bilis, riñón y piel aumentaron (34,5, 13,8 y 6,7 por ciento, respectivamente) disminuyendo los niveles en todos los otros tejidos, particularmente en el músculo (15,9 por ciento). En la vejiga, aproximadamente el 24 por ciento de la radioactividad administrada había sido excretada a las 96 horas. La extracción de la bilis reveló metabolitos de la PbTx-3 solubles tanto en agua como en solventes (>94 por ciento de radioactividad en la bilis). No se han identificado metabolitos (Van Apeldoorn *et al.*, 2001)

El corvinón ocelado joven (*Scianops ocellatus*) mostró una actividad significativamente más elevada de la enzima hepática P450 etoxiresorufina *O*-deetilasa (EROD) con la dosis mayor, luego de recibir oralmente, por cebado, 1,5 o 2,5 µg de PbTx-3/100 g pc en una pasta de carne de pescado. No se vieron afectadas las actividades de las enzimas hepáticas, P450 pentoxiresorufina *O*-depentilasa (PROD), ni de la citosólica, glutatióna *S*-transferasa (GST). El citocroma total P450 no era superior en los peces tratados. (Van Apeldoorn *et al.*, 2001)

Se examinaron en la lubina estriada (*Morone saxatilis*) los efectos de la PbTx-2 sobre las enzimas xenobioticas metabolizantes y la posible identificación de marcadores biológicos potenciales de la exposición. A siete lubinas estriadas se las expuso durante cuatro días a una pasta con toxinas (~50 µg/100 g pc) administrada oralmente por cebado a un nivel de 0,5 g/100 g pc. Un grupo de control negativo recibió la pasta de control y otro positivo recibió por vía intraperitoneal β-naftoflavona (5 mg/100 g pc). Se buscó EROD, UDP glucuronosil transferasa, epóxido de hidrolasa microsomal, y cuatro isozimas de la glutatióna-*S*-transferasa (GST). No se apreció un efecto significativo sobre el peso corporal en los peces tratados con PbTx-2. En los peces tratados con PbTx-2 se observaron un mayor índice hepatosomático y que tanto las proteínas microsomales como las cistosólicas del hígado eran significativamente inferiores. La PbTx-2 incrementó tres veces la actividad de la EROD, mientras que la β-naftoflavona la aumentó 30 veces. La PbTx-2 incrementó 35 y 50 por ciento la actividad de dos isoenzimas glutatióna *S*-transferasa (GST). Los incrementos observados en las isoenzimas GST las convierten en biomarcadores potencialmente útiles. La PbTx-3 indujo la citocrome P-450IA, una enzima clave Fase I y la glutatióna *S*-transferasa, una importante enzima Fase II. Los posibles senderos metabólicos incluyen la epoxidación en el doble enlace del anillo H, la hidrólisis del epóxido para formar el hidrodiole, el clivaje del anillo A de la lactona y la formación de conjugados de glutatióna tanto en la función alcohólica de la PbTx-3 o en los metabolitos Fase I (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.4.2 Mariscos con toxinas NSP

El marisco es el fruto del mar con brevetoxinas más importante (Viviani, 1992). Se ha informado que varias especies (como las ostras, las almejas y mejillones) las acumulan. Estas especies son inmunes a las brevetoxinas, permaneciendo sanas; en tanto que los peces, aves y mamíferos son todos susceptibles a las brevetoxinas (Fleming y Baden, 1999).

Las PbTx-2 y PbTx-3 fueron detectadas en Nueva Zelanda en la ostra *Crassostrea gigas* (Ishida *et al.*, 1996), junto con cuatro análogos (ver Figuras 5.2a y 5.2b), la BTX-B1 en berberechos (*Austrovenus stutchburyi*) (Ishida *et al.*, 1995) y las BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 un tipo de almejas (*Perna canaliculus*) (Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998). Estos análogos sólo se encontraron en mariscos contaminados y no en floraciones de campo de *G. breve* o en cultivos de *G. breve*, por lo que fueron considerados metabolitos de las brevetoxinas formados por el propio marisco (Morohashi *et al.*, 1999). Este marisco de Nueva Zelanda resultó de incidentes con NSP. Las BTX-B1, BTX-B2 y BTX-B4 no mostraron ictiotoxicidad pero mantenían su capacidad de activar los canales de sodio (Ishida *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1998; Morohashi *et al.*, 1999). La BTX-B3, administrada a ratones

intraperitonealmente a 300 µg/kg pc, no los mató (Morohashi *et al.*, 1995). No se dispone de datos sobre la ictiotoxicidad de la BTX-B3.

Se buscaron, con un radioinmunoensayo y con un radioensayo, brevetoxinas en caracoles marinos (*Busycon contrarium*) y almejas (*Chione cancellata* y *Mercenaria* spp.) recogidos de la Bahía de Sarasota, Florida (una zona en la que tres personas fueron afectadas por la NSP en 1996). La actividad encontrada era consistente con la de las brevetoxinas en las muestras de mariscos. Los análisis por HPLC de los extractos de marisco confirmaron la presencia de PbTx-2 y PbTx-3 así como de metabolitos conjugados de las PbTxs. No se ha aún aclarado la estructura de estos metabolitos (Poli *et al.*, 2000).

5.4.3 Otros organismos acuáticos con toxinas NSP

Se siguieron, en el laboratorio, las brevetoxinas de *G. Breve*, a lo largo de cadenas alimentarias experimentales desde el dinoflagelado, pasando por copépodos pastoreadores, a peces jóvenes. Se utilizaron tres combinaciones diferentes de copépodos y especies de peces jóvenes:

- (a) el copépodo *Temora turbinata*, el, *Euchinostomus argenteus*, y el *Fundulus majalis*.
- (b) el copépodo *Labidocera aestiva* y el *Lagodon rhomboides*
- (c) el copépodo *Acartia tonsa* y el *Leiostomus xanthurus*

Ninguna de las cuatro especies de peces murió luego de ingerir copépodos alimentados con *G. breve*.

En la experiencia (a) solamente se detectaron las brevetoxinas (PbTx-2 y -3) en los peces cuando los copépodos se alimentaron con cultivos con 600×10^3 células/litro de *G. breve*. No se encontraron toxinas en los peces alimentados con cultivos de 8×10^3 y 20×10^3 células/litro. Se apreció una transferencia de un 10 por ciento, en un plazo de digestión de dos horas, de los copépodos a las vísceras de los peces. En los experimentos (b) se apreció en dos horas la transferencia de las brevetoxinas de los copépodos a las vísceras de los peces (luego de alimentarlos durante 40-50 minutos con copépodos). Los niveles de toxinas en las vísceras disminuyeron dentro de las ocho horas; no se encontraron toxinas en el tejido muscular. Nuevamente en (c) se detectaron toxinas en los peces. Los niveles más elevados en las vísceras se encontraron a las dos horas; entre dos-seis horas y hasta 25 horas la toxina se transfería a los músculos (Tester *et al.*, 2000).

Las brevetoxinas han sido detectadas cuantitativamente en aves de Muir de la costa de California, en algunas muestras de atún de Australia y en lachas y lisas de la costa de la Florida (Bossart *et al.*, 1998; Quilliam, 1999).

5.5 Toxicidad de las toxinas NSP

5.5.1 Mecanismo de acción

Las brevetoxinas son sustancias depolarizantes que accionan los canales de sodio de las paredes celulares sensibles al voltaje. De esta forma se alteran las propiedades de membrana de las células excitables favoreciendo el flujo hacia el interior de iones Na^+ . Por incorporación externa de tetrodotoxina puede bloquearse esta corriente (Fleming y Baden, 1999). Las brevetoxinas actúan sobre la posición 5 con una estequiometría 1:1 (Rein *et al.*, 1994). La toxina parece que produce sus síntomas sensoriales al enlentececer los canales de sodio rápidos, resultando en una activación persistente y un gatillado repetitivo (Watters, 1995).

El análisis conformacional muestra que el anillo H no saturado de la brevetoxina B (ver Figura 5.1) favorece la conformación bote al igual que el anillo G saturado de la brevetoxina A (ver Figura 5.1). Por reducción, el anillo H de la brevetoxina B pasa a una conformación corona. Este sutil cambio en

las preferencias conformacionales induce un cambio significativo en la forma general de la molécula, que se cree causa pérdidas de afinidad y toxicidad (Rein *et al.*, 1994).

Los problemas respiratorios asociados con la inhalación de brevetoxinas en aerosol son posiblemente debidos en parte a la apertura de los canales de sodio. En ovejas, los broncoespasmos podían bloquearse con atropina. Además, parece que los mastocitos tienen su papel al poder bloquearse eficazmente el broncoespasmo en las ovejas con cromolina y clorfeniramina. Se informó que la brevetoxina podía combinarse con una posición separada a las puertas del canal de sodio, provocando la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas autónomas. En particular, puede liberar acetilcolina, que provoca contracciones moderadas de la tráquea y una desgranulación masiva de los mastocitos (Fleming y Baden, 1999).

Por ser además las brevetoxinas inhibidores enzimáticos de las proteinasas lisosomales conocidas como catepsinas, encontradas en células fagocíticas como los macrófagos y los linfocitos, es posible que puedan asociarse también efectos inmunológicos agudos y crónicos (incluida la liberación de intermediarios inflamatorios resultantes en un shock tóxico fatal) con la exposición a brevetoxinas en aerosol, especialmente crónicas y/o poblaciones susceptibles (Bossart *et al.*, 1998), aunque Fleming y Baden (1999) dudan del mecanismo de las catepsinas.

5.5.2 Farmacocinética

estudios en animales de laboratorio

administración oral

Las ratas macho F344 administradas con una única dosis oral de ³H-PbTx-3 murieron pasadas 6, 12, 24, 48, 96 o 192 horas. Se analizó la radioactividad de los tejidos recuperados. A otro grupo de animales se le administró oralmente una dosis bolus de ³H-PbTx-3 recogiéndose con intervalos de 24 horas durante siete días, la orina y las heces. La PbTx-3 se distribuyó ampliamente en todos los órganos disminuyendo gradualmente las concentraciones con el tiempo. El nivel más alto de PbTx-3 se encontró en el hígado durante todo el muestreo. También basado en los estudios intravenosos que se mencionan seguidamente, puede concluirse que el hígado recibió la PbTx-3 tanto del portal como de la circulación hepática y continuó acumulando PbTx-3. Siete días después de recibir la dosis bolus oral, aproximadamente el 80 por ciento fue excretada por la orina y las heces, en cantidades equivalentes. Sin embargo, en las primeras 48 horas se liberó más PbTx-3 por las heces, y seguidamente la mayor parte de la toxina fue eliminada por la orina (Cattet y Geraci, 1993).

administración intravenosa

Los estudios intravenosos en ratas Sprague-Dawley macho con ³H- PbTx-3 mostraron una rápida desaparición de esta toxina del torrente sanguíneo (menos del 10 por ciento permanecía pasado un minuto), hígado (18 por ciento de la dosis pasados 30 minutos), músculo esquelético (70 por ciento de la dosis pasados 30 minutos) y tracto gastrointestinal (8 por ciento de la dosis pasados 30 minutos), la fase de distribución T_{1/2} aproximadamente 30 segundos. El corazón, riñones, testículos, cerebro, pulmones y bazo contenían cada uno menos del 1,5 por ciento de la dosis. Al cabo de 24 horas la radioactividad en el músculo esquelético disminuyó a 20 por ciento de la dosis mientras permanecía constante la radioactividad en el hígado y aumentaba en el estómago, intestinos y heces lo que apunta a la excreción biliar como una ruta de liberación importante. Al sexto día, el 14,4 por ciento de la radioactividad había sido excretada por la orina y el 75,1 por ciento por las heces con un 9,0 por ciento en el cuerpo. La cromatografía en capa fina de orina y heces indicó una biotransformación en varios compuestos más polares.

Experiencias con hígados perfundidos y con hepatocitos aislados confirmaron que el mecanismo ocurre en el hígado y que la excreción biliar es una ruta importante para la eliminación de la toxina. La PbTx-3 fue excretada a la bilis como toxina madre junto con cuatro metabolitos más polares, uno de

los cuales parecía ser un derivado de epóxido. Se desconoce si este compuesto corresponde a la PbTx-6, al epóxido correspondiente de la PbTx-3 o a otra estructura (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Aplicación por la dermis

Se examinó la penetración percutánea *in vitro* de la ^3H -PbTx-3 en la piel humana y en la de cobayos, comparándose los resultados con tres vehículos (agua, metanol y dimetilsulfoxido, DMSO). Se ocluyeron las superficies epidérmicas con PbTx-3 en agua durante toda la duración de la experiencia (48 horas) para reducir la evaporación. Se expusieron superficies epidérmicas con PbTx-3 en metanol o DMSO, a condiciones ambientales (incubación de células de difusión a 36 °C). La penetración total a través de la piel humana aislada fue respectivamente de 0,43, 0,14 y 1,53 por ciento de la dosis con agua, metanol y DMSO como vehículo. La penetración total a través de la piel de conejillos de India fue respectivamente de 1,5, 3,4 y 10,1 por ciento de la dosis con agua, metanol y DMSO como vehículos. La penetración a través de la piel del cobayo fue significativamente más rápida que a través de la piel humana con metanol y DMSO como vehículos. El análisis del fluido receptor indicó que más del 80 por ciento de la radioactividad estaba asociada con PbTx-3 no modificada (Kemppainen *et al.*, 1989).

Se estudió la penetración y distribución en la dermis de ^3H -Pbtx-3 en la piel de cerdo (0,3-0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de piel) *in vivo* e *in vitro*. Se empleó como vehículo DMSO. En los estudios *in vivo* se cubrió el punto de aplicación con un elemento de protección no oclusivo. En los estudios *in vitro* las superficies de la epidermis se expusieron al medio ambiente (22 °C). Los estudios *in vivo* indicaron una absorción cutánea media del 11,5 por ciento de la dosis administrada durante 48 horas de aplicación tópica (calculada dividiendo el porcentaje de la dosis excretada luego de la administración tópica por el porcentaje de la dosis excretada luego de la administración subcutánea multiplicado por 100). En los estudios *in vitro* la absorción subcutánea media durante las 48 horas siguientes a la administración fue de 1,6 por ciento (basada en la radiactividad acumulada en el fluido receptor) o 9,9 por ciento (basada en el fluido receptor y la dermis). La penetración a través de la epidermis en la dermis fue rápida; la acumulación máxima en la dermis se apreció a las cuatro horas (9,1 por ciento *in vivo* y 18 por ciento *in vitro*). A las 24 horas disminuyó la cantidad en la dermis, respectivamente a 2,3 y 15 por ciento *in vivo* e *in vitro*. En el estudio *in vitro* más del 95 por ciento de la radiactividad en el fluido receptor no fue alterada por la PbTx-3 (Kemppainen *et al.*, 1991).

instilación intratraqueal

Se realizó un estudio con PbTx-3 en ratas para analizar la tóxica cinética de esta brevetoxina por ser el tracto respiratorio una de las principales rutas de exposición a las brevetoxinas en los seres humanos.

Por instilación intratraqueal se administró ^3H -Pbtx-3 a ratas macho F344. Los animales fueron sacrificados a las 0, 5, 3, 6, 24, 48 o 96 horas posteriores a la exposición recogiendo orina, heces y tejidos. Mas del 80 por ciento de la dosis se eliminó rápidamente (dentro de 0,5 hora) del pulmón distribuyéndose por el cuerpo, principalmente al músculo esquelético (49 por ciento), intestinos (32 por ciento) e hígado (8 por ciento); solo se encontró un 6 por ciento en el pulmón pasada 0,5 hora. Los menores niveles estaban en la sangre, cerebro y grasas. Por siete días se retuvo un 20 por ciento del nivel inicial en los tejidos. La mayor parte de la PbTx-3 fue excretada dentro de las 48 horas por las heces y orina, con aproximadamente el doble por las heces (60 por ciento) que por la orina (30 por ciento). No se han identificado los metabolitos. Los resultados de este estudio apuntan a que los efectos potenciales sobre la salud, asociados con las brevetoxinas inhaladas, pueden ir más allá de la irritación respiratoria pasajera observada en los seres humanos expuestos al aerosol proveniente del mar durante las mareas rojas (Benson *et al.*, 1999).

5.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

Cuadro 5.1 Toxicidad aguda de las brevetoxinas en ratones suizos

brevetoxinas	ruta	Tiempo de observación (horas)	Valor LD ₅₀ µg/kg pc	vehículo	referencia
PbTx-1	intraperitoneal	24	> 100	0,9% salina + 0,1% Tween 60	Dechraoui <i>et al.</i> , 1999
PbTx-3	oral (hembras)	24	520	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-3	intraperitoneal (hembras)	24	170	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-3	intravenoso (hembras)	24	94	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-	oral (hembras)	24	6 600	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-2	intraperitoneal (hembras)	24	200	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-2	intravenoso (hembras)	24	200	0,9% salina	Baden and Mende, 1982

Cuadro 5.2 Toxicidad intraperitoneal aguda de análogos de la brevetoxina en ratones

análogos de la brevetoxina	ruta	tiempo de supervivencia	dosis letal mínima µg/kg pc	vehículo	referencia
BTX-B1	intraperitoneal	< 2 horas	50	metanol	Ishida <i>et al.</i> , 1995; 1996
BTX-B2	intraperitoneal	< 1 hora	306	agua	Morohashi <i>et al.</i> , 1999; Murata <i>et al.</i> , 1998
BTX-B3	intraperitoneal	no hubieron muertes dentro de las 24 horas	>300	desconocido	Morohashi <i>et al.</i> , 1995
BTX-B4	intraperitoneal	6-24 horas	100	1% Tween 60	Morohashi <i>et al.</i> , 1999

síntomas de intoxicación

Las brevetoxinas producen una variedad de efectos centrales y periféricos *in vivo*; incluyen una rápida reducción del ritmo respiratorio, problemas de conducción cardiacos y una disminución de las temperaturas corporales internas y periféricas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

La PbTx-3 ocasionó temblores en ratones alimentados oralmente, seguidos de marcadas contracciones musculares o fasciculaciones, fenómeno caudal de Straub, un periodo de respiración muy dificultosa y la muerte. Los ratones inyectados con PbTx-3 mostraron el síndrome de SLUD, salivación,

lacrimación, micción y defecación. El síntoma más pronunciado fue la hipersalivación y eran también comunes una micción y defecación copiosas. Ocasionalmente, a dosis superiores, se presentaban movimientos masticatorios compulsivos y rinorea. La dosificación intravenosa en los ratones produjo efectos inmediatos, y la intraperitoneal y oral resultó en respuestas latentes (respectivamente 30 minutos y 5 horas). La potencia dos veces superior de la PbTx-3, por administración intravenosa, comparada con la intraperitoneal apunta a una detoxificación o excreción parcial por la bilis durante el primer pasaje por el hígado (Baden y Mende, 1982). En ratas se observaron, movimientos respiratorios como los ocasionados por falta de aire, movimientos de la cabeza, depresión, ataxia y, en algunos animales, torsiones de la cabeza (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Con posterioridad a la inyección intraperitoneal, los análogos de la brevetoxina BTX-B2 y BTX-B4 causaron en ratones parálisis de los miembros posteriores, diarrea, dipnea y convulsiones (Morohashi *et al.*, 1999) y la BTX-B1 irritabilidad, parálisis posterior y/o de los cuartos posteriores, dipnea severa y convulsiones previas a la muerte por parálisis respiratoria (Ishida *et al.*, 1995; 1996).

antidotos

En un estudio profiláctico se pretrataron ratas macho en estado conciente con catéteres en la arteria carótida y en la vena yugular con 1 ml de la anti-brevetoxina IgG (PbAb) o del control IgG, por infusión intravenosa de 10 minutos. Veinte minutos después se administró durante una hora, PbTx-2 a las ratas (25 µg/kg pc = dosis subletal). Las ratas pretratadas con IgG de control mostraron signos de intoxicación con brevetoxina, que no se manifestaron en las ratas pretratadas con PbAb. En un estudio de terapia se administró 100 µg/kg pc de PbTx-2 (=LD₉₅), durante 1 hora a las ratas, inmediatamente seguido de 2 ml de PbAb o del control IgG durante 30 minutos. Durante la infusión con PbTx-2, ambos grupos mostraron signos de intoxicación por brevetoxinas. Las ratas tratadas con el IgG de control murieron dentro de las seis horas. La respiración de las ratas tratadas con PbAb volvió a valores normales casi inmediatamente y solo se apreciaron escasos signos neurológicos. Pasadas 24 horas, habían desaparecido casi todos los signos neurológicos con temperaturas internas y periféricas en valores normales. Todos los animales tratados con PbAb sobrevivieron por lo menos ocho días. Hubo una diferencia de tiempos entre dos grupos de signos, apuntando a compartimentos de alta y de baja accesibilidad para el anticuerpo que representa probablemente los sistemas nervioso central y periférico (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

dosificación intravenosa

En ratones, la LD₅₀ intravenosa pareció ser de 2-4 mg/kg pc para la fracción hemaglutinativa aislada de las mareas rojas de *Chattonella marina*. Los ratones mostraron parálisis respiratoria (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Fueron observadas durante seis horas o hasta la muerte grupos de cuatro ratas macho que recibieron una infusión intravenosa durante una hora, después de ser quirúrgicamente preparados y de una recuperación de 24 horas, o solo con vehículo o con 12,5, 25, 50 o 100 µg PbTx-2/kg pc. Todos los animales con dosis al nivel de 100 µg/kg pc murieron dentro de las dos horas. Uno de cada cuatro animales con 50 µg/kg pc murieron durante las seis horas de duración del estudio, sobreviviendo el resto. Las velocidades de respiración a 12,5 µg/kg pc cayeron en 90 minutos a casi un 60 por ciento del valor de base y al 20 por ciento para 25, 50 y 100 µg/kg pc. La recuperación a los valores respiratorios normales tuvo lugar seis horas después de la exposición, excepto para el grupo de 50 µg/kg pc que recuperó solo 60 por ciento del valor base. Durante las primeras dos horas, se presentaron en todos los grupos tratados disminuciones de temperatura interna del cuerpo dependientes de la dosis, observándose una notoria caída de la temperatura periférica en todos los grupos con excepción del de 12,5 µg/kg pc. Se observó una disminución promedio de la temperatura corporal periférica de 0,5 °C en el grupo de 12,5 µg/kg pc. Los valores de gas en la sangre permanecieron normales, excepto en la fase terminal. La electrocardiografía mostró a dosis ≥25 µg/kg pc bloqueo del corazón, contracciones ventriculares prematuras y ritmos idioventriculares (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Cobayos Hartley macho cateterizados recibieron una infusión intravenosa de PbTx-3 a una velocidad de 0,63 µg/kg/min hasta la muerte del animal. El tiempo promedio para presentarse el paro respiratorio fue de 25 minutos. La dosis media de PbTx-3 en ese momento fue de 15,8 µg/kg. La PbTx-3 causó acidosis láctica temprana en el periodo de infusión, con etiología desconocida, compensada incrementando el flujo. No fue incrementada la resistencia de las vías respiratorias, ni disminuyó la acción dinámica durante la intoxicación, lo que sugiere que ni las vías respiratorias centrales (vías respiratorias superiores, traquea y vías respiratorias de segunda-tercera generación) ni las periféricas respondieron de manera significativa (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

dosificación intraperitoneal

No causó ningún síntoma anormal la inyección intraperitoneal en ratones de la fracción hemaglutinativa aislada de mareas rojas de *Chattonella marina*, en dosis de 2,5 mg (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

toxicidad con dosis repetidas

No hay información

teratogenicidad/reproducción

No hay información

mutagenicidad

No hay información

estudios in vitro con brevetoxinas

Se evaluaron en cortes de hígado de ratón los efectos de la PbTx-3 sobre diversos parámetros del metabolismo hepático. La PbTx-3 inhibió el consumo de oxígeno, incrementó el contenido de Na⁺ y, presumiblemente la concentración intracelular de Na⁺ de los cortes de hígado. La PbTx-3 activó también un camino de intermediario para el egreso del K⁺. No se observó ningún efecto de la PbTx-3 sobre la actividad de bombeo Na⁺-K⁺. La tetrodotoxina, un bloqueador de canales, suprimió el efecto de la PbTx-3 sobre el contenido de Na⁺ en los cortes de hígado. La tetrodotoxina también antagonizó la inhibición del consumo de oxígeno. La tetrodotoxina, no afectó el efecto de la PbTx-3 sobre los movimientos del K⁺ lo que apunta a la activación por la PbTx-3 de dos diferentes caminos o canales iónicos. Los resultados de este estudio sugieren que la PbTx-3 puede inducir sobre el hígado efectos que parecen similares a los observados sobre nervios y membranas musculares (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se estudiaron también en cortes de hígado los efectos sobre la estructura de las células hepáticas. La microscopía común mostró hipertrofia e incremento de los espacios vacíos en los hepatocitos y un incremento de la basofilia en la zona perivenosa de los lóbulos. Ultra estructuralmente, la vacuolación estaba relacionada al hinchamiento acuoso del retículo endoplasmático grueso y/o por retención de proteínas sin acumulación de gotitas grasas. La acumulación de proteínas y/o de ribosomas degranulados es responsable del incremento de la reacción basofílica de las células, especialmente en la región perivenosa, zona donde los lípidos son habitualmente procesados. El hinchamiento en el retículo endoplasmático suave, la de granulación del retículo endoplasmático grueso, las deformaciones y los *lytic cristae* en la mitocondria y, la presencia de lisosomas activos evidencian los efectos de la PbTx-3 sobre las células hepáticas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se observaron efectos inotrópicos y arritmogénicos positivos en preparaciones cardiacas aisladas de ratas y cobayos a concentraciones entre 1,25 x 10⁻⁸ y 1,87 x 10⁻⁷ M PbTx-2. Los estudios sugieren que la PbTx-2 es una poderosa cardiotoxina que actuó incrementando la permeabilidad sarcolemnal del

sodio y liberando catecolaminas de terminaciones nerviosas del nervio simpático (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Las preparaciones de brevetoxinas en bruto contraen de las vías respiratorias; se desconocía sin embargo si esta respuesta mecánica estaba asociada a cambios en el potencial de membrana de los músculos lisos de las vías respiratorias, sea directamente sobre las membranas de las células musculares o indirectamente por liberación de acetilcolina endógena a nivel de las terminaciones nerviosas periféricas. Por lo tanto se midieron los potenciales de membrana y la contractibilidad *in vitro* de preparaciones de músculos lisos traqueales caninos antes de y durante la exposición a toxinas en bruto (0,01-1,2 µg/ml), o a fracciones purificadas de PbTx-2 y PbTx-3 (0,01-0,07 µg/ml). Análogamente se estudiaron los potenciales de membrana en células de cultivo de músculos lisos de las vías respiratorias. La fracción en bruto de las brevetoxinas produjo despolarizaciones dependientes de la concentración en las preparaciones *in vitro* de músculos lisos de vías respiratorias, al igual que las fracciones purificadas de las PbTx-2 y PbTx-3 aunque con una potencia unas diez veces superior que las toxinas en bruto. En todos los casos las despolarizaciones se estabilizaron en menos de cuatro minutos. No hubo una diferencia significativa en la relación concentración-respuesta entre las PbTx-2 y PbTx-3. A los 30 minutos de su lavado del baño de cultivo, se revirtieron totalmente los efectos de las toxinas crudas y purificadas. Los resultados indican que las brevetoxinas no produjeron efectos de despolarización directa en las células musculares lisas de las vías respiratorias, pues las brevetoxinas no tenían ningún efecto significativo sobre las preparaciones *in vitro* tratadas con tetrodotoxina, o en las preparaciones con células de cultivo. La broncoconstricción inducida por la brevetoxina se debe probablemente al efecto despolarizador de la acetilcolina endógena liberada de terminaciones nerviosas periféricas en la célula muscular lisa de la vía respiratoria (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.5.4 Toxicidad en seres humanos

exposición oral

Cuando las brevetoxinas se acumulan en los mariscos, su consumo crudos o cocidos, puede causar NSP, un síndrome tóxico algo similar a las intoxicaciones PSP y ciguatera, aunque menos severo. Los síntomas de NSP aparecen entre los 30 minutos y las tres horas, duran unos pocos días con náuseas, vómitos, diarrea, chuchos de frío, sudoraciones, cambios de temperatura, hipotensión, arritmias, entumecimientos, hormigueo, parestesia labial, de la cara y de las extremidades, calambres, broncoconstricción, parálisis, ataques y coma. No se han informado síntomas crónicos o mortalidad (Cembella *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 1995; Tibbets, 1998). El tratamiento es básicamente de apoyo (Fleming y Baden, 1999).

exposición dérmica

Por su fragilidad relativa el organismo *G. breve*, se abre fácilmente por acción del mar liberando las toxinas (*G. breve* es un organismo "desnudo" desprovisto de caparazón externa de placas de polisacáridos como otros dinoflagelados). Al nadar en contacto directo con floraciones tóxicas, puede causar irritaciones de los ojos y membranas nasales (Cembella *et al.*, 1995; Fleming y Baden, 1999; Tibbets, 1998).

exposición por inhalación

Puede ocurrir también una exposición inhalatoria a las brevetoxinas resultante en dificultades respiratorias, así como irritación de las membranas nasal y de los ojos por la fragilidad relativa del organismo *G. breve* (Cembella *et al.*, 1995; Fleming y Baden, 1999; Tibbets, 1998).

Las toxinas de la *G. breve* estimulan fibras colinérgicas post-gangliónicas lo que puede resultar, por exposición a agua de mar en aerosol o a sus mareas rojas, en irritaciones respiratorias y conjuntivales, catarros con copiosos exudados, rinoreas, toses no productivas, y broncoconstricción. Algunas personas informan de otros síntomas como mareos, visión en túnel y sarpullidos de la piel. La irritación y la broncoconstricción son, en las poblaciones normales, rápidamente reversibles al abandonar las playas o al permanecer en zonas con aire acondicionado. Los asmáticos parecen ser, sin embargo, particularmente susceptibles. Además, hay informes anecdóticos de enfermedades

pulmonares prolongadas, especialmente en poblaciones susceptibles como ancianos o personas con enfermedades pulmonares crónicas (Fleming y Baden, 1999; Watters, 1995). Se supone que la PbTx además causa, inmunosupresión crónica, con posible intermediación de un blanco farmacológico adicional, las catepsinas de cisteína, presentes en las células inmunes e involucradas en la presentación de antígenos (Van Dolah *et al.*, 2001).

Se ha señalado a la PtBx-3 como la toxina primariamente responsable por molestias respiratorias en seres humanos (Benson *et al.*, 1999).

5.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

C. marina inhibió fuertemente la floración de la bacteria marina, *Vibrio alginolyticus*, en un co-cultivo de plancton/bacteria. La inhibición del crecimiento bacteriano causado por *C. marina* se relacionó con la densidad y el potencial metabólico de *C. marina*. El plancton rupturado no tenía efectos tóxicos sobre las bacterias. Fue completamente suprimido el efecto tóxico de *C. marina* en *V. alginolyticus* por agregado de catalasa y de superóxido dismutasa. Además de estas enzimas radicales eliminadoras de restos, el benzoato de sodio, un producto químico con la misma función, tenía también un efecto protector. Estos resultados sugieren que los radicales oxígeno son importantes en el accionar tóxico de *C. marina* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

La incubación del erizo de mar (*Lytechinus variegatus*) y de la trucha marina (*Cynoscion nebulosis*) en la micro capa superficial marina recogida próxima a las costas de los Cayos de la Florida, particularmente la proveniente de rastrillajes, afectó la embriogénesis temprana tanto de los invertebrados como de los peces. Las muestras del estrato por debajo de la superficie del agua no presentaron casi ninguna respuesta adversa en los embriones de cultivo. Los resultados de un procedimiento de evaluación para identificar la toxicidad parcial mostraron que un compuesto orgánico con un grupo funcional no polar era el responsable primario de la toxicidad. A pesar de que los análisis subsiguientes por CG-EM no identificaron un compuesto en particular, permitieron descartar como posibles agentes tóxicos a xenobióticos comunes como los plaguicidas organoclorados. Ensayos preliminares indicaron que dos de las muestras más tóxicas de la micro capa superficial marina contenían una brevetoxina. Sin embargo, la identificación es siempre especulativa en ausencia de una evaluación completa que permita la identificación toxicológica (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Segun Viviani (1992) los peces comienzan a morir cuando la cuenta de *G. breve* alcanza valores de 250 000 células/litro. Otros autores, sin embargo, informan que las muertes ocurrirán con cuentas de $\geq 100\ 000$ células/litro (Landsberg y Steidinger, 1998).

Los síntomas ictio-tóxicos incluían sacudidas violentas y nado en tirabuzón, pérdida de equilibrio progresivo por las aletas pectorales y dorsales, seguidos de parálisis respiratoria y muerte. Se cree que estos síntomas comienzan con el enlace de la PbTx-3 a sitios receptores específicos de los tejidos excitables de los peces (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se hicieron ensayos de toxicidad con peces dorada de cinco a seis meses de edad (*Pagrus major*) en cultivos 1-1 de *Chattonella antiqua*, *Fibrocapsa japonica* e *Heterosigma akashiwo*. En las etapas tempranas de crecimiento *C. antiqua* resultaba apenas tóxica hasta que la densidad celular alcanzó valores próximos a $1,95 \times 10^3$ células/ml. En cultivos de baja densidad (al segundo día) los peces no morían, aunque mostraban movimientos anormales durante 30 a 45 minutos; se recobraban gradualmente y a las pocas horas nadaban normalmente. Pasado este punto el incremento de la toxicidad parecía depender de la densidad celular. La toxicidad celular más elevada se observó durante la fase de crecimiento logarítmica temprana a media. La toxicidad decreció gradualmente durante la fase logarítmica tardía de crecimiento. En la fase logarítmica temprana el contenido de CaTx-II (~PbTx-3) era 14 veces superior al contenido de PbTx-3 en la fase de crecimiento logarítmica de los cultivos de *C. marina*, mientras que el contenido de CaTx-III (~ PbTx-2 oxidada) era solo dos veces superior que el de la PbTx-2 oxidada en *C. marina*. Como la PbTx-3 es 10 veces más ictiotóxica que

la PbTx-2 oxidada, *C. antiqua* parece ser mucho más ictho tóxica que *C. marina*. No se detectó toxicidad atribuible a cultivos de *F. japonica* en dorada hasta que la densidad celular alcanzó las $4,1 \times 10^3$ células/ml. La icthiotoxicidad también parecía variar con las fases de crecimiento e incrementarse con la edad; al octavo día alcanzó los valores más elevados. De ahí comenzó a caer a valores menores a medida que las células entraban en la fase estacionaria temprana. En los cultivos de *H. akashiwo* el dorada del Japón (*Pagrus major*) no mostró ningún comportamiento anormal a densidades celulares de 34 000 células/ml aunque tuvo una parálisis violenta, que condujo a la muerte cuando la densidad celular superó las 120 000 células/ml. Al estar expuesto a una marea roja de *H. akashiwo* con densidades celulares de 30 000 células/ml, el dorada del Japón (*Pagrus major*) experimentó parálisis transitoria, aunque no mortal. La marea roja en la Bahía de Kagoshima, en Japón, mató peces con densidades celulares de $>100\ 000$ células/ml (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Los huevos del pez Medaka (*Oryzias latipes*) micro inyectados con una dosis de 0,1-8,0 ng PbTx-1/huevo (seis a ocho horas luego de la post-fertilización), mostraron inhibición en los nacimientos dependiente de la dosis (la mitad del efecto máximo a unos 3 ng/huevo) y supervivencia de las larvas (mitad del efecto máximo a unos 4,5 ng/huevo). Se observó un incremento relacionado con la dosis de la actividad muscular (hipercinésis) al cuarto día embrionario con dosis de 0,1 a 0,9 ng/huevo y superiores. Luego de los nacimientos se encontraron anomalías morfológicas a los siguientes LAELs: 1,0 a 3,0 ng/huevo, curvatura lateral de la espina dorsal, cuya gravedad estaba relacionada con la dosis; 3,1 a 3,4 ng/huevo hernias del cerebro y las meninges por efectos craneales; y 3,4 a 4,0 ng/huevo ojo mal posicionado y ausencia de parte delantera del cráneo. Se observaron anomalías en los nacimientos con dosis $\geq 2,0$ ng/huevo (primero la cabeza en lugar de la cola) y con dosis $\geq 4,1$ ng/huevo se produjeron embriones que no dieron origen a nacimientos (Kimm-Brinson y Ramsdell, 2001).

Las mareas rojas de *H. akashiwo* dañaron el cultivo de peces en Japón (hamachi de cola amarilla y dorada del Japón (*Pagrus major*) en el Mar Interior de la isla Seto), Nueva Zelanda, Columbia Británica y Chile (salmón) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Varias floraciones importantes causadas por células de *Chattonella* sp., potencialmente tóxica ocurrieron entre la Bahía Alemana y el norte de Skagen entre marzo y la primera mitad de mayo de 1998, 2000 y 2001, resultando en mortandad de peces (Douding y Göbel, 2001).

En abril y mayo de 1996, murieron, luego de una floración, 1 700 toneladas de un atún de cultivo (*Thunnus maccoyi*) en Australia del Sur luego de una floración de *Chattonella marina* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se estudió la toxicidad sobre peces mosquito hembra (*Gambusia affinis*) de las PbTx-1, 2, 3, 6 y 9. Los valores de LC_{50} (24 horas) fueron de respectivamente 2,57, 14,3, 15,8, 77,7 y 31,4 nM para las PbTx-1, 2, 3, 6 y 9 (Rein *et al.*, 1994).

Se aislaron fracciones neurotóxicas, hemolíticas y hemaglutinativas de mareas rojas de *Chattonella marina*. Se expusieron dorada del Japón (*Pagrus major*) juveniles a las tres fracciones (0,02 por ciento) en frascos con agua de mar. Los peces murieron por exposición a las fracciones neurotóxicas de entre siete a nueve minutos, mostrando edemas conspicuos en su segunda lamela. Expuestos a las fracciones hemolítica y hemaglutinativa murieron dentro de los 20 a 50 minutos con liberación notoria de mucosa sobre los filamentos de sus agallas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Las exposiciones de dorada del Japón (*Pagrus major*) a mareas rojas de *C. marina* disminuyeron significativamente las pulsaciones, presumiblemente resultante en anoxia por una circulación reducida en las agallas. Como las pulsaciones se recuperaron con atropina, pareció que el trastorno cardiaco estaba neurológicamente asociado con la cardiofisiología intrínseca del pez. Las pulsaciones son controladas principalmente por el nervio vago, de naturaleza parasimpática y que deprime las pulsaciones bajo condiciones de despolarización. Se ha informado que la atropina inhibe la función del nervio vago. Las fracciones de neurotoxinas de *C. marina* despolarizaron el nervio vago de los peces,

induciendo la reducción en las pulsaciones. Los exámenes histológicos mostraron poco daño branquial resultante de las fracciones de neurotoxinas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Durante el otoño e invierno de 1987 a 1988, el tercero de un estudio de larvas de ocho años de duración, tuvo lugar una floración de *G. breve* en aguas costeras de Carolina del Norte. Se compararon las densidades de nueve especies de peces larvales (*Paralichthys albigutta*, *Citharichthys spilopterus*, *Micropogonias undulatus*, *Lagodon rhomboides*, *Brevoortia tyrannus*, *Paralichthys lethostigma*, *Leiostomus xanthurus*, *Mugil cephalus*, *Myrophis punctatus*) en los años 1987 y 1988 con sus densidades durante las dos estaciones anteriores y las cinco siguientes a la floración. No hubo evidencias de un impacto severo sobre las larvas en su conjunto durante el año de la floración. Sin embargo, había diferencias según las especies a la presencia de *G. breve*. Dos especies (*Micropogonias undulatus* y *Lagodon rhomboides*) mostraron densidades en general normales o superiores, tanto durante la floración como en el resto de la estación de reclutamiento de larvas. Dos especies, (*Paralichthys albigutta* y *Citharichthys spilopterus*), habían tenían, consistentemente, densidades inferiores durante su periodo normal de reclutamiento, sugiriendo que el reclutamiento en estuarios pudo haber sufrido el impacto de efectos de *G. breve* aun terminada la floración. Las cinco especies restantes (*Brevoortia tyrannus*, *Paralichthys lethostigma*, *Leiostomus xanthurus*, *Mugil cephalus* y *Myrophis punctatus*) tenían densidades bajas durante la floración, las que se incrementaron fuertemente al avanzar la estación (Warlen *et al.*, 1998).

En 1996, por lo menos murieron 149 manatíes (*Trichechus manatus latirostris*) durante una epizootia sin precedentes a lo largo de la costa sudoeste de la Florida. Al mismo tiempo apareció en la misma zona una floración de *G. breve*. La exposición de manatíes tuvo lugar por ingestión oral e inhalación (Bossart *et al.*, 1998). Uno de los vectores posibles de la toxina son los ascidia (*Ecteinascidia turbinata*) que se alimentan por filtración (Marsden, 1993). En todos los casos se manifestaron congestiones nasofaríngeas severas, pulmonares, hepáticas, renales y cerebrales. También se observaron edemas nasofaríngeos y pulmonares. Las lesiones macroscópicas consistentes fueron rinitis con catarro, hemorragias y edemas pulmonares, hemosiderosis de múltiples órganos y leptomeningitis no supurativa. Las tinturas inmunohistoquímicas que emplean un anticuerpo policlonal primario a la brevetoxina, mostraron tinturas positivas intensas de los linfocitos y macrófagos en el pulmón, hígado y tejidos linfoides secundarios. Además, los linfocitos y los macrófagos asociados con las lesiones respiratorias de las mucosas nasales y meninges también resultaron positivos a la brevetoxinas. Estos resultados involucran a la brevetoxicosis como un componente de, y quizás la principal etiología primaria de la epizootia. Los datos sugieren que la mortalidad resultante de la brevetoxicosis podría no ser necesariamente aguda, aunque puede durar días o incluso semanas después de la inhalación y/o ingestión de las brevetoxinas. Los signos neurológicos de cuatro manatíes rescatados con vida de la epizootia incluían fasciculaciones musculares, falta de coordinación e incapacidad de mantener un "righting reflex". Resultó positiva la tintura inmunohistoquímica con una enzima convertidora- interleuquina-1- β con un tropismo celular similar al de la brevetoxina. Esto sugiere que la brevetoxicosis podría ser iniciadora de una apoptosis y/o de la liberación de intermediarios inflamatorios que culminan en un shock tóxico fatal (Bossart *et al.*, 1998).

Se demostró que la brevetoxina (PbTx-3) se encontraba unida a preparaciones aisladas de nervios de cerebro de manatíes, con una afinidad similar a la de varios animales terrestres. Los estudios *in vitro* con ^3H -PbTx-3 mostraron la unión con alta especificidad y afinidad a las sinaptosomas del cerebro de los manatíes. La unión era saturable, con competencia por enlaces específicos y dependiente de la temperatura (afinidad tóxico-receptora disminuida y porcentajes medidos inferiores de enlaces específicos al aumentar la temperatura de 0 a 37 °C) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Los análogos de la brevetoxina (o metabolitos) encontrados en los berberechos silvestres (*Austrovenus stutchburyi*) (BTX-B1) y en las almejas Greenshell (*Perna canaliculus*) (BTX-B2 y BTX-B4) no mostraron ictiotoxicidad con los peces de agua dulce *Tanichthys albonubes* a 0,1 mg/litro a diferencia de las brevetoxinas (Ishida *et al.*, 1995; Morohashi *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 1998).

Se observó la mortalidad causada por las brevetoxinas en los cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) a lo largo de la costa del Golfo en la Florida (Fleming y Baden, 1999). La brevetoxina causó una mortalidad veraniega en California, que afectó los arao comunes (*Uri aalge*) (Fleming y Baden, 1999).

5.5.6 Estudios de toxicidad con un componente de *G.breve* con fósforo

Además de las potentes brevetoxinas, se han aislado de *G. breve* algunos componentes tóxicos fosforados. Se aisló uno de ellos (ictiotóxico) determinándose posteriormente su estructura. El nombre químico es *O,O*-dipropil (*E*)-2-(1-metil-2-oxopropilideno)-fosforohidrazidotioato(*E*)oxima. Posee una estructura química similar a un organotiofosfato (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

ratones

Se ha estudiado en ratones la toxicidad intraperitoneal aguda de la oxima anterior (sintética) y la de algunos análogos, prestando especial atención a la inhibición (IC₅₀) en los tejidos cerebrales y periféricos de la acetilcolinesterasa (AChE). La oxima pareció ser un inhibidor más potente *in vivo* de la AChE que los análogos; la alta toxicidad se asocia con algunos análogos lo que sugiere que otros factores afectan la toxicidad más que la inhibición AChE. Los ratones expuestos a la oxima y sus análogos mostraron hiperactividad, temblores y convulsiones no muy severas. Generalmente estos síntomas aparecen en animales expuestos a agentes AChE cuando se observa una inhibición superior al 40 por ciento de la AChE cerebral. En este estudio, se inhibió en un 36,6 por ciento la actividad AChE cerebral luego de una dosificación intraperitoneal de la oxima. Esta inhibición puede causar solo síntomas ligeros (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

ratas

Ratas macho Wistar anestesiadas recibieron una única inyección intravenosa con 16, 24, 48 o 72 µg/kg pc de la oxima. Se observó una actividad depresora cardiovascular dependiente de la dosis, como lo indican disminuciones tanto en la presión arterial media como en el ritmo cardiaco. Solamente, se apreció una recuperación dependiente del tiempo, con las dosis inferiores (16, 24 µg/kg pc). A dosis superiores la toxina causó hipotensión y bradicardia reversibles. Los animales murieron por paro cardiaco inmediatamente después de administrarles 72 µg/kg pc intravenosa. Los efectos no fueron acompañados de constricción o espasmo en respuesta traqueo bronquial. La hipotensión y la bradicardia se dieron aun con ratas ventiladas artificialmente. El tetraetilamonio actuó como antagonista de los efectos cardiovasculares, en tanto que no pudieron modificarlos ni el bloqueo de los receptores colinérgicos e histaminérgicos ni la inhibición de la síntesis de la prostaglandina. Esto indica que probablemente son mediados los efectos cardiovasculares por bloqueo α-adrenérgico y gangliónico acompañado por modulación de la actividad del canal de K⁺ (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Gatos

Se estudiaron los efectos sobre la tensión arterial media, el perfil del ECG, la descarga unitaria de los baroreceptores y la actividad respiratoria inyectando por vía intravenosa la oxima a gatos anestesiados. Una caída de la tensión sanguínea, dependiente de la dosis, resultó de la administración intravenosa de dosis de 0,25 a 1,5 mg/kg, asociada con bradicardia. Se observó una apnea respiratoria inicial seguida de velocidad y profundidad de la respiración incrementadas (hiperapnea). El efecto hipotensivo fue acompañado por una disminución en la actividad del baroreceptor aórtico medido por el ritmo cardiaco en los aferentes aórtico-cervicales. El ECG mostró bloqueo de la conducción atrioventricular, arritmia y depresión del segmento S-T y de la onda T, indicios de una insuficiencia coronaria. Posiblemente la propiedad vaso-depresora de la toxina sea de naturaleza muscarínica, ya que la atropina actuó contrarestando la vaso depresión (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

peces

la oxima, pareció ser muy ictiotóxica (0,9 mg/L against *Lebistes reticulatus*) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.6 Prevención de la intoxicación NSP

5.6.1 Depuración

Detoxificación de mariscos

La velocidad con la que pierden la toxina los bivalvos depende del lugar donde se acumule, que puede diferir para las distintas ficotoxinas. Las almejas son la especie más estudiada, para la que se ha sugerido una detoxificación en dos etapas: una pérdida inicial rápida con una velocidad semejante a la de la acumulación seguida de una fase más lenta. Durante este proceso, el perfil de la toxina puede cambiar entre tejidos como el riñón y el manto, con transferencia de toxina entre los compartimentos de tejidos o los órganos antes de ser excretadas o segregadas al medio ambiente. Los bivalvos comúnmente se auto depuran, habitualmente trasladándolos a agua limpia. La cocción y el congelado no son efectivos. Uno de los tratamientos más promisorios parece ser con ozono, que se ha demostrado ayuda a la depuración de NSP del tejido de las almejas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Las ostras acumulan brevetoxinas en menos de cuatro horas en presencia de 5 000 células/ml, y depuran en 36 horas el 60 por ciento de la toxina acumulada. La potencia de la depuración depende de las especies y es muy variable, aun bajo condiciones de laboratorio controladas. Los bivalvos comerciales pueden ingerirse sin riesgo de uno a dos meses después de terminado un episodio de floración aislado. El enlatado disminuye la concentración de brevetoxina en los bivalvos (Viviani, 1992).

En *Crassostrea virginica* la depuración de las brevetoxinas tiene lugar entre dos a ocho semanas de desaparecida la floración. Con un diseño de experiencias semi-factorial, se cultivaron y alimentaron ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) con células de *G. breve* a velocidades entre 10 y 25 millones de células por ostra en períodos de 24 horas. Posteriormente se detoxificaron en varios tanques de laboratorio por períodos de cinco días. Los bioensayos con ratón mostraron niveles iniciales entre 25 y 100 unidades ratón (UR) por 100 g de carne de ostra escurrida; las ostras grandes acumulando más toxinas que las más pequeñas. Los factores experimentales eran la temperatura (15 y 20 °C), salinidad (24 y 33-34 ‰), filtrado versus no filtrado (5 µm) y tratamiento con ozono (a un potencial redox de 350 mV en los tanques de mariscos) versus esterilización pasiva con luz UV. Dos experiencias compararon ostras alimentadas con *G. breve* durante cinco días (5,0 o 3,5 millones de células por ostra/día) con las alimentadas por 24 horas (10 o 25 millones de células por ostra). Con excepción de uno (cuatro tanques), todas las combinaciones de tratamientos resultaron en una disminución inicial del nivel de la brevetoxina que alcanzó un mínimo <20 UR por 100 g al tercer día independiente del nivel de toxina inicial o de si la toxina se había acumulado en uno o cinco días. El período de disminución de tres días fue seguido de un período con reducciones mínimas. Ninguno de los factores experimentales era estadísticamente significativo sobre los niveles finales de toxinas sugiriendo que las ostras se detoxificarán independientemente de las condiciones una vez se encuentren en un ambiente libre de algas tóxicas. Se observaron en algunas muestras de cuatro tratamientos niveles de brevetoxina finales ligeramente superiores a 20 UR por 100 g (20,6 UR por 100 g) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Disminución de las células de G.breve y reducción de las toxinas

Se sometieron a irradiación con microondas cultivos celulares de *G. breve* en agua de mar sintética a 2 450 MHz. Se irradió durante cuatro intervalos de 60 segundos, seguidos por períodos de enfriamiento de cinco minutos a 25 °C, disminuyendo la cantidad de células. En función de la potencia aplicada (0-0,113 kJ/ml cultivo), las células sobrevivientes disminuyeron en un 14 por ciento. Con niveles de energía superiores a 0,08 kJ/ml de cultivo, se apreció una disminución pronunciada del efecto de umbral (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se estudió el efecto sobre las toxinas y células de *G. breve* del agua de mar sintética ozonizada. Al agregarse a cultivos de *G. breve* agua de mar sintética ozonizada durante 60 segundos, las células sobrevivientes disminuyeron en aproximadamente el 80 por ciento ($t_{1/2}$ =10 segundos). No se encontraron células intactas al ozonizarse directamente cultivos de *G. breve* en agua de mar sintética

durante 60 segundos ($t_{1/2}=2.5$ segundos). Experiencias realizadas en agua de mar sintética han demostrado que las toxinas extraídas de la *G. breve* (PbTx-1, -2, -3, -5, -7 y -9), al igual que las toxinas en los cultivos celulares enteros, mostraron una marcada disminución al aumentar su exposición al ozono, durante 0,1, 5 o 10 minutos, luego de ser reintroducidas en agua de mar sintética. La concentración total de toxinas se redujo en un 99,9 por ciento luego de 10 minutos de ionización determinada por análisis con HPLC. Los bioensayos con el pez *Cyprinodon variegatus* confirmaron la reducción de la toxina. En ambas experiencias, con brevetoxinas extraídas y brevetoxinas de células enteras, pudo apreciarse un ligero incremento de la PbTx-7 con una exposición al ozono de 1 minuto, causado probablemente por la reducción de la PbTx-1, forma aldehído de las brevetoxinas de tipo A, a PbTx-7, forma alcohol de la misma estructura. Las cantidades totales de todas las toxinas se redujeron, al incrementarse a cinco minutos la exposición al ozono. (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Doucette *et al.* (1999) estudiaron el papel de las bacterias algicidas activadas frente a la *G. breve*. Dos cepas bacterianas aisladas del Golfo de México parecieron resultar letales para la *G. breve*. Se caracterizó la actividad algicida de una de estas dos cepas. La cepa aislada provenía de aguas libres de células de *G. breve*, lo que sugiere que estas bacterias son parte de la comunidad microbiana del ambiente y no se limitan a zonas con alto contenido de *G. breve*. La cepa bacteriana estudiada, produjo (un) compuesto(s) algicida disuelto liberado en el medio de cultivo, siendo efectivo contra los cuatro aislados ensayados de *G. breve* del Golfo de México, así como con *G. mikimotoi*, una especie HAB muy relacionada, también presente en la zona.

Pérez *et al.* (2000) destacaron el descubrimiento de varias algas productoras de alelopáticos, denominados APONINs, que pueden afectar la *G. breve*. Se diseñó un modelo de computación dinámico basado en estudios de laboratorio para evaluar la eficacia del tratamiento de las floraciones de *G. breve* con el alga alelopática, *Nannochloris oculata*, productora de la sustancia cistólica APONIN-3, que retarda el crecimiento de la *G. breve*. Hay sin embargo que considerar ciertas condiciones de contorno y/o supuestos que influyen. El modelo demostró que la *N. oculata* erradicaría el brote de *G. breve* en poco menos de dos días y que es un método potencial de gestionar las floraciones de *G. breve*, aunque se requieren experiencias complementarias.

Detoxificación de las brevetoxinas

Las brevetoxinas con un grupo funcional aldehído sobre la cadena lateral terminal "cola", son fácilmente convertidas a estructuras dimetilacetal en solución ácida, en tanto que es lenta la reacción para formar el metil éster sobre el anillo de lactona del lado de la "cabeza". La reactividad de las brevetoxinas al ataque ácido sigue el orden: PbTx-1>PbTx-2>PbTx-9. Bajo condiciones básicas, la apertura del anillo de lactona del lado de la "cabeza" iniciado por ataques con iones hidróxido se completa en, respectivamente, 120 y 50 minutos para la PbTx-2 y la PbTx-9, mientras para la PbTx-1 no estaba completada pasados 120 minutos. La hidrólisis básica es más rápida que la ácida bajo condiciones ácidas o básicas comparables. Sin embargo, estas hidrólisis pueden ser reacciones reversibles y no resultar confiables para detoxificar. Las brevetoxinas son oxidadas fácilmente por el permanganato de potasio por adición a los dobles enlaces seguida de clivaje. El tratamiento por oxidación de la brevetoxina es irreversible y relativamente rápido, por lo que puede ser una buena manera de detoxificar las brevetoxinas (Hua y Cole, 1999).

5.6.2 Medidas preventivas

Las floraciones tóxicas de *G. breve* se detectan generalmente por confirmación visual (decoloración del agua y mortandad de peces), por los consumidores de mariscos enfermos y/o la irritación respiratoria en los seres humanos, con la toxicidad real solo comprobada mediante prolongados análisis químicos para las brevetoxinas contenidas en muestras de mariscos y por bioensayos en ratones. No están bien comprendidas las condiciones ambientales exactas que conducen a floraciones de algas perjudiciales. Como resultado, resulta extremadamente difícil predecir la magnitud y la presencia de una floración, asegurando, una estrategia de gestión "después de los hechos" dependiente de una evaluación precisa de la calidad del agua. Los programas de seguimiento basados en la

identificación y enumeración microscópicas de las taxa perjudiciales contenidas en muestras de agua resultan generalmente suficientes para prevenir la intoxicación en los seres humanos. Sin embargo, el seguimiento basado en observaciones microscópicas requiere un alto nivel de conocimientos de taxonomía, habitualmente lleva mucho tiempo y puede ser muy variable según quienes lo realizan. En consecuencia, es muy deseable un procedimiento alternativo para predecir la aparición de floraciones y su dinámica. Las firmas del pigmento para diagnóstico y los espectros de densidad óptica *in vivo* pueden diferenciar eficazmente entre la mayor parte de los grupos filogénicos de micro y de macro algas y, a veces, la taxa con una variedad de habitats. Podría desarrollarse un protocolo "biomarcador" rápido, objetivo y económico si estos pigmentos de diagnóstico y/o espectros permitiesen detectar la presencia de taxa perjudicial previo a declararse la floración. El diéster de giroxantina puede ser un pigmento de diagnóstico para la *G. breve* en las aguas costeras de la Florida. Este pigmento ha sido solo informado del *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum* y *G. breve*. De estas taxa, solamente *G. breve* puede considerarse como una especie de agua cálida y sería de esperar que se presente en aguas costeras de la Florida. Además el diéster de giroxantina era un componente menor, aunque estable, de los carotenoides totales en la *G. breve*, resultando detectable consistente y cuantificablemente en poblaciones expuestas a todos los tratamientos irradiantes.

Se evaluó en cultivos de laboratorio y en condiciones naturales la utilidad de los foto-pigmentos y de las firmas de absorción para la detección y enumeración de *G. breve*. La presencia del diéster de giroxantina permitió delinear la *G. breve* de otras taxa dentro de conjuntos de fitoplancton en la Florida. Además, la buena correlación de este carotenoide con la abundancia de células de *G. breve* permitió seguir el desarrollo y la senescencia de las floraciones. No obstante, el diéster de giroxantina tan solo ofrece una contribución menor a la absorción celular, tiene máximos de absorción similares a los de otros carotenoides y a la clorofila *c*, no alterando su presencia de manera dramática los espectros de absorción de un conjunto mixto. Los adelantos tecnológicos en equipos computarizados estimularán el uso más frecuente de metodologías bio-ópticas para la detección y caracterización potenciales del plancton perjudicial (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Kirkpatrick *et al.* (2000) compilaron información sobre pigmentos y datos de espectros de absorción de floraciones naturales del este del Golfo de México entre agosto de 1995 y agosto de 1997. La cuantificación del diéster de giroxantina y de la clorofila *a* permitió estimar la fracción de la biomasa en poblaciones mixtas asociadas a *G. breve*. La regresión de los índices de semejanza de *G. breve* con las fracciones de biomasa de *G. breve* produjo una correlación lineal significativa. Parece ser promisorio la tecnología que emplea una célula capilar con guía de onda líquida para automatizar esta técnica.

Se compararon métodos microfotométricos y espectrofotométricos convencionales para evaluar los espectros de absorción de cultivos de monoespecies. Se comprobó la viabilidad de emplear micro fotometría para caracterizar los coeficientes de absorción de los espectros de a.o. *G. breve*. Se evaluó una aproximación para detectar *G. breve* en una población mixta sobre la base de las firmas en espectros de absorción. El desarrollo de hiperespectros mejorados *in situ* o de sensores aero transportados puede incrementar las capacidades para controlar la presencia y evolución de floraciones de algas perjudiciales. Las fases de las floraciones de *G. breve* incluyen: a) iniciación próxima a la costa; b) transporte a mitad de la plataforma y c) crecimiento. Varios aspectos de la biología y ecología de *G. breve* permiten que sea una especie que posiblemente pueda detectarse y seguirse mediante control remoto. Mientras que un conteo celular de 5 000 células/litro alcanza para prohibir la cosecha de los cultivos de mariscos, en general, la detección visual de las floraciones de *G. breve* a simple vista solo puede hacerse cuando las concentraciones celulares son próximas a 10^6 células/litro, momento en el que ya se manifiestan irritación respiratoria, contaminación de mariscos y mortandad de peces. En tanto la concentración de biomasa es por zonas, los valores de clorofila *a* de >1 a 100 mg/m^3 hacen la superficie del agua decolorada detectable con sensores colorimétricos en satélites (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se informó por control remoto de un nivel de detección mínimo de aproximadamente 100 000 células/litro; 10 veces más sensible que la detección visual. En este caso, podría haber un mínimo de

tres a seis días entre la detección de la biomasa de la floración y el crecimiento de la población a niveles conocidos como causantes de mortandades masivas de peces. Entretanto puede comprobarse la presencia de *G.breve* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7 Casos y brotes de NSP

5.7.1 Europa

Francia

En octubre de 1991 se informó por primera vez la presencia de *Fibrocapsa japonica* sobre las costas del Canal de la Mancha, en Normandía, Francia (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Las tomas de video desde la costa francesa de *H. akashiwo* mostraron una fuerte semejanza con especímenes encontrados en el Mar del Norte holandés en 1994 y en el Mar de Wadden en 1997 (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Alemania

Se detectó la presencia el 26 de agosto y el 15 de diciembre de *H. akashiwo* en el Mar de Wadden (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

En el verano de 1997, se observó cerca de Sylt *Fibrocapsa japonica*. Desde julio, en el verano de 1995 se ha encontrado *F. japonica* en muestras de fitoplancton del Mar de Wadden próximo al puerto de Büsum sobre la costa oeste de Schleswig-Holstein. También en 1996 y 1997 fue mencionada, *F. japonica* en los mensajes del "Algenfrühwarnsystem" alemán para el Mar de Wadden. En el puerto de Büsum las concentraciones de *F. japonica* aumentaron de valores máximos de 25 y 30 células/cm³ en 1995 y 1996 respectivamente, a 115 células/cm³ en 1997. El máximo valor con 327 células/cm³ se registró el 24 de julio de 1997 (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

En el verano de 1997 se observó también *H. akashiwo* en aguas alemanas, en Friedrichskoog. Resultó difícil contar las concentraciones celulares (Rademaker *et al.*, 1997).

Varias floraciones extensas, causadas por *Chattonella* sp., potencialmente tóxico, tuvieron lugar desde la Bahía Alemana hasta casi Skagen del Norte desde fines de marzo a la primera mitad de mayo de 1998, 2000 y 2001 con mortandad de peces (Douding y Göbel, 2001).

Grecia

Se ha informado de una especie similar a *G. breve* en el Mar Egeo, aunque sin efectos adversos (Smith *et al.*, 1993).

Países Bajos

Se detectaron por primera vez en 1991 y luego en 1992 y 1993, *Raphidophyceae Fibrocapsa japonica*, *Chattonella antiqua* y *Chattonella marina* en el Mar de Wadden, en el Mar del Norte y/o en la zona del delta al sur del estuario del Rin. En los Países Bajos no se han registrado eventos perjudiciales causados por *Raphidophyceae*, pero no puede descartarse un brote pues potencialmente la especie detectada puede presentarse cada año (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se encontró en el verano de 1997, *F. japonica* en casi todas las muestras del Programa Holandés de Floración de Algas a lo largo de la costa holandesa desde Noordwijk a Borkum. Las densidades celulares en las muestras eran de 2 células/cm³. En agosto de 1994 por primera vez se encontró el potencialmente tóxico *Raphidophyte Heterosigma akashiwo* en una floración de algas próxima a Noordwijk con conteos celulares de aproximadamente 2 400 células/cm³ (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Portugal

Se ha informado de una especie similar a *G. breve* en la costa atlántica de Portugal, aunque sin efectos perjudiciales (Smith *et al.*, 1993).

Federación Rusa

En setiembre de 1987, una marea roja causada por *Chattonella* sp. Causó mortandad de peces en la Bahía de Amurskii (Orlova *et al.*, 1998).

España

Se ha informado de una especie semejante a *G. breve* en la costa atlántica de España pero sin efectos perjudiciales (Smith *et al.*, 1993).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo*, causantes de mortandad en peces de cultivo, desde Inglaterra a Bermuda (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7.2 Africa

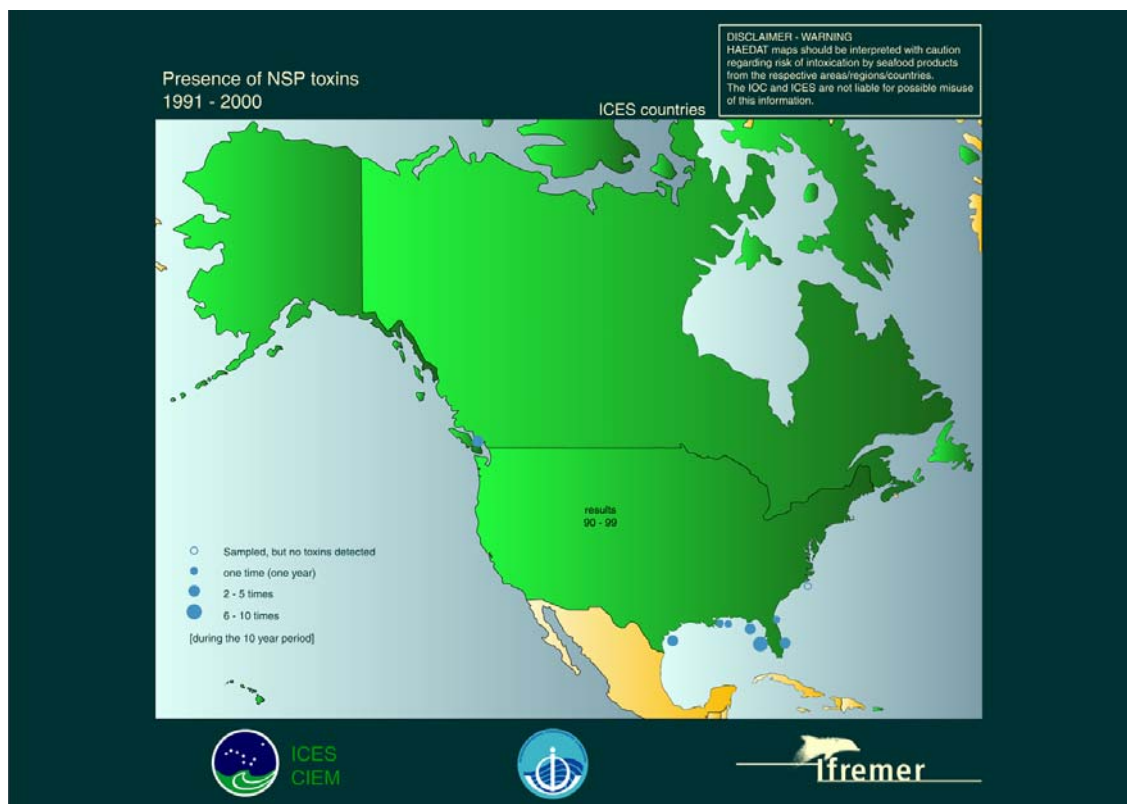
Sud Africa

En el verano de 1995 a 1996, se informó un serio problema de toxinas en aerosol en la Bahía False, que posteriormente se extendió al balneario costero de Hermanus en la Bahía Walker. En personas que concurren a las playas y en los residentes vecinos a la costa se observaron tos, quemaduras de las vías nasales, dificultades respiratorias, ojos y piel irritados. La toxina en aerosol se vinculó con la floración de una especie de dinoflagelado tóxico *Gymnodinium*, registrada por primera vez en la Bahía False en 1988. A pesar de otras floraciones de la especie en varias ocasiones desde entonces, los efectos nocivos sobre los seres humanos no habían sido nunca antes tan evidentes como en 1995-96. Las mortandades de la fauna fueron, sin embargo, pequeñas, con excepción de las larvas sufridas por cultivadores de abalone en tierra firme, en la zona de la Bahía Walker. A lo largo de la costa sud africana usualmente aparece implicado en casos de NSP el dinoflagelado *Gymnodinium nagasakiense*. La mayor parte de los brotes han sido informados de la Bahía False, donde son responsables de la decoloración verde-oliva del agua de mar durante el otoño. De la HF Reserva Marina de Verwoerd en 1989 fueron lavadas treinta toneladas de abalone, luego de floraciones de *Gymnodinium nagasakiense* (Van der Vyver *et al.*, 2000).

5.7.3 América del Norte

La Figura 5.5 ilustra la presencia de toxinas NSP en los países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000.

Figura 5.5 Presencia de toxinas NSP en los países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Canadá

Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* (pertenecientes a la clase *Raphidophyceae*), causantes de mortandades de peces de cultivo en aguas de bahías (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Estados Unidos de América

Costa Este

Se postuló que la mortandad de una variedad de delfines (*Tursiops truncatus*) estaba asociada con brevetoxinas (a lo largo de la costa del Atlántico medio de los Estados Unidos desde 1987 a 1988 (Bossart *et al.*, 1998).

Se identificó *G. breve* (6×10^6 células por litro) en muestras de agua retiradas de la costa de Carolina del Norte el 2 de noviembre de 1987. Este fue el primer registro de la presencia de *G. breve* al norte de la Florida, extendiendo el rango de este dinoflagelado subtropical tóxico en más de 800 km hacia el norte. Antes de la finalización de esta floración y transcurridos tres meses y medio, había informados 48 casos de NSP en seres humanos con más de 1 480 km² aguas en que se cosechan mariscos (ostras y almejas) cerradas en el pico de la cosecha. Se informó, además en algunas zonas de mortandades importantes de vieiras. Se ha sugerido que el sistema de la Corriente del Golfo en la Florida transportó *G. breve* hacia el norte a la costa de Carolina del Norte en octubre de 1987. Durante las fases de floración de *G. breve* en Carolina del Norte las concentraciones de fitoplancton crecieron con el tiempo en todas las estaciones independientemente de las concentraciones de *G. breve* (hasta 3.27×10^5 células/litro) o del grado de desarrollo de la floración. Esto contrasta con las floraciones de *G. breve* en el Golfo de México típicamente mono específicas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* (perteneciente a la clase *Raphidophyceae*) en las aguas de

bahías de la Costa Este como causantes de mortandad en peces de cultivo (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Diez eventos de mortandad de peces, involucrando principalmente a menhaden del Atlántico, tuvieron lugar desde julio a setiembre de 2000 en varias bahías y cañadas en Delaware. Dos de los eventos resultaron en mortandades importantes estimadas entre 1,5 a 2 millones de peces en Bald Eagle Creek, Bahía de Rehoboth. Se demostró la presencia de *Chattonella cf. vericulosa* con una densidad máxima de $1,04 \times 10^7$ células/litro. También se detectaron PbTx-2, PbTx-3 y PbTx-9 (Bordelais *et al.*, 2002).

Florida y Golfo de México

El 16 de junio de 1996, el Departamento de Salud del Condado de Sarasota, la Oficina de Epidemiología Ambiental, el Departamento de Protección Ambiental de la Florida y la FDA diagnosticaron NSP en tres pacientes. Todos habían ingerido almejas (*Chione cancellata*) y especies no identificadas de caracoles marinos cosechadas de una zona de recolección prohibida desde el 31 de enero de 1996 al 8 de junio de 1996 por una marea roja de *G. breve*. Fue cerrada nuevamente el 11 de junio. Las almejas habían sido cocidas hasta su apertura, desconociéndose el tiempo de cocción de los caracoles marinos (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Desde comienzos de marzo a fines de abril de 1996, por lo menos 149 manatíes (*Trichechus manatus latirostris*) murieron en una epizootia sin precedentes a lo largo de unas 80 millas de la costa sudoeste de la Florida (zona de Charlotte Harbour). Casi simultáneamente en la misma zona geográfica de la epizootia que afectó a manatíes, una floración ocasionó una importante marea roja, mayoritariamente de *G. breve*, productora de brevetoxina. Las cuentas celulares de *G. breve* eran de aproximadamente $23,3 \times 10^6$ células/litro. La autopsia indicó una neurointoxicación facilitada por exposición oral y por inhalación. Existen tres rutas potenciales para la intoxicación: i) inhalación de aerosoles tóxicos; ii) ingesta de alimentos tóxicos; y iii) ingesta de agua de mar tóxica. Una especulación análoga se hizo para las mortandades de manatí en el sudoeste de la Florida en 1963 y 1982 (Bossart *et al.*, 1998).

En la Florida, se ha informado de la intoxicación de manatíes por brevetoxinas en tunicados pelágicos unidos a pasto de mar (Hallegraeff, 1995). Se han detectado también brevetoxinas en menhaden y lisas de la costa de la Florida (Quilliam, 1999).

Se ha postulado la mortandad asociada con brevetoxinas en un tipo de delfines (*Tursiops truncatus*) ocurrida en 1946 y 1946 en el sudoeste de la Florida (Bossart *et al.*, 1998), debido a una floración de *G. breve* identificado en 1947 como el agente etiológico y considerado como único responsable de todos los brotes descritos desde 1844. Además, se había observado la mortandad asociada a las brevetoxinas en estos delfines a lo largo de la costa del Atlántico en 1987 y 1988 (Bossart *et al.*, 1998).

Todas las mareas rojas en la Florida se han asociado con mortandades masivas de animales marinos. Se observaron estos fenómenos 24 veces desde 1844 a 1971 y su origen natural se ve comprobado por haber ocurrido antes del desarrollo de la agricultura, de las ciudades, industrias y turismo. Se han notado también los problemas causados por ingestión de mariscos infestados con toxinas o inhalación de células en aerosoles (Viviani, 1992).

A lo largo de la costa del Golfo en la Florida se ha observado la mortandad entre los cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) (Fleming y Baden, 1999).

A fines de octubre de 1996 y hasta diciembre de 1996, tuvo lugar por primera vez una floración de *G. breve* en aguas de baja salinidad en el norte del Golfo de México. Las densidades deben ser considerablemente inferiores a las normales para que aparezca *G. breve*. Los cultivos de ostras permanecieron cerrados de noviembre de 1996 a fines de abril de 1997 (Dortch *et al.*, 1998).

Costa Oeste

La brevetoxina fue la causa de la mortandad estival en California de araos (*Uri aalge*) (Fleming y Baden, 1999).

Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) en aguas de bahías de la Costa Oeste, causando mortandades en peces de cultivo (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7.4 América Central y del Sur

Brasil

Chattonella sp. y *Heterosigma akashiwo* representan un riesgo para los cultivos intensivos de camarones y mariscos en Santa Catalina (Ferrari, 2001).

México.

En el Golfo de México, *G. breve* es la especie dominante, que desarrolla floraciones importantes casi todos los años en el otoño, con mortandad de peces a lo largo de las costas de los estados de Veracruz y Tamaulipas, afectando a veces otros estados del Golfo de México. Desde 1994, los eventos se han hecho más permanentes (alcanzando más de 100 días durante el otoño de 1997), tanto por sus consecuencias ambientales como por sus efectos sobre la salud humanas, con grandes mortandades de peces y muchas personas afectadas por la exposición a los aerosoles de agua de mar o por inmersión en ella (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

5.7.5 Asia

China, Hong Kong Región Administrativa Especial

Heterosigma akashiwo causó la primera floración perjudicial de *Raphidophytes* en Yim Tim Tsai, en aguas de la Región Administrativa Especial de Hong Kong en marzo de 1987. Una floración de *Chattonella marina* tuvo lugar en 1991, resultante en mortandad de peces. También fue identificada la *Chattonella antiqua*. Estas floraciones de *Raphidophytes* pueden representar una seria amenaza a la acuicultura de peces de escama (Songhui y Hodgkiss, 2001).

Japón

Se ha informado de mareas rojas provocadas por *Heterosigma akashiwo* en aguas de bahías, resultando en mortandad de peces de cultivo (colas amarillas jóvenes en jaulas, *Seriola quinqueradiata*) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se ha informado en 1972 de mareas rojas de *Fibrocapsa japonica* primero en aguas costeras de la Prefectura de Ehime, causantes de fuertes mortandades de peces cola amarillo jóvenes enjaulados (*S. quinqueradiata*) y luego en la Bahía de Atsumi Bay (1973), el Mar Interior de Selo (1987) y Harima Nada (1989) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Chattonella antiqua formó mareas rojas muy densas en regiones costeras del Japón matando gran cantidad de peces de cultivo (colas amarillas enjaulados) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

República de Corea

Se ha informado de mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* responsables de mortandad de peces de cultivo en aguas de bahías (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Malasia

Se ha informado de mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* responsables de mortandad de peces de cultivo en aguas de bahías en Singapur, (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7.6 Oceanía

Australia

En la Bahía Boston, Australia Meridional, se encontraron niveles altos de brevetoxinas (hasta 142 µg/100 g) en los hígados de atunes de aleta azul (*Thunnus maccoyii*) muestreados en diferentes momentos de un episodio de mortandad importante. Las muestras de plancton revelaron una floración del *Raphidophyte Chattonella marina* de hasta 66 000 células/litro). Había tenido lugar una exposición a *C. marina*, tanto antes, como por lo menos un mes después, de que ocurriera el principal episodio de mortandad. La patología de las agallas del atún indicó una marcada hinchazón epitelial, epitelio levantado y copiosa producción de mucus. Las evidencias apoyando la acción de microalgas tóxicas fueron la patología típica, la alta relación entre el área de las agallas y el peso del cuerpo y el extremadamente alto volumen de ventilación del atún que maximizaría la exposición a los efectos tóxicos de la *C. marina*. El hecho que los atunes de cultivo hayan recibido como alimento carne de pescado altamente oxidada usado en anzuelos habría agotado los antioxidantes endógenos en los atunes y causado una sensibilidad exquisita del pez a los radicales oxígeno activados.

Se sabe que *C. marina* resulta tóxica para los peces mediante al menos dos mecanismos, la producción de radicales oxígeno reactivos y la producción de brevetoxinas ictiotóxicas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). En enero de 1994, asociadas con una floración del tipo *G. breve*, las almejas de la isla de Tamboon Inlet en la costa de Gippsland, en Victoria contenían un nivel de toxina NSP de 27,5 MU/100 g (ANZFA, 2001).

Nueva Zelanda

Se asociaron enfermedades humanas y animales durante el verano de 1992/1993 con biotoxinas marinas en mariscos. Aunque se demostró la presencia de cuatro tipos de toxinas diferentes, solo la NSP y posiblemente la DSP se asociaron con enfermedades clínicas. Algas semejantes, pero no idénticas a *G. breve* se consideraron como responsables de síntomas típicos de NSP y de la irritación respiratoria aguda asociados con fragmentos del alga transportados en aerosol. En toda Nueva Zelanda se registraron 186 casos de NSP (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Durante el brote de intoxicaciones con mariscos de 1993, el nivel de toxinas NSP alcanzó a 592 UR/100 g para mariscos comestibles (ANZFA, 2001). En el período de setiembre de 1994 a julio de 1996, 0,2 por ciento de las muestras retiradas semanalmente a lo largo de la costa de Nueva Zelanda presentaron un nivel de toxina NSP superior al límite reglamentario en un total de 10 eventos con NSP (nivel máximo 26 UR/100 g (para diversas especies de mariscos)). En el noreste de la Isla del Norte hubo una intoxicación NSP muy extendida con 186 personas afectadas (ver también arriba) (Sim y Wilson, 1997).

A comienzos de 1993, fue encontrada *Fibrocapsa japonica*, en las costas este y oeste de la Isla del Norte y en la costa este de la Isla del Sur (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se ha informado la presencia de *Heterosigma akashiwo*, causante de mortandades en peces de cultivo, en mareas rojas en aguas de bahías en Nueva Zelanda (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Inmediatamente después de una serie de episodios resultantes en la muerte de peces y otra fauna marina, unidos a brotes de enfermedades respiratorias en seres humanos próximos a la costa de Wairarapa y a la Bahía de Hawke en la costa este de la Isla del Norte, Wellington Harbour sufrió un severo brote tóxico que persistió de mediados de febrero a abril de 1998. Este brote decimó casi toda la vida marina (incluso algas) en el puerto. Durante estos brotes poco comunes, se encontró que las anguilas y los lenguados fueron los primeros en sucumbir, extendiéndose luego a otros peces pelágicos e invertebrados marinos. Ochenta personas en Wellington Harbour experimentaron enfermedades respiratorias; las personas que concurren a las playas, nadadores y wind-surfistas se quejaron todos de tos seca, dolores severos de garganta, nariz con mucosidades e irritaciones de los ojos. Además los trabajadores de los cultivos y los buzos experimentaron, entre otros síntomas, severos dolores de cabeza y sensación de quemaduras en la cara como las causadas por el sol. Se encontró que esta floración sin precedentes, estaba dominada por una *Gymnodinium* sp. no descrita ($33,3 \times 10^6$ células/litro). Los caracteres morfológicos de esta nueva especie recordaban al *Gymnodinium*

mikimotoi japonés. La toxina de Wellington Harbour era estable tanto en condiciones ácidas como alcalinas, aunque inestable en medio ácido débil. Esto hace que sea menos probable que resulte al ser ingerido en un riesgo a la salud humana. Al calentarse a 100 °C la toxina perdió la mayor parte de su toxicidad. Era, también muy oxidable pudiendo consecuentemente destruirse por ozonización. Una de las características notables de la floración en Wellington Harbour de 1998 fue la aparición de una extendida espuma de mar, persistente por varias semanas. Los impactos sobre la vida marina de este nuevo *Gymnodinium* sp. son seguramente más severos que los causados por el *G. mikimotoi* de Japón, *G. breve* de la costa atlántica de los Estados Unidos, *G. cf. mikimotoi* de Europa Occidental y *G. galatheanum* del Mar del Norte. En lo que hace a los impactos de las toxinas transportadas por aire o por agua sobre los seres humanos, esta nueva *Gymnodinium* sp. es muy similar a las de *G. breve* de la costa atlántica de los Estados Unidos y a la recientemente informada *Gymnodinium* sp. de Sud Africa (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.8 Reglamentaciones y seguimiento

5.8.1 Europa

Dinamarca

Existe, para varias especies de algas, un programa de seguimiento de *Gymnodinium* spp. Las zonas de cosecha de productos pesqueros se cierran cuando se alcanzan las $5,10^5$ células/litro (según las especies) (Van Egmond *et al.*, 1992; Shumway, 1995)

Italia

Se hace el seguimiento de las algas productoras de NSP y se cierran las zonas de cosecha de productos pesqueros cuando simultáneamente aparecen algas en el agua y toxinas en almejas. En Italia, la legislación se basa en el bioensayo en ratón con un valor "no detectable" para mariscos (Van Egmond *et al.*, 1992; Viviani, 1992).

5.8.2 América del Norte

Estados Unidos de América

La FDA actúa cuando el nivel en mariscos es de 80 µg PbTx-2/100 por g de tejido de marisco (0,8 mg/kg o 20 UR/100 g o 4 µg/ratón) analizado según el bioensayo en ratón (FDA, 2000). El uso en los reglamentos de información resultante del bioensayos en ratón está basado en estudios de la década de 1960 en los que se compararon las incidencias de enfermedades en seres humanos con la muerte de ratones inyectados con extractos en bruto de mariscos en dietiléter (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Florida y el Golfo de México

El departamento de Recursos Naturales de la Florida tiene desde mediados de la década de 1970 un programa general de control. Solamente en 1984, se indicaron específicamente en los reglamentos empleados en las floraciones de *G. breve*. Los cultivos de mariscos se cierran cuando las concentraciones de *G. breve* superan 5 000 células/litro. Los cierres se mantienen desde unas pocas semanas hasta los seis meses. Se realizan los primeros bioensayos en ratón de los mariscos dos semanas después que las concentraciones de *G. breve* caen por debajo de 5 000 células/litro. Cuando los niveles son inferiores a 20 UR/100 g se reabren los cultivos. El sistema de bioensayos es lento; los resultados tardan casi una semana. Se está desarrollando un kit de campo (Viviani, 1992). Las medidas anteriores debieran evitar casos de NSP relacionados con consumo de mariscos contaminados en la mayor parte de la población humana de la Florida, aunque no podrán prevenir la irritación respiratoria asociada con la exposición a las toxinas en aerosol de las mareas rojas. Aunque otros estados, como Tejas han procedido de otra manera, en la Florida donde las mareas rojas ocurren casi todos los años, las playas no se cierran a las personas que trabajan en ellos, aun con floraciones muy activas próximas a las costas (Fleming y Baden, 1999).

5.8.3 América Central y del Sur

Argentina

La Argentina cuenta con un programa nacional de seguimiento de la toxicidad de almejas en cada provincia costera con laboratorios regionales y una estación fija en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

El Brasil tuvo una iniciativa piloto durante un año, pero carece de un programa nacional de seguimiento (Ferrari, 2001).

Uruguay

El Uruguay tiene un programa nacional de seguimiento de la toxicidad de almejas y del fitoplancton tóxico (Ferrari, 2001).

5.8.4 Oceanía

Nueva Zelanda

Desde la detección de NSP a comienzos de 1993, Nueva Zelanda ha desarrollado rápidamente una estrategia de gestión. Se toman muestras semanalmente de todas las zonas de cultivo de mariscos, comerciales y no comerciales, a lo largo de toda la faja costera durante todo el año. La mayor parte de las zonas comerciales de cultivo cuentan con programas semanales de muestreo del fitoplancton y se ha comenzado con un sistema de "biblioteca" de muestreo de cosechas para cubrir la distribución temporal y espacial de eventos tóxicos. Esta vigente un bioensayo en ratón (método APHA) con 20 UR/100 g como nivel aceptable. Este nivel corresponde a un tiempo de supervivencia de seis horas para los ratones (Trusewich *et al.*, 1996).

Actualmente el ensayo de mariscos implica un bioensayo en ratón de cribado de toxinas NSP con pruebas confirmatorias (Busby y Seamer, 2001).

Está en desarrollo un Programa de Seguimiento de Biotoxinas que proporcionará datos muy precisos, en menor tiempo y sin bioensayos en ratón. Implementará métodos de ensayo basados en CL-EM, resultantes en datos químicos analíticos en lugar de resultados de bioensayos. Está en discusión el desarrollo y la implementación de nuevos métodos de ensayo, así como su financiación, la validación, el reglamento de ensayo, la disponibilidad de normas analíticas, la comparación con ensayos existentes, los tipos de instrumentos y la cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

6. Intoxicación por azaspiracida en mariscos (AZP)

Por lo menos ocho personas enfermaron en los Países Bajos en noviembre de 1995, luego de consumir mejillones (*Mytilus edulis*) cultivados en Killary Harbour, Irlanda. Aunque los síntomas recordaban los de las intoxicaciones diarreicas por mariscos (DSP) las concentraciones de las principales toxinas DSP eran muy bajas (McMahon y Silke, 1996; Satake *et al.*, 1998a). No se observaron en las muestras de aguas entonces recogidas los organismos conocidos como productores de toxinas DSP. Además, se observó en el bioensayo en ratón usando los extractos de mejillones, una parálisis lenta y progresiva. Estos síntomas neurotóxicos eran muy diferentes de los provocados por las intoxicaciones típicas con DSP (Satake *et al.*, 1998a). Se identificó así la azaspiracida (antes llamada Killary Toxin-3 o KT3) y el nuevo síndrome tóxico pasó a denominarse intoxicación por azaspiracida (AZP por sus siglas en inglés).

6.1 Estructuras químicas y propiedades de la azaspiracida

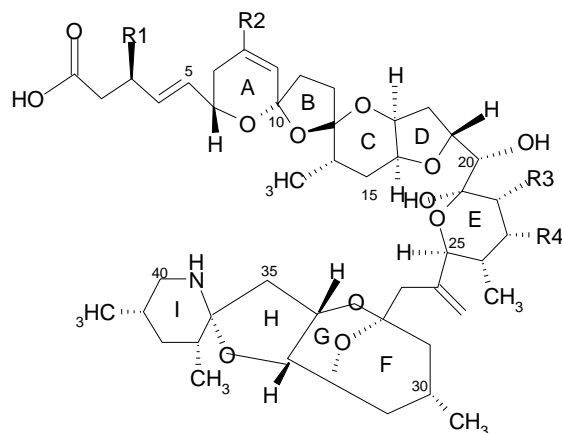
Satake *et al.* (1998b) aclararon la estructura de la azaspiracida resultante en intoxicaciones en seres humanos causadas por el consumo de mejillones irlandeses contaminados. La azaspiracida se extrajo de carne entera de mejillones contaminados presentándose como un sólido amorfo sin color y sin absorción máxima en el UV por encima de 210nm. Se aislaron, además de la azaspiracida (AZA), cuatro análogos, AZA 2 a AZA5 y se establecieron sus estructuras químicas (ver Figura 6.1). Ofuji *et al.* (1999a) identificaron las azaspiracida-2 (AZA-2) y la azaspiracida-3 (AZA-3) y demostraron que estos compuestos eran, respectivamente la 8-metilazaspiracida y la 22-demetilazaspiracida. Ofuji *et al.* (2001) determinaron la estructura de otros dos análogos de la azaspiracida encontrados en mejillones, la azaspiracida-4 (AZA-4) y la azaspiracida-5 (AZA-5), demostrando que eran respectivamente 3-hidroxi-22-demetilazaspiracida y 23-hidroxi-22-demetilazaspiracida, (es decir análogos hidroxilados de la AZA-3). Al momento no se dispone de datos experimentales que permitan conocer si las toxinas experimentan modificaciones estructurales, y como en los mariscos. Por analogía con las pectenotoxinas y las yesotoxinas, que por hidroxilación sufren modificaciones estructurales en mejillones, puede suponerse que la AZA-4 y la AZA-5 son metabolitos oxidados de la AZA-3. Por tanto probablemente, las AZA, AZA-2 y AZA-3 son productos genuinos del organismo marino causante. La azaspiracida fue considerada como el agente principal causante (Satake *et al.*, 1998b).

Las azaspiracidas difieren de cualquier otra toxina nitrogenada previamente conocida en mariscos o dinoflagelados (por ej. prorocentrolida, pinnatoxina, gimnodimina y las espirolidas). Los anillos de las azaspiracidas (AZAs) poseen disposiciones únicas, una amina cíclica en lugar de un grupo imino cíclico, sin anillo carbocíclico o de lactona (Satake *et al.*, 1998b).

Dounay y Forsyth (2001) realizaron estudios de síntesis de las azaspiracidas en el rango C5 – C20 para identificar estos sub-fragmentos.

Satake *et al.* (1998b) informaron que los extractos de mejillones no mostraban una disminución significativa de la toxicidad al calentarlos a 5 °C durante 150 minutos en soluciones 1,0 N de ácido acético/metanol o 1,0 N de hidróxido de amonio y que no tenía lugar un cambio significativo de la toxicidad de la solución durante su almacenamiento. Se supone, entonces, que las AZAs son compuestos relativamente estables.

Figura 6.1 Estructuras químicas de las azaspiracidas



	R_1	R_2	R_3	R_4
azaspiracid (AZA)	H	H	CH ₃	H
azaspiracid-2 (AZA2)	H	CH ₃	CH ₃	H
azaspiracid-3 (AZA3)	H	H	H	H
azaspiracid-4 (AZA4)	OH	H	H	H
azaspiracid-5 (AZA5)	H	H	H	OH

6.2 Métodos de análisis

6.2.1 *En general*

Debe prestarse atención a la posible aparición conjunta en mejillones de OAs, PTXs y YTXs. Se notó en mejillones recogidos en Noruega la coexistencia de estas toxinas con la AZA (Yasumoto y Aune, datos sin publicar en EU/SANCO, 2001).

Se recomienda, en consecuencia, buscar estas toxinas por CL o por CL/EM. Se notó la presencia de toxina(s) desconocida(s) en mejillones en brotes de AZP, aunque a niveles bajos (alrededor del 12 por ciento de la toxicidad total). Los ratones inyectados con esta toxina desconocida mostraban inmediatamente agitación, parálisis y convulsiones del tipo PSP previas a la muerte. Además de presentar estos síntomas en ratones, las propiedades cromatográficas de la toxina desconocida eran diferentes de las de la toxina AZP (probablemente la toxina carece de parte ácida). Los ratones inyectados con esta toxina morían al cabo de 30 minutos. Los ratones sobrevivientes se recuperaron rápidamente. No hay datos actualmente disponibles que permitan saber si la toxina(s) desconocida alcanza un nivel lo suficientemente elevado como para interferir con los resultados del bioensayo en ratón (EU/SANCO, 2001).

6.2.2 *Bioensayos*

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

Los ratones se inyectan intraperitonealmente con extractos de mejillones igual que en los inmunoensayos para determinar DSP. Los resultados sugieren que las azaspiracidas pueden extraerse de la carne cruda con acetona debido a una mayor solubilidad por la presencia de agua y lípidos en la carne (EU/SANCO, 2001). La respuesta a la azaspiracida se caracteriza por saltos y rascarse de los

ratones, con una parálisis progresiva atípica para la DSP (Flanagan *et al.*, 2000; Satake *et al.*, 1998a). El menor tiempo que tardaron en morir los ratones fueron 35 minutos (a seis veces de la dosis letal) y el más prolongado 30 horas y 46 minutos (EU/SANCO, 2001). Habitualmente, las toxinas de poliéter se concentran en las glándulas digestivas de los mariscos, lo que no siempre sucede con las azaspirácidas. La azaspirácida y sus análogos, AZA2 y AZA3, se distribuyen en los tejidos de los mariscos. Empleando protocolos convencionales para bioensayos de DSP en ratón (en los que se emplea sólo el hepatopáncreas), se mide solamente de cero a 40 por ciento del contenido total de azaspirácida del marisco, lo que puede explicar los falsos negativos (James *et al.*, 2002a).

bioensayo en ratas

Ensayo basado en inducir diarrea en ratas. Los animales hambrientos se alimentan con el tejido de marisco sospechoso (mezclado en la dieta), manteniéndolos por 16 horas en observación buscando señales de diarrea, consistencia de las heces y rechazo de alimentos. En el mejor de los casos el método es semi-cuantitativo (Hallegraeff *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993). El ensayo se emplea aun rutinariamente en los Países Bajos y es permitido oficialmente por la legislación de la UE.

en general

La Comisión Europea ha reconocido las necesidades de la comunidad analítica de desarrollar métodos alternativos a las pruebas con animales. En el Área 5 “Calidad e Inocuidad Alimentaria” del Sexto Programa Marco de la Comisión figura un llamado a propuestas (EC, 2003), siendo uno de sus objetivos el desarrollo de herramientas costo-efectivas para el análisis y la detección de peligros asociados con los frutos de mar de aguas costeras, incluyendo las toxinas azaspirácidas de mariscos. De así hacerse, significará que son de esperar progresos en los años próximos.

ensayos in vitro

ensayo con cultivos de células de mamíferos

El desarrollo de estrategias de diagnóstico alternativas para detectar la contaminación de mariscos con ficotoxinas es motivado por consideraciones científicas, éticas y financieras. Para encararlas, se ha desarrollado un ensayo basado en las respuestas citopatológicas a las ficotoxinas de células cultivadas de mamíferos. La respuesta primaria de estas células a cualquier familia de toxinas del ácido ocadaico es la de “reunirse”, a las tres horas, perdiendo su morfología típica, aunque permaneciendo un 90 por ciento viables hasta las 48 horas. Las muestras azaspirácida positivas, cuando se aplican a este sistema no provocan el efecto de “reunirse” sobre las células de cultivo. En cambio, la viabilidad celular, medida con un ensayo MTT, cae a menos de 10 por ciento de la viabilidad de las células de control pasadas 18 a 24 horas. La combinación de la observación de la morfología celular a las tres horas con la medida de viabilidad a las 24 horas permite detectar tanto las toxinas del tipo ácido ocadaico como las azaspirácidas en mariscos (Flanagan *et al.*, 2000; 2001).

6.2.3 Análisis químicos

espectrometría de masas

El primer método informado empleando CL-EM para determinaciones cuantitativas para las azaspirácidas estaba basado en la detección mediante seguimiento con ión selectivo (SIM, por sus siglas en inglés) (Ofuji *et al.*, 1999b), con un ión por compuesto y con calibración externa. La linealidad se verificó en un rango de concentraciones relativamente amplio (50 pg a 100 ng). Los datos de recuperación parecían correctos, pero no quedó claro cuantas muestras diferentes servían de base para los experimentos de recuperación. Como solo se seguía un ión por compuesto, no era posible ninguna verificación de especificidad con la relación de intensidad iónica. En resumen, la base analítica del método no es sólida, lo que hace discutible su aplicación práctica.

Las primeras aplicaciones de métodos CL-EMⁿ para AZAs, luego publicadas, fueron presentadas por James *et al.* (2001). Se desarrolló un método de micro cromatografía líquida en tandem con espectrometría de masas (micro-CL-EM-EM) para la determinación de las azaspirácidas (Draisci *et*

al., 2000). El método apuntaba a la identificación de las azaspirácidas, por lo que de hecho tenía un componente cualitativo. Eventualmente el objetivo se formuló como "...investigar la aplicabilidad de la CL-EM y de la CL-EM-EM para detectar sin ambigüedades la azaspirácida en mariscos." Aplicando seguimiento de ión selectivo (SIM) en los iones que corresponden solo con moléculas protonadas, se buscaba la forma más sensible de detección (intensidades máximas). Se obtenía también una buena sensibilidad (definida como un límite de detección bajo) aplicando micro-CL (1,0 mm D.I. columna), la que resulta efectiva por ser el Electrospray-EM un detector dependiente de la concentración. Se usó en este estudio un triple cuadrupolo MS (tripleQ). Este instrumento es más comúnmente empleado que la EM de trampa iónica en el área de las biotoxinas marinas. Se obtuvo información estructural empleando las capacidades CID-ES-ES del tripleQ, primero en modalidad de barrido completo para encontrar los iones hijos adecuados, luego utilizados en la modalidad SRM. Se obtuvieron también datos cuantitativos basados en la modalidad SRM optimizada. Se observó una buena linealidad ($r^2 > 0.995$) para un rango de concentraciones pequeño (0,1–1 µg/ml), en tanto que el límite de detección era de aproximadamente 20 ng de azaspirácida por gramo de mejillón entero. En conclusión, el método desarrollado suministró datos muy selectivos y específicos. Sin embargo, tal como lo afirman los autores "una validación completa se hizo difícil por la falta de los estándares de azaspirácida necesarios para los experimentos de recuperación".

Lehane *et al.* (2002) informaron el desarrollo de un método CL-ESI-EMⁿ para determinar las tres toxinas AZA más frecuentes (AZA1-3), así como los isómeros análogos hidroxilados (AZA4-5). Demostraron que la CL en tandem múltiple es más sensible que la CL-solo-EM, lo que sugiere "... que la reducción del ruido de fondo en la EMⁿ es más dramática que la caída en la señal del analito." Notable es su uso de la activación WideBand, que les permite reducir el tiempo total de elusión apuntando a la determinación de cinco azaspirácidas. Aunque los autores afirman que han desarrollado un método que requiere un mínimo de pasos para la preparación de la muestra y la preparación de ésta en su conjunto muy posiblemente insuma la mayor parte del tiempo del análisis.

Junto con el artículo recién mencionado, el mismo grupo de investigadores, informó de una comparación de métodos de extracción en fase sólida para determinar azaspirácidas en mariscos mediante el método CL-ESI-EMⁿ de Lehane (Moroney *et al.*, 2002). Se obtuvieron buenos datos de recuperación y reproducibilidad con un cartucho diol SPE y dos tipos de cartucho C₁₈ SPE. Afirman que: "...los eficientes métodos SPE aquí presentados para la preparación de muestras debieran ser más útiles en el desarrollo de métodos analíticos alternativos para las toxinas AZP en mariscos." Esto se alinea con su afirmación anterior: "La preparación de la muestra para la determinación de ficotoxinas en mariscos puede resultar en parte problemática, debido, a extensas variaciones en el contenido tóxico."

Este mismo grupo informó el desarrollo del mismo método en otra publicación (Furey *et al.*, 2002) "con el objetivo primario de producir un protocolo que pudiera usarse para el control reglamentario de las azaspirácidas en mariscos". Son dignos de mención, en particular, sus extensos estudios de linealidad para determinaciones en extractos de mariscos: durante dos décadas se obtuvieron muy buenos resultados para un rango de concentración. Los datos indican que es posible un control reglamentario con los métodos informados. El mismo grupo informó de una aplicación del método recién nombrado (James *et al.*, 2002a; 2002b). El informe muestra espectros CL-EM³ de las AZA1-3, tanto como estándares como analitos en extractos de mejillones.

6.3 Organismos fuente y habitat

Desde 1996, se han identificado varios incidentes de AZP en Irlanda. En noviembre de 1997, ocurrieron nuevamente casos de contaminación en la isla Avianmore, región de Donegal, en el noroeste de Irlanda, causando repetidas intoxicaciones en seres humanos (McMahon y Silke, 1998), como también en otros países europeos (principalmente con mejillones cultivados en Irlanda). El origen último de las azaspirácidas probablemente sea un dinoflagelado debido a la estructura poliéter altamente oxigenada y a las apariciones estacionales. Sin embargo, no se encontró ninguna de las

especies de fitoplancton tóxicas conocidas en las muestras de agua recogidas al momento de la intoxicación (James *et al.*, 2000b; Satake *et al.*, 1998b). Informaciones recientes (Peperzak *et al.*, 2002) sugieren que el *Protoceratium crassipes* es el dinoflagelado productor de la AZP. McMahon (2000) informó que como organismo fuente se ha sugerido un organismo del género *Protoperdinium*.

6.4 Presencia y acumulación en frutos de mar

6.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas AZP en organismos acuáticos

Aunque no sea este el caso con las azaspirácidas, las toxinas poliéteres se concentran típicamente en las glándulas digestivas de los mariscos. La azaspirácida y sus análogos metil- y demetil, AZA2 y AZA3, respectivamente, no están confinados al hepatopáncreas distribuyéndose también en todos los tejidos de los mariscos. Los perfiles de las toxinas diferían significativamente en los diversos tejidos de mejillones con AZA como toxina predominante en las glándulas digestivas y la AZA3 y un isómero de la AZA predominantes en los restantes tejidos. Las glándulas digestivas de los mejillones contenían inicialmente la mayor parte de las azaspirácidas debido a su alimentación con dinoflagelados tóxicos. Es, sin embargo, impredecible el transporte de estas toxinas a otros tejidos de mejillones, aunque, de ocurrir, es probable un periodo de intoxicación prolongado con mariscos debido a la baja velocidad de depuración natural. Las azaspirácidas tienen una distribución inusual en los solventes durante su proceso de extracción. Esto lleva a especular que los aminoácidos polares y las zonas no poliéter de la azaspirácida imparten a la molécula propiedades detergentes. La facilidad con que pueden moverse las azaspirácidas por diferentes polaridades probablemente juegue un papel importante en la penetración incrementada de estas toxinas en los tejidos de mariscos y mamíferos. Puede haber una variación significativa en el nivel total de AZAs en los mejillones de diferentes lugares pertenecientes a una misma región de cultivo. Ver el Cuadro 6.1 (James *et al.*, 2002a).

Cuadro 6.1 Distribución de las toxinas AZP en tejidos de mejillones

Sitio No.	Carne ^a (AZAs Total) µg/100g	HP (AZAs Total) µg/100g	AZAs Total µg/100g	Distribución de AZAs (% carne/HP) ^b
1	14	0	12	100/0
2	14	34	17	67/33
3	6	10	7	75/25
4	7	18	9	67/33
5	84	12	72	96/4
6	37	100	48	64/36
7	48	33	45	88/12

^a carne de mejillón sin hepatopáncreas

^b el peso promedio es 4,8 g; HP representaba 15-18% del total del tejido de mejillones

6.4.2 Mariscos con toxinas AZP

Se encontró que los mejillones y ostras contienen toxinas AZP (James *et al.*, 2000b).

6.5 Toxicidad de las toxinas AZP

6.5.1 Mecanismo de acción

Sin información

6.5.2 Farmacocinética

Sin información

6.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

estudios orales

Se hicieron en ratones estudios orales agudos con azaspiracida. La azaspiracida fue extraída de mejillones recogidos en Killary Harbour, Irlanda en febrero de 1996. La toxina principal se concentró, durante la purificación, en una fracción lipídica codificada KT3 (Ito *et al.*, 2000). Los ratones no evidenciaron ningún cambio clínico por administración oral (alimentación forzada con tubo de 60 µl de la fracción KT3 durante 24 horas. Se observaron, durante la autopsia pasadas cuatro horas, una activa secreción de fluido del ileum y restos de células epiteliales necrotizantes de las vellosidades en el lumen (SEM) y, pasadas ocho, la erosión desde la parte superior de las vellosidades, resultó en que éstas quedan más cortas, observándose una acumulación prominente de fluido acompañando a edemas en la lámina propia. Pasadas 24 horas, no se observaron estos cambios, pero las células epiteliales de los vellosidades adyacentes estaban fusionadas entre sí (Ito *et al.*, 1998).

Los ratones macho ICR alimentados por oralmente por cebado con una única dosis de 500, 600 o 700 µg AZA/kg pc purificada no mostraron dentro de las cuatro horas ningún cambio de comportamiento. Los sobrevivientes pasadas 24 horas fueron respectivamente 0/2, 3/6 y 1/2 a 500 µg/kg pc (con ocho semanas de edad), 600 µg/kg pc (cinco semanas de edad) y 700 µg/kg pc (cinco semanas de edad). Se observaron, respectivamente, diarrea y disminución del peso corporal dentro de las 24 horas a 600 µg/kg pc y 700 µg/kg pc. Con dosis orales únicas de 300 a 700 µg/kg pc, la AZA causó cambios dosis-dependientes en el intestino delgado (atrofia necrótica en la lámina propia de los vellosidades) y en los tejidos linfoides como el timo, bazo y las placas de Peyer. En el bazo se redujo la cantidad de no-granulocitos y tuvieron lugar lesiones tanto para los linfocitos T como para los B. Aumentó además el peso, cambió el color de rojo oscuro a rojo rosado y se observaron cambios en las grasas del hígado. La AZA no causó cambios importantes en la mucosa del estómago, pero se observó la aparición de muchas células degenerantes en el intestino grueso. El páncreas parecía perder localmente gránulos sueltos de cimógeno, aunque no fueron dañadas las células. No se observó daño hispatológico a otros órganos (riñón, corazón y pulmón). Los cambios morfológicos en ratón, inducidos por la AZA, eran muy diferentes de los del ácido ocaidaico (Ito *et al.*, 2000)

En las últimas experiencias de Ito *et al.* (2002), se utilizaron para producirles lesiones graves y observar su recuperación, un total de 18 ratones de cuatro, cinco de seis y dos de cinco semanas de edad. Se administraron oralmente a cinco grupos cuatro niveles de dosis (250, 300, 350 y 450 µg de AZA (extracto más purificado de mejillones azules de Killary Harbour y de la isla Arranmore Island en Irlanda)/kg pc (disueltos en etanol al 50). Diez ratones sobrevivientes del tratamiento inicial recibieron un segundo tratamiento al tercer día. Nueve ratones sobrevivientes del segundo tratamiento murieron entre los días siete y 90 posteriores al tratamiento. Se emplearon trece ratones de control. La dosis superior de 450 µg/kg pc causó la muerte en 11/16 de los ratones tratados de cuatro semanas. Dos de dos ratones de seis semanas de edad y otros dos de dos de cinco semanas, también murieron, al recibir, respectivamente dosis de 300 y de 250 µg/kg pc. De los diez ratones sobrevivientes al primer tratamiento, uno murió luego del segundo con 350 µg/kg pc. Se apreciaron recuperaciones lentas posteriores a la administración oral de dosis de 300, 350 y 450 µg/kg pc. Persistieron por más de tres meses erosiones y vellosidades más cortas en el estómago e intestino delgado, edema, sangrado e

infiltración de células en la pared alveolar por 56 días, cambios grasos en el hígado por 20 días y necrosis de los linfocitos del timo y bazo durante 10 días. La dosis oral más reducida de $\mu\text{g AZA/kg pc}$ pareció ser letal para los ratones empleados en este estudio.

Se ha señalado que la toxina KT3 parcialmente purificada causó una acumulación de fluidos intestinales y daños histológicos al páncreas mucho más severos (Ito *et al.*, 1998) que la toxina más purificada usada en los trabajos de Ito *et al.* (2002). Es posible que en la fracción no purificada estuviesen presentes varios análogos desconocidos de la azaspiracida. Debe mencionarse también, que la diferencia entre letalidades en ratón resultante de las administraciones por vía oral e intraperitoneal resultó ser mucho menos significativa con la azaspiracida que con otras ficotoxinas (Ito *et al.*, 2000).

estudios intraperitoneales

Los ratones expuestos a AZA con inyecciones intraperitoneales reaccionan de forma diferente que los expuestos a otras toxinas de mariscos. Luego de administrar una dosis de la toxina KT3 parcialmente purificada a ratones ddY macho, los animales se volvieron perezosos y permanecían sentados en los rincones con parálisis progresiva y respiración fatigosa. No se observó diarrea. Los animales murieron dos a tres días después de que se le administraran dosis bajas. Se informó la dosis letal mínima como de $150 \mu\text{g/kg pc}$ (Satake *et al.*, 1998a). Ito *et al.* (1998) inyectaron i.p. $10 \mu\text{l}$ de la toxina KT3 parcialmente purificada a 10 ratones (de tres semanas) macho ICR. Todos los animales mostraron inactividad y debilidad general, muriendo dentro de las 24 horas. Los cambios morfológicos causados por la KT3 eran claramente diferentes de los inducidos por las toxinas DSP, PSP o ASP. Los principales órganos blanco de la KT3 fueron el hígado, bazo, páncreas, timo y el tracto digestivo. Por el contrario, para las toxinas DSP es el tracto digestivo, para las PSP el sistema nervioso central y para las ASP el cerebro. El blanco de la toxina KT3 era el intestino delgado, en el que degeneraron las vellosidades desde el comienzo. A nivel histopatológico, las células del parénquima del páncreas y los hepatocitos, que contienen numerosos retículos endoplasmáticos ásperos, son los afectados preferentemente siendo probable que la KT3 inhiba la síntesis de las proteínas.

Satake *et al.* (1998b) informaron de una dosis letal i.p. de AZA purificada en ratones de $200 \mu\text{g/kg pc}$. En ratones, las dosis letales intraperitoneales para las AZA-2 y -3 eran respectivamente de 110 y $140 \mu\text{g/kg pc}$, (Ofuji *et al.*, 1999a) y para la AZA-4 y la AZA-5 de aproximadamente 470 y menos de $1000 \mu\text{g/kg pc}$, respectivamente (Ofuji *et al.*, 2001).

toxicidad por administración repetida

estudios orales

Se administraron dosis orales de 50, 20, 5 y $1 \mu\text{g}$ de AZA/kg pc dos veces por semana, hasta 40 veces, en 145 días, respectivamente a cuatro grupos de 10, 10, 5 y 6 ratones (de cuatro semanas de edad). Se usaron como control diecinueve ratones. Nueve de cada diez ratones con $50 \mu\text{g/kg pc}$ y tres de diez ratones con $20 \mu\text{g/kg pc}$ se debilitaron tanto (inactividad y pérdida de peso) que fueron sacrificados antes de ser tratados las 40 veces (principalmente luego de 30 tratamientos). Se observaron neumonía intersticial y vellosidades más cortas en el intestino delgado. No se observó mortalidad a 5 y a $1 \mu\text{g/kg pc}$. Los ratones que sobrevivieron los 40 tratamientos se conservaron por hasta tres meses. No se apreciaron los cambios grasos en el hígado, previamente observados con dosis agudas o letales. Se observó, a $50 \mu\text{g/kg pc}$, un tumor de pulmón en 1/10 ratones dosificados 32 veces. A $20 \mu\text{g/kg pc}$ se observó un tumor de pulmón en 1/10 ratones dosificados 36 veces y en dos ratones más, una vez retirada la dosis. Además, se observó hiperplasia de las células epiteliales del estómago en 6/10 ratones a $20 \mu\text{g/kg pc}$. A $5 \mu\text{g/kg}$ los 5 ratones mostraron erosión del intestino delgado (atribuible posiblemente a lesiones no curadas más que a efectos tardíos desarrollados en el periodo siguiente al retiro de la dosis). Uno de cada seis ratones, a $1 \mu\text{g/kg}$, desarrollaron nódulos hiperplásticos del hígado y dos de cada seis ratones mostraron mitosis en el hígado. (Ito *et al.*, 2002).

reproducción/teratogenicidad

Sin información.

mutagenicidad

Sin información.

toxicidad in vitro

Las azaspirácidas resultaron cito-tóxicas para las células P388, pero la potencia para las células KB era mucho menos importante (EU/SANCO, 2001). La AZA no inhibió la fosfatasa 2A de las proteínas. Se notó que los estudios *in vitro* sobre células humanas de donantes sanos sugieren que el umbral para modificar la función celular de los análogos de la azaspirácida sería de 24 µg/kg para una persona de 60 kg.

6.5.4 Toxicidad en seres humanos

En noviembre de 1995, al menos ocho personas en los Países Bajos enfermaron después de consumir mejillones (*Mytilus edulis*) cultivados en Killary Harbour, Irlanda. Aunque los síntomas en seres humanos como náusea, vómitos, diarrea grave y calambres de estómago, eran similares a los de las intoxicaciones diarreicas por mariscos (DSP), las contaminaciones con las principales toxinas DSP, el ácido ocaidaico (OA) y las dinofisistoxinas (DTXs), eran muy bajas. Estas observaciones motivaron a los investigadores a explorar la estructura de la toxina causante. Mediante análisis químicos, los investigadores identificaron y cuantificaron la AZA (Satake et al., 1998a; 1998b). Basado en estos resultados, se estimó la toxicidad de los mejillones en 0,15 unidades ratón (UR)/g (equivalentes a 0,6 µg de AZA/g) (EU/SANCO, 2001). Se informó (Ofuji et al. (1999b) un contenido de toxina superior de 1,4 µg AZAs/g de carne (0,4 UR/g de carne). La toxicidad humana se encontró entre los 6,7 (5 por ciento) y 24,8 (95 por ciento) µg/persona con un valor medio de 15 µg/persona. Sin embargo, los nuevos datos de estabilidad térmica de la azaspirácida sugieren que no es apropiado considerar una reducción de la concentración de AZAs debida al calentamiento. En consecuencia el rango recalculado para el LOEL es de 23 a 86 µg por persona con un valor medio de 51,7 µg/persona (EU/SANCO, 2001).

6.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

Sin información.

6.6 Prevención de la intoxicación AZP

6.6.1 Depuración

En invierno, cuando los mariscos están libres de contaminación con toxinas DSP, éstas pueden estar presentes en los mejillones. La larga duración de los periodos de toxicidad, que a menudo se extiende a casi seis meses, ocasiona problemas (Ofuji et al., 2001). Durante las etapas iniciales de la intoxicación, las glándulas digestivas contienen la mayor parte de las toxinas AZP. Puede darse una migración de toxinas AZP a otros tejidos de los mejillones, ocasionando una intoxicación persistente. Esta poco común distribución de toxinas AZP dentro de los tejidos de los mariscos puede resultar en bajas velocidades de depuración por vías naturales. Además el protocolo para el bioensayo en ratón de la DSP, en el que sólo se emplea el hepatopáncreas en la extracción, puede no detectar las toxinas AZP en mejillones (James et al., 2002a).

6.7 Casos y brotes de CFP

6.7.1 Europa

La Figura 6.2 ilustra la presencia de azaspirácidas en los países europeos integrantes del CIEM.

Irlanda

En noviembre de 1995, por lo menos ocho personas en los Países Bajos se intoxicaron al consumir mejillones (*Mytilus edulis*) cultivados en Killary Harbour, Irlanda (McMahon y Silke, 1996; Satake *et al.*, 1998a). Se detectó una toxina por entonces llamada Killary Toxin-3 o KT3. Satake *et al.* (1998b) aclararon la estructura de la KT3 y la llamaron azaspirácida. Los mejillones recogidos en febrero de 1996, contenían 0,15 MU/g (=0.6 µg AZA/g) de toxina (EU/SANCO, 2001).

Desde 1996 se han identificado en Irlanda varios incidentes con AZP. Nuevamente en 1997 hubo casos de contaminación que causaron repetidas intoxicaciones en seres humanos– en la región de la isla Arranmore de Donegal, noroeste de Irlanda (McMahon y Silke, 1998) – y en otros países europeos. Aunque no se observó con posterioridad a estas intoxicaciones ningún fitoplancton conocido en las zonas de cultivo, es probable que dinoflagelados marinos produjeran las toxinas AZP (James *et al.*, 2002a).

Los mejillones recogidos en Killary Harbour el 23 de abril de 1996 (cinco meses después del incidente) contenían 1,14 µg AZA/g de carne, 0,23 µg AZA2/g de carne y 0,06 µg AZA3/g de carne (total de AZAs 1,4 µg/g de carne). Los mejillones recogidos en Arranmore Island el 3 de noviembre de 1997 (de uno a dos meses después del incidente) contenían 0,865 µg AZA/g de carne de mejillones enteros (incluyendo hepatopáncreas), 0,25 µg AZA2/g y 0,24 µg AZA3/g (total de AZAs 1,36 µg/g). Los resultados del bioensayo en ratón indicaron 0,4 MU/g de carne (Ofuji *et al.*, 1999b). McMahon (2000) informó que el contenido máximo de AZA en los mariscos en el incidente de Arranmore era de 10,7 µg/g de hepatopáncreas. En noviembre de 1997, James y Furey (2000) detectaron 2,21 µg de AZAs/g en carne cruda entera de mejillones.

Después de la intoxicación inicial en Arranmore Island y Killary Harbour, la toxina persistió por siete a ocho meses más. Las ostras parecen ser igualmente susceptibles que los mejillones a intoxicaciones con toxinas AZP como lo ilustra el Cuadro 6.2 (James *et al.*, 2000).

Cuadro 6.2 Niveles de AZAs en mejillones y ostras de Irlanda

Localidad en Irlanda	Fecha	AZAs Totales µg/100 g (mejillón)	AZAs Totales µg/100 g (ostra)
Condado de Cork	noviembre de 1998	70	70
County Cork	febrero de 2000	10	20
Condado Bruckless, Donegal	noviembre de 1999	10	30

Durante 1999, se ensayaron en Irlanda unas 1 800 muestras para determinar toxinas DSP/AZP empleando el bioensayo en ratón de Yasumoto *et al.* (1978). Aproximadamente el 5 por ciento de las muestras fueron positivas. Se detectó la azaspirácida en varias zonas de producción y se ha prohibido la cosecha de todos los bivalvos en Bruckless Bay, en el noroeste de Irlanda desde agosto de 1999 al haberse detectado toxinas AZP en muestras ensayadas semanalmente (EU-NRL, 2000).

Noruega

Se han identificado azaspiracidas en mejillones (James *et al.*, 2000b).

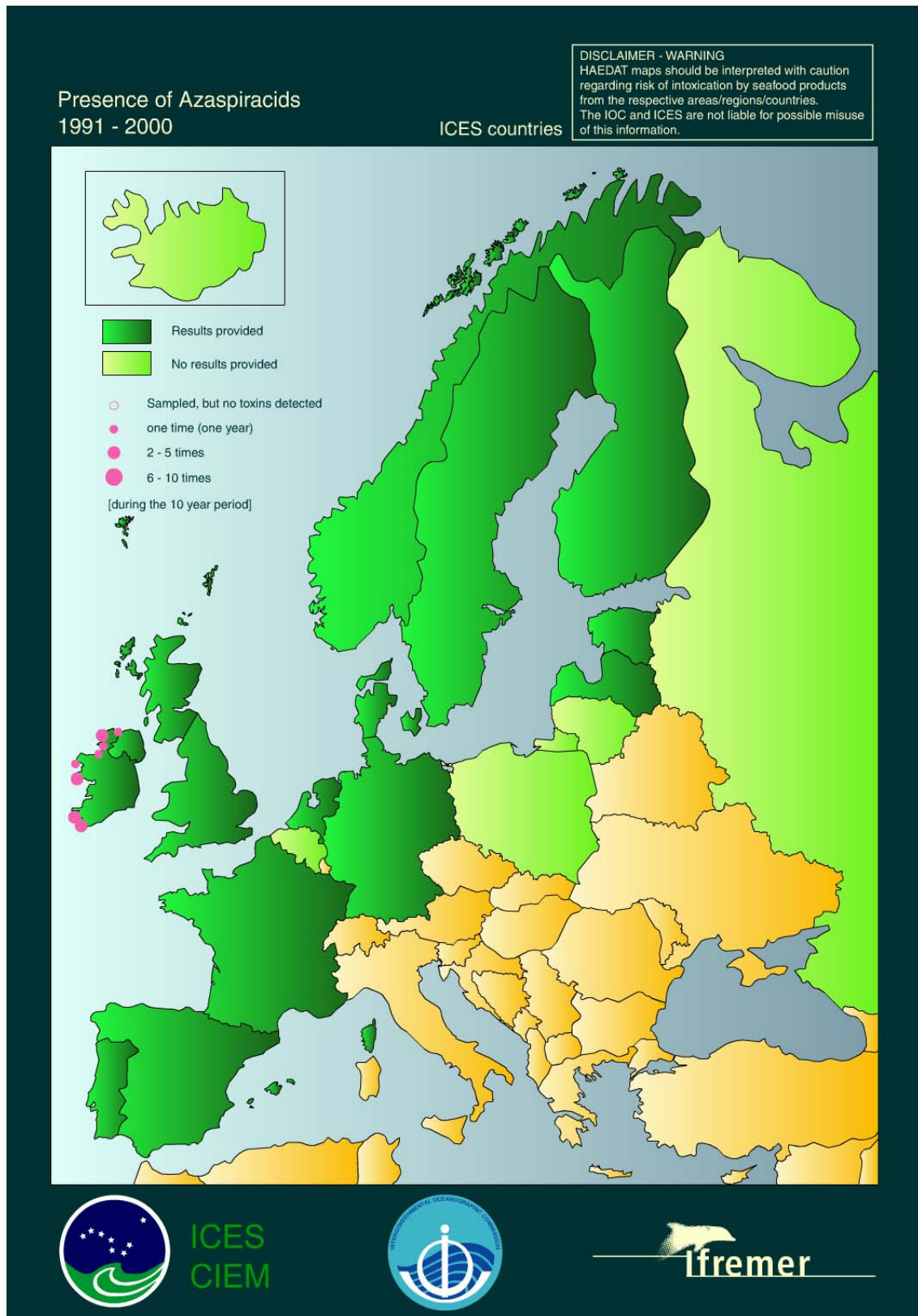
Portugal

Se informó una toxicidad extraña en berberechos (*Cerastoderma edule*) similar a la AZP pero no encontrada en mejillones (EU-NRL, 1998).

Reino Unido

Se han identificado azaspiracidas en mejillones (James *et al.*, 2000b).

Figura 6.2 Presencia de toxinas AZP en aguas costeras de países europeos miembros del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

6.8 Reglamentos y seguimiento

La opinión de los expertos irlandeses que realizaron la evaluación de riesgos es que debe revisarse el límite tolerable predominante de 8 µg/100 g de marisco (ver el Capítulo 8.5 Evaluación de riesgos para la intoxicación azaspiracida por mariscos (AZP) y el Capítulo 9.1.5 Conclusiones relativas a la AZP), debido a la falta de datos sobre las toxinas AZP y a la incertidumbre delineada en la misma.

Debe prestarse atención a la posible aparición simultánea del ácido ocadaico, de las pectenotoxina y de las yesotoxinas en mariscos. Se notó la coexistencia de estas toxinas con las AZP en mejillones recogidos en Noruega (Yasumoto y Aune in EU/SANCO, 2001).

6.8.1 Europa

En marzo de 2002 la Comisión Europea fijó las reglas siguientes (EU, 2002a):

- Los niveles máximos para las toxinas en los moluscos bivalvos, equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos (cuerpo entero o cualquier parte comestible separadamente) serán de 160 µg/kg.
- Los métodos de ensayo preferidos son el bioensayo en ratón o rata. Pueden usarse diversos métodos analíticos como la CL con detector de fluorescencia, la CL-EM y los inmunoensayos, como métodos alternativos o complementarios a los métodos de ensayo biológicos, siempre que solos o combinados puedan al menos detectar los siguientes análogos AZA, AZA2 y AZA3; que no sean menos eficaces que los métodos biológicos y que su implementación suministre un nivel equivalente de protección de la salud:
- Cuando los resultados de los análisis demuestren discrepancias entre los diferentes métodos el método de bioensayo en ratón debiera considerarse como el método de referencia.

Irlanda

El Programa de Seguimiento de Biotoxinas comenzó en Irlanda en 1984 basado inicialmente en el tamizado de muestras mediante bioensayos para detectar la presencia de toxinas DSP. En los últimos años, la detección de toxinas adicionales, como la DA y particularmente las azaspiracidas, ha incrementado los seguimientos y el programa comprende actualmente ensayos semanales de mariscos empleando el bioensayo en DSP en ratón, CL-EM (ácido ocadaico, DTX2, azaspiracidas) y CL (DA) así como análisis del fitoplancton. Se envían informes regulares de los resultados del análisis de las muestras a las autoridades reglamentaras, los responsables de la salud así como a los productores y procesadores de mariscos. Se está desarrollando un sistema de información basado en Internet para incrementar el acceso a la información (McMahon *et al.*, 2001).

McMahon (2000) informó que la Autoridad de Inocuidad de los Alimentos de Irlanda propuso un umbral de concentración interino de 0,1 µg AZA/g de mejillón entero. Se propuso también examinar y, de resultar necesario, revisar este valor a medida que haya disponibles nuevos datos.

7. Intoxicación por ciguatera en pescados (CFP)

Desde hace muchos siglos se conoce la intoxicación por ciguatera en pescados (CFP por sus siglas en inglés). En 1511 Peter Martyr de Anghera informó su aparición en las Antillas Occidentales, Hermansen en 1601 lo hizo para las islas del Océano Índico y De Quiros en 1606 para varios archipiélagos del Océano Pacífico. Las zonas endémicas son fundamentalmente las islas tropicales y subtropicales de los Océanos Pacífico e Índico y las regiones tropicales del Caribe, aunque son también afectadas las zonas continentales de arrecifes (Legrand, 1998). Don Antonio Parra, en el año 1787, en Cuba, llamó ciguatera a la intoxicación resultante de ingerir la “*cigua*”, el nombre español común de un molusco univalvo, *Turbo pica*, conocido como causante de indigestión. De alguna forma, el término “*cigua*”, pasó a designar una intoxicación causada por la ingesta de pescados de arrecifes tropicales (De Fouw *et al.*, 2001). Las toxinas responsables, las ciguatoxinas, se acumulan en la cadena alimentaria, desde los pequeños peces herbívoros que se alimentan en los arrecifes de coral y pasando a los órganos de los grandes peces carnívoros que se alimentan con ellos (Angibaud y Rambaud, 1998; Lehane, 2000).

En el pasado la intoxicación con ciguatera en los seres humanos se ubicaba fundamentalmente en las regiones costeras, a menudo en comunidades indígenas isleñas. Sin embargo, como consecuencia del incremento del comercio, del consumo de frutos de mar y del turismo internacional se han internacionalizado las poblaciones afectadas. Actualmente, la ciguatera es el tipo, a nivel mundial, más común de intoxicación alimentaria causada por frutos de mar, estimándose que mundialmente entre 10 000 a 50 000 personas sufren anualmente de la enfermedad que conforma un problema sanitario global (De Fouw *et al.*, 2001; Lehane, 2000).

No se ha asociado nunca con la ciguatera ningún indicador como la llamada “marea roja”, un fenómeno superficial muy visible, asociado a las intoxicaciones con mariscos. La ausencia de una señal de advertencia ha contribuido al temor a las intoxicaciones con ciguatera (De Fouw *et al.*, 2001).

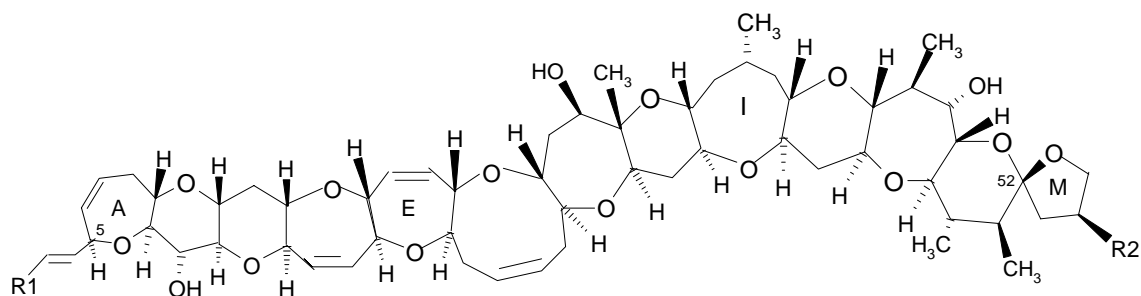
7.1 Estructuras químicas y propiedades de las ciguatoxinas

Las ciguatoxinas son compuestos lipídicos poliéteres solubles formados por 13 a 14 anillos unidos por enlaces éter con una estructura muy rígida del tipo escalera (ver Figura 7.1). Son moléculas relativamente estables al calor que conservan su toxicidad luego de la cocción y de exponerse a condiciones ácidas o básicas suaves. Las ciguatoxinas resultan de la biotransformación en los peces de sus precursoras, las gambiertoxinas (Lehane y Lewis, 2000; Lehane, 2000).

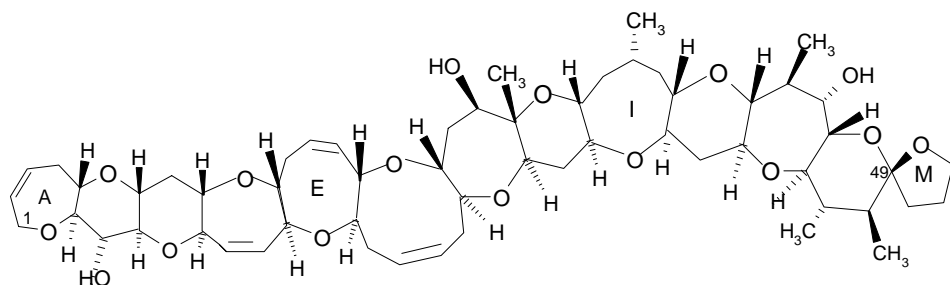
En zonas del Pacífico, la principal y más potente ciguatoxina es la ciguatoxina-1 Pacífico (P-CTX-1, peso mol. 1112). Su posible precursor es la gambiertoxina-4B (GTX-4B). Las principales ciguatoxinas del Pacífico, P-CTX-1, P-CTX-2 y P-CTX-3, se encuentran en los peces en diferentes cantidades relativas (Lehane y Lewis, 2000; Lehane, 2000). Se han determinado las estructuras de más de 20 congéneres de la ciguatoxina. Las modificaciones estructurales, principalmente por oxidación, se observaron principalmente en ambos extremos de las moléculas de toxina (Naoki *et al.*, 2001; Yasumoto *et al.*, 2000). Las ciguatoxinas del Caribe (y las del Océano Índico) difieren de las del Pacífico. La CTX-1 (C-CTX-1) del Caribe es menos polar que la P-CTX-1. En 1998, se determinaron las estructuras de dos ciguatoxinas del Caribe (C-CTX-1 y C-CTX-2). Se han descrito múltiples formas de ciguatoxina, con diferencias moleculares y de patogenicidad menores. La principal es la CTX-1, que se encuentra en peces carnívoros y representa un riesgo para los seres humanos a niveles superiores a 0,1 µg/kg pescado (de Fouw *et al.*, 2001).

En el pasado se ha informado de diferentes especies de pez loro con una toxina denominada escaritoxina, menos polar que la CTX-1. A juzgar por sus propiedades cromatográficas conocidas, la escaritoxina parece corresponder a una mezcla de CTX-4A y de CTX-4B (De Fouw *et al.*, 2001).

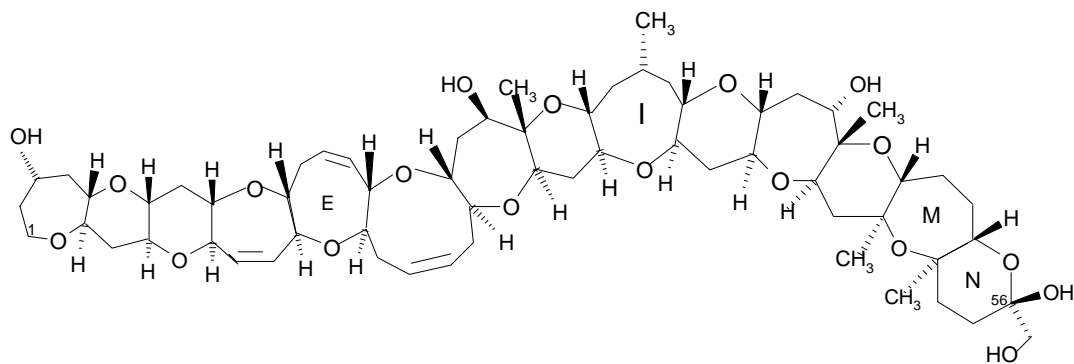
Figura 7.1 Estructura de las ciguatoxinas (CTXs) del Pacífico (P) y del Caribe (C)



	<u>R1</u>	<u>R2</u>
P-CTX-1:	${}^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$	OH
P-CTX-3 (P-CTX-2):	${}^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$	H
P-CTX-4B (P-CTX-4A):	${}^1\text{CH}_2\text{CH}$	H



P-CTX-3C



C-CTX-1 (C-CTX-2)

Entre paréntesis se indican los epímeros energéticamente menos favorables, P-CTX-2 (52-epi P-CTX-3), P-CTX-4A (52-epi P-CTX-4B) y C-CTX-2. Las (56-epi C-CTX-1), 2,3-Dihidroxi P-CTX-3C y 51-hidroxi P-CTX-3C han sido también aisladas de pescados del Pacífico (Lewis, 2001).

7.2 Métodos de análisis

7.2.1 *En general*

Las ciguatoxinas son inodoras, insípidas y en general no detectables con ninguna prueba sencilla. En consecuencia y tradicionalmente, se han empleado bioensayos para el seguimiento de los pescados sospechosos. Se han examinado y rechazado como no válidas muchas pruebas usadas por los nativos para determinar la toxicidad de los pescados, como la decoloración de monedas de plata o de alambres de cobre o el rechazo de moscas y hormigas (Park, 1994).

Aunque no cuantitativas, las pruebas alimentando gatos o mangostas son simples y relativamente sensibles. Como los ratones no son muy sensibles a la ciguatoxina para los bioensayos es necesario purificar los extractos de pescado. El bioensayo alternativo con mosquitos tiene una buena correlación con las pruebas con gatos y con el bioensayo en ratón. Hay disponibles otros bioensayos con pollos, camarones en salmuera y cobayos. Todos los bioensayos tradicionales tienen como desventaja la falta de especificidad a toxinas individuales. Se han encarado recientemente estudios con métodos químicos para la detección y cuantificación de las toxinas vinculadas a la ciguatera, como la cromatografía en capa fina y la CL. Se han desarrollado ensayos alternativos muy prometedores basados en tecnologías inmunoquímicas que pueden emplearse en los programas de seguimiento de frutos del mar (Park, 1994).

7.2.2 *Bioensayos*

Todos los bioensayos mencionados tienen en común la falta de especificidad química hacia las toxinas individuales (Juranovic y Park, 1991), aunque tienen la ventaja como estimaciones groseras de indicar intoxicaciones. Los bioensayos son semicuantitativos y sensibles. La ciguatoxina induce señales características de toxicidad aunque el empleo de algunas especies de animales puede resultar problemático por sus costos y dificultades éticas.

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

El ensayo en ratones, basado en el método descrito por Banner *et al.* (1960) es en la actualidad el más extensamente empleado para detectar ciguatoxinas en pescados. El método consiste en inyectar por vía i.p. en los ratones (intraperitoneal) extractos tóxicos crudos o semi purificados diluidos serialmente, observando los síntomas durante 24 horas. Yasumoto *et al.* (1984b) detalla la realización del ensayo. Ha sido descrito para detectar ciguatoxinas en hasta 20 mg de extracto etéreo de carne de pescado. La fracción de eterdietílico que contiene la ciguatoxina se suspende en 5 ml de una solución salina 1-5% Tween 60/0.9% y se inyecta intraperitonealmente en ratones de ambos sexos (20 ± 2 g). Los ratones son continuamente observados durante las dos primeras horas y pasadas éstas se realizan inspecciones regulares. Se ensayan dos ratones para cada fracción. Los ratones se mantienen a 23 ± 2 °C y se observan durante siete días, registrándose los síntomas y los tiempos que tardan en morir. Intermitentemente se toma la temperatura rectal. Para cuantificar cada fracción se emplea la relación entre la dosis y el tiempo que les toma morir. La letalidad total se expresa en unidades ratón (UR). Para las mezclas de ciguatoxinas encontradas en los peces carnívoros (Lewis y Sellin, 1992; Lewis *et al.* 1991) esta relación la aproxima $\log UR = 2,3 \log (1 + T^{-1})$, donde UR es el número de unidades ratón de ciguatoxina inyectada y T es el tiempo en horas que tarda en morir (ver también el Cuadro 7.2). Una UR es la dosis LD₅₀ para un ratón de 20 g, equivalente a 5 ng, 48 ng y 18 ng de CTX-1, CTX-2 y CTX-3, respectivamente. (Lewis y Sellin, 1992; Lewis *et al.* 1991). Se recomienda una purificación adicional para separar las diferentes toxinas, especialmente las maitotoxinas (ver Capítulo 7.3.1) de las ciguatoxinas, pues las maitotoxinas inducen efectos en los ratones, que a menudo se confunden como efectos de las ciguatoxinas a pesar de claras diferencias (ver Cuadro 7.2). En consecuencia, se ha informado de procedimientos de extracción modificados que pueden mejorar la separación de estos dos tipos de toxinas (Yokayama *et al.*, 1988; Holmes *et al.*, 1991; Holmes y Lewis, 1994; Legrand *et al.*, 1992).

Aunque el ensayo en ratones ha sido ya empleado tradicionalmente, no sirve como ensayo corriente. Otras dificultades adicionales son las variaciones en el peso de los ratones, que deben limitarse empleando una colonia grande de cría de ratones y la relación no lineal entre el tiempo de muerte y la dosis.

ensayo con pollos

Es un medio rápido para determinar la toxicidad de los hígados de pescado administrando directamente pequeñas porciones de hígado a pollos jóvenes al diez por ciento de su peso corporal. Aunque más difícil, puede también administrarse carne de pescado (Vernoux *et al.*, 1985).

ensayo con mangosta y gato

Se sigue para los ensayos con mangostas (Banner *et al.*, 1960) y con gatos (Lewis, 1987; Bagnis *et al.*, 1985) el mismo procedimiento que con pollos, sólo que se administra carne de pescado en cantidades elevadas (se administró alimento del 5 al 15 por ciento del peso del animal de prueba). El gato es menos adecuado como modelo de prueba, al regurgitar frecuentemente parte de los alimentos usados en el ensayo. Los animales se observan durante 48 horas. Aunque las pruebas son simples y permiten distinguir los pescados tóxicos, resultan engorrosas y no son cuantitativas (Bagnis *et al.*, 1987).

ensayo con camarones en salmuera

Fue este el primer ensayo desarrollado con invertebrados. Sin embargo los efectos tóxicos sobre los camarones en salmuera, de la solución Tween 80 recomendada para emulsificar el extracto, daba falsos positivos no pudiendo detectarse efectos tóxicos atribuibles a la ciguatoxina. (Granade *et al.*, 1976; Hungerford, 1993).

ensayo con mosquitos

Se ha desarrollado también un bioensayo con mosquitos. Quizás debido a las dificultades de obtención y cuidado de los mosquitos, por no estar habituados a su manejo y por la falta de familiaridad con el reconocimiento de las señales características de la intoxicación con ciguatoxinas, son pocos los laboratorios que emplean este ensayo. El procedimiento requiere la inyección intra-torácica en los mosquitos de extractos de pescado diluidos serialmente, expresándose la toxicidad como mosquito LD₅₀. Es un ensayo rápido, basado en una extracción simple que requiere una cantidad pequeña de pescado. El ensayo no es, sin embargo, ni específico ni cuantitativo (Bagnis *et al.*, 1985, 1987).

ensayos con larvas de díptera

El ensayo con larvas de díptera podría sustituir al bioensayo en ratón en ausencia de otros ensayos *in vitro*. Sin embargo, no ha sido aun validado (Labrousse *et al.*, 1992). Para detectar la ciguatoxina en la carne de pescado se emplean larvas de díptera (*Parasarcophaga argyrostoma*). Estas larvas son elegidas por la facilidad de cría y manejo, por su habilidad para consumir espontáneamente cantidades grandes de carne fresca y por su muy alta sensibilidad a la ciguatoxina. Para hacerlas crecer, las larvas se alimentaron con unos 5 g de la muestra a ensayar. Puede observarse a simple vista el crecimiento sobre la carne de las larvas durante la noche. Se pesan pasadas 24 horas. Comparadas con muestras sanas, una pérdida de peso o un pequeño incremento indica el grado de toxicidad de la muestra. El límite de detección para la ciguatoxina expresada como CTX-1 se determinó, o pesando las larvas o por un examen a simple vista, con fluctuaciones de alrededor de 0,15 ng/g carne. Las muestras con más de 1 ng de CTX/g carne (anguila morena) mataban las larvas en tres horas, en tanto que muestras con concentraciones menores inhibían su crecimiento. La lectura a simple vista parece satisfactoria hasta los 0,2 ng de CTX/g, mientras por el método más objetivo de la pesada, resultaba aceptable con valores menores de 0,10 a 0,15 ng CTX/g. El ensayo es muy sensible, simple y barato, aunque sería útil fijar una curva de crecimiento estándar. Otro elemento para mejorar en el ensayo es el tiempo de respuesta. Para pescados tóxicos la respuesta es aceptable, pero se requiere más tiempo con muestras de baja toxicidad (comparable con la respuesta del bioensayo en ratón) (Labrousse y Matile, 1996).

ensayos in vitro

ensayos para ciguatoxinas por enlace con canales de sodio

Las ciguatoxinas se unen a los canales de sodio haciendo que se abran a potenciales de membrana de reposo normales para las células. Esto resulta en un ingreso de iones sodio, en una despolarización de la célula y en la aparición de potenciales de acción espontáneos en células excitables. El ingreso de sodio puede favorecerse agregando toxinas activadoras del canal de sodio mediante un mecanismo alostérico. El ensayo para las ciguatoxinas, de acuerdo con la literatura (Manger *et al.*, 1993, 1994, 1995), aprovecha este fenómeno resultante en un ensayo altamente sensible a las ciguatoxinas y a otras toxinas activadoras del canal de sodio. Este ensayo tiene una sensibilidad 10 000 veces superior para las ciguatoxinas que el bioensayo en ratón.

Legrand y Lotte (1994) informaron de un ensayo para pescado contaminado con ciguatoxinas basado en su capacidad inhibitoria de la unión de la $^3\text{[H]}$ -brevetoxina a los canales de sodio en las sinaptosomas del cerebro de las ratas.

Los dos ensayos *in vitro* de canal de sodio mencionados tienen una sensibilidad superior al bioensayo en raton y ofrecen un considerable potencial de sustitución de este ensayo para la detección de ciguatoxinas en extractos de pescado crudo. Sin embargo, actualmente, es improbable que su costo sea viable para uso rutinario en pescados individuales.

bioensayos alternativos

Se han desarrollado varios ensayos como los del ileum del cobayo (Dickey *et al.*, 1982), del atrium del cobayo (Lewis, 1988; Lewis y Endean, 1986), de fibras aisladas de los nervios de sapos (Benoit *et al.*, 1986), con células hemolíticas de seres humanos y de ratones (Escalona De Motta *et al.*, 1986) y el bioensayo que mide la caída en la temperatura del cuerpo de los ratones resultante de inyecciones intraperitoneales con extractos de pescado tóxicos (Gamboa *et al.*, 1990; Sawyer *et al.*, 1984). En el ensayo del atrium del cobayo, el extracto de tejido se emplea para bañar el atrium una vez retirado del animal. Se buscan los efectos inotrópicos característicos de la ciguatoxina (DeFusco *et al.*, 1993).

7.2.3 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Un ensayo ideal para la detección de toxinas marinas debiera ser simple, de alta sensibilidad y específico. Por ello la evaluación de los ensayos para la detección de toxinas marinas se ha desplazado hacia los análisis inmunológicos (Hokama y Smith, 1990). Se han desarrollado métodos inmunoquímicos como el radioinmunoensayo (RIE) (Hokama *et al.*, 1977), un inmunoensayo enzimático de competencia (IEC) (Hokama *et al.*, 1983, 1984, 1986) y un inmunoensayo enzimático rápido por pegado (Hokama, 1985; Hokama *et al.*, 1985, 1987). Los problemas con estos métodos inmunoquímicos son sus reactividades cruzadas con otros compuestos poliéteres y una limitada provisión de anticuerpos.

La presencia de otra familia de ciguatoxinas en la región del Caribe tiene consecuencias importantes para la detección de los pescados con ciguatera. Los métodos de detección de anticuerpos basados en anticuerpos desarrollados contra fragmentos de P-CTX-1 o de P-CTX-1 (Vernoux y Lewis, 1997) pueden no resultar adecuados para detectar las ciguatoxinas del Caribe

radioinmunoensayo

En 1977, se desarrolló un radioinmunoensayo (RIE) para detectar la ciguatoxina directamente en pescados contaminados (Hokama *et al.*, 1977). En este ensayo, se inyectó en ovejas y conejos, CTX conjugada con albúmina humana del suero para producir anticuerpos. Se empleó en el RIE el anticuerpo a la CTX producido por las ovejas, luego de purificado y de unido ¹²⁵I como marcador. En la práctica, se informó de algunos falsos positivos. Este método no pudo emplearse para analizar grandes cantidades de pescados.

ensayos ELISA

La detección de la CTX mejoró al desarrollar Hokama *et al.* (1983) un inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés). El procedimiento incorporaba anti-ciguatoxina de oveja conjugada con peroxidasa y la determinación colorimétrica de la absorbancia resultante de la reacción enzimática. Este ensayo es de eficacia similar a un RIE anterior, aunque más práctico y menos costoso. No obstante, aun resultaba tedioso y fue abandonado como método de detección.

ensayos con palitos

La velocidad de detección mejoró al simplificar Hokama (1985) aun más el procedimiento enzimático cuando incorporando como instrumentos de ensayo, palitos de bambú recubiertos con líquido corrector, con lo que solo era necesario tocar el tejido de pescado con los palitos y, mezclar luego con los reactivos los palitos con tejido adherido. El método permitió la separación exitosa de los pescados tóxicos de los no tóxicos. Eran, sin embargo, necesarios seis ensayos por pescado para una determinación precisa en aquellos pescados con ciguatera próximos a los niveles límite.

El objetivo final, un ensayo rápido, colorimétrico y visual, se logró recubriendo el palito de bambú insertado en la carne de pescado con anti-ciguatoxina de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante. Luego de incubado diez minutos el color del palito se evalúa visualmente, desde el incoloro (no tóxico) a un azulado púrpura intenso (altamente tóxico) (Hokama *et al.*, 1987).

Con posterioridad, Hawaii Chemtect International (Ciguatetect®) desarrolló un inmunoensayo rápido (en 15 minutos) con palitos-enzima empleando un anticuerpo de oveja de la toxina anti ciguatera marcado con peroxidasa de rábano picante para la detección de toxinas de la ciguatera y de toxinas asociadas con intoxicaciones diarreicas con mariscos. El ensayo Ciguatetect® solamente puede usarse como un método general para seleccionar muestras para ser analizadas posteriormente porque la falta de estándares CTX dificulta la determinación de la reactividad cruzada con diversos derivados. Aun no se ha determinado la tasa de falsos positivos (Park, 1995). El ensayo Ciguatetect® fue planificado como un estudio internacional del tipo colaborativo formal de la AOAC. A la fecha, el estudio no se ha realizado aun al no ser los anticuerpos empleados monoclonales, con lo que se cuestionaba su disponibilidad a largo plazo, la calidad necesaria para desarrollos metodológicos de este tipo y su validación. Los coordinadores del estudio están desarrollando nuevas líneas de células hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales de la anti-ciguatoxina (Quilliam, 1998a, 1999).

inmunoensayos con anticuerpos monoclonales

Todos los estudios primarios emplearon un anticuerpo policlonal contra la ciguatoxina producido en ovejas. Un inconveniente de este enfoque resulta en que para la producción de anticuerpos de largo plazo se requiere una provisión continua de antígeno para los refuerzos. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales pueden suministrar una provisión continua de un anticuerpo seleccionado. Hokama *et al.* (1985, 1989a) y Hokama (1990) informaron de la producción de anticuerpos monoclonales vinculados con una toxina poliéter, así como con la ciguatoxina (seguramente la CTX-1).

Cuando se incorporó la tecnología de los anticuerpos monoclonales al procedimiento con palitos (Hokama *et al.*, 1989b) se combinaron la rapidez, la facilidad y el uso específico. Con este ensayo, la CTX se conjugó con albúmina de suero humano con carbonimida, y el conjugado inyectado a ratones

BALB/c. Las células empleadas para la fusión, y ya usadas en otros estudios (Hokama *et al.*, 1989a), fueron las designadas como PBX63-Ag8-65B, de mieloma de ratón no sintetizadoras de inmunoglobulina. El inmunoensayo con enzimas en palitos permanece esencialmente igual al modelo original (Hokama *et al.*, 1987), excepto que la peroxidasa de rábano picante fue ahora conjugada con el anticuerpo monoclonal anti-CTX (MAB-CTX). Este método ha sido ampliamente empleado en relevamientos y confirmaciones clínicas.

ensayo con inmunoesferas en fase sólida

En 1990, comenzó a emplearse para la detección directa de la CTX adsorbida en trozos de bambú recubiertas con fluido corrector (Hokama, 1990; Hokama *et al.*, 1993) un ensayo con inmunoesferas en fase sólida (SPIA, por sus siglas en inglés), con esferas de poliestireno coloreadas cubiertas con MAB-CTX. El ensayo de membrana con inmunoesferas (MIA, por sus siglas en inglés) presentado por Hokama *et al.* (1998) está basado en los principios inmunológicos empleados para desarrollar el SPIA. Usa un anticuerpo monoclonal preparado contra anguila morena purificada (MAB-CTX) con el que se recubren esferas coloreadas de poliestireno. Las toxinas de poliéter extraídas de un trozo de pescado se unen con la membrana hidrófoba de polivinilideno sobre un soporte plástico (palillo con membrana) y pueden detectarse por el MAB-CTX con que se recubren las bolitas de poliestireno coloreadas. La intensidad del color en la porción de membrana del palillo está relacionada con la concentración de CTX en los extractos con metanol. En general, la MIA mostró un límite de detección razonable para la CTX (aprox. 0,032 ng CTX/g tejido). Durante el desarrollo de la MIA, se observaron varios factores críticos para obtener resultado exactos y repetibles: i) no debe tocarse la parte de membrana pues, de hacerse puede resultar en falsos positivos; ii) para obtener resultados óptimos el palillo con membrana debe estar embebido en la suspensión de la muestra de pescado/metanol durante al menos 20 minutos; iii) el palillo y el tubo de ensayo deben estar completamente secos antes de agregar al tubo de ensayo la suspensión con inmunoesferas; y iv) no debe beberse por más de 10 minutos el palillo con membrana en la suspensión de latex con inmunoesferas. La AOAC Internacional en 1999 (Hokama y Ebesu, 2000) sometió el método de Hokama *et al.* (1998) a un estudio colaborativo semi cuantitativo. Los colaboradores en el estudio recibieron muestras de pescado secas, no inoculadas o inoculadas con el extracto estándar de CTX. El estudio está aun en proceso de evaluación por el Comité de Métodos para Toxinas Naturales de la AOAC, aunque una primera evaluación de los resultados indica una sensibilidad (definida como porcentaje de muestras positivas verdaderas (conocidas) que el método encuentra como siendo positivas) y una especificidad (definida como porcentaje de muestras negativas verdaderas (conocidas) que el método encuentra como siendo negativas) de 91 por ciento y 87 por ciento respectivamente.

7.2.4 Análisis químicos

detección cromatográfica

Las ciguatoxinas no poseen un cromóforo útil para una detección espectroscópica selectiva pero si tienen un grupo hidroxilo primario relativamente reactivo, a través del cual (luego de una limpieza adecuada) puede unirse un marcador previo a la detección. La cromatografía líquida de alta presión (CL), junto con los detectores de fluorescencia ofrecen un método muy sensible con el potencial de detectar niveles naturales de ciguatoxinas en extractos crudos de carne de pescado. Dickey *et al.* (1992b) y Yasumoto *et al.* (1993) han informado de resultados prometedores marcando la ciguatoxina con nuevos reactivos fluorescentes basados respectivamente en la cumarina o en el 1-antróilnitrilo fluorescente, previo a la separación por CL y a la detección por fluorescencia. Una alternativa a la detección por fluorescencia de la ciguatoxina en los eluatos de la CL, es una CL acoplada a espectroscopia de masa de ión selectivo. Este enfoque ha demostrado un considerable potencial para la detección de toxinas diarreicas marcadas de mariscos (Pleasant *et al.*, 1992b). Los estudios preliminares con CTX-1 indican que esta aproximación podría servir de base para un ensayo analítico confirmatorio para las ciguatoxinas en pescados (Lewis *et al.*, 1994).

resonancia magnética nuclear /espectrometría de masa

Las técnicas de RMN y/o de EM han sido empleadas para caracterizar las ciguatoxinas presentes en las vísceras de pescado (Murata *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991), en la carne (Lewis y Sellin, 1992) y las gambiertoxinas en extractos de *G. toxicus* naturales y de cultivo (Murata *et al.*, 1990; Satake *et al.*, 1993).

Los métodos analíticos actuales usados para caracterizar las ciguatoxinas (NMR y MS) requieren extracciones en gran escala de las ciguatoxinas presentes en bajas concentraciones en pescados altamente tóxicos y no ha sido posible en la mayor parte de los casos la caracterización de las ciguatoxinas presentes a niveles inferiores a 0,1 nmol/kg. Lewis y Jones (1997) describen métodos de gradiente revertido-cromatografía de fase líquida/espectrometría de masa (LC/MS) para identificar las ciguatoxinas acumuladas en pescados. Los análisis se hicieron sobre muestras de 5 µg de anguila morena altamente tóxicas, parcialmente purificadas originarias del Océano Pacífico. Se empleó la P-CTX-1, la toxina más importante en la carne y en las vísceras de los peces carnívoros con ciguatera del Pacífico, como la ciguatoxina de referencia para este estudio. El método parece ser más sensible y selectivo que el bioensayo en ratón, identificando 11 nuevos congéneres del P-CTX en una fracción enriquecida de las vísceras de las anguilas morenas. Aun debe establecerse la potencia y origen de estos congéneres.

espectroscopía de masa

Lewis *et al.* (1999) informan en su trabajo sobre la aplicación de la LC-ESI-MS/MS (ESI= ionización electronebulización, por sus siglas en inglés) con notas muy prácticas sobre la detección y determinación de las ciguatoxinas y el estado del arte de estas técnicas. Pudieron detectarse niveles equivalentes a 40 ng/kg de P-CTX-1 y a 100 ng/kg de C-CTX-1, en carne de pescado. Se analizaron varias muestras tomadas de la vida real.

electroforesis de zona capilar

Se desarrolló un método que aplica la electroforesis de zona capilar (CZE, por sus siglas en inglés) con detección por UV para identificar la maitotoxina (MTX), (ver Capítulo 7.3.1), una toxina asociada con la intoxicación con pescados con ciguatera (Bouaïcha *et al.*, 1997b). Los autores demuestran la aplicabilidad de la CZE para una separación rápida y de alta resolución de la MTX de una solución de un estándar comercial (no puro). Según informan, cantidades tan bajas como 50 pg eran visibles en el electroferograma, por absorción UV a 195 nm. Concluyeron que la CZE es una alternativa prometedora comparada con técnicas existentes como la LC/MS, para determinar MTX en los alimentos, aunque la extracción en fase sólida sería una técnica necesaria para extraer la toxina de los pescados con ciguatera, al estar presente normalmente en cantidades del orden de los ng/kg.

7.3 Organismos fuente, hábitat y distribución

7.3.1 Organismos fuente

El *Gambierdiscus toxicus* es la fuente de dos tipos de toxinas marinas, i.e. las maitotoxinas, solubles en agua (MTXs) y las ciguatoxinas, solubles en grasas. Las MTXs son producidas por todas las cepas de *G. toxicus* examinadas hasta la fecha, produciendo, aparentemente, cada cepa un solo tipo de MTX. Las MTXs se encuentran principalmente en los intestinos de peces herbívoros y no tienen un papel comprobado en la CFP. Por otro lado, las ciguatoxinas las producen solamente algunas cepas de *G. toxicus*, se encuentran en el hígado, músculos, piel y espinas de los peces carnívoros de gran tamaño, y son consideradas como la causa principal de la CFP en los seres humanos (Chinain *et al.*, 1999; Lehane y Lewis, 2000).

A fines de los años 1970 se identificó, el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* próximo a las Islas Gambia. Este dinoflagelado vive en una asociación epifítica con algas marinas rojas, marrones y verdes, apareciendo también en forma libre en los sedimentos y restos de coral (Hallegraeff *et al.*,

1995). Los peces herbívoros se alimentan de corales muertos y de algas, muy desarrollados en los sistemas de arrecifes tropicales y sub-tropicales; estos peces acumulan y concentran las toxinas producidas por el dinoflagelado. Los peces herbívoros son consumidos por peces carnívoros de gran tamaño. Durante el tránsito por la cadena alimentaria tiene lugar una biotransformación oxidativa de las gambiertoxinas menos oxidadas a las ciguatoxinas más oxidadas y tóxicas (Durborow, 1999; Lehane y Lewis, 2000). En el estómago de los peces herbívoros, se ha apreciado la transformación parcial de las gambiertoxinas en ciguatoxinas. Las toxinas, luego de su acumulación en los herbívoros se transfieren a los peces carnívoros. Se ha demostrado que los peces carnívoros tienen ciguatoxinas pero no gambiertoxinas, lo que indica que cualquier gambiertoxina remanente en la presa herbívora es bio-transformada completamente en los peces carnívoros (Burgess y Shaw, 2001). Se demostró que en la zona de Puerto Rico, el dinoflagelado béntico *Ostreopsis lenticularis* era un vector de la CFP (Tosteson *et al.*, 1998). Se mencionaban, en la literatura, otros dinoflagelados, que pueden tener su papel en la producción de toxinas asociadas con la intoxicación por ciguatera, como *Prorocentrum concavum*, *P. mexicanum*, *P. rhathytum*, *Gymnodinium sangieneum* y *Gonyaulax polyedra* (Aseada, 2001).

Las toxinas del Caribe (C-CTXs) y las del Pacífico (P-CTXs) tienen estructuras muy relacionadas, pero distinguibles entre sí por cromatografía, lo que demuestra que las ciguatoxinas del Mar Caribe forman parte de otra familia de ciguatoxinas. La presencia de diferentes familias de toxinas puede ser la causa de las diferencias en los síntomas de las ciguateras de las regiones del Pacífico y del Caribe. Es posible que las ciguatoxinas del Caribe se originen en un pequeño número de toxinas precursoras, similares a la ciguatera del Pacífico donde una gambiertoxina (la GTX-4A) puede dar origen a por lo menos cuatro ciguatoxinas que acumulan los peces. Probablemente diferentes cepas de *G. toxicus* sean capaces de producir diferentes disposiciones de toxina con poliéteres, proponiéndose una cepa caribeña del *G. toxicus* como fuente de la C-CTX-1 y de la -2 (De Fouw *et al.*, 2001).

7.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

La *G. toxicus* es de crecimiento lento y se distribuye alrededor del Trópico entre los 32° N y 32° S. Parece ser más prolífica en aguas poco profundas alejadas de influencias terrestres; la mayor parte de las zonas en las que la ciguatera es endémica, se caracterizan por aguas con salinidad oceánica (De Fouw *et al.*, 2001). La baja salinidad y las intensidades luminosas elevadas afectan negativamente el crecimiento de la *G. toxicus*. Las investigaciones sobre las poblaciones de *G. toxicus* en los Cayos de la Florida demuestran que las profundidades preferidas por la *G. toxicus* se sitúan entre los 1 a 4 m, que crecen mejor con un 11 por ciento del total de luz solar y que su abundancia máxima tiene lugar a temperaturas del agua de unos 30° C (Lehane y Lewis, 2000). La *G. toxicus* habitualmente crece de forma epifítica en las microalgas que colonizan los arrecifes de coral dañados, como la *Turbinaria ornata*, *Amphiroa* spp., *Halimeda opuntia* y *Jania* spp. (De Fouw *et al.*, 2001).

Los estudios ambientales sugirieron que la *G. toxicus* incrementaba su desarrollo en aislamiento (exposición a la luz solar), en presencia de silicatos y óxidos de los suelos linderos y con restos de algas que resultan en el desarrollo de algas de las especies *Turbinaria*, *Jania* y *Amphiroa*. Las densidades poblacionales del *G. toxicus* son desparejas y pueden aumentar o disminuir rápidamente. Estos patrones de crecimiento son presumiblemente responsables de la variabilidad espacial y temporal de los brotes de ciguatera. Sin embargo, se sabe poco de las condiciones ambientales precisas que resultan en un incremento de la producción de gambiertoxinas en la naturaleza (De Fouw *et al.*, 2001). En la zona de Puerto Rico la toxicidad máxima del dinoflagelado béntico *Ostreopsis lenticularis*, fue observada entre octubre y diciembre, precedida por varios meses de exposición (agosto a septiembre) a temperaturas del agua superficial consistentemente elevadas y con una duración promedio de 20 días. La *Spyraenea barracuda* capturada en el área entre octubre y diciembre, presentó una toxicidad máxima a los 24 días siguientes de exposición a temperaturas superficiales del agua elevadas durante los meses precedentes (agosto a octubre). Varios factores pueden ser responsables de la correlación entre una mayor temperatura de las aguas de mar superficiales y la ciguatoxicidad en los pescados. Es de esperar que cambios de dos o tres grados en la

temperatura ambiente produzcan respuestas marcadas en las velocidades de respiración y metabólicas, en la circulación de las hormonas y en la actividad predatoria de una variedad de pescados (Tosteson *et al.*, 1998).

Desde febrero de 1993 a diciembre de 1997, se monitorearon semanalmente las densidades de población del *Gambierdiscus* spp. en la zona de Papara en la Polinesia Francesa para analizar la influencia de la temperatura y de la salinidad. Se registraron un total de 58 floraciones, con un 65 por ciento sólo en 1995 y 1996. Se encontraron estacionalidades de febrero de 1993 a mayo de 1995 en las densidades de las células. En este periodo las poblaciones de *Gambierdiscus* spp. tendían a alcanzar su abundancia máxima al comienzo y al final de la estación caliente. Por el contrario, la salinidad no resultó ser un factor determinante en la abundancia estacional de este dinoflagelado. El notable incremento registrado posteriormente en 1995 y 1996, tanto para las densidades pico como en la frecuencia de las floraciones, fue precedido por temperaturas del agua inusualmente calientes entre enero y abril de 1994, concomitantemente con un grave episodio de blanqueo de corales. Las determinaciones de toxicidad señalaron un máximo de producción de toxina desde octubre de 1994 a diciembre de 1996, no encontrándose correlación entre la toxicidad de las floraciones y su biomasa, ni con la distribución estacional de las temperaturas (Chinain *et al.*, 1999).

Según Lehane (2000), la presencia del *G. toxicus* resulta impredecible y su abundancia no refleja necesariamente su potencial de producción de gambiertoxinas. Algunas investigaciones indican que ciertas bacterias se encuentran en asociación simbiótica con los dinoflagelados y que juegan un papel en la elaboración de toxinas por parte de los dinoflagelados en simbiosis. Se sugirió que las bacterias pueden producir nutrientes que son asimilados por los dinoflagelados y resultan necesarios para producir toxinas. Otra sugerencia fue que las bacterias sintetizan toxinas que son luego fagocitadas por los dinoflagelados (Lehane, 2000).

En las últimas décadas, se han ido acumulando evidencias de que los desarrollos turísticos y militares que perturban los arrecifes incrementan el riesgo de aparición de ciguatera al aumentar el sustrato béntico para el crecimiento de los dinoflagelados (Hallegraeff *et al.*, 1995). Aunque no parece haber variaciones estacionales en las intoxicaciones por ciguatera, según algunos autores, la frecuencia de las capturas de barracudas contaminadas con ciguatera, varía estacionalmente, con valores pico (60 a 70 por ciento de pescados tóxicos) a fines del invierno e inicios de la primavera (enero a mayo) y en otoño (agosto a noviembre). En verano (junio y julio) y en diciembre se observaron frecuencias mínimas (0 a 10 por ciento de pescados tóxicos). Las variaciones estacionales en la toxicidad de las barracudas debidas a las ciguatoxinas pueden ser reflejo de la variabilidad de la toxicidad de sus presas inmediatas, así como de la capacidad de su sistema de detoxificación (al mecanismo de detoxificación lo inhiben las hormonas producidas en el ciclo reproductivo y las temperaturas reducidas) (De Fouw *et al.*, 2001).

7.3.3 Hábitat

La *G. toxicus* está distribuida alrededor de los trópicos entre 32° N y 32° S y consecuentemente la ciguatera está mayormente confinada a regiones discretas de los Océanos Pacífico e Indico occidental y del Mar Caribe (Lewis, 2001).

7.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

7.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas CFP en los organismos acuáticos

Se determinó la incorporación y distribución de las ciguatoxinas en los pescados capturados en la isla de St. Barthelemy (Caribe francés), entre 1980 y 1983. Se analizaron los lípidos extraídos de varias partes de estos pescados mediante bioensayos en ratón. Las especies de peces pertenecían a las familias de las *Muraenidae*, *Serranidae*, *Scombridae*, *Carangidae* y *Sphyraedinae*. La concentración de ciguatoxinas era más elevada en las vísceras, en particular en el hígado, bazo y riñones y más baja

en las espinas. Las relaciones entre la concentración de toxina en el hígado o en las vísceras con la de la carne eran elevadas y variaban con la especie, sugiriendo que la toxina se distribuye de manera diferente en diferentes pescados. El hecho que órganos muy vascularizados como el hígado, bazo y riñón retenían la mayor concentración de ciguatoxina por unidad de peso sugiere que la sangre tiene un papel en la distribución de la ciguatoxina a otros tejidos (De Fouw *et al.*, 2001; Pottier *et al.*, 2001).

La ciguatoxina se concentra cada vez más al desplazarse en la cadena alimentaria y su nivel es de hasta 50 a 100 veces más concentrado en las vísceras, hígado y gónadas de los peces afectados que en otros tejidos. Se desconoce porque los peces son asintomáticos luego de ingerir la toxina y el tiempo por el que pueden permanecer tóxicos los afectados (De Fouw *et al.*, 2001).

Se caracterizaron las toxinas en los tejidos del herbívoro *Ctenochaetus striatus* recogidos en la Gran Barrera de Arrecifes con bioensayos en ratón y cromatografía. Se recogieron los bio detritus (sobre un césped de algas) con las que se alimentan los peces y se compararon las toxinas presentes con las encontradas en el *C. striatus*. Resultó que los niveles de gambiertoxinas que penetran los peces eran típicamente más elevados que los niveles encontrados posteriormente en el hígado. En consecuencia, las gambiertoxinas y los productos biológicamente transformados (ciguatoxinas) no aparecen como acumulándose de manera simple y aditiva, sugiriendo que la depuración de las ciguatoxinas y/o de las gambiertoxinas puede resultar significativa en el *C. striatus* (De Fouw *et al.*, 2001).

7.4.2 Peces con ciguatoxinas

La ciguatera engloba mundialmente muchas especies y familias de peces de arrecife. Se incluyen entre estas el herbívoro *Acanthuridae* y el coralívoro *Scaridae* (pez loro), considerados vectores clave en la transferencia de ciguatoxinas a los peces carnívoros. Muchas más especies de peces carnívoros causan ciguatera, incluyendo las *Muraenidae* (anguila morena) y las *Lutjanidae* (pargos) comunes en el Pacífico, las *Serranidae* (meros) con la trucha de coral de la Gran Barrera de Arrecifes, las *Epinephelidae*, *Lethrinidae*, *Scombridae* (caballa), las *Carrangidae* (jurel) y las *Sphyrnidae* (barracudas). Las dos últimas familias son un problema particular en el Caribe (Crump *et al.*, 1999b; Lewis, 2001). Se ha informado en la literatura de más de 400 especies de peces óseos como causantes de intoxicación con ciguatera. Los carnívoros de mayor tamaño son los más tóxicos, como las anguilas morenas, los pargos, meros, carite atlánticos, emperadores, algunos atunes costeros y las barracudas (IPCS, 1984).

A lo largo de la costa suroeste de Puerto Rico, las barracudas capturadas participan en las intoxicaciones con ciguatera. Se estudió la toxicidad de componentes de la cabeza, vísceras y tejidos de carne de 219 barracudas (528 muestras de tejidos) en el periodo de marzo de 1985 a mayo de 1987. Veintinueve por ciento de estos pescados dieron preparaciones tóxicas en por lo menos uno de los componentes de los tejidos (De Fouw *et al.*, 2001).

En los Estados Unidos continentales, el mero, pargo colorado, el jurel y la barracuda son las especies de peces más comúnmente asociadas con la intoxicación con ciguatera (De Fouw *et al.*, 2001). En la Florida, en la mayoría de los casos, la gran barracuda ha estado involucrada en intoxicaciones con ciguatera entre 1954 y 1992. Además de la barracuda, otras especies sobre las que comúnmente hay informes son el pargo, jurel, *Lachnolaimus maximus* y mero (De Fouw *et al.*, 2001).

En Hawaii, las especies más comúnmente asociadas con la toxina de la ciguatera son el jurel, el pargo negro y el navajón (De Fouw *et al.*, 2001). En el archipiélago de las Mascareñas han sido identificadas, 34 especies de peces involucradas en intoxicaciones con ciguatera. Los predadores de gran tamaño como el mero (*Serranidae* 53 por ciento, *Carangidae* 10 por ciento, *Lethrinidae* 15 por ciento) son los más vinculados con las CFP. La mayor parte de los pescados fueron capturados sobre bancos de coral situados al norte de Mauricio (De Fouw *et al.*, 2001).

El Cuadro 7.1 incluye una lista incompleta de las especies de peces asociadas con ciguatera. Un listado completo resultaría casi imposible pues en algunas zonas cientos de especies de peces pueden estar involucradas en CFP.

Las CTX-1, CTX-2 y la CTX-3 son las ciguatoxinas más importantes (determinadas por CL/EM y bioensayos en ratones) presentes en la carne de los pescados con ciguatera (*Scomberomorus commersoni*, *Plectropomus* spp. y *Pomadasys maculatus*) capturados en las costas australianas. Se identificaron también dos toxinas menores, que pueden ser análogos más oxidados de la CTX-1 y de la CTX-2 (De Fouw *et al.*, 2001).

Cuadro 7.1 Ejemplos de peces asociados con la ciguatera

Especies	Distribución
<i>Acanthurus linearis</i>	Indico-Pacífico
<i>Albula vulpes</i>	Globalmente en mares cálidos
<i>Balistes carolinensis</i>	Atlántico, Golfo de México
<i>Calamus calamus</i>	Atlántico occidental
<i>Caranx latus</i>	Atlántico
<i>Carcharinus longimanus</i>	Globalmente
<i>Cheilinus undulatus</i>	Indico-Pacífico
<i>Chlorurus gibbus</i>	Indico-Pacífico
<i>Epinephelus morio</i>	Atlántico occidental
<i>Gymnothorax javanicus</i>	Indico-Pacífico
<i>Lachnolaimus maximus</i>	Atlántico occidental
<i>Lutjanus campechanus</i> - <i>Megalops atlanticus</i>	Atlántico occidental, Golfo de México
<i>Mugil capurri</i>	Atlántico oriental
<i>Ocyurus chrysurus</i>	Atlántico centro oriental
<i>Plectropomus maculatus</i>	Atlántico occidental
<i>Sparus coeruleus</i>	Pacífico occidental
<i>Scomberomorus maculatus</i>	Atlántico occidental
<i>Seriola fasciata</i>	Atlántico occidental
<i>Sphyaena barracuda</i>	Atlántico occidental
<i>Symphorus nematophorus</i>	Indico-Pacífico, Atlántico occidental
<i>Xiphias gladius</i>	Pacífico occidental
	Atlántico, Indico-Pacífico, Mediterráneo

Fuente: Farstad y Chow, 2001

7.4.3 Otros organismos acuáticos con ciguatoxinas

Aunque la gran mayoría de las intoxicaciones causadas por peces con ciguatera se observan luego de la ingesta de peces carnívoros, se sospecha que otras especies marinas tienen responsabilidad en la intoxicación de los seres humanos. En particular, se encontró la ciguatoxina en las vísceras de un caracol marino, *Turbo argyrostoma*. Este caracol ha causado intoxicaciones del tipo de la ciguatera en seres humanos (IPCS, 1984).

Los invertebrados (camarones y cangrejos pequeños) pueden ser también vectores en la transferencia de las gambiertoxinas a los peces carnívoros. Esta sugerencia está basada en un estudio con el *Pomadasys maculatus*, frecuentemente contaminado con ciguatera que se alimenta predominantemente con camarones y cangrejos pequeños en Platypus Bay, Queensland. Sólo los camarones tenían niveles detectables de toxinas del tipo de las ciguatoxinas (detectadas con

bioensayos en ratón). No se ha aun determinado si los camarones son capaces de bio-transformar las gambiertoxinas en ciguatoxinas o si sólo los peces son capaces de hacerlo (De Fouw *et al.*, 2001).

Los camarones *Alpheidae* parecen ser un vector importante en Platypus Bay, Fraser Island, Queensland (Australia), para la transferencia de las ciguatoxinas a los pequeños carnívoros *Pomadasy maculatus*. El *P. maculatus* probablemente pasa estas toxinas a la caballa (*Scomberomorus commersoni*) de gran tamaño, frecuente en esta zona. Considerando la diversidad de presas disponibles para las familias de carnívoros, parece probable que en el futuro se identificarán más vectores herbívoros de las ciguatoxinas (Lewis, 2001)

7.5 Toxicidad de las toxinas CFP

7.5.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las ciguatoxinas está vinculado con su efecto directo sobre las membranas excitables. Estas membranas resultan críticas para la función de los nervios y músculos, principalmente por su habilidad de generar y propagar potenciales de acción. Las ciguatoxinas se caracterizan por su afinidad para unirse a los canales de sodio sensibles a los voltajes, que los abren a potenciales de membrana normales para células en reposo. Esto resulta en un ingreso de iones Na^+ , en una despolarización de la célula y en la aparición de potenciales de acción espontáneos en las células excitables. Una consecuencia de la permeabilidad incrementada al Na^+ , es que la membrana de plasma no es capaz de mantener el ambiente interno de las células y el control del volumen. Esto resulta en una alteración de los mecanismos bioenergéticos, en un hinchamiento de las células y mitocondrios y en la formación de ampollas sobre las superficies celulares. La ciguatoxina actúa sobre el mismo sitio receptor (sitio 5) del canal de Na^+ , como la brevetoxina, pero la afinidad de la CTX-1 por los canales de Na^+ dependientes del voltaje, era unas 30 veces superior que la de la brevetoxina, mientras que la CTX-4B tenía casi la misma afinidad que la brevetoxina. Se demostró que la CTX-1 y la CTX-4B inhibían competitivamente el enlace de la brevetoxina al canal de Na^+ dependiente del voltaje de las membranas de ratas. La ciguatoxina ejercía una disminución significativa de la velocidad de conducción del nervio y una prolongación de los periodos refractarios absolutos y super normales indicando una apertura anormalmente prolongada del canal de Na^+ en las membranas de los nervios (Lehane y Lewis, 2000 y De Fouw *et al.*, 2001).

Se pensó que los efectos cardiovasculares de las ciguatoxinas resultaban de un efecto inotrópico positivo sobre el miocardio. Cuando la ciguatoxina afecta canales dependientes del voltaje, causando que el Na^+ se mueva intracelularmente, los mecanismos celulares normales comienzan a extrudar sodio y a tomar calcio. El calcio es el gatillo intracelular para la contracción de los músculos. Aunque buena parte del calcio adicional está tamponado por el retículo sarcoplasmático es posible que las concentraciones de calcio localmente incrementadas, aumenten la fuerza de contracción del músculo cardiaco tal como se observa en la intoxicación con ciguatoxina.

Un mecanismo similar de transporte intracelular de calcio, inducido por la ciguatoxina tiene lugar en las células epiteliales del intestino. La concentración de calcio intracelular incrementada causada por la ciguatoxina actúa como un segundo mensajero en la célula, al distorsionar sistemas importantes de intercambio iónico. Esto resulta en secreción de fluidos, que se manifiesta como diarrea (Lehane y Lewis, 2000).

7.5.2 Otras toxinas que actúan en la intoxicación con ciguatera

La *G. toxicus* también produce las maitotoxinas que resultan, por vía intraperitoneal, más tóxicas que la ciguatoxina. Sin embargo, las maitotoxinas son aproximadamente 100 veces menos potentes por vía oral comparada con la intraperitoneal, en tanto que las ciguatoxinas tienen igual potencia (De Fouw *et al.*, 2001).

Mientras que las ciguatoxinas actúan en los canales Na^+ en nervios y músculos, la maitotoxina estimula el movimiento de los iones Ca^{2+} a través de las biomembranas, siendo un activador potente de cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en las células de una amplia variedad de organismos. Como consecuencia de un aporte de Ca^{2+} , las maitotoxinas pueden producir varios efectos: secreción de hormonas y de neurotransmisores; rotura de los fosfoinosítidos y activación de los canales Ca^{2+} , debido a despolarización de las membranas. No se ha identificado ningún bloqueador específico para este canal inducido por la maitotoxina. Sin embargo permanece aun indefinido el objetivo primario de las MTXs. Se ha insistido que estas toxinas no tienen actividad ionofórica. Entre los productos naturales, las maitotoxinas poseen el mayor peso molecular (3422 Da) comparadas con cualquier otro conocido, aparte de biopolímeros como proteínas o polisacáridos. Los estudios de mecánica molecular sugirieron que más que una acumulación plana de anillos unidos, la molécula podría representar un “alambre” molecular (Escobar *et al.*, 1998). Las maitotoxinas se acumulan también en las vísceras de los peces herbívoros, pero obviamente no lo hacen en dosis lo suficientemente elevadas en los peces carnívoros como para causar problemas a los seres humanos al consumirlos. Si las maitotoxinas estuvieran involucradas en CFP, serían de esperar diferencias cualitativas en la sintomatología, teniendo en cuenta que la farmacología de las maitotoxinas es muy diferente de la de las ciguatoxinas (Lewis, 2001).

Se ha informado que diversas especies de pez loro contienen una toxina menos polar que la CTX-1, llamada escaritoxina. A juzgar por sus propiedades cromatográficas, la escaritoxina parece corresponder a una mezcla de CTX-4A y CTX-4B. La intoxicación con escaritoxina no está bien descrita. El nombre surge del pez venenoso *Scarus gibus*. Las intoxicaciones tienen dos fases de síntomas, el primer conjunto recuerda una típica intoxicación con ciguatera, el otro, que se desarrolla entre cinco y diez días se caracteriza por fallas de equilibrio y una marcada ataxia locomotora (De Fouw *et al.*, 2001).

7.5.3 Farmacocinética

Las ciguatoxinas son solubles en grasas con una absorción rápida y sustancial por los intestinos, aunque pueden presentarse vómitos y diarreas prematuras al expelerse algunas dioxinas antes que puedan absorberse. Parece que las ciguatoxinas pueden penetrar la piel y las membranas mucosas pues la limpieza de los pescados con ciguatera puede ocasionar cosquilleos en las manos y su ingesta causar alteraciones sensoriales en la cavidad bucal y disfgia. Estas propiedades las tienen también las brevetoxinas vinculadas con ellas. Las ciguatoxinas son arrastradas en la sangre unidas a la albúmina del suero humano y se ha informado de niveles moderados (no especificados) de ciguatoxina en el suero de un paciente 22 semanas después de consumir pescado con ciguatoxinas. Las ciguatoxinas se transmiten también por la leche materna, pudiendo atravesar la placenta y afectar al feto (Lehane and Lewis, 2000).

Se ha descrito la transmisión sexual de la ciguatera de la mujer al hombre (dolor de pene luego del acto sexual) y viceversa (dolores pélvicos y abdominales luego del acto sexual) (De Fouw *et al.*, 2001).

La disuria, o micción con dolores, sugiere que las ciguatoxinas son excretadas al menos parcialmente y posiblemente sin modificaciones por la orina. Sin embargo, esta excreción puede ser ni rápida ni completa en razón de los niveles de suero 22 semanas después de la intoxicación. Como las ciguatoxinas se acumulan en el organismo, pueden de tanto en tanto, reactivar síntomas clínicos. Las ciguatoxinas almacenadas en los tejidos adiposos no son probablemente un problema a menos que se rompa rápidamente el tejido como sucede, por ejemplo, cuando al perder peso en corto tiempo (Lehane y Lewis, 2000). Se supone que las ciguatoxinas y las brevetoxinas tienen comportamientos farmacocinéticos similares en razón de su semejanza estructural. Esto implica, tal como se demostró para las brevetoxinas, que la ruta principal es la biliar/fecal para la eliminación de las ciguatoxinas (Lehane y Lewis, 2000).

7.5.4 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

Se realizó un estudio en ratones macho para determinar el origen de las secreciones acuosas y del tipo de diarrea observado en las intoxicaciones con ciguatera. Se extrajo ciguatoxina semi-pura (85.7 por ciento) de las vísceras de la anguila morena. Las cantidades de CTX se expresan en UR (unidades ratón). La UR, se define como la cantidad de CTX necesaria para matar un ratón de 15 g en 24 horas, que corresponde a 7 ng de CTX pura. Esta definición difiere de la que sigue y de aquella del Cuadro 7.2. Se comparó con las diarreas causadas por la toxina del cólera para estimar la potencia de la CTX responsable de diarreas. La CTX fue administrada por un tubo gástrico y por vía intraperitoneal en dosis diferentes. Se observaron al microscopio la diarrea y las influencias morfológicas causadas por la CTX en los tractos digestivos. Los resultados del estudio revelaron que:

- La diarrea tenía lugar por tratamiento intraperitoneal pero no por tratamiento *per os*. Es probable que la CTX administrada oralmente fuera absorbida y metabolizada de una manera ligeramente diferente que la incorporada intraperitonealmente, y que en consecuencia, no ocasionó diarrea.
- El rango de dosis efectivo para causar diarreas era de 0,14 a 1 UR.
- La diarrea fue probablemente resultado de una hipersecreción de mucus en el colon y de una excreción acelerada en el recto, de manera que sólo resultó afectada la porción inferior del intestino.
- La diarrea se detuvo dentro de la hora, pero la secreción de mucus fue estimulada aun pasadas 24 horas, acompañada por un aumento anormal de la cantidad de células del cáliz.
- El tipo de diarrea fue similar al observado en la coleratoxicosis. Se sugirió que la potencia de la CTX de causar diarreas era de unas 1 300 a 8 500 veces superior que la de la toxina del cólera (De Fouw *et al.*, 2001).

En los ratones, los síntomas están bien definidos y la hipotermia es una respuesta característica. Se desconoce, sin embargo, si la ciguatoxina tiene efectos directos sobre el sistema nervioso central y cuales pueden ser sus blancos cerebrales. Se investigó en ratones ICR hembra la acción de la ciguatoxina administrada intraperitonealmente (0,5 UR) (1 UR = LD₅₀ dosis para un ratón de 20 g) aislada de la cepa caribeña *G. toxicus* MQ2, para identificar blancos discretos de la ciguatoxina sobre el sistema nervioso central. Se utilizó *c-fos* como marcador de neuroexcitabilidad. Se investigó el efecto de la CTX sobre el *c-fos* mRNA para establecer un curso de acción en el cerebro y su efecto sobre el producto de traslación *c-fos* para identificar caminos neuronales específicos activados por esta toxina. Se notó una pronunciada disminución de la temperatura corporal luego de 10 a 20 minutos de administrada. La ciguatoxina provoca una inducción rápida del *c-fos* mRNA en el cerebro que se corresponde con la baja de la temperatura del cuerpo. Los blancos primarios de la CTX parecerían ser el hipotálamo y el pedúnculo cerebral. Los resultados indican que la CTX tiene acciones neuroexcitativas sobre regiones del pedúnculo cerebral que reciben aferentes vagales y caminos ascendentes asociados a respuestas viscerales y termoregulatorias (De Fouw *et al.*, 2001).

Cuadro 7.2 ⁽¹⁾ Efectos de las ciguatoxinas (CTXs), gambiertoxinas (GTXs) y maitotoxinas (MTXs) administradas intraperitonealmente (i.p.) en ratones de (18-) 20 g

Toxina	ip. LD ₅₀ (µg/kg pc)	UR ⁽²⁾ (ng)	Signos de intoxicación	Min. / max. Tiempo para la muerte ⁽³⁾
P-CTX-1	0,25	5	hipotermia por debajo de 33°C, piloerección, diarea, lacrimación, hipersalivación, dispnea, comportamiento oscilante en posición levantada, jadeo, convulsiones terminales con arqueo de la cola, muerte por falla respiratoria	37 min./≈ 24 h
CTX-1B	0,33			tiempo medio de supervivencia 10-20h ⁶
P-CTX-2	2,3	9	como para la P-CTX-1, más parálisis progresiva de los miembros posteriores	53 min./ ≈100 h
CTX-2A2	1,9			tiempo medio de supervivencia 10-20 h ⁶
CTX-2A1	3,5			tiempo medio de supervivencia 3,5-4,5 h ⁶
P-CTX-3	0,9	18	como para la P-CTX-1, más parálisis progresiva de los miembros posteriores	60 min./ ≈ 26 h
CTX-3C	2,5			tiempo medio de supervivencia 10-20 h ⁶
GTX-3C	1,3	26		
CTX-4B	10			tiempo medio de supervivencia 3,5-4,5 h ⁶
GTX-4B	4,0	80	como para la P-CTX-1, más parálisis progresiva de los miembros posteriores	
MTX-1 ⁽⁴⁾	0,05	1	hipotermia, piloerección, dispnea, parálisis progresiva de los miembros traseros extendiéndose a los delanteros, jadeo moderado, convulsiones moderadas que preceden a la muerte > 30 segundos	72 min./≈ 72 h
MTX-2 ⁽⁴⁾	0,08	1,6	como para la MTX-1	41 min./≈72 h
MTX-3 ⁽⁴⁾	≈ 0,1	≈ 2	como para la MTX-1	72 min./≈ 72 h
C-CTX-1 ⁽⁵⁾	3,6			
C-CTX-2 ⁽⁷⁾	1			

⁽¹⁾ Hallegraeff *et al.* (1995).

⁽²⁾ La unidad ratón es 1/50 x LD₅₀ (~1 UR es la dosis LD₅₀ para un ratón de 20 g) (Lewis y Sellin, 1992)

⁽³⁾ Tiempo mínimo estimado para la muerte; tiempo máximo estimado para la muerte resultante de efectos de dosis próximas a la dosis LD₅₀ (De Fouw *et al.*, 2001).

⁽⁴⁾ De *Gambierdiscus toxicus* pero es improbable que acumule en la carne de los pescados a niveles tóxicos para los seres humanos por la ruta oral. Las MTXs pueden inducir ligeras secreciones acuosas anales, pero no causan diarrea.

⁽⁵⁾ Fouw *et al.* (2001).

⁽⁶⁾ Dechraoui *et al.* (1999).

⁽⁷⁾ Lehane y Lewis (2000).

Del Cuadro 7.2, resulta que luego de una inyección i.p., las maitotoxinas son más letales que las ciguatoxinas en ratones Sin embargo, las maitotoxinas son unas 100 veces menos tóxicas por vía oral que por vía i.p. (Lehane y Lewis, 2000).

Se administró ciguatoxina o ciguatoxina-4c a ratones ICR macho (con dosis de 0,7 µg/kg de peso corporal) por vía oral o por ruta intraperitoneal. La ciguatoxina-4c no fue especificada. Se examinaron cambios histopatológicos y ultra estructurales de varios órganos y los efectos modificadores de varios antagonistas sobre la permeabilidad de membrana de sodio. Parecía que los órganos blanco eran el corazón, la médula de las glándulas adrenales, los nervios autónomos y el pene. No había diferencias en las señales clínicas o en los cambios histopatológicos en los ratones receptores de ciguatoxina o de ciguatoxina-4c. Resultaban característicos los cambios ultra estructurales en el corazón siguientes a la administración. Eran prominentes edemas nítidos entre miofrillas y otros organelos. Resulta interesante que no tenían efecto sobre lesiones cardíacas los antagonistas a los autonervios colinérgicos y adrenérgicos empleados en esta experiencia. Por lo tanto, el efecto de la ciguatoxina sobre el músculo cardíaco puede basarse en su actividad directa sobre éstos. A pesar de la diarrea severa, no había cambios morfológicos en la capa mucosa del intestino delgado, aunque el sistema de nervios autónomo en las capas musculares del intestino delgado era sensible a las toxinas. El tratamiento previo con atropina evitaba la diarrea causada por las toxinas y se sugirió, en consecuencia, que ésta era inducida probablemente por un accionar directo de estas toxinas sobre el sistema autónomo del intestino delgado. No se observaron cambios en la capa cortical de las glándulas adrenales pero si era notoria una degeneración de la médula de éstas glándulas. Aun después de muertos podían observarse los penes erectos de los ratones tratados. Se desconoce el mecanismo preciso, pero pueden jugar un papel las terminaciones autónomas de los cuerpos cavernosos y la formación de trombosis en los mismos por efecto directo o indirecto de las toxinas. (De Fouw *et al.*, 2001).

Se examinó la respuesta morfológica del corazón del ratón luego de una exposición a dosis bajas (0,1 µg/kg de peso corporal) y repetidas (15 días) a la ciguatoxina o a la ciguatoxina-4c administradas oral e intraperitonealmente. Se investigaron además, para ambas rutas de exposición y para las dos toxinas, los cambios secuenciales de las lesiones cardíacas luego de hasta 14 meses de con dosis bajas repetidas o luego de una única dosis elevada (0,7 µg/kg peso corporal). Una única dosis de 0,1 µg/kg peso corporal resultó en cambios morfológicos no discernibles en los corazones de los ratones, frente a los cambios morfológicos severos resultantes de de una administración repetida, como la marcada hinchazón de las células de miocardio y endoteliales que recubren los vasos capilares. Los efectos observados luego de una exposición repetida resultan similares a los que se observan luego de administrada una única dosis elevada. La marcada hinchazón de las células de recubrimiento del endotelio probablemente cause alteraciones serias de la permeabilidad, que pueden resultar en migraciones de plasma de las células endoteliales degeneradas al espacio intersticial. Los miocitos y los capilares parecían normales dentro del mes siguiente a la administración. La efusión en los espacios intersticiales resultó en paquetes densos de colágeno, persistentes durante 14 meses. Los resultados indican que la ciguatoxina y la ciguatoxina-4c tienen un efecto acumulativo sobre el tejido cardíaco. Esto quiere decir que si hay exposiciones repetidas a dosis bajas de pescados con ciguatera, aun la ingesta de pescados ligeramente contaminados con ciguatoxina puede tener su papel en el desarrollo de enfermedades cardíacas (De Fouw *et al.*, 2001).

Administración repetida

No hay información

reproducción/teratogenicidad

No hay información

mutagenicidad

No hay información

estudios in vitro

Se experimentó sobre nodos de Ranvier de fibras de nervios de mielina aislados del nervio ciático de sapos adultos. Se extrajo y se purificó muy bien la CTX-1b, la principal toxina involucrada en las intoxicaciones con ciguatera en pescados, de las vísceras y del hígado de la anguila morena. Los autores no explicaron porque definieron la toxina como CTX-1b. La CTX-1b provocó hinchazón en los nodos de Ranvier. La hinchazón fue evitada mediante la tetradotoxina, bloqueador del canal de Na^+ , lo que indica que se originó por la entrada de Na^+ a través de canales de Na^+ dependientes del voltaje. El D-mannitol causó la contracción de los nodos de Ranvier previamente hinchados por la CTX-1b. La CTX-1b indujo potenciales de acción espontáneos y causó una activación persistente de una fracción de corriente de Na^+ , el D-manitol suprimió estos potenciales de acción espontáneos. (De Fouw *et al.*, 2001).

Los resultados de un estudio con ciguatoxina en las atria de cobayos y en los músculos papilares sugirieron que los efectos tóxicos de la ciguatoxina surgen de su acción directa sobre la apertura de los canales de Na^+ del miocardio. Las extrasístoles se desarrollaron en los atria y en los músculos papilares luego de 45 minutos de agregada la ciguatoxina (> 0.15 UR/ml) y parecían resultar sobre todo por su efecto sobre los canales neurales de Na^+ causando una mayor liberación de noradrenalina de los nervios asociados con el miocardio. Los músculos papilares eran menos sensibles a los efectos tóxicos de la ciguatoxina que los del atrium. Esto correspondía a una diferencia de 10 veces en su sensibilidad a dosis inotrópicas positivas de ciguatoxina (De Fouw *et al.*, 2001).

7.5.5 Toxicidad en seres humanos

síntomas clínicos

En intoxicaciones severas La aparición de los primeros síntomas puede ocurrir en menos de 30 minutos de consumidos los pescados contaminados con ciguatoxina, demorando, para casos más benignos hasta 24, y ocasionalmente 48 horas. Los primeros síntomas pueden ser de naturaleza gastrointestinal o neurológica (por ej. cosquilleo circumoral). Los síntomas gastrointestinales duran habitualmente solo unos pocos días, mientras que algunos síntomas neurológicos pueden desarrollarse en varios días. Los síntomas de la ciguatera persisten habitualmente de varias semanas a varios meses. En un pequeño porcentaje de casos (menos del 5 por ciento), algunos síntomas pueden persistir por varios años.

Se han informado combinaciones de unas pocas a más de 30 perturbaciones gastrointestinales, y/o neurológicas generalizadas. Los síntomas gastrointestinales con vómitos, diarrea, náusea y dolores abdominales ($> \sim 50\%$ de los casos) tienen habitualmente lugar en las primeras etapas de la enfermedad y a menudo, aunque no siempre, acompañan a las perturbaciones neurológicas. Estas invariablemente resultan en hormigueo en labios, manos y pies, trastornos inusuales de la percepción de la temperatura, los objetos fríos dan sensación de hielo seco y una picazón severa localizada de la piel ($> \sim 70$ por ciento de los casos). Estos síntomas, junto con una profunda sensación de fatiga (90 por ciento de los casos), pueden darse durante la enfermedad. Se presentan en diverso grado dolores musculares (> 80 por ciento), articulares (> 70 por ciento) y de dientes (> 30 por ciento), en tanto que ocurren con menor frecuencia desórdenes del comportamiento, como depresión y ansiedad (50 por ciento). Los casos severos pueden incluir hipotensión con bradicardia, dificultades respiratorias y parálisis, aunque la muerte sea poco común (menos del 1 por ciento según Lehane, 2000). La baja tasa de mortalidad (2 por ciento) resulta de que raramente se acumulan en una sola comida niveles suficientes de ciguatoxina como para resultar letales, quizás porque los propios peces sucumben a los efectos letales de niveles superiores de ciguatoxinas (Lewis, 2001).

Lehane y Lewis (2000) notaron que la mayoría de los casos de CFP en el Pacífico comportaban el consumo de pescados con un contenido de 0,1-5 nmol P-CTX-1/kg, equivalente a unos 0,1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de carne de pescado.

persistencia y recurrencia de los síntomas

Las perturbaciones neurológicas comúnmente se resuelven en semanas, aunque algunos síntomas pueden persistir durante meses o aun años. El prurito, la artralgia y la fatiga pueden persistir también por meses o años. El análisis de las ciguatoxinas en muestras de sangre sugiere que puede almacenarse en el tejido adiposo y que pueden reaparecer los síntomas en periodos de estrés, de ejercicios, de pérdida de peso o de consumo de alcohol excesivo. Luego del primer ataque, a sensibilidad al alcohol puede también persistir por años (Lehane, 2000).

factores que influyen en los síntomas clínicos

sensibilización

El fenómeno de la sensibilización ha sido observado en personas que, previamente intoxicadas con ciguatoxina pueden experimentar, después de ingerir pescado una recurrencia de los síntomas de la ciguatera, que, en otras personas, no causa ninguna sintomatología. Tal sensibilización puede darse pasados muchos meses o incluso años de la intoxicación con CFP (De Fouw *et al.*, 2001).

Se notó también que las personas que habían sufrido CFP, a menudo tienen síntomas luego de ingerir cualquier fruto del mar, nueces, aceites de nuez así como bebidas alcohólicas. Por lo tanto a los pacientes que sufren de CFP se les recomienda evitar estos productos. Consumir durante años pescados con bajos niveles de toxinas sin experimentar síntomas puede resultar eventualmente en una sensibilización a la toxina, por acumulación de la ciguatoxina en el huésped o por una posible inducción de una reacción inmunológica (De Fouw *et al.*, 2001).

especies de pescados involucradas

Se aprecian grandes variaciones en la frecuencia y gravedad de los síntomas luego de una intoxicación con ciguatera. Se examinaron, buscando patrones de sintomatología relacionados con los tipos de pescado consumidos, informes de casos de ciguatera del Departamento de Salud del Estado de Hawaii. Aunque no pueda descartarse como responsable de las grandes variaciones la variabilidad y el carácter individual de la respuesta de los seres humanos a algunas toxinas en particular, la información presentada sugeriría que hay también diferencias en los síntomas específicos para los peces y toxinas. Puede postularse que los carnívoros se alimentan de diferentes herbívoros o que metabolizan las toxinas de la misma presa a formas más o menos activas (De Fouw *et al.*, 2001).

Variaciones étnicas

Aunque la variabilidad en la sintomatología es posiblemente el resultado de informes poco consistentes, se ha también especulado con su vinculación a diferencias en las toxinas en el mismo pez contaminado. Algunos autores informaron que los síntomas correlacionaban con grupos étnicos. Parecería que los melanesios mostraban más frecuentemente prurito, ataxia, dolor abdominal y debilidad; que los europeos experimentaban rigidez de la nuca, lacrimación, artralgia e inversión de la sensación térmica y que los asiáticos sufrían más diarreas y dolores abdominales (De Fouw *et al.*, 2001).

variación geográfica

En el Océano Pacífico, predominan los síntomas neurológicos, mientras que en el Caribe los síntomas gastrointestinales son un aspecto dominante de la enfermedad. Esta diversidad en los síntomas es una clara evidencia de que diferentes ciguatoxinas pueden estar detrás de la ciguatera de las aguas del Pacífico y del Caribe. Una tercera clase de ciguatoxinas probablemente subyace al diferente patrón de comportamiento de los síntomas observados en el Océano Indico, donde los peces con ciguatera provocan un conjunto de síntomas que recuerdan las intoxicaciones alucinógenas, con falta de coordinación, pérdida del equilibrio, alucinaciones, depresión mental y pesadillas, agregadas a los típicos síntomas de la ciguatera. Los peces con ciguatera del Océano Indico están más frecuentemente también contaminados con niveles letales de toxina (Lewis, 2001).

Los porcentajes para los síntomas en diferentes regiones son:

- Síntomas neurológicos: parestesia en un 36 por ciento de los casos en las Islas Vírgenes de los EEUU, 70 a 76 por ciento en Australia y Miami y en el 87 al 89 por ciento de los casos en la Polinesia Francesa, Fiji y la zona del Caribe (De Fouw *et al.*, 2001).
- Síntomas gastrointestinales: la diarrea parece ser común en 32 por ciento de los casos en Fiji y 86 por ciento en otras regiones (De Fouw *et al.*, 2001).
- Manifestaciones cardíacas: Se informó de bradicardia e hipotensión en la Polinesia Francesa (16 por ciento) y en Fiji (9 por ciento) (De Fouw *et al.*, 2001).

La toxina responsable por la ciguatera en la región de Gove en Australia Septentrional es la misma que la principal toxina responsable de las intoxicaciones de peces carnívoros en el Océano Pacífico, pero difiere de las toxinas del Océano Índico y en el Mar Caribe (De Fouw *et al.*, 2001).

transmisión sexual de la intoxicación

Cuatro hombres enfermaron luego de ingerir trucha de coral y especies de jurel recién capturadas previo al desarrollo de síntomas característicos de la intoxicación con ciguatera. Además de estos síntomas, dos de ellos se quejaron de dolores intensos en el pene en tanto la compañera del paciente, que no había ingerido pescado alguno sufrió disestesia circumoral, prurito, artralgia, náusea y letargo dentro de las 24 horas de mantener ambas relaciones sexuales sin protección (De Fouw *et al.*, 2001).

efectos durante el embarazo

La ciguatóxina se transfiere por la placenta de la madre al feto. No afecta el desarrollo del feto aunque se le han atribuido movimientos fetales acelerados. Puede también pasar de la madre al bebé a través de la leche materna. Las madres que alimentan a sus bebés han informado de dolores excesivos en sus pezones. Los bebés tenían diarrea. Las mujeres que tenían síntomas crónicos de ciguatera informaron ocasionalmente de un empeoramiento de los síntomas durante la menstruación (Beadle, 1997).

A una familia de cuatro personas en Queensland (Australia), dos niños, padre y madre con un embarazo de 11 meses se le diagnosticó intoxicación con ciguatera después de ingerir una trucha de coral. La intoxicación fue confirmada clínicamente y por bioensayo en ratón. La concentración en la trucha consumida, con 1,3 ng/g, era relativamente elevada. El padre y la madre, que mostraban una intoxicación más severa, fueron tratados con manitol al 20 por ciento intravenoso (250 ml en 30 minutos). La madre se recuperó rápidamente, en tanto que en el padre tuvo efectos beneficiosos una segunda aplicación de manitol a la semana de la intoxicación. Veintiocho semanas después, la madre dio a luz un niño de 3,4 kg. El recién nacido tuvo problemas respiratorios al nacer y fue tratada su hipertensión pulmonar persistente, no atribuida a la exposición a la ciguatóxina *in utero*. Pasados dos meses no había síntomas residuales (De Fouw *et al.*, 2001).

Una mujer embarazada en San Francisco (EEUU) mostró los síntomas característicos de la intoxicación con ciguatera cuatro horas después de consumir una porción considerable de barracuda. Muchos de los síntomas persistieron por varias semanas. La mujer, en su segundo trimestre, experimentó un incremento de los movimientos del feto una hora después de la comida contaminada, los que se prolongaron por unas pocas horas. Se confirmó la presencia de ciguatóxina con dos bioensayos (ensayo de estimulación del atrium del cobayo y un bioensayo en ratón) y con ensayo inmunoenzimático con palito. El recién nacido era normal y en los 10 primeros meses no aparecieron anomalías de tipo alguno (De Fouw *et al.*, 2001).

Dos días antes de la fecha de nacimiento prevista, una mujer ingirió trucha de coral con ciguatera. Dentro de las cuatro horas experimentó los síntomas gastrointestinales y neurológicos característicos de la CFP: movimientos fetales tumultuosos y unos peculiares “temblores” fetales intermitentes, que comenzaron simultáneamente con sus propios síntomas sistémicos. Los extraños movimientos fetales continuaron vigorosamente por 18 horas, disminuyendo gradualmente durante las 24 horas siguientes. Un niño de 3,8 kg nació por cesárea dos días después. Sufría de parálisis facial izquierda

(posiblemente miotonía de los pequeños músculos de las manos) y síndrome de fatiga respiratoria, recuperándose en seis semanas (Lehane y Lewis, 2000).

tratamiento

No se conoce ninguna terapia de antídoto. Si el paciente presenta síntomas de intoxicación por ciguatera poco después de ingerir pescado, puede resultar útil un lavado gástrico seguido de un tratamiento con carbono activado. El mayor éxito en el tratamiento de la ciguatera fue con manitol. No parece influir sobre los síntomas cardiovasculares o gastrointestinales, pero reduce la gravedad y duración de los síntomas neurológicos. Idealmente, para ser efectivo, el manitol debiera administrarse en la fase aguda. La investigación clínica demuestra que no es efectivo si se administra pasadas 48 horas de la aparición de los síntomas (De Fouw *et al.*, 2001).

Se ha informado solo de una prueba controlada con manitol en la que los pacientes desconocían el tratamiento recibido. Se demostró que 250 ml de manitol intravenoso al 20 por ciento administrado en 1 hora era ligeramente más eficaz que una combinación de vitaminas y calcio intravenosos administrada también en 1 hora. Los síntomas mejoran por tratamiento con una solución intravenosa de manitol al 20 por ciento en agua en dosis de 1 g/kg pc a una velocidad inicial de 500 ml/hora (De Fouw *et al.*, 2001).

No se comprende totalmente el mecanismo del tratamiento con manitol. Una teoría sostiene que el manitol compite realmente con los canales de sodio. Otra es que la eficacia del manitol radica en su capacidad de acción como agente osmótico a nivel celular de reducción del exceso de fluido en el citoplasma de las células de los nervios o para evitar el ingreso de sodio a través de los canales de sodio para estabilizar la membrana de las células. Una tercera, sugiere que el manitol puede reaccionar directamente con la toxina neutralizándola o desplazándola de su punto de enlace en la célula (De Fouw *et al.*, 2001).

Se ha sugerido también que la presencia de manitol en el fluido extra-celular inhibe estéricamente el movimiento de los iones sodio por los canales bloqueados por la molécula de ciguatoxina. Otra sugerencia es que el manitol puede actuar eliminando los grupos hidroxilo en los sistemas ciguatóxicos (De Fouw *et al.*, 2001).

Pueden requerirse infusiones cristaloides intravenosas y agentes vasoactivos, en el caso de deshidratación e hipotensión. Pueden salvar la vida el sulfato de atropina para la bradicardia y la infusión de dopamina para las hipotensiones severas. Puede ser necesaria una ventilación mecánica en casos de depresión respiratoria (De Fouw *et al.*, 2001).

Luego de consumir un tipo de mero en la República Dominicana, dos pacientes de un hospital de Santiago de Chile con CFP, fueron exitosamente tratados con gabapentina (400 mg oralmente tres veces al día), (Perez *et al.*, 2001).

La amitriptilina puede ser útil para el tratamiento de la disestesia, que puede ser crónica (Crump *et al.*, 1999b).

datos experimentales

Se seleccionaron cinco pacientes con CFP que sufrían aun de una parestesia intensa para estudios de temperatura. La percepción de la temperatura parecía normal en estos pacientes en un rango desde muy frío a caliente. Se registró el punto de corte de los síntomas peculiares descritos como, percepción de inversión de la temperatura (hormigueo, quemazón, escozor y eléctrico) de los 24 a 26 °C y esta temperatura aparece correlacionar muy bien con el umbral de frío de los noniceptores C-polimodales (23°C). Esto sugiere que las molestias sensoriales paradójicas son, muy probablemente, un resultado de una despolarización exagerada e intensa de los nervios en pequeños tejidos nerviosos periféricos, como las fibras A-delta mielinadas y en particular las fibras noniceptoras C-polimodales sin mielinar. Este tipo de fibras cutáneas sin mielinar responden a estímulos mecánicos y químicos, al

calor y al frío, en el rango de intensidad doloroso. Por el mismo mecanismo, la intensa sensación de picazón que experimenta un gran porcentaje de pacientes con ciguatera es característica de las menores frecuencias de descarga en algunas fibras noniceptoras C-polimodales (De Fouw *et al.*, 2001).

7.5.6 Toxicidad en organismos acuáticos

peces

Individualmente y sin demostrar patologías obvias, los peces tropicales pueden ser portadores de cantidades suficientes de ciguatoxina en sus tejidos para intoxicar a varios seres humanos, sin demostrar patologías obvias. Sin embargo, se ha demostrado que la ciguatoxina era letal para peces de agua dulce y marinos. Los canales de Na⁺ de éstos últimos son susceptibles a la ciguatoxina, que ejerce efectos similares sobre los canales de Na⁺ de peces y mamíferos. Puede concluirse que:

- Los peces son susceptibles a la ciguatoxina aunque en dosis superiores a las requeridas para causar la muerte en los mamíferos
- Los canales de Na⁺ y/o las puertas de Na⁺ tanto de los peces portadores como de los no portadores de ciguatoxina eran sensibles a ser abiertos por la ciguatoxina; y
- La sensibilidad de los nervios de los peces a la ciguatoxina y la falta de una patología evidente en los peces tóxicos sugería que los peces portadores poseen un mecanismo de partición o de detoxificación que mantiene la toxina alejada de los sitios blanco.

Se sugirió que la presencia de una asociación ciguatoxina-inducida proteína soluble-ciguatoxina en el músculo de las especies tóxicas de carite estriado puede ser la base de un mecanismo por el que se reducen los enlaces de la ciguatoxina a los sitios de blanco de los canales de sodio de las membranas excitables de los peces. (Lehane y Lewis, 2000).

Los efectos adversos se cuantificaron por microinyección de la ciguatoxina en la yema del huevo de embriones de *Oryzias latipes*. Los embriones microinyectados con 0,1-0,9 pg/huevo mostraron taquicardia aunque sin reducción en el número de huevos nacidos; sin embargo, 22 por ciento de los peces que nacen en este rango de dosis muestran efectos letales de la espina. A niveles superiores (1,0-9,0 pg/huevo) se apreció una disminución directa en el número de nacimientos, junto con una incidencia del 93 por ciento de defectos letales de la espina. Los embriones expuestos a 10-20 pg/huevo de ciguatoxina muestran un 0 por ciento de nacimientos. Los resultados de este estudio indicaron que la transferencia por vía materna de niveles bajos de ciguatoxina puede representar una amenaza desconocida para la reproducción exitosa de peces de arrecifes y una consecuencia ecológica previamente desapercibida de la proliferación de algas productoras de ciguatoxinas en sistemas de arrecifes cada vez más impactados por perturbaciones de origen humano (Edmunds *et al.*, 1999).

7.6 Prevención de la intoxicación CFP

7.6.1 Depuración

La ciguatoxina no puede identificarse por su color, sabor o apariencia. Es también termoestable, por lo que no es destruíble por cocción o congelamiento. La ciguatoxina no puede tampoco eliminarse por salado, ahumado o marinado. Los peces contaminados pueden permanecer tóxicos por años, aun con dietas no tóxicas (Beadle, 1997). Las únicas herramientas disponibles actualmente para evitar la intoxicación, además de evitar el consumo de pescados predatorios de gran tamaño, son las pruebas de selección animal (De Fouw *et al.*, 2001).

7.6.2 Medidas preventivas

La fuente principal de casos de ciguatera es la pesca deportiva (79 por ciento). Si se pudiera educar para evitar el consumo de cabezas, vísceras y huevas de peces de arrecifes y de peces capturados en zonas con ciguatera conocida, los casos probablemente disminuyesen dramáticamente. (De Fouw *et al.*, 2001).

Son los más fácilmente afectables los grandes peces predatorios de los arrecifes; cuanto mayor el tamaño, mayor el riesgo. Aunque solo sea una precaución relativa, algunas autoridades aconsejan evitar pescados de más 1,35 a 2,25 kg. No existe, sin embargo, forma alguna de saber el tamaño del pescado del cual se cortó la carne servida o el filet. Las carnes derivadas de órganos, incluso las huevas, parecen contener concentraciones más elevadas de toxinas y deben evitarse. El riesgo se reducirá también, consumiendo porciones pequeñas de varios pescados en lugar de una porción grande de cualquier pescado sospechoso (De Fouw *et al.*, 2001).

7.7 Casos y brotes de CFP

7.7.1 General

Anualmente se informan mundialmente hasta 50 000 casos de CFP; la condición es endémica en regiones tropicales y subtropicales de la cuenca del Pacífico, del Océano Índico y del Caribe. Esporádicamente tienen lugar brotes aislados, aunque cada vez con más frecuencia, en zonas templadas como Europa y América del Norte. El aumento de los viajes entre países templados y zonas endémicas y la importación de pescados susceptibles resulta en la aparición de la CFP en regiones del mundo donde antes se encontraba raramente (Ting y Brown, 2001). En las zonas endémicas primarias, inclusive el Caribe y las islas del Pacífico sur, la incidencia es de entre 50 y 500 casos por cada 10 000 personas (Perez *et al.*, 2001). En el mundo desarrollado, la CFP constituye una amenaza a la salud pública por diagnósticos demorados o por falta de ellos. Sin tratamiento, persisten síntomas neurológicos característicos, que a veces se confunden con esclerosis múltiple. Los síntomas constitucionales pueden ser objeto de diagnósticos falsos como el síndrome de fatiga crónica (Ting y Brown, 2001). Se supuso que las cifras de incidencia representaban probablemente solo un 10 al 20 por ciento de los casos reales, con los casos sub informados variando entre países y con el tiempo (De Fouw *et al.*, 2001).

7.7.2 Europa

Francia

Dos personas mostraron señales de CFP luego de consumir pescado congelado (no especificado) de China (Provincia de Taiwan) (IPCS, 1984).

Luego de consumir trozos de diferentes pescados, un hombre de 60 años desarrolló una CFP con diarrea, parestesia facial, mialgia, calambres y debilidad. El examen físico mostró un déficit motor distal de los cuatro miembros, mioquimia y ataxia. Las pruebas EMG apuntaban a una neuropatía axonal. Los síntomas neurológicos persistieron por dos meses. Este caso ilustra un nuevo mecanismo pato-fisiológico de neuropatía: “canalopatía axonal” (Derouiche *et al.*, 2000).

Un paciente sufrió ataxia y estupor pocos días después de ingerir mariscos (*Tectus pyramis*). Aparecía confundido con señales cerebelares y perturbaciones oculares (hipotropía). Los resultados sanguíneos, del fluido cerebro-espinal y la TC del cerebro no mostraron nada anormal. El paciente desarrolló un choque séptico y falleció a las cuatro semanas de admitido. No se realizó la autopsia. El cuadro clínico sugiere claramente una intoxicación con ciguatera. Sin embargo, no se realizaron pruebas toxicológicas. La CFP no ha sido nunca informada para *Tectus pyramis* (Angibaud *et al.*, 2000). En 2002 se informó de un caso confirmado de CFP (EU-NRL, 2002).

Alemania

Se ha descrito en Alemania una intoxicación con ciguatera en un hombre de 40 años, luego de un viaje a la República Dominicana. El hombre evidenció los síntomas característicos de la ciguatera luego de una comida con mero. Ingresó en un hospital a su regreso a Alemania. Se diagnosticó intoxicación con ciguatera en base a la historia y los datos clínicos. Todos los síntomas desaparecieron finalmente a las 16 semanas. (De Fouw *et al.*, 2001).

Luego de acortar sus vacaciones en la República Dominicana, cuatro personas de una excursión de regreso en Alemania, mostraron síntomas neurológicos complejos, con parestesia, nerviosismo, percepción invertida de la temperatura, calambres musculares, dolor de cabeza y mareos. Se diagnosticó la intoxicación con ciguatera en base a la comida del lugar de vacaciones de "medregal y salsa de limón". Los primeros síntomas para todos los integrantes del grupo de viaje (26 personas) fueron diarrea, malestar y sudores (Blume *et al.*, 1999).

Una mujer de 45 años mostró a su regreso a Alemania de un viaje al Mar Rojo señales de CFP. Aparentemente había ingerido una comida a base de pescados en sus vacaciones. Tres semanas después de aparecidos los síntomas no resultó suficiente el tratamiento habitual con manitol. Sin embargo, durante los 21 meses siguientes, los síntomas clínicos y electrofisiológicos se revirtieron espontáneamente de manera muy clara (Ruprecht *et al.*, 2001).

Italia

Ha comenzado a aparecer la CFP en viajeros italianos a las islas del Caribe (Bavastrelli *et al.*, 2000).

Países Bajos

Cinco pacientes con síntomas de intoxicación con ciguatera fueron internados en el departamento de pacientes externos de Medicina Tropical de un hospital de Amsterdam. Los pacientes habían ingerido pescado en Curaçao y en la Isla Margarita (Venezuela). Se diagnosticó la ciguatera basándose solamente en los síntomas clínicos y en el hecho que los pescados fueron ingeridos en la zona del Caribe (De Fouw *et al.*, 2001).

7.7.3 África

Madagascar

Un brote muy severo de intoxicación con ciguatera, causado presumiblemente por un tiburón, ocurrió en Manakara, una ciudad de la costa este de Madagascar, el 28 de noviembre de 1993. La tasa de mortandad fue del 20 por ciento (murieron 98 de cada 500 personas intoxicadas). Cuando cinco días después de la tragedia llegó el equipo médico, ya habían fallecido la mayor parte de los casos graves. Ciento cincuenta pacientes estaban aun hospitalizados (35 en estado crítico, de los que 15 murieron a los pocos días). La sintomatología de los pacientes en estado crítico como resultado de su severidad no apuntaba a una CFP, con coma, rigidez corporal, miosis, midriasis, convulsiones, trastornos respiratorios y edema pulmonar, colapsos cardiovasculares, bradicardia, gengovorragia y deshidratación. Los síntomas en las personas con intoxicación moderada (115 casos) eran típicos de CFP. Lamentablemente, no había restos del tiburón disponibles para investigaciones químicas (Boisier *et al.*, 1995).

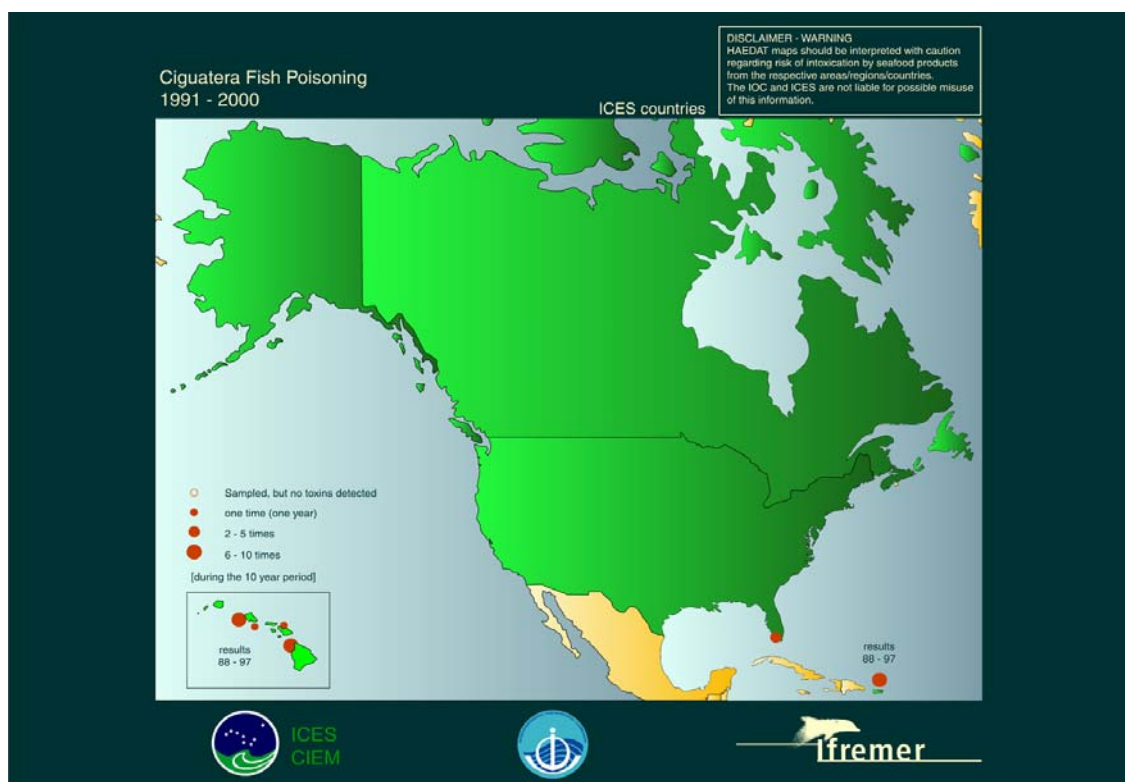
Se informaron los datos epidemiológicos relativos al mismo brote en Manakara de noviembre de 1993, experimentado por casi el 100 por ciento de las personas. Se estudiaron las historias de los 188 pacientes hospitalizados. Los primeros síntomas clínicos aparecieron entre las cinco y las 10 horas posteriores a la ingesta. La mortandad total fue cercana al 30 por ciento, debido quizás a lo inadecuado de las tecnologías locales. Los pacientes sufrían casi exclusivamente de síntomas neurológicos, el más notorio una ataxia severa y constante. En raros casos se manifestaban señales digestivas y cardiovasculares. Eran raros los trastornos gastrointestinales, como diarrea y vómitos. Del hígado se aislaron dos toxinas liposolubles, las que provisoriamente se llamaron carcoquina-A y -B,

respectivamente. Sus propiedades cromatográficas eran diferentes de las ciguatoxinas. La letalidad en ratones del hígado de tiburón era de unas 30 UR por g de hígado (1 unidad ratón definida como la cantidad de toxina requerida para matar un ratón de 16 g de peso en 24 horas). Este valor superaba los mayores niveles de ciguatoxina informados para el hígado de la anguila morena (20 UR/g hígado). Ambas toxinas, como la ciguatoxina, causaron diarrea, respiración dificultosa, parálisis de los miembros, y convulsiones previas a la muerte de los ratones. En lo que hace a la respuesta dosis-tiempo de supervivencia se notó, sin embargo, una diferencia entre las toxinas del tiburón y las ciguatoxinas. Los ratones a los que se administró toxinas del tiburón o murieron dentro de las 4 horas, o sobrevivieron. Por el contrario, los ratones a los que se administró ciguatoxina murieron aun después de 24 horas (De Fouw *et al.*, 2001).

7.7.4 América del Norte

La Figura 7.2 ilustra la presencia de toxinas CFP en los países norteamericanos integrantes del CIEM

Figura 7.2 Presencia de toxinas CFP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Canadá

Los canadienses han sido afectados por la CFP en los pescados tropicales consumidos, principalmente al viajar a zonas del Caribe septentrional u ocasionalmente por pescado importado. Un segundo grupo de personas expuesto a las ciguatoxinas compra pescados tropicales en los mercados locales o ingiere los mismos en restaurantes. En los años 1983 a 1997, se informó de 22 casos de CFP en Canadá, en su mayoría originados en pescados importados (Todd, 1997). En 1998, se informó de un incidente de CFP en hospitales de Montreal, Quebec, con siete casos. Estos incluyeron a integrantes de tres familias, cada una de las cuales había consumido barracuda. Los pacientes tenían síntomas gastrointestinales y neurológicos. En uno de los casos aun quedaban restos de pescado. Se produjo

una mortandad con el ensayo en ratón. Un ensayo ELISA no fue concluyente (Anónimo, 2000b). Recientemente se notificó al Ministerio de Salud de Canadá de treinta canadienses intoxicados con ciguatera por ingerir pescados coralinos cocidos de Fiji (Anónimo, 2002b).

Estados Unidos de América

Desde 1983 hasta 1992, se informaron en Estados Unidos 129 brotes de intoxicación por ciguatera en 508 personas pero sin muertes relacionadas. La mayor parte de los brotes fueron informados en Hawaii (111) y en la Florida (10). Los otros brotes, en diferentes partes del país, se han asociado al consumo de pescado importado (De Fouw *et al.*, 2001).

California

Una mujer de 34 años y un hombre de 40, enfermaron seis horas después de ingerir la barracuda pescada en aguas turbias cercanas a Cancún, México. Cinco semanas después de la aparición de los síntomas se hizo el diagnóstico de intoxicación CFP. Diez semanas después los síntomas habían desaparecido (Farstad y Chow, 2001).

Los meros pescados próximo a la costa de la Península Baja, en un año afectado por El Niño, fueron responsables de los brotes en California meridional (Farstad y Chow, 2001).

Florida

En Miami, la incidencia estimada anual es de 50 por cada 100 000 de población (De Fouw *et al.*, 2001). En 1972, se informaron 34 casos de CFP luego de un brote resultante de ingerir barracuda (Pottier *et al.*, 2001). En 1980, 129 personas mostraron síntomas de CFP luego de ingerir especies locales de mero y pargo. No hubieron casos de mortandad (IPCS, 1984). Se informó al Departamento de Salud y Servicios de Rehabilitación de la Florida de veinte casos de CFP resultantes de consumir medregal en agosto y setiembre de 1991. Cuarenta por ciento de las muestras de medregal provenientes de un distribuidor en Cayo Hueso y en restaurantes y almacenes de Florida y Alabama dieron positivo con el bioensayo en ratón. (Anónimo, 1993). Se estiman en los 1 300 los casos de intoxicación por CFP en la Florida meridional, siendo los peces capturados en aguas de la Florida responsables por un 10 por ciento de los casos. Muchos de los peces con ciguatera provienen de las Bahamas. Se informó de una incidencia anual de cinco casos de CFP por cada 10 000 habitantes en el condado de Dade (Miami), (Pottier *et al.*, 2001).

Maryland

Se informó en 1980, de doce personas con síntomas de CFP luego de ingerir mero de la Florida (IPCS, 1984).

Nueva York

Un hombre de 36 años se presentó a la emergencia de un hospital de Nueva York seis horas después de un vuelo tarde en la noche desde Aruba. El paciente sufría náuseas y vómitos (cinco episodios), diaforésis, dolores abdominales y tres episodios de heces acuosas y blandas. Los síntomas comenzaron unas tres horas luego de su regreso. El paciente había ingerido inmediatamente antes de embarcarse de regreso un cocido a base de un pescado local desconocido. Fue dado de alta luego de cuatro horas en el hospital. Seis horas después, regresó al hospital con problemas gastrointestinales continuados asociados a prurito, una sensación de “dormido” alrededor de la boca y dificultades de locomoción moderadas causadas por mialgias. El paciente había tomado alcohol en su casa. La evaluación neurológica indicó distesia sensorial invertida y parestesia generalizada. El paciente respondió bien a la terapia de apoyo y fue dado de alta dos días después (Aseada, 2001).

Carolina del Norte

En 1987, se informaron 10 casos de CFP como consecuencia de ingerir barracuda, lampuga y atún de aleta amarillas (Pottier *et al.*, 2001).

Rhode Island

Un paciente masculino en Rhode Island experimentó una intoxicación CFP luego de ingerir una sopa de pescados. Manifestó síntomas gastrointestinales y neurológicos, dificultades respiratorias y cianosis, seguidas de estupor y coma. El coma es poco frecuente aunque hay casos. Podría suceder que haya consumido grandes cantidades de toxinas. Es posible, también, que el consumo de alcohol, la ingestión de toxinas no relacionadas con los frutos del mar o una susceptibilidad genética hayan causado una respuesta más severa a la ciguatoxina. Se ensayó una muestra de la sopa de pescados y el inmunoensayo empleado determinó que se trataba de un “tóxico no edible”. El bioensayo en ratón provocó su muerte dentro de las 48 horas, aunque la respuesta del ratón no mostró todos los síntomas de la ciguatera. El ensayo con atrium de cobayo fue negativo; ambos atria no mostraron la respuesta inotrópica típica a la toxina de la ciguatera (De Fouw *et al.*, 2001).

Vermont

En 1986, dos personas en Vermont mostraron síntomas de CFP luego de consumir barracuda de las aguas costeras de la Florida. El inmunoensayo con enzimas, sobre porciones de una sola barracuda congelada en un restaurante, dio positivo. (Anónimo, 1986).

Hawaii

Basado en los registros epidemiológicos para CFP del Ministerio de Salud del Estado de Hawaii, en un periodo de cinco años (enero de 1984 a diciembre de 1988) se informaron 150 brotes en total con 652 individuos expuestos, resultantes en 462 casos con síntomas de intoxicación por ciguatera (una tasa de ataque global del 70,9 por ciento). La costa Kona de la isla de Hawaii fue responsable de la mayor parte de los incidentes (De Fouw *et al.*, 2001).

Las zonas frecuentemente implicadas fueron El Punto Sur de la isla de Hawaii y la costa Napali en la isla de Kauai. La tasa de incidencia anual informada por Gollop y Pon (1992), en Hawaii, era de 8,7 por 100 000 de 1984 a 1989 comparada con 2,5 por 100 000 de 1975 a 1981 (De Fouw *et al.*, 2001).

En 1985 se informó una intoxicación CFP confirmada (en restos del pescado consumido, con inmunoensayo) en la que enfermaron 15 personas de varias edades luego de consumir un medregal capturado en la costa occidental de la isla de Kauai (Hawaii). Todas las personas mostraron los síntomas gastrointestinales y neurológicos característicos dentro de 1,5 a seis días. Además, 10 de las 15 personas mostraron síntomas cardiovasculares, como bradicardia e hipotensión. La enfermedad duró de dos a 132 días. La bradicardia se asoció con una mayor edad y peso corporal, así como con la cantidad de pescado consumido. Se correlacionó la mayor duración de la enfermedad (aunque no una mayor severidad) con mayor edad y peso, resultando independiente de la cantidad y componentes del pescado tóxico consumido (De Fouw *et al.*, 2001).

7.7.5 América Central y del Sur

Anguilla

Se informó que la incidencia de CFP varía entre dos a cinco casos por cada 1 000 habitantes por año (Pottier *et al.*, 2001).

Las Bahamas

En marzo de 1982, 14 integrantes de la tripulación de un carguero italiano mostraron síntomas de intoxicación CFP luego de ingerir barracuda local. No se informó de ninguna mortandad (Anónimo, 1982).

Luego de consumir una barracuda contaminada capturada en el Cay Sal Bank de las Bahamas el 12 de octubre de 1997, 17 integrantes de la tripulación de un carguero noruego mostraron dos a 16 horas después, síntomas de intoxicación con ciguatera (nausea, vómitos, diarrea y debilidad muscular). Se ensayaron, con un inmunoensayo experimental con membrana, tres muestras de los restos de la barracuda cruda y de un pargo, capturado junto con la barracuda consumida. Ambas dieron ciguatoxina positiva (Smith *et al.*, 1998)

Chile

Se sospechó de un salmón de cultivo, como responsable de CFP en 1992. La mujer intoxicada estaba gravemente enferma 1,5 horas después de consumir el pescado (Durborow, 1999).

Cuba

Oficialmente, se registran diez casos anuales, excepto en 1974 cuando se informó de 174 (Pottier *et al.*, 2001). En 1978, se informaron 100 casos de CFP luego de ingerir especies locales de anguila morena y carite atlántico. No hubieron muertes (IPCS, 1984).

Se informó en 1987, de un brote con 57 casos de CFP (Pottier *et al.*, 2001). Tres de cada cuatro personas que consumieron barracuda durante sus vacaciones en Cuba mostraron frecuentes diarreas acuosas y vómitos dentro de las cinco horas. El cuarto paciente desarrolló síntomas similares, aunque menos intensos dentro de las 12 horas. Los síntomas gastrointestinales cedieron gradualmente entre las 24 a 48 horas en las que se desarrollaron debilidad, prurito generalizado y parestesias de extremidades peri orales y distales (Butera *et al.*, 2000).

República Dominicana

En 1989, se informaron 81 casos de CFP. Seis de estos eran casos aislados, y 75 los restantes aparecieron en 13 brotes (Pottier *et al.*, 2001).

Guadalupe

Un estudio de más de 20 años, en Saintes Islands (islas meridionales del Caribe), estimó una incidencia promedio de tres casos por 10 000 habitantes por año. Durante los seis primeros meses de 1970, ocurrieron varios brotes en muchas localidades. De 1980 a 1985, se informaron 255 casos, con cinco requiriendo resucitación. Desde 1992, se informó una incidencia de CFP de 0,7 por 10 000 habitantes por año. Sin embargo, parece ser una subestimación grosera pues sólo informaron 32 de los 300 médicos del archipiélago. Los supervisores médicos estiman 100 casos anuales en Guadalupe (Pottier *et al.*, 2001).

Haiti

En 1985, se informaron dos casos de CFP (Pottier *et al.*, 2001). En febrero de 1995, enfermaron seis soldados de los EEUU luego de ingerir un pescado capturado localmente, el (*Seriola dumerili*). Los síntomas gastrointestinales y neurológicos fueron característicos de la ciguatera, tres pacientes con bradicardia e hipotensión. Todos los pacientes se recuperaron completamente entre uno a tres meses (los síntomas gastrointestinales y cardiovasculares mermaron dentro de las 72 horas). El análisis de una porción de pescado cocido efectivamente contenía unos 20 ng de ciguatoxina-1 (C-CTX-1)/g de carne. Además se detectaron una toxina menor más polar y otra menos polar (De Fouw *et al.*, 2001).

Jamaica

En 1978, 250 personas mostraron síntomas de CFP tras ingerir mero y barracuda locales. No hubo mortandad (IPCS, 1984). En Jamaica son raros los informes sobre CFP la mayoría de brotes afectan de cinco a 18 personas (Pottier *et al.*, 2001).

Martinica

En 1982 se informaron ochenta intoxicaciones. En 1983, la incidencia anual se estimó en 41 por 100 000 habitantes por año (Pottier *et al.*, 2001).

México

La CFP está presente en ambas costas mexicanas. Hay casos de intoxicación cada primavera y verano, tanto en las costas del Caribe como del Pacífico (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

Se informó que en 1974, 24 personas a bordo de un barco mostraron síntomas de CFP después de ingerir barracuda del Golfo de México. No hubo mortandad (IPCS, 1984). Un total de 200 casos de intoxicación con ciguatera tuvieron lugar en 1984, en La Paz, Baja California Sur después de consumir pargo contaminado (*Lutjanus* sp.) (Ochoa *et al.*, 1998). En mayo de 1993, se enfermó, con síntomas similares a los de la ciguatera, toda la tripulación de un barco pesquero luego de consumir pescados (*Serranidae* y *Labridae*) capturados en las Rocas Alijos (costa oeste de la Península de Baja California) a profundidades entre los 9 y 36 metros. Se confirmó la presencia de toxinas del tipo de la ciguatera una vez analizados los pescados sospechosos con el bioensayo en ratón (De Fouw *et al.*, 2001).

En julio de 1994, ocurrieron 10 casos de CFP en Isla Mujeres luego de consumir barracuda. Se informaron síntomas de intoxicación, entre los 20 minutos y las 12 horas de ingeridos los pescados contaminados. Todos sufrieron molestias gastrointestinales como cuadro principal. La diarrea acuosa resultó la primera queja. Todos sufrieron disestesia con inversión de temperatura de frío a caliente, aunque con diferencias en la ocurrencia y severidad de otros síntomas. No se encontró asociación entre la cantidad de pescado tóxico ingerido y el periodo de latencia y la severidad y duración de los síntomas (Arcila-Herrera *et al.*, 1998).

Se informaron, en un período de cuatro meses, veinticinco casos de intoxicación con ciguatera en la costa del Pacífico de los EEUU descubiertos por el Departamento de Servicios de Salud en San Diego (California). Todas las personas habían consumido el pescado conocido como cabrilla capturado en la costa de Baja California (México). Las personas sufrieron primariamente síntomas gastrointestinales (diarrea, vómitos, náusea) y neurológicos (parestesias de las extremidades, prurito, parestis, mareos, dolor de cabeza); una mujer tuvo bradicardia e hipotensión (De Fouw *et al.*, 2001).

En el período de 1993 a 1996, en El Pardito, un pequeño complejo isleño en el Golfo de California, tuvieron lugar casos de CFP en seres humanos luego de consumir vísceras de *Serranidae* y *Lutjanidae* (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998). En 1997 se informó un brote de CFP afectando a 30 turistas franceses (Pottier *et al.*, 1997). Sierra-Beltrán *et al.* (1998) informaron que el último brote en México causó dos muertes. Como frecuentemente las costas del país son azotadas por huracanes, es posible que bajo estas condiciones se favorezca la expansión de *G. toxicus*, *O. ovata* o *P. mexicanum* productores de toxinas.

Puerto Rico

La CFP aparece mayormente en las islas menores. Entre 1980 y 1982, hay registrados 100 brotes afectando a 215 personas. Se estimó una incidencia anual de 90 por 10 000 habitantes (Pottier *et al.*, 2001).

Saint Barthelemy

Los médicos tratan anualmente unos 30 pacientes, principalmente turistas o pescadores que han ingerido meros, caballas, jureles o pargos. Sin embargo, la incidencia de CFP se reducirá, evitando los pescados locales riesgosos con mayores importaciones a la isla (Pottier *et al.*, 2001).

Saint Martin

La incidencia de la CFP se estima en dos a cinco casos por cada 1 000 habitantes por año (Pottier *et al.*, 2001).

Saint Vincent

Se informó en 1985, de un brote de CFP con 105 pacientes después de consumir barracuda (Pottier *et al.*, 2001).

Venezuela

Doscientos casos de CFP en un crucero causaron varias muertes (Farstad y Chow, 2001).

Islas Vírgenes

Una encuesta de hogares en las Islas Vírgenes de los Estados Unidos mostraron una tasa anual de incremento de 730 por 100 000 habitantes (De Fouw *et al.*, 2001). En 1981 se informaron 14 brotes de CFP con 65 pacientes luego de ingerir pargo de aleta negra (Pottier *et al.*, 2001). Luego de consumir especies locales de carrang y/o de pargo, en 1982 y 1983, 33 y 51 personas, mostraron respectivamente síntomas de CFP. No hubo muertes (IPCS, 1984).

En 1980, se estimó una incidencia de CFP de 940 casos por 60 000 personas en St. Thomas y St. John, en tanto que en 1982 se informaron estimaciones entre 73 a 360 por 10 000 habitantes por año (Pottier *et al.*, 2001).

7.7.6 Medio Oriente

Israel

Dos familias se quejaron de una sensación de “corrientes eléctricas”, temblores, calambres musculares, pesadillas, alucinaciones, agitación, ansiedad y náusea con varios grados de severidad. Los síntomas duraron de 12 a 30 horas desapareciendo completamente. Todos los pacientes habían consumido quimera ("aras"). Las manifestaciones clínicas típicas conjuntamente con los patrones de alimentación conocidos de este pez apuntaron a la CFP (Raikhlin-Eisenkraft y Bentur, 2002).

7.7.7 Asia

China

En la Región Administrativa Especial de Hong Kong, se informaron al Ministerio de Salud de 1988 a 1992, 47 brotes de CFP con 397 personas. El pargo era responsable de la mayoría (59,6 por ciento) de estos brotes (Chan y Kwok, 2001).

La incidencia de la CFP en la Región Administrativa Especial de Hong Kong tuvo lugar en seres humanos poco tiempo después de consumir un pargo de manglar capturado en el Mar del Sur de la China. Las cuatro personas se enfermaron, con los síntomas gastrointestinales y neurológicos (náusea, dolores abdominales, diarrea, parestesia y entumecimiento de las extremidades) típicos de la CFP. Un paciente experimentó también bradicardia e hipotensión que pusieron en riesgo su vida (De Fouw *et al.*, 2001).

Ocho integrantes de una familia mostraron señales de CFP luego de consumir un mero. Uno de estos ocho pacientes fue hospitalizado y tratado con manitol con una mejora inicial de los síntomas clínicos. Algunos de los síntomas (principalmente neurológicos) nuevamente aparecieron pasada una semana y permaneciendo durante 45 días luego de consumido el pescado tóxico (Chan y Kwok, 2001).

Fiji

En 1984, se informaron 925 casos de CFP por consumir especies locales de pargo, barracuda, mero y emperador. Falleció una persona (IPCS, 1984).

Polinesia Francesa – Nueva Caledonia (Pacífico Sur)

Aunque era una enfermedad rara hace dos siglos, la ciguatera ha ahora alcanzado proporciones de epidemia en la Polinesia Francesa. Se informó de más de 24 000 pacientes en esta zona entre 1960 y 1984 (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Luego de consumir pescado contaminado en Vanuatu, cuatro turistas adultos tuvieron CFP (Ting y Brown, 2001). En 1979, 3 009 personas sufrieron CFP por consumir pescados locales (navajón, mero, pargo, carrang, emperador y barracuda). Fallecieron tres personas (IPCS, 1984).

Océano Índico

Hay muy poca información disponible sobre la tasa de incidencia anual en las islas del Océano Indico (Comores, las Seychelles, Mauricio y Rodrigues), estimada en 0,78 por 10 000 residentes (De Fouw *et al.*, 2001).

Reunion (Oceano Indico)

Después de consumir pargo de Salya de Malha, 367 personas sufrieron CFP en 1978. No hubo muertes (IPCS, 1984).

Islas del Pacífico Sur

La tasa media de incidencia informada de CFP para las islas del Pacífico Sur durante el periodo de cinco años entre 1979 a 1983) fue de 97 por 100 000. La Comisión del Pacífico Sur informó una incidencia media anual de 217 por 100 000 habitantes en 1987. Durante los años entre 1985 a 1990 las islas de Kiribati, Tokelau y Tuvalu informaron de 90 a 100 casos por 10 000 habitantes por año. Los casos en la Polinesia Francesa, Vanuatu, las Islas Marshall y las Islas Cook, variaban aproximadamente de 35 a 50 por 10 000 habitantes por año. Se informó de menos de 20 casos por 10 000 habitantes por año para Fiji, las Marianas del Norte, Nueva Caledonia, Wallis y Futuna, las Samoas Americana y Occidental, Niue, Guam, Nauru, los Estados Federados de Micronesia, Palau, Tonga y Papua Nueva Guinea. La información es del Servicio de Información Epidemiológica y de Salud del Pacífico Sur (De Fouw *et al.*, 2001).

7.7.8 Oceanía

Australia

En Australia se estimó una incidencia anual de 30 por 100 000 habitantes. Se ha informado que la incidencia anual en Queensland es de unos 1,6 casos por 100 000 habitantes (De Fouw *et al.*, 2001). Cada año, tienen lugar brotes de CFP resultantes del consumo de pescados capturados en la costa tropical de Australia oriental. En 1988 se publicaron los detalles clínicos de una base de datos de Queensland con 617 casos de 225 brotes recogidos en 23 años. Los principales brotes ocurrieron en Sydney en 1987 (63 personas) y en 1994 (43 personas), tras consumir carite oriental de Queensland (Lehane, 2000 y Lehane y Lewis, 2000).

Se informó de un brote de CFP luego de ingerir un solo pescado coralino capturado en el Mar de Arafura (Australia Septentrional) responsable de 20 eventos de intoxicación. Se detectó la presencia de la ciguatoxina-1 (P-CTX-1) con el bioensayo en ratón y con CL/EM sobre una muestra de 230 g de pescado. Fue esta la primera vez que se identificó la toxina que contribuye a la CFP en el Mar de Arafura (De Fouw *et al.*, 2001).

Más recientemente desde julio de 1997 a agosto de 1998, ocurrieron tres brotes pequeños de CFP en la zona de Sydney causados por peces de arrecife. En los tres incidentes, el diagnóstico se basó en datos clínicos. El primer brote (seis casos) fue causado por truchas de coral de Fiji; el segundo (10 casos) por truchas de coral de Queensland y el tercero (10 casos) por bacalao manchado de Queensland. El tercer brote incluyó dos bebés alimentados exclusivamente de pecho que manifestaron sus síntomas dos días después de aparecer éstos en la madre (Karakis *et al.*, 2000).

En setiembre de 1997, se rastreó un brote de CFP en las afueras de Melbourne a 16,2 kg de pescado *Labridae* (Maori Wrasse) importado en Victoria del Arrecife Trunk en Queensland. Treinta personas asistentes a un banquete en un restaurante asiático consumieron al menos uno de los cuatro platos preparados con la carne y vísceras del pescado. Treinta de ellos informaron de uno o más síntomas, principalmente gastrointestinales y/o en 18 casos, neurológicos. Se observaron diecisiete casos en cuatro hospitales diferentes con nueve tratados con manitol parenteral. Nueve de dieciocho casos manifestaban aun síntomas pasadas 10 semanas del episodio (Ng y Gregory, 2000).

Dos pacientes masculinos fueron admitidos en 1998 a un hospital en Herston, Queensland con síntomas de CFP, incluso toxicidad cardiaca. En un paciente, los síntomas cardiacos se resolvieron al cabo de tres días y los restantes en los 14 siguientes. En el segundo paciente, todos los síntomas se normalizaron en seis semanas (Miller *et al.*, 1999).

De 1990 a 2000, se registraron en total 132 casos de CFP en 10 brotes. No se incluyen en este total un promedio estimado de 48 casos anuales de CFP en Queensland, que incrementaría el total para los diez años a 612 casos (Sumner y Ross, 2002).

Nueva Zelanda

En 1997 se notificaron tres casos importados (Crump *et al.*, 1999a). Un hombre de 42 años se presentó en un hospital de Christchurch con síntomas de CFP a las tres semanas de regresar de Fiji. En Fiji, desarrolló síntomas de CFP a las tres horas de consumir pescado asado. El paciente requirió por un tiempo terapia respiratoria de apoyo. La disestesia de manos y pies persistió por semanas, resolviéndose luego de un tratamiento de cinco días con amitriptilina (Crump *et al.*, 1999a).

Tonga

Se informó de un caso de CFP asociado con ingestión de cindaria (medusas y otros invertebrados relacionados). Las cindaria no han sido asociadas previamente con intoxicaciones directas por ciguatera en seres humanos. Una niña de 12 años de Tonga había ingerido medusas unas dos horas antes de que aparecieran los síntomas gastrointestinales y neurológicos característicos de la CFP. Todas las demás personas que habían consumido las medusas no tenían síntomas, lo que podía indicar una intoxicación previa con ciguatoxina con sensibilización y reaparición de los síntomas con una nueva exposición. Se analizaron ciguatoxinas en muestras de suero. El ensayo de ciguatoxinas dio 3,5 (en una escala de 1 a 5), valor muy positivo, y comparable con otros obtenidos previamente de víctimas agudas de CFP. No se pudo obtener una muestra de las medusas servidas en la comida ni especificar la fuente o especie (De Fouw *et al.*, 2001).

7.8 Reglamentación y seguimiento

Existen muy pocos reglamentos específicos para la ciguatoxinas (Van Egmond, *et al.*, 1992). En algunas zonas, se han adoptado medidas de salud pública que prohíben la venta de pescados de alto riesgo originarios de lugares conocidos como tóxicos. Vedas de este tipo se han usado en la Samoa Americana, Queensland, la Polinesia Francesa, Fiji, Hawaii y Miami. Las vedas tuvieron aparentemente cierto éxito, aunque con pérdidas económicas asociadas (De Fouw *et al.*, 2001).

7.8.1 Europa

En la UE, está vigente la Directiva del Consejo 91/493/EEC (EC, 1991b), que establece las condiciones sanitarias para la producción y puesta en el mercado de productos de la pesca. Esta directiva indica: “Estará prohibida la puesta en el mercado de los productos siguientes; productos de la pesca con biotoxinas, como las toxinas de la ciguatera”, sin otros detalles específicos sobre metodología analítica.

En Francia, esta directiva está incorporada a la legislación francesa y es aplicable a los productos importados desde fuera de la UE. El reglamento permite la importación de algunas especies de pescados de mar, en una lista positiva (De Fouw *et al.*, 2001).

7.8.2 América del Norte

Estados Unidos de América

Los principales lugares afectados son Hawaii, Puerto Rico y la Florida. No existen ni normas ni un método oficial. Por este motivo, no hay programas de ensayo efectivos para CFP y la medida sanitaria más ampliamente empleada para su prevención es la prohibición de vender especies de pescado reconocidas como potencialmente tóxicas, o para las que se han informado algunos brotes de CFP. (Fernández, 1998; Van Egmond *et al.*, 1992)

En Hawaii se ha establecido un programa limitado que emplea un inmunoensayo. Los pescados con resultados positivos se consideran peligrosos y son retirados del mercado (Van Egmond *et al.*, 1992).

7.8.3 Oceanía

Australia

En Platypus Bay, Queensland, para reducir sus impactos adversos, hay veda para la captura de carite estriado Indo-Pacífico (*Scomberomorus commersoni*) y de barracuda (*Spyraena jello*), conocidas como potencialmente contaminadas con ciguatera. Los carnívoros de arrecifes como anguilas morena, lubinas roja y *Symphorus nematophorus*, entre otros, considerados desde hace tiempo como portadores habituales de ciguatera, no son ya comercializados en Australia (De Fouw *et al.*, 2001).

8. Evaluación de riesgos

Los niveles de tolerancia válidos actualmente para las ficotoxinas, se basan principalmente en datos de incidentes de intoxicación. Sin embargo, son pocas veces precisos y completos limitándose a toxicidad aguda. En algunos casos, el nivel de tolerancia se adapta también a las limitaciones del método de detección. Para el análisis de riesgos, debieran normalizarse los niveles de ingesta de mariscos en los seres humanos.

8.1 Evaluación de riesgos para la intoxicación paralítica por mariscos (PSP)

La evaluación toxicológica de riesgos para las toxinas PSP puede basarse actualmente sólo en datos de toxicidad aguda. No hay disponibles datos subcrónicos y crónicos ni para animales ni para seres humanos. Las menores dosis que ocasionan síntomas leves de PSP en los seres humanos varían entre los 120 y los 304 µg/persona, en tanto que las más bajas asociadas con intoxicaciones/muertes severas están entre los 456 y los 576 µg STX/persona. Comúnmente se aplica, para proteger a las personas más susceptibles (niños, ancianos, enfermos), basado en datos de seres humanos, un factor de incertidumbre de 10 para calcular los valores de la ingesta diaria total para los contaminantes. Sin embargo, en los cálculos para la PSP debe tenerse en cuenta a qué niveles los efectos deben considerarse “adversos” y cuál es el nivel real para los NOAEL y LOAEL. Por otra parte, como los datos de PSP representan a muchos individuos con grandes diferencias en sus susceptibilidades, puede no ser necesario un factor de 10 (Aune, 2001). La mayoría de los países utilizan un factor de tolerancia de 80 µg STX eq/100 g de carne de mejillones. Si se estima el consumo de mariscos entre 100 y 300 g/comida, existe un margen de seguridad de alrededor de < 1 a 3,8 para los síntomas leves y, más importante, un margen de seguridad de sólo 1,9 a 7,2 para las intoxicaciones graves y la muerte. Estos son, o márgenes muy pequeños o bien no hay margen alguno.

No obstante, no resulta ni práctico ni realista fijar un nivel de tolerancia muy bajo al ser el método para determinar las toxinas PSP más extensamente empleado en la actualidad el bioensayo en ratón con un límite de detección de aproximadamente 40 µg PSP (STX eq)/100 g marisco. Una vez que se disponga de análisis químicos más sensibles (y confiables), debieran examinarse nuevamente los valores de toxicidad del STX y sus derivados para exposiciones agudas y subcrónicas.

8.2 Evaluación de riesgos para la intoxicación diarreica por mariscos (DSP)

Las diferentes toxinas en el complejo DSP pueden dividirse en tres grupos, el ácido ocaidaico y las DTXs, las PTXs y las YTXs, estructuralmente vinculadas.

Un Grupo de Trabajo de la UE de Toxicología de las DSP y de las AZP ha recomendado niveles de tolerancia para estos tres grupos de toxinas DSP (EU/SANCO, 2001).

OA y DTXs

En las experiencias con animales, los efectos genotóxicos y cancerígenos de las OA y de las DTXs se aprecian a dosis relativamente altas y con periodos de exposición prolongados, comparativamente con los niveles causantes de diarreas en seres humanos poco después del consumo de mariscos contaminados. Es, entonces, poco probable que exista en los consumidores de mariscos un riesgo sustancial de cáncer debido a estas toxinas. En consecuencia, la evaluación de riesgos en los seres humanos está basado en un N(L)OAEL sobre datos de animales y seres humanos con un factor de incertidumbre. De disponerse, son preferibles, los datos en seres humanos.

Puede concluirse, tomando en cuenta todos los datos de exposición para seres humanos, que los niveles más bajos que resultan en efectos diarreicos van de 32 a 55 μg OA y/o DTX1. Estos valores surgen de informaciones japonesas y noruegas. Los efectos parecen limitarse a diarreas, vómitos, dolores de cabeza y malestar general. A estos niveles no se han apreciado efectos serios o irreversibles sobre la salud (EU/SANCO, 2001). Los reglamentos europeos vigentes permiten valores máximos conjuntos de OA, DTXs y PTXs de 160 μg OA eq/kg de tejido comestible. Estimando que el consumo de mariscos está entre 100 y 300 g/comida, existe un margen de seguridad de cerca de < 1 a 3,4 para los efectos diarreicos. Estos márgenes son o muy pequeños o bien no existe margen alguno. EU/SANCO (2001) sostiene que si el nivel de OA y de DTXs en los mariscos no supera los 16 $\mu\text{g}/100$ g de carne de marisco, no existen riesgos apreciables para la salud con consumos de 100 g de carne de mejillones diarios.

PTXs

No se dispone de datos para seres humanos de PTXs. El nivel de seguridad para los seres humanos se basa, entonces, en datos toxicológicos de animales. Sólo se dispone de datos de toxicidad en animales para las toxinas PTX2, del grupo de las PTX. No se sabe de efectos de inducción o promoción de tumores. Se ha informado un valor de 0,25 mg/kg pc para el LOAEL de la PTX2 administrada oralmente a los ratones, basado en los efectos diarreicos y hepáticos. El NOAEL debiera estimarse aplicando un factor de 10 al LOAEL. Para extrapolar los datos de animales a los riesgos en seres humanos se aplica un factor de 100. Resulta así, que aplicando un factor de incertidumbre de 1 000, puede calcularse un nivel de seguridad de 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc para los seres humanos ~ 15 μg para un adulto con 60 kg de peso. EU/SANCO (2001) ha recomendado un nivel de tolerancia de 15 $\mu\text{g}/100$ g de carne de marisco. No obstante, si el consumo de mariscos se estima entre 100 y 300 g por comida, el nivel de tolerancia debe estar entre 5 y 15 $\mu\text{g}/100$ g de tejido comestible de mariscos.

Se dispone de datos de exposición para los seres humanos para el ácido seco PTX2 (PTX2-SA), resultantes de un caso de intoxicación por el marisco pipi (56 casos de hospitalización) en Nueva Gales del Sur (Australia) en diciembre de 1997 (ANZFA, 2001). Según Quilliam *et al.* (2000), la PTX2-SA puede haber contribuido a los síntomas gastrointestinales, los vómitos o la diarrea en los seres humanos (Aune, 2001). Burgess y Shaw (2001) informaron que los pacientes habían consumido aproximadamente 500 g de pipis conteniendo 300 μg de PTX-2SA/kg (~ 150 μg PTX-2SA/persona ~ 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc para una persona con un peso de 60 kg). Aplicando un factor de incertidumbre de 100 (10 para diferencias entre las especies y de 10 para extrapolaciones de LOAEL a NOAEL) (~ 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc para una persona con un peso de 60 kg) puede calcularse un nivel seguro para los seres humanos de 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc para la PTX-2SA. Esto implica que para la PTX2-SA, el nivel de tolerancia debe estar entre 0,5 y 1,5 $\mu\text{g}/100$ g de tejido comestible con consumos entre 100 y 300 g por comida.

YTXs

No hay información disponible en seres humanos para las YTXs. El nivel de seguridad está, por tanto, basado en datos para animales. Se estimó el NOAEL en los ratones en 1,0 mg/kg pc mediante administración oral aguda basada en los efectos cardíacos. Se ha calculado un nivel de seguridad para los seres humanos de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc para efectos tóxicos agudos YTX con un factor de incertidumbre de 100. Para un adulto con un peso de 60 kg, esto representaría un nivel de seguridad de 600 μg de YTX. Dada la ausencia de datos para administraciones repetidas, y el factor de incertidumbre elevado recomendado por la OMS para una sustancia que lesiona los músculos cardíacos, el nivel indicado de seguridad calculado para los seres humanos podría reducirse en un factor de 6 a 100 μg (EU/SANCO, 2001). EU/SANCO (2001) recomendó un nivel de tolerancia de 100 μg de YTXs/100 g de carne de marisco. Sin embargo, si se estima el consumo de mariscos entre 100 y 300 g por comida, el nivel de tolerancia debe situarse entre 33 y 100 $\mu\text{g}/100$ g de tejido comestible de mariscos.

8.3 Evaluación de riesgos para la intoxicación amnésica por mariscos (ASP)

El valor guía generalmente aplicado de 20 mg DA/kg de mejillones, resulta de un incidente de ASP en el Canadá (Isla Príncipe Eduardo) y ha sido adoptado por varios países. El valor guía de 20 mg DA/kg resulta de una ingesta de 0,03 a 0,1 mg DA/kg pc por persona con un peso corporal de 60 kg y para un consumo de mejillones de entre 100 y 300 g/comida. Los datos epidemiológicos empleados para deducir el valor guía, revelaron efectos gastrointestinales moderados en los seres humanos para 1 mg DA/kg pc. Con posterioridad el valor guía fue evaluado en estudios agudos con animales. Sin embargo, al comparar las dosis necesarias para causar toxicidades evidentes en especies animales, ratones y ratas parecían ser relativamente insensibles comparados con las de monos y con las dosis orales que requerían más toxinas (más de 10 veces en los roedores) para alcanzar los mismos efectos que con una dosificación i.p. Las ratas mostraron efectos evidentes de intoxicación con DA con dosis orales únicas de unos 80 mg/kg pc, en tanto que los monos tenían vómitos, arcadas y bostezos ya a valores de 1 mg/kg de pc. Una única dosis oral de 0,75 mg de DA/kg de pc en monos no produjo efectos evidentes. Esta sensibilidad, aparentemente disminuida, de los roedores puede resultar de su ineptitud para vomitar y/o del hecho de que la vida media del plasma del DA en la rata es unas 6 veces menor que la del mono. Comparando el valor guía de 20 mg DA/kg de tejido de mejillones (~ 0.1 mg/kg pc para seres humanos y suponiendo un consumo de 300 g de mejillones por comida) con la dosis sin-efecto (0,75 mg/kg pc) en estudios orales agudos con monos, entre estos valores aparece un factor menor de 10. Se desconocen los efectos de exposiciones prolongadas a niveles bajos de DA. Sin embargo, los estudios de corto plazo con animales con exposiciones repetidas no apuntan a una eliminación alterada del DA del suero o a respuestas neurotóxicas superiores a las resultantes de exposiciones simples.

Para las 10 personas involucradas en el incidente canadiense (personas mayores con edades entre los 60 y los 84 años) pudieron determinarse datos dosis-respuesta razonablemente buenos. De acuerdo con estos datos el NOAEL era de 0,2-0,3 mg DA/kg pc, en tanto que el LOAEL de 0,9-2,0 mg DA/kg pc para intoxicaciones serias registradas con valores de 1,9 a 4,2 mg DA/kg pc. Resulta interesante que las estimaciones de ingesta mostraron consumos sorprendentemente elevados de mejillones azules, 120 a 400 g de carne de mejillones por persona y por comida (Aune, 2001). Esto implica que hay un factor dos entre el NOAEL y el límite reglamentario de 20 mg DA/kg de carne de mejillones que equivale a 0,1 mg/kg pc para una persona de 60 kg de peso que consume 300 g de carne de mejillones por comida. Entre el LOAEL y el límite reglamentario hay un margen de 9 a 20 y entre el nivel de efectos serios y el límite reglamentario el margen es de 19 a 42.

8.4 Evaluación de riesgos para la intoxicación neurológica por mariscos (NSP)

No es posible el análisis de riesgos por falta de suficientes datos toxicológicos y por las dificultades analíticas relacionadas con la determinación de la exposición a la brevetoxina. La gestión de riesgos que se realiza actualmente (en los estados costeros del Golfo de México) se basa en el cierre de las bases de mariscos a valores de 5000 *G. breve* células/litro volviéndose a abrir cuando la determinación de la Tx en los mariscos es menor a 80 µg/100 g.

8.5 Evaluación de riesgos para la intoxicación azaspiracida por mariscos (AZP)

EU/SANCO (2001), basado en incidentes de intoxicaciones en Irlanda, afirma que los niveles de AZAs calculados y causantes de intoxicaciones en seres humanos están entre 6,7 y 24,9 µg. Estos valores incluían una disminución en el contenido de AZA resultante del calentamiento de los mejillones. Los nuevos datos de estabilidad térmica indican que estaba justificada esta reducción del contenido de toxinas debida al calentamiento. En consecuencia, el rango nuevamente calculado para el nivel mínimo con efecto adverso observable (LOAEL) parecía estar entre 23 y 86 µg por persona suponiendo un consumo máximo de 100 g de mariscos por comida. EU/SANCO (2001) aplicaron un factor de seguridad de tres para convertir el LOAEL en un NOAEL. Basándose en un nivel de ingesta con un máximo de 100 g de carne de marisco/comida y con el LOAEL más bajo dividido por tres,

EU/SANCO (2001) afirman que un nivel de tolerancia de 8 µg AZAs/100 g de marisco debiera resultar en un riesgo no apreciable para la salud humana. Se ha sugerido un nivel de 16 µg/100 g para permitir la detección por el bioensayo en ratón. Sin embargo, con consumos de mariscos de 300 g por comida, un individuo ya ingeriría una cantidad de AZAs equivalente al LOAEL para seres humanos.

Ofuji *et al.* (1999b) informaron en incidentes de intoxicación un nivel de 1,4 µg/g para el AZAs total en carne cruda de mejillones. Esto equivale a una ingesta de 140 a 420 µg AZAs/persona, con consumos de 100 a 300 g por comida. Para calcular el NOAEL se aplica comúnmente un factor de 10 por representar estos valores un nivel de efecto (LOAEL). Esto significa que el NOAEL es de 14 a 42 µg por persona suponiendo un consumo de 100 a 300 g de carne de mariscos/comida. Como resultado el nivel de tolerancia para la carne de mariscos debe ser de 14 µg/100 g. Debe señalarse que no se aplicó un factor de 10 al NOAEL para tener en cuenta las diferencias entre especies (variación en la población humana).

8.6 Evaluación de riesgos para la intoxicación por ciguatera en pescado (CFP)

Los datos disponibles sobre ciguatera para animales no son adecuados para un análisis de riesgos. En consecuencia, debieran emplearse datos de seres humanos resultantes de incidentes de intoxicación.

Son de esperar ya síntomas ligeros de CFP en algunos individuos luego de ingerir pescados con la principal ciguatoxina del Pacífico (la P-CTX-1) en un nivel de 0,1 µg/kg. La principal ciguatoxina del Caribe (C-CTX-1) es menos polar y 10 veces menos tóxica que la P-CTX-1. Suponiendo consumos de pescado de 500 g por comida y un peso corporal del ser humano de 50 kg, esto se corresponde con 0,001 µg/kg pc (=LOAEL). Estos valores resultan de un servicio importante de comidas con el pescado menos tóxico causante de efectos en algunos seres humanos. Es de esperar que un nivel de 0,01 µg/kg pc resulte tóxico para la mayoría de las personas por ser diez veces superior al nivel responsable de síntomas ligeros en algunos individuos. Puede calcularse un nivel “seguro” de 0,01 µg/kg de carne de pescado, empleando un factor de incertidumbre de 10 (por las diferencias entre especies) al menor nivel responsables de síntomas suaves en los seres humanos (=LOAEL), (Lehane, 2000; Lehane y Lewis, 2000). Debe señalarse que no se utilizó el factor de incertidumbre habitual de 10 sobre el LOAEL para calcular el NOAEL.

8.7 Comentarios finales

La evaluación de riesgos para las ficotoxinas no se ha realizado, hasta el momento, de manera simple. El proceso se ha complicado al mezclarse la evaluación de riesgo y la gestión de riesgos. Hay, en general, carencias de datos toxicológicos particularmente para las exposiciones repetidas. Con sus propias limitaciones, se disponía de datos epidemiológicos de incidentes de intoxicaciones, lo que permitió evaluaciones de riesgo provisionarias para algunas ficotoxinas, las que no siempre fueron lógicas y consistentes. Para algunas ficotoxinas, la evaluación de riesgos no se ha podido realizar por falta de un mínimo de datos.

De disponerse de datos científicos adecuados (toxicológicos, epidemiológicos y de presencia), podría hacerse una evaluación de riesgos empleando factores de seguridad y de incertidumbre aceptados generalmente. Con conjuntos adecuados de datos para animales, puede deducirse el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL). Para los seres humanos puede calcularse un nivel seguro empleando para el NOAEL un factor de incertidumbre de 100 (10 para diferencias entre especies y 10 para diferencias intra especies). De disponerse de un conjunto adecuado de datos para seres humanos un nivel seguro resulta de aplicar un factor de incertidumbre de 10 al NOAEL (para tener en cuenta las diferencias intra especies), resultante de esos datos sobre humanos.

9. Conclusiones y recomendaciones

9.1 Conclusiones

El consumo de diversos mariscos y pescados ocasiona mundialmente un número creciente de intoxicaciones en los seres humanos. El diagnóstico se basa principalmente en el reconocimiento de señales y síntomas específicos y en la identificación de las toxinas marinas presentes en los frutos del mar. Debido a los métodos analíticos inadecuados, habitualmente no se dispone ni de indicadores de los efectos ni de la exposición, para las a veces complejas mezclas de toxinas de algas. Por lo general sus efectos se observan como intoxicaciones agudas. Apenas se conocen los efectos resultantes sobre la salud de exposiciones episódicas y de la exposición crónica a niveles bajos de toxinas de algas. Estos últimos efectos pueden pasar sin ser informados por el o los individuos afectados o ser objeto de diagnósticos médicos erróneos.

Para la gestión de riesgos es esencial el seguimiento de la toxicidad de los frutos del mar. No obstante, existen diversas limitaciones, como las variaciones en el contenido de toxinas entre mariscos tomados individualmente, los diferentes métodos de detección y aun de extracción para las diferentes toxinas que requieren decidir cuales son las toxinas a ensayar y la frecuencia del muestreo que asegure que la toxicidad no alcance niveles peligrosos entre los tiempos y los lugares de muestreo, tanto en el tiempo como en el espacio. Pueden, además, incrementar los problemas sanitarios en los seres humanos y las responsabilidades de gestión, las crecientes cosechas de mariscos no tradicionales (como caracoles de la luna, busicones, percebes, etc.).

Un seguimiento del plancton tóxico permitiría posiblemente superar algunos de estos problemas. Sin embargo, las poblaciones de plancton son efímeras y espaciadas y resulta difícil establecer una correlación cuantitativa entre la cantidad de plancton tóxico y los niveles de toxinas en los mariscos y la cantidad de toxina por célula, muy variable. Los datos de presencia de especies de toxinas de algas pueden indicar cuales son las toxinas esperables durante los periodos de floración de las algas y cuales productos de mariscos debieran considerarse para el seguimiento analítico. Un problema es que algunas especies de algas, desconocidas en una zona determinada, pueden aparecer de manera repentina y causar problemas rápidamente. Las observaciones sobre el plancton se emplean para dirigir los ensayos de toxicidad, pero no para adoptar decisiones reglamentarias sin otro tratamiento. Más aun, la mayor parte de los programas de seguimiento y reglamentarios son con frecuencia inadecuados para enfrentar las crecientes amenazas de las nuevas floraciones de algas perjudiciales. Como resultado, cuando ocurren nuevos brotes, la respuesta es frecuentemente lenta y no coordinada. Las floraciones de algas son impredecibles y la información sobre su inicio escasa.

Las floraciones tóxicas se detectan fundamentalmente por confirmación visual (decoloración de las aguas y mortandad de peces), enfermedades en personas que han consumido mariscos y/o irritación respiratoria, aunque la toxicidad real sea solo verificada mediante largos bioensayos en ratón y análisis químicos de muestras de mariscos. Esta estrategia “posterior a los hechos” resulta de las grandes dificultades para predecir la presencia y magnitud de la floración. Para evitar la contaminación de seres humanos, son en general suficientes programas de seguimiento basados en la enumeración e identificación microbiológica de las especies perjudiciales en las muestras de aguas. Las técnicas de seguimiento microscópico, sin embargo, requieren de una alta habilidad taxonómica, son largas y, dependiendo de la persona que las realice, muy variables.

Uno de los problemas más serios es la falta de información sobre la biología de las algas perjudiciales es., Se sabe muy poco, por ejemplo, de la abundancia, distribución, dinámica poblacional y fisiología de las especies más perjudiciales, tanto en aguas locales como de otras zonas. Es esencial el seguimiento rutinario y de largo plazo del fitoplancton y del medio ambiente, para obtener los datos necesarios que permitan determinar, al menos, la ecología más elemental de las especies perjudiciales. Además, por ser compleja la dinámica de la floración, los factores determinantes en una zona geográfica, en particular pueden no afectar la misma especie en otra zona, aunque próxima. En

consecuencia, son deseables sistemas de evaluación alternativos para predecir la ocurrencia de floraciones.

Son diversos los factores que juegan para fijar criterios reglamentarios y límites para las toxinas marinas; como la disponibilidad de datos de encuestas, de datos toxicológicos, de la distribución de las toxinas en los lotes muestreados y de la estabilidad de las muestras, de métodos analíticos y de reglamentaciones ya vigentes en diferentes países. Respecto a la toxicidad, hasta ahora sólo se dispone para la mayoría de las toxinas marinas de datos de toxicidad oral aguda tanto para animales de laboratorio como para seres humanos. Sin embargo, puede ser frecuente la exposición repetida a niveles de dosis subletales.

En lo que hace a los métodos de detección, existe una necesidad mundialmente generalizada de que sean rápidos, confiables y sensibles para la determinación de las toxinas marinas en mariscos y pescados. El bioensayo en ratón disponible actualmente no resulta lo suficientemente sensible, lleva tiempo, es susceptible a las interferencias y no ético respecto al bienestar de los animales. Quilliam (1998b) aboga por el empleo de la CL-EM como método de detección universal para todas las toxinas marinas. Esta técnica ofrece un bajo límite de detección, una alta sensibilidad y la capacidad de enfrentar la diversidad estructural y la naturaleza lábil de las toxinas. Además, hace posible la separación de mezclas complejas, su determinación cuantitativa exacta y precisa, la automatización y un elevado número de análisis, con resultados aceptables legalmente para confirmar toxinas y obtener información estructural de nuevas toxinas.

Otro nuevo desarrollo prometedor son los biosensores con los que pueden determinarse simultáneamente multiplicidad de toxinas.

Puede acelerarse el desarrollo y el empleo de nuevos métodos analíticos, idóneos y eficientes, suministrando información de manera rápida y adecuada, por ejemplo, mediante una base de datos accesible por Internet. La base de datos debe incluir los nombres químicos, las propiedades físicas/químicas, las clasificaciones, el o los efectos tóxicos, las fuentes, el hábitat, los límites reglamentarios y referencias bibliográficas.

9.1.1 Conclusiones relativas a la intoxicación paralítica por mariscos (PSP)

Los niveles de tolerancia fijados para las toxinas PSP son hasta ahora decisiones prácticas basadas en casos de intoxicación y aunque haya muchos casos informados debidamente de intoxicaciones de seres humanos atribuibles a las toxinas de mariscos, resulta difícil obtener datos de toxicidad humana *confiables*. Por ejemplo, las variaciones observadas en la toxicidad humana de las toxinas PSP pueden no sólo deberse a variaciones en la sensibilidad entre personas sino también a la composición de las toxinas individuales en las muestras. Los perfiles de las toxinas pueden variar según la especie de marisco consumido y la zona de cosecha. Además, las dosis tóxicas se estiman con frecuencia sobre restos de alimentos marinos. Estos no son necesariamente representativos de los alimentos ingeridos pues las toxinas PSP pueden estar distribuidas irregularmente en los lotes y dentro de los propios mariscos individuales, además de no ser todas las toxinas PSP estables.

Los diversos métodos analíticos con los que es posible medir los compuestos de PSP tienen todas limitaciones y a menudo no son fácilmente realizables debido a la falta de materiales de referencia, pese a los recientes avances en este campo. En el año 2003, había disponibles comercialmente estándares certificados de las toxinas STX, neoSTX, dc-STX, GNTX 1-4, GNTX 2/3 y GNTX 5. Sin embargo, resultan costosos y disponibles básicamente de una única fuente. Aun así, mejora significativamente con ellos la calidad de los datos obtenibles con los métodos de CL. Los esfuerzos del Programa de Normas, Medidas y Ensayos de la Comisión Europea, han resultado en materiales de referencia para mariscos con fracciones de masa certificadas para algunas de las toxinas PSP toxicológicamente más significativas. A pesar de estos desarrollos positivos, la situación analítica permanece difícil y la falta de compuestos PSP puros en cantidades suficientes para estudios repetidos

de dosis de toxicidad resulta un factor limitante para el desarrollo de una evaluación de riesgos confiable.

9.1.2 Conclusiones relativas a la intoxicación diarreica por mariscos (DSP)

La variedad de actividades biológicas de las toxinas DSP puede causar algunos problemas. Aunque las PTXs y YTXs resultan agudamente tóxicas en ratones luego de inyecciones i.p., se desconoce su toxicidad oral en seres humanos. En consecuencia, debe disponerse de más datos toxicológicos de las PTXs y de las YTXs. Además, la OA y la DTX poseen actividad promotora de tumores, en tanto que la OA muestra también actividad genotóxica e inmunotóxica. Estos efectos plantean preguntas sobre los riesgos para la salud humana a exposiciones subcrónicas a niveles bajos de estos compuestos. Un problema acuciante es la falta de cantidades suficientes de toxinas DSP que permitan realizar estudios de toxicidad subcrónica en animales.

Aunque se aplican mundialmente, los bioensayos para la toxicidad DSP, hay una gran diferencia en el comportamiento de, por ejemplo, el bioensayo en ratón (el punto final de la toxicidad es la muerte del animal; sin consenso sobre el tiempo de observación adecuado) en los diferentes países, lo que resulta en diferencias de especificidad y detectabilidad. Un problema importante es que los bioensayos en ratón detectan todos los componentes de la DSP y quizás también otras toxinas. Sin embargo, no es posible distinguir entre las diferentes toxinas aun cuando se han fijado límites legales específicos para los grupos de toxinas (por ejemplo en la UE). Por otra parte, los bioensayos en ratas sólo detectan la OA y las DTXs por ser los puntos finales de este análisis heces blandas, diarreas y rechazo de los alimentos que se sabe son sólo causados por las OA y las DTXs (y las AZAs).

Los métodos químicos (CL) resultan útiles para la identificación y cuantificación de toxinas diarreicas seleccionadas (en general OA o DTXs). Recientemente se desarrolló un método de CL para la detección de YTXs, pero hasta el momento no se dispone de ninguno para las PTXs salvo la CL-EM, que no es aun satisfactorio. Los métodos químicos se emplean como una herramienta reglamentaria para confirmar los resultados obtenidos de un bioensayo.

Ninguna de las muchas aproximaciones empleadas para la determinación de la DSP en mariscos ha sido formalmente evaluada mediante estudios colaborativos de la ISO/IUPAC/AOAC por lo que las características de funcionamiento no son conocidas completamente. El desarrollo posterior, la evaluación y la comparación de las diversas técnicas resultaría significativamente más simple de poderse desarrollar y poner a disposición de la comunidad científica estándares y materiales de referencia confiables (como muestras de mejillones liofilizadas y con contenido certificado de las diferentes toxinas DSP).

9.1.3 Conclusiones relativas a la intoxicación amnésica por mariscos (ASP)

Los problemas derivados de las toxinas amnésicas de los mariscos son comparativamente de menor magnitud que los resultantes de los paráliticos y diarreicos. El único brote confirmado e informado a nivel mundial de ASP, resultante en enfermedades graves, tuvo lugar en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá. Con posterioridad al primer brote en el Canadá, solamente se observaron enfermedades en seres humanos (benignas y cortas) en un brote causado por el consumo de navajuelas contaminadas (de la costa oeste de los Estados Unidos). Las autoridades sanitarias, sin embargo, no pudieron confirmar que la DA fuese responsable por las enfermedades. En dos brotes, se informó de la muerte de cormoranes y/o de pelícanos marrones por consumo de anchoas y caballas contaminadas, lo que indica que los peces herbívoros pueden ser vectores de la DA. La DA también fue recientemente detectada en mariscos de algunos países europeos (1999 a 2002).

Los métodos analíticos para la DA son bastante simples y menos complejos que los requeridos para analizar las toxinas paráliticas y diarreicas en mariscos. Se ha validado exitosamente un método químico para determinar el DA en los mejillones (CL con detector UV) en estudios colaborativos

formales, en tanto que otro método (mejorado) está siendo actualmente objeto de un estudio colaborativo. Se obtienen fácilmente los materiales de referencia certificados y para calibraciones.

9.1.4 Conclusiones relativas a la intoxicación neurológica por mariscos (NSP)

Son posibles diferentes rutas de exposición de los seres humanos a las brevetoxinas; la ruta oral mediante el consumo de mariscos contaminados, la ruta inhalatoria mediante la exposición a brevetoxinas bajo forma de aerosol y la ruta dérmica mediante contacto directo con agua de mar contaminada. Los efectos de las diferentes rutas de exposición en seres humanos son de difícil evaluación al ser limitados los datos de toxicidad de las brevetoxinas. Se dispone de algunos estudios agudos en ratones y de datos de casos de intoxicación en seres humanos y mamíferos marinos; faltan, sin embargo, estudios dérmicos agudos y de inhalación, así como estudios orales, dérmicos y de inhalación con animales de laboratorio sometidos a exposiciones repetidas. No es posible, en consecuencia, realizar la evaluación de peligros.

Para realizar estudios de toxicidad serían necesarias toxinas puras y sus metabolitos. Además, para desarrollar y mejorar aun más la metodología analítica y para permitir el aseguramiento analítico de los laboratorios de control, serían necesarios materiales de referencia analíticos. Actualmente los diferentes obstáculos para una evaluación confiable de la presencia y de la exposición de las brevetoxinas dificultan proseguir con la evaluación de riesgos y, en consecuencia, fijar reglamentos significativos.

A pesar de estos problemas, en unos pocos países hay vigentes reglamentos para las toxinas NSP en mariscos, basadas en bioensayos en ratones, particularmente en los Estados Unidos, Italia y Nueva Zelanda. El nivel de acción es de 20 MU/100 g carne de mariscos (~80 µg PbTx-2/100 g carne de marisco).

9.1.5 Conclusiones relativas a la intoxicación por azaspirácida en mariscos (AZP)

Un motivo de preocupación son los tumores de pulmón en ratones luego de dosis repetidas de 20 µg AZA/kg pc y superiores. Esto debiera confirmarse con experiencias involucrando una cantidad mayor de ratones y periodos de exposición más prolongados (Ito *et al.*, 2002).

El actual nivel de tolerancia debe revisarse a medida que se disponga de nuevos datos. Sin embargo, en todos los estudios, un serio obstáculo es carecer de toxinas puras. A su vez, la producción de toxinas puras requiere disponer de cantidades importantes de mejillones tóxicos. Debiera explorarse el desarrollo de métodos de detección rápidos del tipo de la CL-con detector de fluorescencia (DFL), ELISA y ensayos funcionales.

9.1.6 Conclusiones relativas a la intoxicación ciguatera en pescado (CFP)

La intoxicación por ciguatera tiene lugar principalmente en las regiones tropicales del planeta, siendo esporádica en Europa, particularmente en los países de Europa del norte. Para aquellos países fuera de una zona en que la CFP es endémica, resulta adecuado un control analítico regular de las ciguatoxinas en los pescados importados predatorios de gran tamaño.

Hay pocos reglamentos específicos para las ciguatoxinas. Un resultado positivo en un pescado determina su retiro de la venta. A veces, sin analizar la toxina, se imponen restricciones a la venta de pescados de determinadas especies o tamaños provenientes de una zona en particular. Cuanto mayor sea el pescado, seguramente más edad tiene y haya probablemente acumulado más toxina. Como principio, y por considerarlos portadores habituales de ciguatoxina, con frecuencia se prohíbe la venta de pescados carnívoros que habitan en arrecifes. El peligro se asocia con la acumulación de toxina en la cadena alimentaria, imposible de relacionar con ninguna floración de algas. El conteo de células en

el plancton no permite predecir si el pescado ha acumulado o no ciguatoxinas. (Boutrif y Bessey, 2001).

9.2 Recomendaciones

Basado en las conclusiones anteriores, se hacen las recomendaciones siguientes:

1. Se necesitan datos sobre desarrollo de floraciones que tengan en cuenta las condiciones hidrográficas y climáticas y el estado nutricional de la columna de agua.
2. Deben hacerse estudios de toxicidad sobre los efectos luego de exposiciones repetidas a las toxinas marinas.
3. Deben continuar desarrollándose técnicas de química analítica capaces de separar, identificar y cuantificar toxinas marinas individuales.
4. Deben desarrollarse alternativas a los ensayos en ratón cuando ocurran eventos de floración no caracterizados. El énfasis en el uso de técnicas in vitro para floraciones caracterizadas debiera reducir el uso de ensayos en animales vivos.
5. Debe desarrollarse una base de datos, que incluya información básica de las biotoxinas marinas, sus estructuras químicas, sus propiedades físicas/químicas y métodos analíticos, que faciliten la aplicación rápida de métodos analíticos adecuados para las toxinas marinas.
6. Se requiere producir estándares y materiales de referencia certificados de toxinas puras, tanto para datos de toxicidad como para el desarrollo y la validación de técnicas analíticas.
7. Las organizaciones internacionales reconocidas-como el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y la Autoridad Europea de Inocuidad de los Alimentos deben ocuparse de las evaluaciones de riesgo formales basadas en datos toxicológicos y de exposición, científicos y sólidos. De carecerse de datos suficientes, puede encararse una consulta de expertos que explore las posibilidades de una adecuada evaluación de riesgos que sirva de base a reglamentos significativos.

Referencias

- Aase, B. & Rogstad, A.** 1997. Optimization of sample clean-up procedure for determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins by use of experimental design. *J. Chromatogr., A* 764: 223-231.
- Adachi, M., Sako, Y. & Ishida, Y.** 1996. Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* y *A. tamarense* (Dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization. *J. Phycol.*, 32: 1049-1052.
- Alfonso, M., Durán, R. & Arufe, M.C.** 2000. Effect of excitatory amino acids on serum tsh and thyroid hormone levels in freely moving rats. *Hormone Research* 54: 78-83.
- Ammons, D. Rampersad, J. & Poli, M.A.** 2001. Evidence for PSP in mussels in Trinidad. *Toxicon* 39: 889-892.
- Amorim, A. & Dale, B.** 1998. Distribution of cysts from toxic or potentially toxic dinoflagellates along the Portuguese coast. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae* (June 1997, Vigo, Spain), pp. 64-65. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Amzil, Z., Pouchus, Y.F., Le Boterff, J., Roussakis, C., Verbist, J.F., Lebaut, C. & Masselin, P.** 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* 30 (11): 1419-1425.
- Amzil, Z., Fresnel, J. Le Gal, D. & Billard, C.** 2001. Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39: 1245-1251.
- Anderson, D. M.** 1994. Red Tides. *Scientific American* 271: 62-68.
- Anderson, D.M.** 1997. Diversity of harmful algal blooms in coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* 42(5):1009-1022.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Qi, Y.Z., Zheng, L., Lu, S. & Lin, Y.T.** 1996. Paralytic shellfish poisoning in southern China. *Toxicon* 34(5): 579-590.
- Andrinolo, D., Michea L.F. & Lagos N.** 1999a. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP) in cats. *Toxicon* 37: 447-464.
- Andrinolo, D., Santinelli, N., Otano, S., Sastre, V. & Lagos, N.** 1999b. Paralytic shellfish toxins in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdes Peninsula, Chubut, Patagonia, Argentina: kinetics of a natural depuration. *J. Shellfish Res.* 18(1): 203-209.
- Angibaud, G. & Rambaud, S.** 1998. Serious neurological manifestations of ciguatera: is the delay usually long? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64: 688-694.
- Angibaud, G., Leveque J.M., Laurent D. & Gaultier C.** 2000. Manifestations neurologiques consécutives à la consommation d'un coquillage du lagon Calédonien. *Rev. Neurol.* 156(1): 65-66.

- Anonymous.** 1982. Epidemiologic Notes and Reports Ciguatera Fish Poisoning, the Bahamas, Miami. *Morb. Mortal. Weekly Report* 31(28): 391-392.
- Anonymous.** 1986. Epidemiologic Notes and Reports Ciguatera Fish Poisoning, Vermont. *Morb. Mortal. Weekly Report* 35(16): 263-264.
- Anonymous.** 1991. Epidemiologic Notes and Reports Paralytic Shellfish Poisoning, Massachusetts and Alaska. *Morb. Mortal. Weekly Report* 40(10): 157-161.
- Anonymous.** 1993. Ciguatera Fish Poisoning, Florida, 1991. *Morb. Mortal. Weekly Report* 42(21): 417-418.
- Anonymous.** 1995. PSP Paralytic Shellfish Poisoning Strikes Again. *State of Alaska Epidemiology Bulletin* No. 11, 27 April 1995, 2 pp.
- Anonymous.** 1997a. PSP Proves Fatal to Kodiak Islander. *State of Alaska Epidemiology Bulletin* No. 30, 4 August 1997, 2 pp.
- Anonymous.** 1997b. Two PSP Outbreaks in Hit Juneau. *State of Alaska. Epidemiology Bulletin* No. 42, 8 December 1997, 2 pp.
- Anonymous.** 1999a. Accelerated detoxification system for live marine shellfish contamination by PSP toxins, European Commission Project Shellfish CRAF-1999-72076, N299, Brussels, Belgium.
- Anonymous.** 1999b. Province Report: British Columbia. 1999. Northwest Fisheries Science Center (available at <http://www.nwfsc.noaa.gov>).
- Anonymous.** 2000a. Caution over bi-valve shellfish – Food Safety Authority issues warning. Press release. Food Safety Authority of Ireland (available at www.fsai.ie).
- Anonymous.** 2000b. Ciguatera food poisoning linked to the consumption of imported barracuda – Montreal, Quebec, 1998. Canada Communicable Disease Report 26-09, 1 May 2000.
- Anonymous.** 2001a. August 2001. News Archive. Food Planet (available at www.foodcrisis.com).
- Anonymous.** 2001b. MURSYS-Niedersächsische Küste. Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (available at www.bsh.de).
- Anonymous.** 2001c. Researchers trace toxins from algal blooms through the marine food web in Monterey Bay. Dated 11 January 2001 (available at www.sciencedaily.com/releases/2001/01/010111074158.htm).
- Anonymous.** 2002a. Saxitoxin poisoning, puffer fish – USA: alert. *Morb. Mortal. Weekly Report* 51(15): 321-323.
- Anonymous.** 2002b. Ciguatera Fish Poisoning. Dated 7 February 2002. Travel Medicine Program (TMP) Health Canada (available at www.hc-sc.gc.ca).

Anonymous. 2002c. DSP Algal Toxins in Queen Scallops. News Release. Dated 9 September 2002. Department of Local Government and the Environment, Isle of Man Government (available at <http://www.gov.im/infocentre/>).

Anonymous. 2002d. Cockle-pickers back in business. Dated 2 August 2002. BBC News (available at <http://news.bbc.co.uk>).

Anonymous. 2002e. Monterey Health Warning. Saint Brendan Corp. (available at www.saintbrendan.com/cdnmay02/Kelp5.html).

Anonymous. 2002f. Mammal, bird die-off, domoic acid, USA (CA). Dated 22 May 2002. Community College Library, University of Hawai'i (available at <http://library.kcc.hawaii.edu>)

Anonymous. 2003a. Red Tides. Department of Environmental Affairs & Tourism, South African Government (available at www.environment.gov.za, accessed on 12 February 2003)

Anonymous. 2003b. General information on toxic shellfish poisoning. Health Protection. Public Health South, New Zealand (available at www.phsouth.co.nz/prot_shelhzdetails.html).

Anonymous. 2003c. Monitoring programme for algal toxins in shellfish from Scotland. Press release. Food Standards Agency, UK (available at www.food.gov.uk/news/newsarchive).

ANZFA. 2001. Shellfish toxins in food. A toxicological review and risk assessment. Technical Report Series No. 14. November 2001. Australia New Zealand Food Authority (ANZFA) (available at www.nicnas.gov.au/australia/fsanz.htm).

AOAC. 1990. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. *In* Hellrich, K. ed. *Official Method of Analysis*. 15th Edition, pp. 881-882, Sec 959.08. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Virginia, USA.

APEC. 1997. Report of the task team on algal biotoxin regulations. Dated 21 May 1997. Marine Resource Conservation Working Group, Project on Management of Red Tides and Harmful Algal Blooms (MRT/HAB), Pusan, Republic of Korea.

Appel, N.M., Rapoport, S.I., O'Callaghan, J.P., Bell, J.M. & Freed, L.M. 1997. Sequelae of parenteral domoic acid administration in rats: comparison of effects on different metabolic markers in brain. *Brain Research* 754: 55-64.

Arcila-Herrera, H., Castello-Navarrete A., Mendoza-Ayora J. & et al. 1998. Diez casos de ciguatera en Yucatán. *Rev. Invest. Clin.* 50: 149-152.

Arévalo, F.F., Bermudez de la Puente, M. & Salgado C. 1998. ASP toxicity in scallops: individual variability and tissue distribution. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1997, Vigo, Spain), pp. 499-502. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Asaeda, G. 2001. The transport of ciguatoxin in a case report. *J. Emerg. Med.* 20(3): 263-265.

Asakawa, Manabua; Nishimura, F., Miyazawa, K. & Noguchi, T. 1997. Occurrence of paralytic shellfish poison in the starfish *Asterias amurensis* in Kure Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon* 35(7): 1081-1087.

- Aune, T.** 2001. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. In De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 515-526. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
- Aune, T. & Yndestad, M.** 1993. Chapter 5. Diarrhetic shellfish poisoning. In Falconer, I.R. ed. 1993. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, pp. 87-104. London, UK, Academic Press.
- Aune, T., Yasumoto, T. and Engeland, E.** 1991. Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 34: 1-9.
- Aune, T. Stabell, O.B., Nordstoga, K. & Tjøtta, K.** 1998. Oral toxicity in mice of algal toxins from the diarrhetic shellfish toxin (DST) complex and associated toxins. *J. Nat. Toxins* 7(2): 141-158.
- Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H. & Landsverk, T.** 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40: 77-82.
- Ayres, D.** 2002. Razor clam opener cancelled due to high toxin count. News Release dated 1 October 2001 Washington Department of Fish and Wildlife, Washington States, USA (available at www.wa.gov/wdfw/do/oct02/oct0102a.htm).
- Ayres, D.** 2003. Razor clam season still clouded by high toxin counts. News Release dated 14 January 2003. Washington Department of Fish and Wildlife, Washington States, USA. (available at <http://wdfw.wa.gov>).
- Baden, D.G. & Mende, T.J.** 1982 Toxicity of two toxins from the Florida red tide marine dinoflagellate, *Ptychodiscus brevis*. *Toxicon* 20(2): 457-461.
- Baden D.G., Mende, T.J., Szmant A.M., Trainer, V.L., Edwards, R.A. & Roszell, L.E.** 1988. Brevetoxin binding: molecular pharmacology versus immunoassay. *Toxicon* 26(1): 97-103.
- Baden, D.G., Melinek, R., Sechet, V., Trainer, V.L., Schultz, D.R., Rein, K.S., Tomas, C.R., Delgado, J. & Hale, L.** 1995. Modified Immunoassays for Polyether Toxins: implications of biological matrixes, metabolic states, and epitope recognition. *J. AOAC Int.* 78(2): 499-508.
- Bagnis, R., Bennet, J., Barsinas, M., Chebret, M., Jacquet, G., Le Chat, I., Mitermite, Y., Perout, P.H. & Rongras, S.** 1985. Epidemiology of ciguatera in French Polynesia from 1960 to 1984. In Gabrie, C. & B. Salvat, eds. *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress*, 4, pp. 475-482. Tahiti.
- Bagnis, R., Barsinas, M., Prieur, A., Pompon, E., Chungue, E. & Legrand, A.M.** 1987. The use of mosquito bioassay for determining toxicity to man of ciguateric fish. *Biol. Bull.* 172: 137-143.
- Bagøien, E., Miranda, A., Reguera, B. & Franco, J.M.** 1996. Effects of two paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons*. *Mar. Biol.* 126(3): 361-369.

- Banner, A.H. et al.** 1960. Observations on ciguatera-type toxin in fish. *Ann. NY Acad. Sci.* 90: 770-787.
- Bates, S.S.** 2000. Domoic-acid producing diatoms: another genus added! *J. Phycol.* 36: 978-985.
- Bates, H.A. & Rapoport, H.** 1975. A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. Agric. Food Chem.* 23: 237-239.
- Bates, H.A. & Rappoport, H.** 1978. A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications. *J. Agric. Food Chem.* 26: 252-254.
- Bates, S.S., Bird C.J., de Freitas A.S.W., Foxall, R., Gilgan M.W., Hanic L.A., Johnson G.E., McCulloch A.W., Odense P., Pocklington R.G., Quilliam M.A., Sim P.G., Smith J.C., Subba Rao D.V., Todd E.C.D., Walter J.A. & Wright J.L.C.** 1989 Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1203-1215.
- Bates, S.S., deFreitas, A.S.W., Milley, J.E., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Smith, J.C. & Worms, J.** 1991. Controls on domoic acid production by the Diatom *Nitzschia pungens* f. multiseriis in culture: nutrient and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1136-1144.
- Bates, M., Baker, M., Wilson, N., Lane, L. & Handford, S.** 1993. Epidemiologic overview of the New Zealand shellfish toxicity outbreak. In Jasperse, J.A. ed. 1993. *Marine toxins and New Zealand shellfish. Proceedings of a workshop on research issues*, June 1993, pp. 35-40. The Royal Society of New Zealand, Miscellaneous Series 24.
- Bauder, G. & Grant, J.** 1996. Kinetics of diarrhetic shellfish toxins in the bay scallop, *Argopecten irradians*. *J. Shellfish Res.* 15(2): 501-502.
- Bavastrelli, M., Bertucci, P., Midulla, M., Giardini, O. & Sanguigni, S.** 2000. Ciguatera fish poisoning: an emerging syndrome in Italian travelers. *J. Travel. Med.* 8: 139-142.
- Beadle, A.** 1997. Ciguatera fish poisoning. *Military Medicine* 162(5): 319-322.
- Béchemin, C., Grzebyk, D., Hachame, F., Hummert, C. & Maestrini, S.Y.** 1999. Effect of different nitrogen/phosphorous nutrient ratios on the toxin content in *Alexandrium minutum*. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 20: 157-165.
- Benoit, E., Legrand, A.M. & Dubois, J.M.** 1986 Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fiber. *Toxicon* 24: 357-364.
- Benson, J.M., Tischler, D.L. & Baden, D.G.** 1999. Uptake, distribution, and excretion of brevetoxin 3 administered to rats by intratracheal instillation. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 56: 345-355.
- Benton, B.J., Keller, S.A., Spriggs, D.L., Capacio, B.R., et al.** 1998. Recovery from the lethal effects of saxitoxin a therapeutic window for 4-aminopyridine (4-AP). *Toxicon* 36(4): 571-588.
- Berenguer, J.A., Gonzalez, L., I. Jimenez, et al.** 1993. The effect of commercial processing on the paralytic shellfish poison (PSP) content of naturally contaminated *Acanthocardia tuberculatum* L. *Food Additives and Contaminants.* 10(2): 217-230.

- Blanco, J., Franco, J.M., Reyero, M.I. & Moroño, A.** 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158: 165-175.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A. & Moroño, A.** 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176: 153-163.
- Blume, C., Rapp, M., Rath, J., Arendt, G., Köller, H., Bach, D. & Grabensee, B.** 1999. Die Ciguatera-Vergiftung. Wachsende differentialdiagnostische Bedeutung im Zeitalter des Fernreistourismus. *Med. Klin.* 94(1): 45-49.
- Boesch, D.F., Anderson, D.M., Horner, R.A., Shumway, S.E., Tester, P.A. & Whitedge, T.E.** 1997. Harmful algal blooms in coastal waters: options for prevention control and mitigation. *NOAA Coastal Ocean Program, Decision Analysis No. 10, Special Joint Report with the National Fish and Wildlife Foundation, February 1997.*
- Boisier, P., Ranaivoson, G., Rasolofonirina, N., Andriamahefazafy, B., Roux, J., Chanteau, S., Satake, M. & Yasumoto, T.** 1995. Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): Clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. *Toxicon* 33(10): 1359-1364.
- Bourdelaïs, A.J., Tomas, C.R., Naar, J., Kubanek, J. & Baden, D.G.** 2002. New fish-killing alga in Coastal Delaware produces neurotoxins. *Environ. Health Perspect.* 110(5) : 465-470.
- Bossart, G.D., Bossart, G.D., Baden, D.G., Ewing, R.Y., Roberts, B. & Wright, S.D.** 1998. Brevetoxicosis in Manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996. Epizootic: Gross, Histologic, and Immunohistochemical Features. *Toxicol Pathol* 26(2): 276-282.
- Botana, L.M., Rodriguez-Vieytes, M., Alfonso, A. & Louzao, M.C.** 1996. Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. In Nolle, L.M.L. ed. *Handbook of food analysis – residues and other food component analysis*, Volume 2: 1147-1169.
- Botrè, F. & Mazzei, F.** 2000. Inhibition enzymic biosensors: an alternative to global toxicity bioassays for the rapid determination of phycotoxins. *Int. J. Environment and Pollution* 13 (1-6), 173-189.
- Bouaïcha, N., Hennion, M.C., Sandra, P.** 1997a. Determination of okadaic acid by micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection. *Toxicon* 35(2) : 273-281.
- Bouaïcha, N., Ammar, M., Hennion, M.C. & Sandra, P.** 1997b. A new method for determination of maitotoxin by capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection. *Toxicon* 35 (6): 955-962.
- Boutrif, E. & Bessey, C.** 2001. Global significance of mycotoxins and phycotoxins. In De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 3-16. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
- Bower, D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A. & Howden, M.E.H.** 1981. Nonprotein neurotoxins. *Clin. Toxicol.* 18: 813-843.

- Boyer, G.L., Sullivan, J.J., Andersen, R.J., Harrison, P.J. & Taylor, F.J.R.** 1986. Toxin production in three isolates of *Protogonyaulax* sp. In Anderson, D.M., White, A.M. & Baden, D.G. eds. *Toxic dinoflagellates*, pp. 281-286. New York, Elsevier.
- Bravo, I., Reyero, M.I., Cacho, E., et al.** 1999. Paralytic shellfish poisoning in *Haliotis tuberculata* from the Galician coast: geographical distribution, toxicity by lengths and parts of the mollusc. *Aquatic Toxicology* 46(2): 79-85.
- Bricelj, V.M. & Shumway, S.E.** 1998. An overview of the occurrence and transfer kinetics of paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 431-436. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Burgess, V. & Shaw, G.** 2001. Pectenotoxins – an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism. *Environment International* 27: 275-283.
- Busby, P. & Seamer, C.** 2001. Issues in implementing new marine biotoxin management practices. *Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p.12.
- Butera, R., Buonocore, M., Gandini, C., Locatelli, C., Manzo, L. & Prockop, L.D.** 2000. Mild ciguatera poisoning: case reports with neurophysiological evaluations. *Muscle and Nerve* 23 (10): 1598-1603.
- Carmody, E.P., James, K.J. and Kelly, S.S.** 1996. Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland. *Toxicon* 34(3): 351-359.
- Caroppo, C., Congestri, R. & Bruno, M.** 1999. On the presence of *Phalacrocoma rotundatum* in the southern Adriatic Sea (Italy). *Aquat. Microb. Ecol.* 17: 301-310.
- Carvajal, P.** 2002. Chile-Shellfish toxins. Shellfish toxin death in Southern Chile leads to ban. E-mail dated 27 March 2002.
- Castonguay, M., Levasseur, J.L., Beaulieu, Grégoire, F., Michaud, S., Bonneau, E., Bates, S.S.** 1997. Accumulation of PSP toxins in Atlantic mackerel: seasonal and ontogenic variations. *J. Fish Biol.* 50: 1203-1213.
- Cattet, M. & Geraci, J.R.** 1993. Distribution and elimination of ingested brevetoxin (PbTx-3) in rats. *Toxicon* 31(11): 1483-1486.
- Cembella, A.D. & Lamoreux, G.** 1991 *Rev. Int. Oceanogr. Med.* In Van Egmond H.P. et al. 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
- Cembella, A.D., Milenkovic, L., Doucette, G., Fernandez, M.** 1995. *In Vitro* biochemical and cellular assays. In Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & A.D. Cembella, eds. *Manual on harmful marine microalgae*. IOC Manuals and Guides No.33. UNESCO.
- CEN.** 2002a. European Prestandard ENV 14194. Foodstuffs – Determination of saxitoxin and dc-saxitoxin in mussels – HPLC method using post column derivatization. European Committee for Standardization (CEN). April 2002.

CEN. 2002b. European Standard. DRAFT. prEN 14526. European Committee for Standardization (CEN). August 2002.

CEN. 2002c. prEN 14176. Foodstuffs – Determination of domoic acid in mussels by HPLC. European Committee for Standardization (CEN).

Cendes F., Anderman, F.A., Carpenter, S., Zatorre, R.J. & Cashman N.R. 1995. Temporal Lobe Epilepsy Caused by Domoic Acid Intoxication: Evidence for Glutamate Receptor-mediated Excitotoxicity in Humans. *Ann. Neurol.* 37: 123-126.

Chan, T.Y.K. 1995. Shellfish-borne illnesses. *Tropical Geographical Medicine* 47(6): 305-307.

Chan, T.Y.K. and Kwok, T.C.Y. 2001. Chronicity of neurological features in ciguatera fish poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 20: 426-428.

Chang, F.H. & McLean, M. 1997. Growth responses of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) as a function of three different nitrogen sources and irradiance. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 31: 1-7.

Chang, F.H., Anderson, D.M., Kulis, D.M. & Till, D.G. 1997a. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand. *Toxicon* 35(3): 393-409.

Chang F.C., Spriggs D.L., Benton B.J., Keller S.A. & Capacio B.R. 1997b. 4-Aminopyridine Reverses Saxitoxin (STX)- and Tetrodotoxin (TTX)-Induced Cardiorespiratory Depression in Chronically Instrumented Guinea Pigs. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38: 75-88.

Chen, C.Y. & Chou, H.N. 1998. Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins from dinoflagellate to gastropod. *Toxicon* 36(3): 515-522.

Chen, H.M., Lin, C.H., & Wang T.M. 1996. Effects of 4-Aminopyridine on Saxitoxin Intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141: 44-48.

Cheun, B.S., Loughran, M., Hayashi, T., Nagashima, Y. & Watanabe, E. 1998. Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 36(10): 1371-1381.

Chinain, M.G., Paulliac, S. & Legrand, A.M. 1999. Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Marine Biology* 135: 259-267.

Chou, H.N. & Chen C.Y. 2001a. Feeding of *Alexandrium minutum* halim to purple clam *Hialuta rostrata* lightfoot as means for the study of accumulation and depuration of gonyautoxins (PSP Toxins). In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 23. IOC UNESCO, Paris.

Chou, H.N. & Chen, C.Y. 2001b. Ichthyotoxicity of paralytic shellfish poisoning toxins. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 22. IOC UNESCO, Paris.

Chu, F.S. & Fan, T.S.L. 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *J. AOAC.* 68: 13-16.

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 direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Agric. Food Chem.* 44: 4034-4047.

Chu, F.S., Hsu, K.H., Huang, X., et al. 1996. Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(12): 4043-4047.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani R. & Yasumoto T. 1997. Yessotoxin in mussels of the Northern Adriatic Sea. *Toxicon* 35(2): 177-183.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti R. & Viviani, R. 1998. Isolation of Adriatoxin a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett.* 39: 8897-8900.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti R. & Viviani R. 1999. Isolation of 45-hydroxyyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37: 689-693.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R. & Viviani, R. 2000a. Structure determination of carboxyhomoyessotoxin, a new yessotoxin analogue isolated from Adriatic mussels. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 770-774.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R. & Viviani, R. 2000b. A New Analogue of Yessotoxin, Carboxyessotoxin, Isolated from Adriatic Sea Mussels. *Eur. J. Org. Chem.* 291-295.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Fiorino, M. & Montresor, M. 2000c. Saxitoxin and neosaxitoxin as toxic principles of *Alexandrium andersoni* (Dinophyceae) from the Gulf of Naples. *Toxicon* 38: 1871-1877.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M. & Poletti, R. 2001. 42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxohomoyessotoxin, a new biotoxin from mussels of the Northern Adriatic Sea. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 596-599.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S. & Poletti, R. 2002. The detection and identification of 42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from Adriatic shellfish by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 979-984.

Clayton, E.C., Peng, Y.G. & Ramsdell, J.S. 1999. Working memory deficits induced by single but not repeated exposures to domoic acid. *Toxicon* 37: 1025-1039.

Collins, J. 2001. Red tide and shellfish poisoning. Botany Department, University of the Western Cape, South Africa (available at www.botany.uwc.ac.za/Envfacts/redtides/).

Compagnon, D., Lembeye, G., Marcos, N., Ruiz-Tagle, N. & Lagos, N. 1998. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the bivalve *Aulocomya ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during an *Alexandrium catenella* bloom in southern Chile. *J. Shellfish Res.* 17(1): 67-73.

Corrales, R.A. & Maclean, J.L. 1995. Impacts of harmful algae on seafarming in the Asia-Pacific areas. *J. Appl. Phycol.* 7: 151-162.

CRL. 1995. State of the art NRLs on marine biotoxins. CRL Rep 01/95, European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins (CRL). Vigo, Spain.

CRL. 2001. Report on the EU-NRLs intercalibration exercise on DSP determination. April, 2001. European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins (CRL). Vigo, Spain.

Croci, L., Lepri, A., Stacchini, A., De Medici, D. & Toti, L. 1997. A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. *Toxicon* 35(2): 223-230.

Croci L., Stacchini, A., Cozzi, L., Ciccaglioni, G., Mazzei, F., Botre, F. & Toti L. 2001. Evaluation of rapid methods for the determination of okadaic acid in mussels. *J. Appl. Microbiol.* 90(1): 73-77.

Crump, J.A., McLay, C.L. & Chambers, S.T. 1999a. Ciguatera fish poisoning. *Postgrad. Med. J.* Nov. 75: 678-679.

Crump, J.A., McLay, C.L. & Chambers, S.T. 1999b. Ciguatera fish poisoning. *New Zealand Med. J.* 112: (102): 282-283.

Daiguji, M., Satake, M., James, K.J., Bishop, A., MacKenzie, L., Naoki, H. & Yasumoto, T. 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-*epi*-Pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem. Lett.* 653-654.

Dakshinamurti, K., Sharma, S.K., Sundaram, M. & Watanabe, T. 1993. Hippocampal changes in developing postnatal mice following intrauterine exposure to domoic acid. *J. Neurosci.* 13(10): 4486-4495.

Davio, S.R. & Fontelo, P.A. 1984 A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin. *Anal. Biochem.* 141: 199-204.

De Carvalho, M., Jacinto, J. & Ramos, N. 1998. Paralytic shellfish poisoning: clinical and electrophysiological observations. *J. Neurol.* 245(8): 551-554.

Dechraoui, M.Y., Naar, J., Pauillac, S. & Legrand, A.M. 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 37: 125-143.

De Fouw, J.C., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. 1999. Ciguatera fish poisoning: a review. RIVM Report No.388802021 (available at www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/388802021.html).

DeFusco, D.J., O'Dowd, P. & Hokama, Y. 1993. Coma due to ciguatera poisoning in Rhode Island. *Am. J. Med.* 95(2): 240-243.

De la Rosa, L.A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M.R. & Botana, L.M. 2001. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 61(7): 827-833.

Deroiche, F., Cohen, E., Rodier, G., et al. 2000. Ciguatera et neuropathie périphérique: un cas. *Rev. Neurol.* 156(5): 514-516.

De Schrijver, K., Maes, I., De Man, L. & Michelet, J. 2002. An outbreak of diarrhoeic shellfish poisoning in Antwerp, Belgium. *Eurosurveillance Monthly Archives* 7(10): 138-141.

Determan, T. 1998. Temporal and spatial distribution of paralytic shellfish poisoning (PSP) in Puget Sound Embayments (available at http://www.psat.wa.gov/Publications/98_proceedings/pdfs/5c_determan.pdf).

Dickey, R.W., Miller, D.M. & Tindall, D.R. 1982. The extraction and effects of crude ciguatoxin from *Scomberomnis cavalla* upon acetylcholine and histamine receptor sites of the guinea pig ileum. *Fed. Proc. Abstract* 7548, 41:1562.

Dickey, R.W., Fryxell, G.A., Granade, H.R. & Roelke, D. 1992a. Detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid in shellfish and phytoplankton in the Gulf of Mexico. *Toxicon* 30(3): 355-359.

Dickey, R.W., Bencsath, F.A., Granade, H.R. & Lewis, R.J. 1992b Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for the determination of marine polyether toxins. *Bull. Soc. Pathol. Experiment.* 85: 514-515.

Dickey, R., Jester, E., Granade, R., Mowdy, D., Moncreiff, C., Rebarchik, D., Robl, M., Musser, S. & Poli, M. 1999. Monitoring Brevetoxins During a *Gymnodinium Breve* Red Tide: Comparison of Sodium Channel Specific Cytotoxicity Assay and Mouse Bioassay for Determination of Neurotoxic Shellfish Toxins in Shellfish Extracts. *Nat. Toxins* 7: 157-165.

Diogene, G. et al. 1995. Evaluation of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid. In Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. & C. Marcaillou, eds. *Harmful marine algal blooms*, pp. 285-289.

Dortch, Q. 2002. *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid are present in Louisiana coastal waters – is an outbreak of amnesic shellfish poisoning possible? Louisiana Sea Grant Research 2000-2002 (available at http://www.laseagrant.org/research/2002/coastal_resources.htm).

Dortch, Q., Moncreiff, C.A., Mendenhall, W.M., Parsons, M.L., Franks, J.S. & Hemphill, K.W. 1998. Spread of *Gymnodinium breve* into the northern Gulf of Mexico. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 143-144. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Doucette, G.J., McGovern, E.R. & Babinchak, J.A. 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J. Phycol.* 35: 1447-1454.

Doucette, T.A., Strain, S.M., Allen, G.V., Ryan, C.L. & Tasker, R.A.R. 2000. Comparative behavioural toxicity of domoic acid and kanaic acid in neonatal rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 22: 863-869.

Douding, L.U. & Göbel, J. 2001. A novel bloom of raphidophytes in the German Bight. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 64. IOC UNESCO, Paris.

Douglas, D.J., Kenchington, E.R., Bird, C.J., Pocklington, R., Bradford, B. & Silvert, W. 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 907-913.

- Dounay, A.B. & Forsyth, C.J.** 2001. Synthetic studies toward the C5 – C20 domain of the azaspiracids. *Organic Letters* 3: 975-978.
- Draisci, R., Croci, L., Giannetti L., Cozzi, L., Lucentini, L., De Medici, D. & Stacchini A.** 1994. Comparison of mouse bioassay, HPLC and enzyme immunoassay methods for determining diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussels. *Toxicon* 32(11): 1379-1384.
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P. & Poletti, R.** 1996a. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34(8): 923-935.
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L. & Boria Poletti, R.** 1996. Biotossine algali DSP (Diarrhetic Poisoning) in molluschi bivalvi e fitoplancton Adriatico. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 25(1): 7-16.
- Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., Marchiafava, C., James, K.J., Bishop, A., Healy, B. & Kelly, S.S.** 1998. Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *J. Chromatogr. A*, 798: 137-145.
- Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Furey, A., James, K.J., Satake, M. & Yasumoto, T.** 2000. Development of a method for the identification of azaspiracid in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 871: 13-21.
- Duran, R., Reis, R.A., Almeida, O.M., De Mello, M.C., & De Mello, F.G.** 1995. Domoic acid induces neurotoxicity and ip₃ mobilization in cultured cells of embryonic chick retina. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 100-107.
- Durborow, R.M.** 1999. Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. *Occup. Med: State of the Art Reviews* 14(2): 373-406.
- Dutz, J.** 1998. Repression of fecundity in the neritic copepod *Acartia clausi* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium lusitanicum*: relationship between feeding and egg production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 175: 97-107.
- Earnshaw, A.** 2003. Marine Toxins, Pilot Study August 2003. Report Food Analysis Performance Assessment Scheme, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK.
- EC.** 1991a. Council Directive 91/942/EEC of 15 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Communities* L 268/1-14.
- EC.** 1991b. Council Directive 91/943/EEC of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products. *Off. J. Eur. Communities* L 268, 24/09/1991, 15-34. Plus Amendments.
- EC.** 1996. Council Directive 96/77 EEC of 18 January 1996. Establishing the conditions for the harvesting and processing of certain bivalves from areas where paralytic shellfish poison exceeds the limit laid down by the Council Directive 91/492/EEC. *Off. J. Eur. Communities* L 15/46-47.

EC. 2002a. Commission Decision of 15 March 2002. Laying down rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods. *Off. J. Eur. Communities.* (2002./225/EC) L 75/62-63.

EC. 2002b. Commission Decision of 15 March 2002. Establishing special health checks for the harvesting and processing of certain bivalve molluscs with a level of amnesic shellfish poison (ASP) exceeding the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC. *Off. J. Eur. Communities* (2002./226/EC) L 75/65-66.

EC. 2003. Final Draft 6 of 19 September 2003: Work Programme for the specific programme for research, technological development and demonstration: "Integrating and strengthening the European Research Area". Priority 5: Food Quality and Safety. European Commission (EC), Brussels.

Edebo, L., Lange, S., Li, X.P. & Allenmark, S. 1988a. Toxic mussels and okadaic acid induce rapid hypersecretion in the rat small intestine. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 96: 1029-1035.

Edebo, L., Lange, S., Li, X.P., Allenmark, S., Lindgren, K. & Thompson, R. 1988b. Seasonal, Geographic and individual variation of okadaic acid content in cultivated mussels in Sweden. *Acta Pathol Microbiol. Immunol. Scand.* 96: 1036-1042.

Edmunds, J.S.G., McCarthy, R.A. & Ramsdell, J.S. 1999. Ciguatoin reduces larval survivability in finfish. *Toxicon* 37(12): 1827 -1832.

Escalona de Motta, G., Rodriguez-Costas, I., Tosteson, T.R., Ballantine D.L. & Durst, H.D. 1986 Lysis of red blood cells by extracts from benthic dinoflagellates. *Puerto Rico Health Sci. J.* 5, 133-136.

Escobar, L.I., Salvador, C., Martinez, M. & Vaca, L. 1998. Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology* 6(1): 59-74.

EU-NRL 1996. Report of the 1st meeting of the EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins on analytical methods and toxicity criteria. 7-9 March 1996. Vigo, Spain.

EU-NRL 1998. Minutes of the 2nd meeting of the EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins. September-October 1998. Vigo, Spain.

EU-NRL 2000. Minutes of the 3rd meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins. 15-17 March 2000. Vigo, Spain.

EU-NRL 2001. Minutes of the 4th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins. 29-31 October 2001. Vigo, Spain.

EU-NRL 2002. Minutes of 5th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins. 10-12 December 2002. Brussels, Belgium.

EU/SANCO 2001. Report of the meeting of the working group on toxicology of DSP and AZP 21 to 23rd May 2001, Brussels.

- Fairey, E.R., Edmunds, J.S.G. & Ramsdell J.S.** 1997. A Cell-Based Assay for Brevetoxins, Saxitoxins, and Ciguatoxins Using a Stably Expressed c-fos-Luciferase Reporter Gene. *Anal. Biochem.* 251: 129-132.
- Fairey, E.R., Dechraoui, M.Y.B., Sheets, MF. & Ramsdell, J.S.** 2001. Modification of the cell based assay for brevetoxins using human cardiac voltage dependent sodium channels expressed in HEK-293 cells. *Biosensors and Bioelectronics* 16(7-8): 579-586.
- Farstad, D.J. & Chow, T.** 2001. A brief case report of ciguatera poisoning. *Wilderness Environmental Medicine* 12: 263-269.
- FDA.** 2000. Species-Related Hazard and Control #3 Hazard: Natural Toxins. Extracted from FDA Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. Washington, DC, Food and Drug Administration (available at www.agen.ufl.edu/~foodsaf/sf100.html).
- Fernández, M.L.** 1998. Phycotoxins: Regulatory Limits and Effects on Trade. In Miraglia, M. *et al.* eds. *Mycotoxins and Phycotoxins – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, pp. 503-516. Fort Collins, Colorado, Alaken, Inc.
- Fernández, M.L.** 2000. Regulations for marine microalgal toxins: towards harmonization of methods and limits. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 22: 339-346.
- Fernández, M.L. & Cembella, A.D.** 1995. Part B. Mammalian Bioassays. In Hallegraeff G.M. *et al.* eds. *Manual on harmful marine microalgae*, pp. 213-228. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A.** 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* 34(30): 381-387.
- Ferrari, G.** 2001. HABs in the Southwestern Atlantic Ocean. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), pp. 34-35. IOC UNESCO, Paris.
- Ferrario, M.E., Scar, E.A., Castanos, C. & Hinz, F.** 1999. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. *Nova Hedwigia* 68(1-2): 131-147.
- Fessard, V., Grosse, Y., Pfohl-Leszkwicz, A. & Puiseux-Dao, S.** 1996. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res.* 36: 133-141.
- Fladmark, K.E. et al.** 1998. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon* 36 (8): 1101-1114.
- Flanagan, A.F., Donlon, J., Palmer, R. & Kane, M.** 2000. Bioanalytical detection of azaspiracid, a newly discovered phycotoxin. *Biochem. Soc. Transact.* 28 (Part I): A46.
- Flanagan, A.F., Callanan, K.R., Donlon, J., Palmer, R., Forde, A. & Kane, M.** 2001. A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon* 39 (7): 1021-1027.
- Fleming, L.E.** 2003. Diarrhetic shellfish poisoning (available at www.who.edu/science/B/redtide/illness/dsp.html).

Fleming, L.E. & Baden, D.G. 1999. Florida Red Tide and Human Health: Background (available at www.redtide.whoi.edu/hab/illness/floridaredtide.html).

Fleming, L.E., Bean, J.A. & Baden, D.G. 1995. Epidemiology & Public Health. In Hallegraeff, G.M. Anderson, D.M. & A.D. Cembella, eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, pp. 475-487. UNESCO.

Forteza, V., Quetglas, G., Delgado, M., Reyero, M.I., Fraga, S., Franco, J.M. & Cacho, E. 1998. Toxic *Alexandrium minutum* bloom in Palma de Mallorca harbour, (Balearic Islands), western mediterranean. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 270-273. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Fraga, S., Alvarez, M.J., Míguez, Á., Fernández, M.L., Costas, E. & López-Rodas, V. 1998. *Pseudo-nitzschia* species isolated from Galician waters; toxicity, DNA content and lectin binding assay. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 270-273. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Franco, J.M. & Fernández, P. 1993. Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35: 613-620.

Fujiki, H., Sugunama, K., Suguri, H., Yoshizawa, S., Tagai, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., Yasumoto, T. & Sugimura, T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promotor on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 79: 1089-1093.

Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., et al. 1989. Tumor promotion with diarrhetic shellfish toxins. *Mutation Research* 216(6): 360.

Furey, A., James, K.J. & Sherlock, I.R. 1998. First reports of paralytic shellfish poisoning toxins in the Republic of Ireland. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1998. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1997, Vigo, Spain), p. 70-71. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Furey, A., Braña-Magdalena, A., Lehane, M., Moroney, C., James, K.J., Satake, M. & Yasumoto, T. 2002. Determination of azaspiracids in shellfish using liquid chromatography/tandem electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16: 238-242.

Gago-Martinez, A., de la Fuente-Santiago, E., Rodriguez-Vasquez, J.A., Alvito, P. & Sousa, I. 1993. Okadaic acid as the main component of diarrhetic shellfish toxins in molluscs from the West coast of Spain and Portugal. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 537-540. Elsevier, Amsterdam.

Gago-Martinez, A., Rodriguez-Vasquez, J.A., Thibalt, P. & Quilliam, M.A. 1996. Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat Toxins* 4: 72-79.

Gallacher, S. & Smith, E.A. 1999. Bacteria and paralytic shellfish toxins. *Protist* 150: 245-255.

Gamboa, P.M., Park, D.L. & Fremy, J.M. 1990. Extraction and purification of toxic fractions from Barracuda (*Sphyraena barracuda*) implicated in ciguatera poisoning. Presented at the 3rd Conference on Ciguatera 30 April to 4 May 1991, Lajac, Puerto Rico). In Juranovic and Park, 1991.

Garthwaite, I., Ross, K.M., Miles, C.O., Hansen, R.P., Foster, D., Wilkins, A.L. & Towers, N.R. 1998. Polyclonal antibodies to domoic acid and their use in immunoassays for domoic acid in seawater and shellfish. *Nat. Toxins* 6: 93-104.

Garthwaite, I., Ross, K.M., Miles, C.O., Briggs, L.R., Towers, N.R., Borrell, T. & Busby, P. 2001. Integrated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Screening System for Amnesic, Neurotoxic, Diarrhetic, and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins Found in New Zealand. In press. *JAOAC Int.* 84(5): 1643-1648.

Gessner, B.D. 1996. Epidemiology of paralytic shellfish poisoning outbreaks in Alaska. *Alaska's Marine Resources*. October 1996. 8(2): 16-19.

Gessner, B.D. & Schloss, M. 1996. A population-based study of paralytic shell fish poisoning in Alaska. *Alaska Med.* 38(2): 54-58/68.

Gessner, B.D., Bell, P., Doucette G.J., Moczydlowski, E., Poli, M.A., Van Dolah F. & Hall S. 1997. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon* 35(5): 711-722.

GFL. 2001. Determination of Okadasäure in mussels with HPLC (L 12.03/04-2). In Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgVV. Loose leaf edition, as of July 2001. Vol. 1. Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH.

Giacobbe M.G., Oliva, F.D. & Maimone, G. 1996. Environmental Factors and Seasonal Occurrence of the Dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP Potential producer, in a Mediterranean Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 42: 539-549.

Giacobbe, M.G., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R. & Yang, X. 2000. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). *Phycologia* 39(3): 177-182.

Gochfeld, M. & Burger, J. 1998. Apparent paralytic shellfish poisoning in captive herring gulls fed commercial scallops. *Toxicon* 36(20): 411-415.

Gollop, J.H. & Pon, E.W. 1992. Ciguatera: A review. *Hawaii Medical Journal* 51: 91-99.

Gómez-Aguirre, S. & Licea, S. 1998. Blooms of *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 61-62. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

González, J.C., Fontal, O.I., Vieytes, M.R., Vieites, J.M. & Botana, L.M. 2002. Basis for a new procedure to eliminate diarrhetic shellfish toxins from a contaminated matrix. *J. Agric. Food Chem.* 50: 400-405.

Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K. & Yasumoto, T. 2001. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 907: 181-189.

Granade, H. R., Cheng, P.C. & Doorenbos, N.J. (1976) Ciguatera I: brine shrimp (*Artemia salina* L) larval assay for ciguatera toxins. *J. Pharm. Sci.* 65: 1414-1415.

Grune, B., Tiebach, R., Sauer, U., Anderson, D. & De Leeuw, W. 2003. Letter to the Members of the 19th ESAC Meeting on 28 February 2003. Shellfish toxin testing – In urgent need of application of 3Rs. Dated 14 February 2003.

Gucci, P.M., Serse, A.P., Coccia, A.M., Tubaro, A., Della Loggia, R., Gianna, R., Bruno, M. & Volterra, L. 1994. A comparison of methods for diarrhoeic shellfish poison detection. *Toxicol. Lett.* 74: 91-97.

Guzmán, L., Garcia, F., Zunino, S., Atalah, A., Almonacid, E., Rivera, R., Pacheco, H., Quiroz, S., Alarcón, C., Banciella, M.I. & Pizarro, G. 2001. Adaptive training and information dissemination strategy to communities affected by PSP outbreaks in Southern Chile. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 43. IOC UNESCO, Paris.

Haamer, J. 1995. Presence of the phycotoxin okadaic acid in mussels (*Mytilus edulis*) in relation to nutrient composition in Swedish coastal water. *J. Shellfish Res.* 14(1): 209-216.

Hald, B., Bjergskov, T. & Emsholm, H. 1991. Monitoring and analytical programmes on phycotoxins in Denmark. In Fremy, J.M. ed. *Proceedings of the symposium on marine biotoxins*, January 1991. Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires, Paris, pp. 181-187.

Haley, S.T., Cavender, J.F. & Murray, T.E. 1999. Detection of *Alexandrium tamarensis* by Rapid PCR Analysis. *Biotechniques* 26(1): 88-91.

Hallegraeff, G.M. 1992. Harmful algal blooms in the Australian region. *Mar. Poll. Bull.* 25(5-8): 186-190.

Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algae blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79-99.

Hallegraeff, G.M. 1994. Species of the diatom Genus *Pseudo-nitzschia* in Australian waters. *Botanica Marina* 27: 397-411.

Hallegraeff, G.M. 1995. 1. Harmful algal blooms: a global overview. In Hallegraeff, G.M. et al. eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, pp. 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.

Hallegraeff, G.M. & Hara, Y. 1995. Taxonomy of harmful marine raphidophytes. In Hallegraeff, G.M. et al. eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, pp.365-371. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.

Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. eds. 1995. *Manual on harmful marine microalgae.* IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.

- Hallegraeff, G.M., Marshall, J.A., Valentine, J.P. & Hardiman, S.** 1998. Short cyst-dormancy period of an Australian isolate of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar. Freshwater Res.* 49: 415-420.
- Hamano, Y., Kinoshita, Y. & Yasumoto, T.** 1986. Enteropathogenicity of Diarrhetic Shellfish Toxins in Intestinal Models. *J. Food Hyg. Soc Jap.* 27(4): 375-379.
- Hamasaki, K., Horie, M. & Taguchi, S.** 1998. Growth and toxicity of *Alexandrium tamarense* isolated from Hiroshima Bay during blooms in 1992-1995. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 341-342. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Hannah, D.J. et al.** 1998. Phycotoxins – a review of chemical and biological methods of analysis. In Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C. & J. Gilbert, eds. 1998. *Mycotoxins and phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 425-439. Fort Collins, Colorado, Alaken Press.
- Hao, G.** 2001. Study on the Growth Characteristics of Cultured Red-Tide-Alga *Alexandrium tamarense*. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 41. IOC UNESCO, Paris.
- Hasle, G.R. & Fryxell, G.A.** 1995. Taxonomy of Diatoms. In Hallegraeff, G.M. et al. eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, pp. 339-364. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
- Hatchett, W.** 2002. Mystery toxin sparks cockle ban. Dated 7 March 2002 (available at www.ehn-online.com/cgi-bin/news/news1/EpEVVEuuuunnzWWsg.html).
- Hatfield, C.L., Wekell, J.C., Gauglitz, E.J. & Barnett, H.J.** 1994. Salt clean-up procedure for the determination of domoic acid by HPLC. *Nat. Toxins* 2: 206-211.
- Hatfield, C.L. E.J. Gauglitz, Jr., H.J. Barnett, J.K. Lund, J.C. Wekell, and M. Eklund.** The fate of domoic acid in Dungeness crab (*Cancer magister*) as a function of processing. *J. Shellfish Res.* 14(20): 359-363.
- Hernández-Becerril, D.U.** 1998. Species of the phytoplankton diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific coasts of Mexico. *Hydrobiologia* 379: 77-84.
- Higa, T. & Kuniyoshi, M.** 2000. Toxins associated with medicinal and edible seaweeds. *J. Toxicol.-Toxin Reviews* 19(2): 119-137.
- Hokama, Y.** 1985. A rapid, simplified enzyme immunoassay stick test for the detection of ciguatoxin and related polyethers from fish tissues. *Toxicon* 23: 939-946. In Juranovic and Park, 1991.
- Hokama, Y.** 1990 Simplified solid-phase immunobead assay for detection of ciguatoxin and related polyethers. *J. Clin. Lab. Anal.* 4: 213-217. In Hallegraeff et al., 1995.
- Hokama, Y.** 1993. Recent methods for detection of seafood toxins: recent immunological methods for ciguatoxin and related polyethers. *Food Add. Contam.* 10(1): 71-82.

Hokama, Y. & Ebesu, S.M. 2000. Ciguatoxin and related polyethers in fish tissues and extracts, membrane immunobead assay: collaborative study. *J. A.O.A.C. Int.* submitted for publication.

Hokama Y. & Smith, S. 1990 Review: Immunological Assessment of Marine Toxins. *Food Agric. Immunol.* 2: 99-105.

Hokama, Y., Banner, A.H. & Boylan, D.B. 1977. A radioimmunoassay for the detection of ciguatoxin. *Toxicon* 15: 317-325.

Hokama, Y., Abad, M.A. & Kimuar, L.H. 1983. A rapid enzyme-immunoassay for the detection of ciguatoxin. *Toxicon* 21(6): 817-824. In Hokama and Smith, 1990.

Hokama, Y., Kimura, L.H., Abad, M.A., et al. 1984. An enzyme immunoassay for the detection of ciguatoxin and competitive inhibition by related natural polyether toxins. In Regalis, E.P. ed. *Seafood Toxins*. Washington, DC, American Chemical Society, pp. 307-320. In Hallegraeff *et al.* 1995.

Hokama, Y., Osugi, A.M., Honda, S.A.A. & Matsuo, M.K. 1985. Monoclonal antibodies in the detection of ciguatoxin and other toxic polyethers in fish tissues by a rapid poke stick test. In Gabriele, C. and B. Salvat, eds. *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress*, pp. 449-455. Tahiti, Antenne Museum-Ephe, Moorea. In Hokama and Smith, 1990.

Hokama, Y., Honda, S.A.A., Uyehara, K., et al. 1986. Monoclonal antibodies to low Dalton natural marine toxins (Abstract). *J. Toxicol: Toxin Review* 5: 194. In Juranovic and Park, 1991.

Hokama, Y., Shirai, L.K., Iwamoto, L.M., Kobayashi, M.N., Goto, C.S. & Nakagawa, L.K. 1987. Assessment of a rapid enzyme immunoassay stick test for the detection of ciguatoxin and related polyether toxins in fish tissues. *Biol. Bull.* 172: 144-153. In Scheuer, 1994.

Hokama, Y., Honda, S.A.A., Asahina, A.Y., Fong, J.M.L., Matsumoto, C.M. & Gallacher, T.S. 1989a. Cross-reactivity of ciguatoxin, okadaic acid, and polyethers with monoclonal antibodies. *Food Agric. Immun.* 1: 29-35. In Hallegraeff *et al.*, 1995.

Hokama, Y., Honda, S.A.A., Kobayashi, M.N., Nakagawa, L.K., Asahina, A.Y. & Miyahara, J.T. 1989b. Monoclonal antibody (MAB) in detection of ciguatoxin (CTX) and related polyethers by the stick-enzyme immunoassay (S-EIA) in fish tissues associated with ciguatera poisoning. In Natori, S., Hashimoto K. & Y. Ueno, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Amsterdam, the Netherlands, Elsevier Science Publishers, p.303. In Hokama & Smith, 1990.

Hokama, Y., Asahina, A.Y., Shang, E.S., Hong, T.W., Shirai, J.L. 1993. Evaluation of Hawaiian reef fishes with the solid phase immunobead assay. *J. Clin. Lab. Anal.* 7: 26-30. In Hokama *et al.*, 1998.

Hokama, Y., Takenaka, W.E., Nishimura, K.L., Ebesu, J.S., Bourke, R. & Sullivan, P.K. 1998. A simple membrane immunobead assay for detecting ciguatoxin and related polyethers from human ciguatera intoxication and natural reef fishes. *J. AOAC. Int.* 81(4): 727-735.

Holland, P. & McNabb, P. 2003. Inter-laboratory Study of an LC-MS Method for ASP & DSP Toxins in Shellfish. Cawthron Report No. 790 (April 2003). Nelson, New Zealand, Cawthron Institute.

- Hollingworth, T. & Wekell, M.M.** 1990. Fish and other Marine Products 959.08. Paralytic shellfish poisoning. Biological Method, Final Action. In Hellrich, K. ed. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (15th Edition), pp. 881-882. Arlington, Virginia, USA.
- Holmes, M.J. & Lewis, R.J.** 1994. Purification and characterisation of large and small maitotoxins from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Nat. Toxins* 2: 64-72.
- Holmes, M.J., Lewis, R.J., Poli, M.A. & Gillespie, N.C.** 1991 Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* 29: 761-775.
- Honkanen, R.E., Mowdy, D.E. & Dickey, R.W.** 1996a. Detection of DSP-Toxins, Okadaic acid, and Dinophysis Toxin-1 in Shellfish by Serine/Threonine Protein Phosphatase Assay. *J. AOAC Int.* 79 (6): 1336-1343.
- Honkanen, R.E., Stapleton, J.D., Bryan, D.E. & Abercrombie, J.** 1996b. Development of a protein phosphatase-based assay for the detection of phosphatase inhibitors in crude whole cell and animal extracts. *Toxicon* 34(11/12): 1385-1392.
- Holmes, M.J., Teo, S.L.M., Lee, F.C. & Khoo, H.W.** 1999. Persistent low concentrations of diarrhetic shellfish toxins in green mussels *Perna viridis* from the Johor Strait, Singapore: first record of diarrhetic shellfish toxins from South-East Asia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181: 257-268.
- Horner, R.A. & Postel, J.R.** 1993. Toxic diatoms in estern Washington waters (US West Coast). *Hydrobiologia* 269/270: 197-205.
- Horner, R.A., Garrison, D.L. & Plumley, F.G.** 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the US west coast. *Limnol. Oceanogr.* 42(5): 1076-1088.
- Hua, Y. & Cole, R.B.** 1999. Solution Reactivity of Brevetoxins As Monitored by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Implications for Detoxification. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 1268-1277.
- Hua, Y., Lu, W., Henry, M.S., Pierce, R.H. & Cole, R.B.** 1995. On-Line High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Brevetoxins in "Red Tide" algae. *Anal Chem.* 67: 1815-1823.
- Hua, Y., Lu, W., Henry, M.S., Pierce, R.H. & Cole, R.B.** 1996. On-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for determination of the brevetoxin profile in natural "red tide" algal blooms. *J Chromatography A* 750: 115-125.
- Hufnagl, M.** 2001. Mussel farming in Norway. June/July 2001 (available at <http://scorpius.spaceports.com/~hufnagl/norw/intro.htm>).
- Hummert, C., Reichelt, M. & Luckas B.** 1997. Automatic HPLC-UV Determination of Domoic Acid in Mussels and Algae. *Chromatographia* 45: 284-288.
- Hummert, C., Reichelt, M. & Luckas, B.** 2000. New strategy for the determination of microcystins and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, two potent phosphatases 1 and 2A inhibitors and tumor promoters. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366: 508-513.

- Hungerford, J.M.** 1993. Seafood toxins and seafood products. *J. AOAC Int.* 76: 120-130.
- Hungerford, J.M. and Wekell, M.M.** 1992. Analytical methods for marine toxins. In Tu, A.T. ed. *Food Poisoning – Handbook of Natural Toxins*, Vol. 7, pp. 441-450.
- Hungerford, J.M., Lee, S. & Hall, S.** 1991. In *Proceedings of the Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Newport, USA, October-November 1991. In Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G.J.A. & Waldock, M. eds. 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
- Huynh, C., Pinelli, E., Puiseux-Dao, S, Boulekbache, H. & Pfohl-Leskowicz, A.** 1998. Okadaic acid and DNA adduct formation. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1998. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1997, Vigo, Spain), p. 581-583. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Hwang, D.F.** 2003. Overview of Marine Toxins in Taiwan Province of China (available at <http://pop3.wfd.ntou.edu.tw/symposium/Toxins/Abstracts.htm>).
- Hwang, D.F. & Lu, Y.H.** 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38: 1491-1503.
- Hwang, D.F. & Tsai, Y.H.** 1999. Toxins in Toxic Taiwanese crabs. *Food Rev. Int.* 15(2): 145-162.
- Ikawa, M. et al.** 1985. In Anderson, D.M. et al. eds. *Toxic Dinoflagellates*, pp.299-304. Elsevier. In Van Egmond, H.P. et al. 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
- Indrasena, W.M. & Gill, T.A.** 1999. Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands. *Food Res. Int.* 32: 49-57.
- Indrasena, W.M. & Gill, T.A.** 2000a. Thermal Degradation of Partially Purified Paralytic Shellfish Poison Toxins at Different Times, Temperatures and pH. *J. Food Sci.* 65(6): 948-953.
- Indrasena, W.M. & Gill, T.A.** 2000b. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins. *Food Chemistry* 71: 71-77.
- IOC.** 1995. UNEP-WHO-FAO training course on qualitative and quantitative determination of algal toxins. Friedrich-Schiller University of Jena, Jena, Germany, 18-28 October 1994. Training Course Report, *IOC Conference Monograph*, 29.
- IPCS.** 1984. International Programme on Chemical Safety. Aquatic (Marine and Freshwater) Biotoxins. *Environmental Health Criteria* 37. World Health Organization. ISBN 92 4 154097 4.
- Ishida, H., Nozawa, A., Totoribe, K., Muramatsu, N., Nukaya, H., Tsuji, K., Yamaguchi, K., Yasumoto, T., Kaspar, H., Berkett, N. & Kosuge, T.** 1995. Brevetoxin B₁, a new polyether marine toxin from the New Zealand shellfish, *Austrovenus stutchburyi*. *Tetrahedron Lett.* 36(5), 725-728.
- Ishida, H., Muramatsu, N., Nukay, H., Kosuge, T. & Tzujji, K.** 1996. Study on neurotoxic shellfish poisoning involving the oyster, *Crassostrea gigas*, in New Zealand. *Toxicon* 34(9): 1050-1053.

- Ito, S. & Tsukada, K.** 2001. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J. Chromatogr. A* 943: 30-46.
- Ito, E., Terao, K., McMahon, T., Silke, J. & Yasumoto, T.** 1998. Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels. *In* Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 588-589. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahon, T., James, K. & Yasumoto, T.** 2000. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38: 917-930.
- Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahon, T. & Yasumoto, T.** 2002. Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40(2): 193-203.
- Iverson, F. & Truelove, J.** 1994. Toxicology and Seafood Toxins: Domoic Acid. *Nat. Toxins* 2: 334-339.
- Jaim, E., Hummert, C., Hess, P. & Luckas, B.** 2001. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 929: 43-49.
- James, K.J. & Furey, A.** 2000. Neurotoxins: Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science* 3: 3482-3490.
- James, K.J., Carmody, E.P., Gillman, M., Kelly, S.S., Draisci, R., Lucentini, L. & Giannetti, L.** 1997. Identification of a new diarrhetic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection. *Toxicon* 35(6): 973-978.
- James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M., Roden, C., Sherlock, I.R., Twohig, M., Draisci, R., Giannetti, L. & Lucentini, L.** 1999. Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. *Toxicon* 37: 343-357.
- James, K.J., Gillman, M., Lehane, M. & Gago-Martinez, A.** 2000a. New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in seafood and marine phytoplankton. *J. Chromatogr. A*, 871: 1-6.
- James, K.J., Furey, A., Satake, M. & Yasumoto, T.** 2000b. Azaspiracid Poisoning (AZP): A new shellfish toxic syndrome in Europe. Abstract for the 9th International Conference on Algal Blooms, 2000. Tasmania, Australia
- James K.J., Furey, A., Lehane, M., Moroney, C., Satake, M. & Yasumoto, T.** 2001. LC-MS methods for the investigation of a new shellfish toxic syndrome – Azaspiracid Poisoning (AZP). *In* De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 401-408. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.

James, K.J., Lehane, M., Moroney, C., Fernandez-Puente, P., Satake, M., Yasumoto, T. & Furey, A. 2002a. Azaspiracid shellfish poisoning: unusual toxin dynamics in shellfish and the increased risk of acute human intoxications. *Food Add. Contam.* 19(6): 555-561.

James, K.J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higman, W., Satake M. & Yasumoto, T. 2002. First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40: 909-915.

Japanese Ministry of Health and Welfare. 1981. Method of testing for diarrhetic shellfish toxin. *Food Sanitation Research* 7 (31): 60-65.

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: 1143-56.

Jeong, H.J., Shin, I.S. & Man, Y.K. 1999. Studies for Reestablishment of Approval Toxin Amount in Paralytic Shellfish Poison-Infested Shellfish. *J. Fish. Sci. Tech.* 2(2): 155-160.

John, E.H. & Flynn, K.J. 2000. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxic and nutrient levels. *Eur. J. Phycol.* 35: 11-23.

Juranovic, L.R. & Park, D.L. 1991 Food borne toxins of marine origin ciguatera. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 117: 51-94.

Karalis T., Gupta, L., Chu, M., Campbell, B.A., Capra, M.F. & Maywood, P.A. 2000. Three clusters of ciguatera poisoning: clinical manifestations and public health implications. *Med. J. Austr.* 172(4): 160-162.

Kasuga, F., HaraKudo, Y. & Machii, K. 1996. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 37(6): 407-410.

Kawatsu, K., Hamano, Y. & Noguchi, T. 1999. Production and characterization of a monoclonal antibody against domoic acid and its application to enzyme immunoassay. *Toxicon* 37: 1579-1589.

Kawatsu, K., Hamano, Y. & Noguchi, T. 2000. Determination of domoic acid in Japanese mussels by enzyme immunoassay. *J. AOAC Int.* 83 (6): 1384-1386.

Kawatsu, K., Hamano, Y., Sugiyama, A., Hashizume, K. & Noguchi, T. 2002. Development and Application of an Enzyme Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody against Gonyautoxin Components of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *J. Food Protection* 65 (8): 1304-1308.

Kemppainen, B.W., Mehta, M. & Clark, C.R. 1989. Effect of vehicle on *in vitro* percutaneous penetration of [³H] PbTx-3 (a red tide toxin) in human and guinea pig skin. *Toxicon* 27: 54-55.

Kemppainen, B.W., Reifenrath, W.G., Stafford, R.G., et al. 1991 Methods for *in vitro* skin absorption studies of a lipophilic toxin produced by red tide. *Toxicology* 66(1): 1-17.

- Kerr, D.S., Briggs, D.M. & Saba, H.I.** 1999. A neurophysiological method of rapid detection and analysis of marine algal toxins. *Toxicon* 37: 1803-1825.
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y.** 1996. A toxicological study of the marine dinoflagellate, *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Phycologia* 35 (3): 239-244.
- Khera, K.S., Whalen, C., Angers, G. & Arnold, D.L.** 1994. Domoic Acid: A Teratology Study and Homeostatic Study in Rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 18-24.
- Kimm-Brinson, K.L. & Ramsdell, J.S.** 2001. The Red Tide Toxin, Brevetoxin, Induces Embryo Toxicity and Developmental Abnormalities. *Environ. Health Perspect.* 109(4): 377-381.
- Kirkpatrick, G.J., Millie, D.F., Moline, M.A. & Schofield O.** 2000. Optical discrimination of a phytoplankton species in natural mixed populations. *Limnol. Oceanogr.* 45(2): 467-471.
- Kogure, K., Tamplin, M.L. Simidu, U. & Colwell, R.R.** 1988. A tissue culture assay for the tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon* 26: 191-197.
- Koike, K., Sato, S., Yamaji, M., Nagahama, Y., Kotaki, Y., Ogata, T. & Kodama, M.** 1998. Occurrence of okadaic acid-producing *Prorocentrum lima* on the Sanriku coast, northern Japan. *Toxicon* 36(12): 2039-2042.
- Kotaki Y., Koike K., Sato S., Ogata T., Fukuyo Y. & Kodama M.** 1999. Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseries* isolated from Ofunato Bay, Japan. *Toxicon* 37: 677-682.
- Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C.V., Huyen, N.T., Hoi, N.C., Fukuyo, Y. & Kodama, M.** 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* isolated from a shrimp culture pond in Do Son, Vietnam. *J. Phycol.* 36: 1057-1060.
- Kungsuwan, A., Arakawa, O., Promdet, M. & Onoue, Y.** 1997. Occurrence of paralytic shellfish poisons in Thai freshwater puffers. *Toxicon* 35(8): 1341-1346.
- Labrousse, H. & Matile, L.** 1996. Toxicological biotest on diptera larvae to detect ciguatoxins and various other toxic substances. *Toxicon* 34: 881-891.
- Labrousse, H., Pauillac, S., Legrand, A.M. & Avrameas, S.** 1992. Utilisation de larves de dipteres pour la détection de poisons ciguatoxique. *Bull. Soc. Pathol. Exp.* 85: 529.
- Lagos, N.** 1998. Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.* 31: 375-386.
- Landsberg, J.H. & Steidinger, K.A.** 1998. A historical review of *Gymnodinium breve* red tides implicated in mass mortalities of the manatee (*Trichechus manatus latirostris*) in Florida, USA. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 97-100. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Lassus P., Bardouil M., Masselin P., Naviner M. & Truquet P.** 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins* 9(1): 1-12.

- Laverty R.** 1993. Modes of action of shellfish toxins. In Jasperse, J.A. ed. 1993. *Marine toxins and New Zealand shellfish. Proceedings of a workshop on research issues*, June 1993, pp. 31-34. The Royal Society of New Zealand Miscellaneous Series 24.
- Lawrence, J.F. & Menard, C.** 1991 Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation. *J. AOAC*. 74: 1006-1012.
- Lawrence, J.F., Charbonneau, C.F., Ménard, C., Quilliam, M.A. & Sim, P.G.** 1989a. Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists. *J. Chromatogr.* 462: 349-356.
- Lawrence, J.F., C.F. Charbonneau, B.D. Page, and G.M.A. Lacroix.** 1989b. Confirmation of domoic acid in molluscan shellfish by chemical derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 462: 419-425.
- Lawrence, J.F., Ménard, C., Charbonneau, C.F. & Hall, S.** 1991a. A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC*. 74: 404-409.
- Lawrence, J.F., Charbonneau, C.F. & Ménard, C.** 1991b. Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1): 68-72.
- Lawrence, J.F., Lau, B.P.Y., Cleroux, C. & Lewis, D.** 1994. Comparison of UV absorption and electrospray mass spectrometry for the high-performance-liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish and biological samples. *J. Chromatogr. A* 659 (1): 119-126.
- Lawrence, J., Bauder, A.G., Quilliam, M.A., & Cembella, A.D.** 1998. *Prorocentrum lima*: A putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 78-79. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Lawrence, J.F., Niedzwiadek, B. & Menard, C.** 2004. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Interlaboratory Study. *J. AOAC International* 87 (1): 83-100.
- Laycock, M.V., Thibault, P., Ayer, S.W. & Walter, JA.** 1994. Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Nat. Toxins* 2: 175-183.
- Lechuga-Devéze, C.H. & Morquecho-Escamilla, M.L.** 1998. Early spring potentially harmful phytoplankton in Bahía Concepción, Gulf of California. *Bull. Mar. Sci.* 63(3): 503-512.
- LeDoux, M. & Hall, S.** 2000. Proficiency testing of eight French laboratories in using the AOAC mouse bioassay for paralytic shellfish poisoning: interlaboratory collaborative study. *Food Chem. Contam.* 83(2): 305-310.

- Ledoux, M. I., Bardouil, M., Nezan, E. & Erard, E.** 1991. Field and experimental studies of shellfish contaminated by an *Alexandrium minutum* strain. In Fremy, J.M. ed. *Proceedings of the symposium on marine biotoxins*, January 1991, pp. 43-51. Paris, Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires.
- Lee J.S., Yanagi T., Kenna R. & Uasumoto T.** 1987 Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51: 877-881.
- Lee, H.O., Cheun, B.S., Watanabe, E. & Han, M.S.** 2000. Application of a channel biosensor for toxicity measurements in cultured *Alexandrium tamarense*. *J. Nat. Toxins* 9(4): 341-348.
- Legrand, A.M.** 1998. Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 39-43. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Legrand, A.M. & Lotte, C.J.** 1994. Detection of ciguatoxic fish by using the binding property of ciguatoxins to voltage-dependent sodium channels. *Mem. Qd. Mus.* 34: 576.
- Legrand, A.M., Fukui, M., Cruchet, P., Ishibashi, Y., Yasumoto, T.** 1992. Characterization of ciguatoxins from different fish species and wild *Gambierdiscus toxicus*. In Tosteson, T.R. ed. *of the Third International Conference on Ciguatera Fish Poisoning*, Puerto Rico, pp. 25-32. Polyscience Publications, Quebec.
- Lehane, L.** 2000. Ciguatera update. *Med. J. Aust.* 172(4): 176-179.
- Lehane, L. & Lewis, R.J.** 2000. Review Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 91-125.
- Lehane, M., Braña-Magdalena, A., Moroney, C., Furey, A. & James, K.J.** 2002. Liquid chromatography with electrospray ion trap mass spectrometry for the determination of five azaspiracids in shellfish. *J. Chromatogr. A* 950: 139-147.
- Leira, F.J., Vieites, J.M., Botana, L.M., Vyeites, M.R.** 1998. Domoic acid levels of naturally contaminated scallops as affected by canning. *J. Food Sci.* 63(6): 1081-1083.
- Levasseur, M., Berard-Therriault, L., Bonneau, E. & Roy, S.** 1998. Distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in the Gulf of St. Lawrence, Canada. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 54-59. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Lefebvre, K.A., Powell, C.L., Busman, M., Doucette, G.J., Moeller, P.D., Silver, J.B., Miller, P.E., Hughes, M.P., Singaram, S., Silver, M.W. & Tjeerdema, R.S.** 1999. Detection of Domoic Acid in Northern Anchovies and California Sea Lions Associated with an Unusual Mortality Event. *Nat. Toxins* 7(3): 85-92.
- Levine, L., Fujiki, H., Yamada, K., Ojika, M., Gjika, H.B. & Van Vunakis, H.** 1988. Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid. *Toxicon* 26: 1123.

- Levine, V.L. & Shimizu, Y.** 1992. Antibodies to brevetoxin B: serologic differentiation of brevetoxin B and brevetoxin A. *Toxicon* 30(4): 411-418.
- Lewis, R.J.** 1987 Ciguatera (fish poisoning) with special reference to cats. *Veterin. Clin. Toxicol.* 103, 59-61. *In Hallegraeff et al.*, 1995.
- Lewis, R.J.** (1988) Negative inotropic and arrhythmic effects of high doses of ciguatoxin on guinea pig atria and papillary muscles. *Toxicon* 26: 639-649.
- Lewis, R.J.** 1993. An overview of ciguatera fish poisoning. *SPC Fisheries Newsletter* 65: 33-36.
- Lewis, R.J.** 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon* 39: 97-106.
- Lewis, R.J. & Endean, R.** 1986 Direct and indirect effects of ciguatoxin on guinea pig atria and papillary muscles. *Arch. Pharmacol.* 334: 313-322. *In Juranovic and Park*, 1991.
- Lewis, R.J. & Jones, A.** 1997. Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguateric fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon*, 35: 159-168.
- Lewis, R.J. & Sellin, M.** 1992. Multiple ciguatoxins in the flesh of fishes. *Toxicon* 30: 915-919.
- Lewis, R.J., Sellin, M., Poli, M.A., Norton, R.S., Macleod, J.K. & Sheil, M.M.** 1991 Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon* 29: 1115-1127.
- Lewis, N.I., Bates, S.S., McLachlan, J.L. & Smith, J.C.** 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries*. *In* Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Amsterdam, Elsevier. pp.601-606.
- Lewis, R.J., Holmes, M.J., Alewood, P.F. & Jones, A.** 1994. Ionspray mass spectrometry of ciguatoxin-1, maitotoxin-2 and -3 and related marine polyether toxins. *Nat. Toxins.* 2: 56-63. *In Hallegraeff et al.*, 1995.
- Lewis, R.J., Jones, A. & Vernoux, J.P.** 1999. HPLC/Tandem Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Sub-ppb Levels of Pacific and Caribbean Ciguatoxins in Crude Extracts of Fish. *Anal. Chem.* 71: 247-250.
- Liao, H.J. & Hwang, D.F.** 2000. Survey of paralytic toxins in shellfish in southern Taiwan between 1995. and 1997.. *J. Nat. Toxins* 9(1): 63-71.
- Lindahl, O.** 1998. Occurrence and Monitoring of harmful algae in the marine environment. *In* Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C. & J. Gilbert, eds. 1998. *Mycotoxins and phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 409-423. Fort Collins, Colorado, Alaken Press.
- Llewellyn, L.E., Dodd, M.J., Robertson, A., Ericson, G., De Koning, C. & Negri, A.P.** 2002. Post-mortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, *Zosimus aeneus*. *Toxicon* 40: 1463-1469.

- Lund, J.K., Barnett, H.J., Hatfield, C.L., Gauglitz, E.J., Wekell, J.C & Rasco, B.** 1997. Domoic acid uptake and depuration in Dungeness crab (*Cancer magister* Dana 1852). *J. Shellfish Res.* 18(1): 225-231.
- Lundholm, N. & Moestrup, Ø.** 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia varisvaringica* sp. nov., another producer of the neurotoxin domoic acid. *J. Phycol.* 36: 1162-1174.
- Lundholm, N, Skov, J., Pocklington, R. & Moestrup, Ø.** 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia serata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia* 33 (6): 475-478.
- Macdonald, E.M. & Davidson, R.D.** 1998. The occurrence of harmful algae in ballast discharges to Scottish ports and the effects of mid-water exchange in regional sea. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 220-223. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- MacKenzie, L. & Berkett, N.** 1997. Cell morphology and PSP-toxin profiles of *Alexandrium minutum* in the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.* 31: 403-409.
- MacKenzie, L., White, D. & Adamson, J.** 1996. Temporal variation and tissue localization of paralytic shellfish toxins in the New Zealand tuatua (*Paphies subtriangulata*). *J. Shellfish Res.* 15(3): 735-740.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M. & Wekell M.M.** 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxin, brevetoxin and ciguatoxins. *Anal. Biochem.* 214: 190-194.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M. & Wekell, M.M.** 1994. Detection of ciguatoxin, brevetoxin, and saxitoxin by cell bioassay. *Mem. Qd. Mus.* 34: 571-575.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M., Hokama, Y., Dickey, R.W., Granade, H.R., Lewis, R., Yasumoto, T. & Wekell, M.M.** 1995. Detection of Sodium Channel Toxins: Directed Cytotoxicity Assays of Purified Ciguatoxins, Brevetoxins, Saxitoxins, and Seafood Extracts. *JAOAC Int* 78(2): 521-527.
- Marasovic, I., Nincevic, Z., Orhanovic, S. & Pavela-Vrancid, M.** 1998. A survey of the shellfish toxicity in the central Adriatic Sea. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 78: 745-754.
- Marcaillou-Le Baut, C., Bardin, B., Bardouil, M., Bohec, M., Maselin, P. & Truquet, P.** 1990. Étude de la décontamination de moules toxiques. Rapport IFREMER DERO-90-02 MR, p. 21.
- Marcaillou-Le Baut, C., Amzil, Z., Vernoux, J.P., Pouchus, Y.F., Bohec, M. & Simon, J.F.** 1994. studies on the detection of okadaic acid in mussels: preliminary comparison of bioassays. *Nat. Toxins* 2: 312-317.
- Mariën, K.** 1996. Establishing tolerable dungeness crab (*Cancer magister*) and Razor Clam (*Siliqua patula*) domoic acid contaminant levels. *Environ. Health Perspect.* 104(11): 1230-1236.

- Marquette, C.A., Coulet, P.R. & Blum, L.J.** 1999. Semi-automated membrane based chemiluminiscent immunosensor for flow injection analysis of okadaic acid in mussels. *Analytica Chimica Acta* 398: 173-182.
- Marr, J.C., Jackson, A.E. & McLachlan, J.L.** 1992. Occurrence of *Prorocentrum lima*, a DSP toxin-producing species from the Atlantic coast of Canada. *J. Appl. Phycol.* 4: 17-24.
- Marsden, I.L.** 1993. Effects of algal blooms on shellfish biology and metabolism. In Jasperse, J.A. ed. *Marine toxins and New Zealand shellfish. Proceedings of a workshop on research issues*, 10-11 June 1993, pp. 23-27. The Royal Society of New Zealand Miscellaneous Series.
- Martin, J.L., Haya, K. & Wildish, D.J.** 1993. Distribution and domoic acid content of *Nitzschia pseudodelicatissima* in the Bay of Fundy. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 613-618. Amsterdam, Elsevier.
- Martin, J.L., Page, F.H., Hanke, A., LeGresley, M.M. & Dowd, M.** 2001. Timing of phytoplankton blooms, including HAB Species *Alexandrium* Spp. and *Pseudo-nitzschia* Spp., in the Bay of Fundy (eastern Canada). In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 75. IOC UNESCO, Paris.
- Matias, W.G. & Creppy, E.E.** 1996a. Evidence for enterohepatic circulation of okadaic acid in mice. *Toxic Substance Mechanism* 15: 405-414.
- Matias, W.G. & Creppy, E.E.** 1996b. Transplacental passage of [³H]-okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and high-performance liquid chromatography. *Human Exp. Toxicol.* 15(3): 226-230.
- Matias, W.G. & Creppy, E.E.** 1998. 5-Methyldeoxycytosine as a Biological Marker of DNA Damage Induced by Okadaic Acid in Vero Cells. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13(1): 83-88.
- Matias, W.G., Bonini, M. & Creppy, E.E.** 1996. Inhibition of protein synthesis in a cell-free system and Vero cells by okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 309-317.
- Matias, W.G., Traore, A. & Creppy, E.E.** 1999a. Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Human Exp. Toxicol.* 18: 345-350.
- Matias, W.G., Traore, A., Bonini, M., Sanni, A. & Creppy, E.E.** 1999b. Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. *Human Exp. Toxicol.* 18: 634-639.
- Matsuoka, K., Fukuyo, Y., Praseno, D.P. & Adnan, Q.** 1998. *Pyrodinium bahamense* cysts in surface sediments of Jakarta Bay and off Ujung Pandang, Indonesia. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), p. 63. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Mayer, A.M.S.** 2000. The marine toxin domoic acid may affect the developing brain by activation of neonatal brain microglia and subsequent neurotoxic mediator generation. *Medical Hypotheses* 54(5): 837-841.

- McGinness, K.L., Fryxell, G.A., & McEachran, J.D.** 1995. *Pseudonitzschia* species found in digestive tracts of northern anchovies (*Engraulis mordax*). *Can. J. Zool.* 73: 642-647.
- McKenzie, C.H., Paranjape, M., Powell, C., Gilgan, M.W. & Quilliam, M.E.** 1994. A *Dinophysis norvegica* bloom and its implications in the occurrence of a diarrhetic shellfish poisoning episode in mussels from Newfoundland during the late Autumn in 1993. *Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2016: 26.
- McLachlan, J.L. et al.** 1994. Effects of Nitrogen Concentration and Cold Temperature on DSP-Toxin Concentrations in the Dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Prorocentrales, Dinophyceae). *Nat. Toxins* 2: 263-270.
- McMahon, T.** 2000. Azaspiracid in Irish Shellfish (available at <http://expresso.chem.umn.edu/media/pdfs/azareport.pdf>, accessed on 28 April 2002).
- McMahon, T. & Silke, J.** 1996. Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14: 2.
- McMahon, T. & Silke, J.** 1998. Re-occurrence of winter toxicity. *Harmful Algae News*, 17: 12-16.
- McMahon, T., Silke, J. & Hess, P.** 2001. Biotoxins in Bivalve Molluscs in Ireland: Monitoring and Management. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 76. IOC UNESCO, Paris.
- McMinn, A., Hallegraef, G.M., Thomson, P., Jenkinson, A.V. & Heijnis, H.** 1997. Cyst and radionucleotide evidence for the recent introduction of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* into Tasmanian waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161: 165-172.
- McNabb, P. & Holland, P.** 2001. Marine biotoxin monitoring of New Zealand shellfish – a new management programme based on LC-MS. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 77. IOC UNESCO, Paris.
- Miller, P.E. & Scholin, C.A.** 1998. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J. Phycol.* 34: 371-382.
- Miller, P.E. & Scholin, C.A.** 2000. On detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using whole cell hybridization: sample fixation and stability. *J. Phycol.* 36: 238-250.
- Miller, R.M., Pavia S. & Keary, P.** 1999. Cardiac toxicity associated with ciguatera poisoning. *Aust. NZ. J. Med.* 29(3): 373-4.
- Mons, M.N., Van Egmond, H.P. & Speijers, G.J.A.** 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005. June 1998.

- Montoya, N.G., Reyero, M.I., Akselman, R., Franco, J.M. & Carreto, J.J.** 1998. Paralytic shellfish toxins in the anchovy *Engraulis anchoita* from the Argentinian coast. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 72-73. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Montresor, M., Sarno, D. & Zingone, A.** 2000. Can we peacefully live together with harmful phytoplankton? The case of the Gulf of Naples. *Proceedings of the Ninth Conference on Harmful Algal Blooms*, Tasmania.
- Morohashi, A., Satake, M., Murata, K., Naoki, H., Kaspar, H.F. & Yasumoto, T.** 1995. Brevetoxin B3, a new brevetoxin analog isolated from the greenshell mussel *Perna canaliculus* involved in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand. *Tetrahedron Lett.* 36(49): 8995-8998.
- Morohashi, A., Satake, M., Murata, K., Naoki, H., Kaspar, H.F., Oshima, Y. & Yasumoto, T.** 1999. Brevetoxin B4 Isolated from Greenshell mussels *Perna canaliculus*, the major Toxin Involved in Neurotoxic Shellfish Poisoning in New Zealand. *Nat. Toxins* 7: 45-48.
- Moroney, C., Lehane, M., Brana-Magdalena, A., Furey, A. & James, K.J.** 2002. Comparison of solid-phase extraction methods for the determination of azaspiracids in shellfish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatography A* 963: 353-361.
- Morton, S.L. & Tindall, D.R.** 1995. Morphological and biochemical variability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from three locations at Heron Island, Australia. *J. Phycol.* 31: 914-921.
- Morton, S.L. & Tindall, D.R.** 1996. Determination of okadaic acid content of dinoflagellate cells: a comparison of the HPLC-fluorescent method and two monoclonal antibody ELISA test kits. *Toxicon* 34(8) : 947-954.
- Morton, S.L., Moeller, P.D.R., Young, K.A., & Lanoue B.** 1998. Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizaneum* Faust isolated from the Belizean coral reef ecosystem. *Toxicon* 36(1): 201-206.
- Mos, L.** 2001. Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9: 79-85.
- Mosley, S., Ikawa, M., Sasner, J.J.** 1985. A combination fluorescence assay and Folin-Ciocalteu phenol reagent assay for the detection of paralytic shellfish poisons. *Toxicon* 23(3): 375-81. In Van Egmond, H.P. *et al.* 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
- Mountfort, D.O., Kennedy, G., Garthwaite, I., Quilliam, M., Truman, P., Hannah, D.J.** 1999. Evaluation of the fluorimetric protein phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels. *Toxicon* 37: 909-922.
- Mountfort, D.O. et al.** 2001. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon* 39: 383-390.
- Munday, B.L. & Hallegraeff, G.M.** 1998. Mass Mortality of Captive Southern Bluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*) in April/May 1996. In Boston Bay, South Australia: A Complex Diagnostic Problem. *Fish Pathol.* 33(4): 343-350.

Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Fukui, M. & Yasumoto, T. 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 4380-4386. In Vernoux and Lewis, 1997.

Murata, K., Satake, M., Naoki, H., Kaspar, H.F. & Yasumoto, T. 1998. Isolation and structure of a new brevetoxin analog, Brevetoxin B2, from greenshell mussels from New Zealand. *Tetrahedron* 54: 734-742.

Murakami, R. & Noguchi, T. 2003. Toxicity of Adductor Muscle of Markedly PSP-infested Scallop *Patinopecten yessoensis* which was discussed in Codex Plan by FAO/WHO (available at <http://pop3.wfd.ntou.edu.tw/symposium/Toxins/Abstracts.htm>).

Naar, J., Pauillac, S., Branaa, P., Dechraoui, M.Y., Chinain, M. & Legrand, A.M. 1998. Improvement of antibody production to PbTx-2-type brevetoxins and development of a new radioimmunoassay. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 567-572. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Naar, J., Branaa, P., Bottein-Dechraoui, M.Y., Chinain, M. & Pauillac, S. 2001. Polyclonal and monoclonal antibodies to PbTx-2-type brevetoxins using minute amount of hapten-protein conjugates obtained in a reversed micellar medium. *Toxicon* 39: 869-878.

Naar, J., Bourdelais, A., Tomas, C., Kubanek, J., Whitney, P.L. Flewelling, L., Steidinger, K., Lancaster, J. & Baden, D.G. 2002. A Competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) in seawater, shellfish and mammalian body fluid. *Environ. Health Perspect.* 10(2): 179-185.

Naoki, H., Fujita, T., Cruchet, P., Legrand, A.-M., Igarashi, T. & Yasumoto, T. 2001. Structural determination of new ciguatoxin congeners by tandem mass spectrometry. In De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 475-482. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.

Naseem, S.M. 1996. Toxicokinetics of [³H] Saxitoxinol in Peripheral and Central Nervous System of Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141: 49-58.

Negri, R.M. & Inza, D. 1998. Some potentially toxic species of Pseudo-nitzschia in the Argentine sea (35°-39°S). In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 84-85. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Ng, S. & Gregory, J. 2000. An outbreak of ciguatera fish poisoning in Victoria. *Commun. Dis.Intell.* 24(11): 344-346.

Nguyen, A.L., Luong J.H.T. & Masson, C. 1990 Capillary electrophoresis for detection and quantitation of domoic acid in mussels. *Anal. Lett.* 23(9): 1621-1634.

Nijjar, M.S. & Madhyastha, M.S. 1997. Effect of pH on domoic acid toxicity in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 167: 179-181.

- Nijjar, M.S., Pierce, G.N., Nijjar, S.S. & Dhalla, N.S.** 1999. Domoic Acid Attenuates the Adenosine-5'-Triphosphate-Induced Increase in $[Ca^{2+}]_i$ in Adult Cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.* 4(3): 159-166.
- Nishio, S.** 2003. Occurrence of toxic oysters *Crassostrea gigas* infested with *Alexandrium tamiyavanichii* in the Seto Inland Sea, Japan (available at <http://pop3.wfd.ntou.edu.tw/symposium/Toxins/Abstracts.htm>).
- Noguchi, T.** 2003. Overview of Marine Toxins in Japan (available at <http://pop3.wfd.ntou.edu.tw/symposium/Toxins/Abstracts.htm>).
- NRC.** 2003. National Research Council Canada (NRC) (available at <http://www.nrc.ca/imb>).
- Nunez, P.E. & Scoging, A.C.** 1997. Comparison of a protein phosphatase inhibition assay, HPLC assay and enzyme-linked immunosorbent assay with the mouse bioassay for the detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins in European shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 39-48.
- Ochoa, J.L., Sanchez-Paz, A., Cruz-Villacorta, A., Nunez-Vazquez, E. & Sierra-Beltran, A.** 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995: origin and impact. *Hydrobiologia* 352: 195-200.
- Ochoa, J.L., Sierra-Beltrán, A., Alonso-Colmenares, G., Barradas-Sánchez, H., Cruz-Villacorta, A., Nuñez-Vázquez, E. & Sánchez-Paz, A.** 1998. Biotoxins in the Pacific Coast of Mexico. In Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C. & J. Gilbert, eds. 1998. *Mycotoxins and phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, p. 441-448. Fort Collins, Colorado, Alaken Press.
- Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K.J., Naoki, H., Oshima, Y. & Yasumoto T.** 1999a. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat. Toxins* 7(3): 99-102.
- Ofuji, K., Satake, M., Oshima, Y., McMahon, T., James, K.J. & Yasumoto, T.** 1999b. A sensitive and specific method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry. *Nat. Toxins* 7(6): 247-250.
- Ofuji, K. et al.** 2001. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 740-742.
- Ogino, H., Kumagai, M. & Yasumoto, T.** 1997. Toxicologic Evaluation of Yessotoxin. *Nat. Toxins* 5(6): 255-259.
- Oikawa, H., Fujita, T., Satomi, M., Suzuki, T., Kotani, Y. & Yano, Y.** 2002. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*. *Toxicon* 40(11): 1593-1599.
- Onoue, Y. et al.** 1983. *J. Agric. Food Chem.* 31, 420-423. In Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G.J.A. & Waldoock, M. 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2(1): 41-83.

- Orellana-Cepeda, E., Martínez-Romero, E., Muñoz-Cabrera, L., López-Ramírez, P., Cabrera Mancilla, E. & Ramírezcamarena, C.** 1998. Toxicity associated with blooms of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in southwestern Mexico. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), p. 60. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Orhanovic, S., Nincevic, Z., Marasovic, I. & Pavela-Vrancic, M.** 1996. Phytoplankton toxins in the Central Adriatic Sea. *Croatica Chemica Acta* 69(1): 291-303.
- Orlova, T., Selina, M.S. & Stonik, I.V.** 1998. Distribution of harmful microalgae in the Peter the Great Bay, Sea of Japan, Russia. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1998. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1997, Vigo, Spain), pp. 86-87. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Osada, M., Marks, L.J. & Stewart, J.E.** 1995 Determination of domoic acid by two different versions of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 797-804.
- Oteri, G., Stamatii, A., Zampaglioni, F., Zucco, F.** 1998. Evaluation of the use of two human cell lines for okadaic acid and DTX-1 determination by cytotoxicity assays and damage characterization. *Nat. Toxins* 6(5): 197-209.
- Pan, Y., Bates, S.S. & Cembella, A.D.** 1998. Environmental Stress and Domoic Acid Production by *Pseudo-nitzschia*: a Physiological Perspective. *Nat. Toxins* 6(3-4): 127-135.
- Pan, Y., Cembella, A.D. & Quillam, M.A.** 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134: 541-549.
- Park, D.L.** 1994. Evaluation of methods for assessing ciguatera toxins in fish. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 136: 1-20.
- Park, D.L.** 1995. Detection of ciguatera and diarrhetic shellfish toxins in finfish and shellfish with Ciguatetect kit. *J. A.O.A.C Int.* 78: 533-537.
- Park, D.L., Adams, W.N., Graham, S.L. & Jackson, R.C.** 1986 Variability of mouse bioassay for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. AOAC Int.* 69: 547-550.
- Parsons, M.L., Dortch, Q. & Fryxell, G.A.** 1998. A multi-year study of the presence of potential domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species in the coastal and estuarine waters of Louisiana, USA. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 184-197. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Parsons, M.L., Scholin, C.A., Miller, P.E., Doucette, G.J., Powell, C.L., Fryxell, G.A., Dortch, Q. & Soniat, T.M.** 1999. *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in Louisiana coastal waters: molecular probe field trials, genetic variability, and domoic acid analyses. *J. Phycol.* 35(6): 1368-1378.
- Peng, Y.G. & Ramsdell, J.S.** 1996. Brain Fos Induction Is a Sensitive Biomarker for the Lowest Observed Neuroexcitatory Effects of Domoic Acid. *Fundam. Appl. Toxicol.* 31(2): 162-168.

Peng, Y.G., Taylor, T.B., Finch, R.E., Switzer, R.C. & Ransdell, J.S. 1994. Neuroexcitatory and the neurotoxic actions of the amnesic shellfish poison, domoic acid. *Neuropharmacol. Neurotoxicol.* 5: 981-985.

Peng, Y.G., Clayton, E.C. & Ramsdell, J.S. 1997. Repeated Independent Exposures to Domoic Acid Do Not Enhance Symptomatic Toxicity in Outbred or Seizure-Sensitive Inbred Mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 40: 63-67.

Peperzak, L., Bouma, H., Peletier, H. & Sandee, B. 2002. Rapport RIKZ/OS/2002.045. Jaarrapport Monisnel 2001. Dated 3 September 2002.

Perez, E., Booth, F.A. & Martin, D.F. 2000. Modeling organism-organism interactions as a means of predicting Florida red tide management potential *J. Environ. Sci. Health A35(2)*: 219-227.

Perez, C.M., Vasquez, P.A. & Perret, C.F. 2001. Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. *New Eng. J. Med.* 344(9): 692-693.

Piñeiro, N., Leão, J.M., Gago Martínez, A. & Rodríguez Vázquez, J.A. 1999. Capillary electrophoresis with diode array detection as an alternative analytical method for paralytic and amnesic shellfish toxins. *J. Chromatogr. A.* 847: 223-232.

Pinsky, C., Glavin, G. & Bose, R. 1989. Kynurenic acid protects against neurotoxicity and lethality of toxic extracts from contaminated Atlantic coast mussels. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 13: 595-598.

Pitcher, G.C., Horstman, D.A., Calder, D., De Bruyn, J.H. & POST, B.J. 1993. The first record of diarrhetic shellfish poisoning on the South African coast. *South African J. Sci.* 89: 512-514.

Pitcher, G.C., Franco, J.M., Doucette, G.J., Powell, C.L., Mouton, A. 2001. Paralytic shellfish poisoning in the abalone *Haliotis midae* on the West Coast of South Africa. *J. Shellfish Res.* 20(2): 895-904.

Pleasance, S., Ayer, S.W., Laycock, M.V. & Thibault, P. 1992a. Ionspray 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 Commun. Mass Spectrom.* 6: 14-24.

Pleasance, S., Quilliam, M.A. & Marr, J.C. 1992b. Ionspray mass spectrometry of marine toxins. IV. Determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussel tissue by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spec.* 6, 121-127. In Hallegraef *et al.*, 1995.

Pocklington, R.; Milley, J.E.; Bates, S.S.; Bird, C.J.; De Freitas, A.S.W. & Quilliam, M.A. 1990. Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 38: 351-368.

Poletti, R. et al. 1998. Distribution of toxic dinoflagellates and their impact on shellfish along the northwest Adriatic coast. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 88-90. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

- Poli, M.A., Mende, T.J. & Baden, D.G.** 1986 Brevetoxins, Unique Activators of Voltage-Sensitive Sodium Channels, Bind to Specific Sites in Rat Brain Synaptosomes. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* 30: 129-135.
- Poli, M. et al.** 1995. Radioimmunoassay for PbTx-2-Type Brevetoxins: Epitope Specificity of Two Anti-PbTx Sera. *J. AOAC. Int.* 78(2): 538-542.
- Poli, M.A. et al.** 2000. Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: a case study from Florida. *Toxicon* 38: 981-993.
- Pottier, I. et al.** 2001. Ciguatera Fish Poisoning in the Caribbean Islands and western Atlantic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 168: 99-141.
- Pouchus, Y.F. et al.** 1997. Specificity of the test based on modification of cell morphology for detection of lipophilic inhibitors of protein phosphatases. *Toxicon* 35(7): 1137-1142.
- Puech, L., Dragacci, S., Gleizes, E. & Fremy, J.M.** 1999. Use of immunoaffinity columns for clean-up of diarrhetic toxins (okadaic acid and dinophysistoxins) extracts from shellfish prior to their analysis by HPLC/fluorimetry. *Food Add. Contam.* 16 (6): 239-251.
- Qi, Y.Z., Hong, Y., Zheng, L., Kulis, D.M. & Anderson, D.M.** 1996. Dinoflagellate cysts from recent marine sediments of the south and east China seas. *Asian Marine Biology* 13: 87-103.
- Quilliam, M.A.** 1998a. General Referee reports. Committee on Natural Toxins. Phycotoxins. *J. AOAC. Int.* 81(1): 142-151.
- Quilliam, M.A.** 1998b. Liquid chromatography-mass spectrometry: A universal method for analysis of toxins? In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 509-514. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Quilliam, M.A.** 1999. General Referee Reports. Committee on Natural Toxins. Phycotoxins. *J. AOAC. Int.* 82(3): 773-784.
- Quilliam, M.A.** 2001. Committee on Natural Toxins and Food Allergens. Phycotoxins. General Referee Reports. *JAOAC. Int.* 84(1): 194-201.
- Quilliam, M.A., Thomson, B.A., Scott, G.J. & Siu, K.W.M.** 1989. Ion-spray Mass Spectrometry of Marine Neurotoxins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3: 145-150.
- Quilliam, M.A., Janecek, M. & Lawrence, J.F.** 1993. Characterization of the Oxidation Products of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6: 14-24.
- Quilliam, M.A., Xie, M. & Hardstaff, W.R.** 1995. Rapid Extraction and Cleanup for Liquid Chromatographic Determination of Domoic Acid in Unsalted Food. *J. AOAC Int.* 78(2): 543-554.
- Quilliam, M.A., Thomas, K. & Wright, J.L.C.** 1998. Analysis of Domoic Acid in Shellfish by Thin-layer Chromatography. *Nat. Toxins* 6 (3/4): 147-152.

- Quilliam, M.A., Cembella, A.D., Windust, A. & Richard, D.** 1999. A Comparison of Saxitoxin Calibration Standards by Mouse Bioassay and Chemical Analysis Methods. *Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci.* Febr. 1999. (2261): 52-57.
- Quilliam, M., Eaglesham, G., Hallegraef, G., Quaine, J., Curtis, J., Richard, D. & Nunez, P.** 2000. Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales, Australia. International Conference on Harmful Algal Blooms (Tasmania), Abstract, p.48. In Aune, T. 2001.
- Quilliam, M., Hess, P. & Dell'Aversano, C.** 2002. Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. In De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 383-391. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
- Quilliam M.A., Dell'Aversano C. & Hess, P.** 2001. Analysis of PSP Toxins by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. In *Book of Abstracts Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation*, 83. 12-16 November, Qingdao, China.
- Rademaker, M., Janmaat, L., Zevenboom, W. & De Jong, B.** 1995. Potentially toxic algae along the Dutch coast in 1994. *Harmful Algae News* 10/11(2): 2 (available at <http://ioc.unesco.org/hab/HAN%2010-11.pdf>).
- Raikhlin-Eisenkraft, B. & Bentur, Y.** 2002. Rabbitfish ("Aras"): An Unusual Source of Ciguatera Poisoning. *Isr. Med. Assoc. J.* 4(1): 28-30.
- Ravn, H.** 1995. HAB Publication series Volume 1. Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). *IOC Manuals and Guides* 31. 15pp.
- Rein, K.S., Lynn, B., Gawley, R.E. & Baden, D.G.** 1994. Chemical Modifications, Synaptosome Binding, Toxicity, and an Unexpected Conformational Effect. *J. Org. Chem.* 59: 2107-2113.
- Rhodes, L.L.** 1998. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32: 537-544.
- Rhodes, L.L. & Syhre, M.** 1995. Okadaic acid production by a New Zealand *Prorocentrum lima* isolate. *New Zealand J. Mar. Freshwat. Res.* 29(3): 367-370.
- Rhodes, L., Scholin, C., Garthwaite, I., Haywood, A. & Thomas, A.** 1998. Domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species detected by whole cell DNA probe-based and immunochemical assays. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae* (June 1999, Vigo, Spain), pp. 274-277. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Romdhane, M. S., Eilertsen, H.C., Yahia, K.D. & Yahia, M.N.D.** 1998. Toxic dinoflagellate blooms in Tunisian lagoons: Causes and consequences for aquaculture. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 80-83. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

- Ritchie, A.H.** 1993. Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins. *Soc. Appl. Bacteriol.* 31: 191-201.
- De Porras, E., Velasquez, O.H., Tauxe, R.V., Kilbourne, E.M. & Blake, P.A.** 1990 Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *Am. J. Trop. Med.* 42(3): 267-271.
- Rogers, C.G. & Boyes, B.G.** 1989. Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in a hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. *Mutat. Res.* 226, 191-195.
- Ruprecht, K., Rieckmann, P. & Gless, R.** 2001. Ciguatera: Klinische Bedeutung eines marinen Neurotoxins. *Dtsch. Med. Wschr.* 126: 812-814.
- Saba, H.I., Briggs, D.M. & Kerr, D.S.** 1997. A neurophysiological method of marine biotoxin detection. *Soc. Neurosci. Abstracts* 23(1-2): 1473.
- Sako, Y.** 1999. Molecular identification of toxic marine dinoflagellates *Alexandrium* species. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 54: 311-324.
- Salati, F. & Meloni, A.** 1994. Le biotossine ed i molluschi in allevamento (Biotoxins in cultured molluscs). *Rivista Italiana Acquacoltura* 29: 141-147.
- Samson, J.C., Robertson, T.L. & Weis, J.S.** 1999. Behavioral effects of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium* on larval mummichogs, *Fundulus heteroclitus*. *American Zoologist* 39(5), 129A.
- Sarno, D. & Dahlmann, J.** 2000. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Harmful Algae News* 21, 5.
- Sasaki, K., Wright J.L.C., Yasumoto, T.** 1998. Identification and characterization of Pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported Pectenotoxins. *J. Org. Chem.* 63: 2475-2480.
- Sasaki, K., Takizawa, A., Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R. & Yasumoto, T.** 1999. Fluorometric analysis of Pectenotoxin-2 in microalgal samples by high performance liquid chromatography. *Nat. Toxins* 7: 241-246.
- Satake, M., Ishimaru, T., Legrand, A.M. & Yasumoto, T.** 1993. Isolation of a ciguatoxin analog from cultures of *Gambierdiscus toxicus*. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. New York, Elsevier. pp. 575-579.
- Satake, M., MacKenzie, L. & Yasumoto, T.** 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the Biogenetic origin of Yessotoxin. *Nat. Toxins* 5: 164-167.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahan, T., Silke, J. & Yasumoto, T.** 1998a. New toxic event caused by Irish mussels. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 468-469. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahan, T., Silke, J. & Yasumoto, T.** 1998b. Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9967-9968.

- Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S. & Oshima, Y.** 1999. Confirmation of Yessotoxin and 45,46,47-Trinoryessotoxin Production by *Prorocentrum reticulatum* Collected in Japan. *Nat. Toxins* 7: 147-150.
- Sato, S., Kodama, M., Ogata, T., Saitanu, K., Furuya, M., Hirayama, K. & Kakinuma, K.** 1997. Saxitoxin as a toxic principle of a freshwater puffer, *Tetraodon fangi*, in Thailand. *Toxicon* 35(1): 137-140.
- Sato, S., Ogata, T., Borja, V., Gonzales, C., Fukuyo, Y. & Kodama, M.** 2000. Frequent occurrence of paralytic shellfish poisoning toxins as dominant toxins in marine puffer from tropical water. *Toxicon* 38: 1101-1109.
- Sawyer, P. R., Jollow, D. J., Scheuer, P. J., York, R., McMillan, J. P., Withers, N. W., Fudenberg, H. H. & Higerd, T. B.** 1984. Effect of ciguatera associated toxins on body temperature in mice. In Regalis, E.P. ed. Seafood toxins. Washington DC, *Am. Chem. Soc. Series*, pp. 321-329.
- Schantz, E.J., McFarren, E.F., Schafer M.L. & Lewis, K.H.** 1958. Purified shellfish poison for bioassay standardization. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 41: 160-168.
- Scheuer, P.J.** 1994. Ciguatera and its off-shoots – chance encounters en route to a molecular structure. *Tetrahedron* 5: 3-18.
- Schmued, L., Scallet, A. & Slikker, W.** 1995. Domoic acid-induced neuronal degeneration in the primate forebrain revealed by degeneration specific histochemistry. *Brain Res.* 695: 64-70.
- Scholin, C.A., Miller, P., Buck, K.R., Chavez, F., Harris, P., Haydock, P., Howard, J. & Cangelosi, G.** 1997. Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol. Oceanogr.* 42(5, Part 2):1275-1272.
- Scholin, C.A., Marin, R. III, Miller, P.E., Doucette, G.J., Powell, C.L., Haydock, P., Howard, J. & Ray, J.** 1999. DNA probes and a receptor binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J. Phycol.* 35: 1356-1367.
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marin, R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V. & Van Dolah, F.M.** 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403(6): 80-84.
- Scoging, A.C.** 1991. Illness associated with seafood. *Communicable Disease Report* U (11): R117-R122.
- Sedmak, B. & Fanuko, N.** 1991. Occurrence of *Dinophysis* spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic. *J. Appl. Phycol.* 3: 289-294.
- Shea, D.** 1997. Analysis of brevetoxins by micellar electrokinetic capillary chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 18: 277-283.

- Sheu, C.W., Rodriguez, I., Dobras, S.N., et al.** 1995. Induction of morphological transformation in BALB/3T3 mouse embryo cells by okadaic acid. *Fd. Chem. Toxicol.* 33 (10): 883-885.
- Shimojo, R.Y. & Iwaoka, W.T.** 2000. A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel-specific marine toxins. *Toxicology* 154: 1-7.
- Shumway, S.E.** 1995. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.* 3(1): 1-31.
- Shumway, S.E., Sherman-Caswell, S. & Hurst, J.W.** 1988. Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. *J. Shellfish Res.* 7(4): 643-652.
- Shumway, S.E., Van Egmond, H.P., Hurst, J.W. & Bean, L.L.** 1995. Management of shellfish resources. In Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Enevoldsen, H.O. eds. *Manual on harmful marine microalgae*, pp. 433-461. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
- Sidari, L., Nichetto, P., Cok, S., Sosa, S., Tubaro, A., Honsell, G. & Della Loggia, R.** 1998. Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. *Marine Biology* 131: 103-111.
- Sierra Beltrán, A., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A. & Ochoa, J.L.** 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35(3): 447-453.
- Sierra-Beltran, A.P., Cruz, A., Nunez, E., Del Villar, L.M., Cerecero, J. & Ochoa, J.L.** 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 36(11): 1493-1502.
- Sim, J. & Wilson, N.** 1997. Surveillance of marine biotoxins, 1993.-1996. *New Zealand Public Health Report* 4(2): 9-16.
- Simon, J.F. & Vernoux, J.P.** 1994. Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Nat. Toxins* 2: 293-301.
- Siu, G.K.Y. Young, M.L.C. & Chan, D.K.O.** 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352: 117-140.
- Slikker, W., Scallet, A.C. & Gaylor, D.W.** 1998. Biologically-based dose-response model for neurotoxicity risk assessment. *Toxicol. Lett.* 102-103: 429-433.
- Smith, D.S. & Kidds, D.D.** 1994. A competitive enzyme-linked immunoassay for domoic acid determination in human body fluids. *Fd. Chem. Toxicol.* 32(12): 1147-1154.
- Smith, D.S. & Kitts, D.D.** 1995. Enzyme Immunoassay for the Determination of Domoic Acid in Mussel Extracts. *J. Agric. Food. Chem.* 43: 367-371.
- Smith, P.J., Chang, F.H. & MacKenzie, L.** 1993. Toxic phytoplankton and algal blooms, summer 1992/93. In Jasperse, J.A. ed. 1993. *Marine toxins and New Zealand shellfish. Proceedings of a workshop on research issues*, 10-11 June 1993. The Royal Society of New Zealand, Miscellaneous Series 24, pp. 11-17.

- Smith, W., Lieber, B., Perrotta, D.M. & Hokama, Y.** 1998. Ciguatera Fish Poisoning – Texas, 1997. *Morb. Mortal. Weekly Report* 47(33): 692-694.
- Sobotka, T.J., Brown, R., Quander, D.Y., Jackson, R., Smith, M. & Long, S.A.** 1996. Domoic Acid: Neurobehavioural and Neurohistological Effects of Low-Dose Exposure in Adult Rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 18(6): 659-670.
- Songhui, L.U. & Hodgkiss, I.J.** 2001. Identifying Harmful Marine Raphidophytes in Hong Kong Waters. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 72. IOC UNESCO, Paris.
- Sparkman, O.D.** 2000. *Mass Spec Desk Reference*. Pittsburg, Pennsylvania, Global View Publishing. First Edition, p. 8.
- Stamman, E., Segar, D.A. & Davis, P.G.** 1987 A preliminary epidemiological assessment of the potential for diarrhetic shellfish poisoning in the northeast United States. *NOAA Technical Memorandum NOS OMA* 34.
- Stancioff, E.** 2000. The Maine Phytoplankton Monitoring Program (available at http://www.nwqmc.org/2000.proceedings/papers/pap_stancioff.pdf).
- Stewart, J.E., Marks, L.J., Gilgan, M.W., Pfeiffer, E. & Zwikler, B.M.** 1998. Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 44: 456-464.
- Stumpf R.P., Ransibrahmanakul, V. & Steidinger, K.A.** 1998. Observations of sea surface temperature and winds associated with Florida, USA, red tides (*Gymnodinium breve* blooms). In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. et al. eds. *Harmful Algae. Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae, 1997*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Paris, pp. 145-148.
- Suárez-Isla, B.A.** 2001. Impacts of Harmful Algal Blooms in Chile. Monitoring and Management. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 90. IOC UNESCO, Paris.
- Subba Rao D.V., Pan, Y. & Mukhida, K.** 1998. Production of Domoic Acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* Hasle, Affected by Lithium. *Mar. Ecol.* 19(1): 31-36.
- Suganuma, M., Tatematsu, M., Yatsunami, J., Yoshizawa, S., Okabe, S., Uemura, D. & Fujiki, H.** 1992. An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis* 13(10): 1841-1845.
- Sullivan, J.J.** 1988. Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: a review. *J. Shellfish Res.* 7: 587-595.
- Sumner, J. & Ross, T.** 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 55-59.

- Sun, T. & Wong, W.H.** 1999. Determination of Domoic Acid in Phytoplankton by High-Performance Liquid Chromatography of the 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl Carbamate Derivative. *J. Agric. Food Chem.* 47 (11): 4678-4681.
- Suzuki, T & Mitsuya, T.** 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 39: 905-908.
- Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T. & Yamasaki, M.** 1996. Interference of Free Fatty Acids from the Hepatopancreas of Mussels with the Mouse Bioassay for Shellfish Toxins. *Lipids* 31 (6): 641-645.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H. & Yamasaki, M.** 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection: Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *J. Chromatogr. A* 815: 155-160.
- Suzuki, T., Ota, H. & Yamasaki, M.** 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-*O*-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37: 187-198.
- Suzuki, T. & Yasumoto, T.** 2000. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *J. Chromatogr. A* 874(2): 199-206.
- Suzuki, T., MacKenzie, L., Stirling, D., & Adamson, A.** 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canalicus*. *Toxicon* 39: 507-514.
- Tahri Joutei L.** 1998. *Gymnodinium catenatum* Graham blooms on Moroccan waters. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 66-67. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Takata, K., Mizuta, M. & Monden, T.** 1994. Reduction in toxicity of PSP-infected oysters by heat treatment. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 35: 624-630.
- Takatani, T., Akaeda, H., Arakawa, O. & Noguchi, T.** 1997. Occurrence of Paralytic Shellfish Poison (PSP) in Bivalves, along with Mossworm Adherent to Their Shells, Collected from Fukue Island, Nagasaki, Japan during 1995 and 1996. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 38(6): 430-434.
- Takatani, T., Nakano, F., Arakawa, O. & Noguchi, T.e.** 2003. Reduction in Toxicity of PSP-infested oyster during retorting process: effectivity of pretreatment and microwave heating (available at <http://pop3.wfd.ntou.edu.tw/symposium/Toxins/Abstracts.htm>).
- Taleb, H., Vale, P. & Blaghen, M.** 1998. Seasonality of PSP toxicity in shellfish from the Atlantic and Mediterranean coasts of Morocco. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 68-69. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

- Taroncher-Oldenburg, G., Kulis, D.M. & Anderson, D.M.** 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* 42(5 Part 2): 1178-1188.
- Tasker, R.A.R., Connell, B.J. & Strain, S.M.** 1991. Pharmacology of systematically administered domoic acid in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69(3): 378-382.
- Tasker, R.A., Strain, S.M. & Drejer, J.** 1996. Selective reduction in domoic acid toxicity in vivo by a novel non-*N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1047-1054.
- Taylor, F.J.R., Fukuyo, Y. & Larsen, J.** 1995. Taxonomy of harmful dinoflagellates. In Hallegraeff G.M. *et al.* eds. *Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and Guides* 33. UNESCO. pp. 283-317.
- Teegarden, G.J.** 1999. Copepod grazing selection and particle discrimination on the basis of PSP toxin content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181: 163-176.
- Teegarden, G.J. & Cembella, A.D.** 1996. Grazing of toxic dinoflagellates, *Alexandrium* spp., by adult copepods of coastal Maine: Implications for the fate of paralytic shellfish toxins in marine food webs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 196: 145-176.
- Teitelbaum J.S., Zatorre R.J., Carpenter S., Gendron D., Evans A.C., Gjedde A. & Cashman N.R.** 1990 Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N. Engl. J. Med.* 322: 1781-1787.
- Ten-Hage, L., Delaunay, N., Pichon, V., Couté, A., Puiseux-Dao, S. & Turquet, J.** 2000. Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef system (SW Indian Ocean). *Toxicon* 38: 1043-1054.
- Tester, P.A., Turner, J.T. & Shea, D.** 2000. Vectorial transport of toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium breve* through copepods to fish. *J. Plankton Res.* 22(1): 47-61.
- Thibault, P., Pleasance, S. & Laycock, M.V.** 1991 Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 542: 483-501.
- Thielert, G., Peters, K., Kaiser, I. & Luckas, B.** 1991 HPLC methods for the determination of PSP toxins. In Fremy, J.M. ed. *Proceedings of the Symposium on Marine Biotoxins*, pp. 121-125. Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires, Paris, January 1991.
- Tibbets, J.** 1998. Toxic Tides. *Environ Health Perspect* 106(7): A326-A331.
- Ting, J.Y.S. & Brown, A.F.T.** 2001. Ciguatera poisoning: a global issue with common management problems. *Eur. J. Emerg. Med.* 8(4): 295-300.
- Todd, E.C.D.** 1993. Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning- A Review. *J.Food Protection* 56(1): 69-83.
- Todd, E.C.D.** 1997. Seafood-associated diseases and control in Canada. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 16 (2): 661-672.

Todd, E.C.D., Kuiper-Goodman, T., Watson-Wright, W., Gilgan, M.W., Stephen, S., Marr, J. & Pleasance S. 1993. Recent illnesses from seafood toxins in Canada: Paralytic, amnesic and diarrhetic shellfish poisoning. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam. *Developments in Marine Biology* 3: 335-339.

Tosteson, T.R., Ballantine, D.L. & Winter, A. 1998. Sea surface temperature, benthic dinoflagellate toxicity and toxin transmission in the ciguatera food web. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1998. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1997, Vigo, Spain), pp. 48-49. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Trainer, V. L. & Baden, D.G. 1991. An enzyme immunoassay for the detection of Florida red tide brevetoxins. *Toxicon* 29(11): 1387-1394.

Trainer, V.L., Baden, D.G. & Caterall, W.A. 1995. Detection of Marine Toxins Using Reconstituted Sodium Channels. *J. AOAC Int.* 78(2): 571-573.

Trainer, V.L., Adams, N.G., Bill, B.D., Anulacion, B.F. & Wekell, J.C. 1998a. Concentration and Dispersal of a *Pseudo-nitzschia* Bloom in Penn Cove, Washington, USA. *Nat. Toxins* 6: 13-126.

Trainer, V.L., Wekell, J.C., Horner, R.A., Hatfield, C.L., & Stein, J.E. 1998. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia pungens*. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 337-340. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Traynor, I.M., Crooks, S.H.R., Plumpton, L. & Elliott, C.T. 2002. Detection of the marine toxin domoic acid in bivalve molluscs by immunobiosensor. Poster presented at the 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis. 4-7 June 2002. Antwerpen, Belgium.

Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P. & Hecht, G. 1997. The Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning, Okadaic Acid, Increases Intestinal Epithelial Paracellular Permeability. *Gastroenterology* 112: 100-108.

Truelove, J., Mueller, R., Pulido, O. & Iverson, F. 1996. Subchronic Toxicity Study of Domoic Acid in the Rat. *Food Chem. Toxicol.* 34: 525-529.

Truelove, J., Mueller, R., Pulido, O., Martin, L., Fernie, S., Iverson, F. 1997. 30-Day oral Toxicity Study of Domoic Acid in Cynomolgus Monkeys: Lack of Overt Toxicity at Doses Approaching the Acute Toxic Dose. *Nat. Toxins* 5: 111-114.

Truman, P. & Lake, R.J. 1996. Comparison of Mouse Bioassay and Sodium Channel Cytotoxicity Assay for Detecting Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Extracts. *J. AOAC Int.* 79(5): 1130-1133.

Trusewich, B., Sim, J., Busby, P. & Hughes, C. 1996. Management of marine biotoxins in New Zealand. In Yasumoto, T., Oshima, Y. & Y. Fukuyo, eds. *Harmful and Toxic Algal Blooms, Proceedings of the VII International Conference on Toxic Phytoplankton, July 1995, Sendai, Japan*. pp. 27-30. Paris, IOC/UNESCO.

- Tryphonas, L., Truelove, J. & Iverson, F.** 1990a. Experimental oral toxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and rats. Preliminary investigations. *Food Chem. Toxicol.* 28(10): 707-715.
- Tryphonas, L., Truelove, J., Nera, E. & Iverson, F.** 1990b. Acute Neurotoxicity of Domoic Acid in the Rat. *Toxicol. Pathol.* 18(1, Part 1): 1-9.
- Tryphonas, L., Truelove, J. & Iverson, F.** 1990. Acute Parenteral Neurotoxicity of domoic Acid in Cynomolgus Monkeys (*M. fascicularis*). *Toxicol. Pathol.* 18(2): 297-303.
- Tubaro, A., Sosa, S., Bruna, M., Gucci, P.M.B., Volterra, L. & Loggia, R.D.** 1992. Diarrhoeic shellfish toxins in Adriatic sea mussels evaluated by an Elisa method. *Toxicon* 30(5/6): 673-676.
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Sosa, S., Della Loggia, R. & Yasumoto, T.** 1996a. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon* 34 (7): 743-752.
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., Della Loggia, R. & Yasumoto, T.** 1996b. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon* 34(9): 965-974.
- Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R. & Yasumoto, T.** 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 470-472. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
- Underdal, B.** 1989. Marine algal toxins as an intoxication threat in Norway. In Natori, S., Hashimoto, K., & Y. Ueno, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins '88. A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, August 1988, Japan. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. *Bioact. Mol.* 10: 295-302.
- Uribe, J.C., García, C., Rivas, M. & Lagos, N.** 2001. First report of diarrhetic shellfish toxins in Magellanic fjords, southern Chile. *J. Shellfish Res.* 20(1): 69-74.
- Usleber, E., Donald, M., Straka, M., et al.** 1997. Comparison of enzyme immunoassay and mouse bioassay for determining paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Add. Contam.* 14(2): 193-198.
- Usup, G. & Ahmad, A.** 2001. Current Status of PSP in Malaysia. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 96. IOC UNESCO, Paris.
- Vale, P. & De M. Sampayo, M.A.** 1999. Comparison between HPLC and a commercial immunoassay kit for detection of okadaic acid and esters in Portuguese bivalves. *Toxicon* 37: 1565-1577.
- Vale, P. & De M. Sampayo, M.A.** 2001. Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon* 39: 893-904.

- Vale, P. & De M. Sampayo, M.A.** 2002. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* 40: 989-996.
- Van Apeldoorn, M.E.** 1998. Diarrhoeic shellfish poisoning: A review. RIVM/CSR Report 05722A00. August 1998.
- Van Apeldoorn, M.E.** 1999. Amnesic shellfish poisoning: A review. RIVM report 388802 019. October 1999.
- Van Apeldoorn, M.E.** 2001. Neurotoxic shellfish poisoning: A review. RIVM report 388802 023. September 2001.
- Van der Vyver, I. & Pitcher, G.** 2000. Red tide and shellfish poisoning. Dated 13 November 2000. Department of Botany, University of the Western Cape (available at <http://www.botany.uwc.ac.za>).
- Van Dolah, F.M., Finley, E.L., Haynes, B.L., Doucette, G.J., Moeller, P.D. & Ramsdell, J.S.** 1994. Development of Rapid and Sensitive High Throughput Pharmacologic Assays for Marine Phycotoxins. *Nat. Toxins* 2(4): 189-196.
- Van Dolah, F.M., Leighfield, T.A., Haynes, B.L., Hampson, D.R. & Ramsdell, J.S.** 1997. A Microplate Receptor Assay for the Amnesic Shellfish Poisoning Toxin, Domoic Acid, Utilizing a Cloned Glutamate Receptor. *Anal. Biochem.* 245: 102-105.
- Van Dolah, F.M., Roelke, D. & Greene, R.M.** 2001. Health and Ecological Impacts of Harmful Algal Blooms: Risk Assessment Needs. *Human Ecological Risk Assessment* 7(5): 1329-1345.
- Van Dolah, F.M., Morton, S.V., Leighfield, T.A., Haynes, B.L., Petitpain, D.L., Busan, M.A., Moeller, P.D.R. & Hurst Jr., J.W.** Undated. Evidence for diarrhetic shellfish poisoning in Maine coastal waters (available at www.bio.gasou.edu/Bull-MDIBL/Bull-00/reports/pages49.2000.%2520/VanDolah.pdf, accessed on 2 April 2003).
- Van Egmond, H.P. & Speijers, G.J.A.** 1999. Natural Toxins II. Phycotoxins. In Van der Heijden K. et al. eds. *International Food Safety Handbook. Science, International Regulation and Control*. pp. 357-368. New York, Marcel Dekker Inc.
- Van Egmond, H.P., Speyers, G.J.A. & Van den Top H.J.** 1992. Current situation on worldwide regulations for marine phycotoxins. *J. Nat. Toxins* 1(1): 67-85.
- Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G. & Waldock, M.** 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
- Van Egmond, H.P., Van den Top, H.J., Paulsch, W.E., Goenaga, X. & Vieytes, M.R.** 1994. Paralytic shellfish poison reference materials: An intercomparison of methods for the determination of saxitoxin. *Food Add. Contam.* 11(1): 39-56.

Van Egmond, H.P., Mouriño, A., Burdaspal, P.A., Bustos, J., Legarda, T., Mesego, A., Paulsch, W.E., Saldago, C., Van de Top, H.J. & Boenke, A. 1998. The certification of the mass fractions of saxitoxin and dc-saxitoxin in two mussel reference materials (CRM 542 & 543) including the identification of other PSP toxins, and a spiking procedure based on an enrichment solution (CRM 663) with a certified mass concentration of saxitoxin. Publication of the European Communities. Directorate-General Science, Research and Development, 1998. Report EUR Report 18318.

Van Egmond H.P., Jonker, K.M., Poelman, M., Scherpenisse, P., Stern, A.G., Wezenbeek, P., Bergwerff, A.A. & Van den Top, H.J. 2004. Proficiency studies on the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish in the Netherlands. *Food Addit. Contam.* 21 (4): 331-340.

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 Add. Contam.* 17(6): 419-433.

Van den Top, H.J., Boenke, A., Burdaspal, P.A., et al. 2001. The development of reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins in lyophilized material. II: Certification study. *Food Add. Contam.* 18(9): 810-824.

Vernoux, J.P. & Lewis, R.J. 1997. Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon* 35: 889-900.

Vernoux, J.P., Lahlou, N., Magras, L.P. & Greaux, J.B. 1985 Chick feeding test: A simple system to detect ciguatoxins. *Acta Trop.* 42: 235-240.

Vernoux, J.P., Le Baut, C., Masselin, P., Marais, C., Baron, B., Choumiloff, R., Proniewski, F., Nizard, G. & Bohec, M. 1993. The use of *Daphnia magna* for detection of okadaic acid in mussel extracts. *Food Add. Contam.* 10 (5): 603-608.

Vieites, J.M., Botana, L.M., Vieytes, M.R. & Leira, F.J. 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *J. Food Protection* 62(5): 5151-519.

Vieytes, M.R., Fontal, O.I., Leira, F., Baptista de Sousa, J.M. & Botana, L.M. 1997. A Fluorescent Microplate Assay for Diarrhetic Shellfish Toxins. *Anal. Biochem.* 248: 258-264.

Villac, M.C., Roelke, D.L., Villareal, T.A. & Fryxell, G.A. 1993a. Comparison of two domoic acid-producing diatoms; a review. *Hydrobiologia* 269/270: 213-224.

Villac, M.C., Fryxell, G.A., Chavez, F.P. & Cifuentes, L.A. 1993b. *Pseudo-nitzschia Australis* Frenguelli and Related Species from the West Coast of the USA: Occurrence and Domoic Acid Production. *J. Shellfish Res.* 12(2): 457-465.

Villareal, T.A., Roelke, D.L. & Fryxell, G.A. 1994. Occurrence of the Toxic Diatom *Nitzschia pungens* f. multiseriis in Massachusetts Bay, Massachusetts, USA. *Mar. Environ. Res.* 37: 417-423.

Viviani, R. 1992. Eutrophication, marine biotoxins, human health. *Sci. Total Environ. Suppl.:* 631-662.

- Waldock, M.J., Evans, K.M., Law, R.J. & Fileman, T.W.** 1991. An assessment of the suitability of HPLC techniques for monitoring of PSP and DSP on the east coast of England. *In* Fremy, J.M. ed. *Proceedings of the international symposium on marine biotoxins*, pp. 137-147. Paris, CNEVA Pub. Series, Maisons-Alfort.
- Warlen, S.M., Tester, P.A. & Colby, D.R.** 1998. Recruitment of larval fishes into North Carolina estuary during bloom of the red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*. *Bull. Mar. Sci.* 63(1): 83-95.
- Watters, M.R.** 1995. Review article. Organic neurotoxins in seafoods. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 97: 119-124.
- Wekell, J.C. et al.** 1994a. The occurrence of domoic acid in razor clams (*Siliqua patula*), Dungeness crab (*Cancer magister*), and anchovies (*Engraulis mordax*). *J. Shellfish Res.* 13 (2): 587-593.
- Wekell, J.C., Gauglitz, E.J., Barnett, H.J., Hatfield, C.L., Simons, D. & Ayres, D.** 1994b. Occurrence of domoic acid in Washington State razor clams (*Siliqua patula*) during 1991-1993. *Nat. Toxins* 2: 197-205
- Wekell, J.C., Lorenzana, R.M., Hogan, M., et al.** 1996. Survey of paralytic shellfish poison and domoic acid in Puget Sound predatory gastropods. *J. Shellfish Res.* 15 (2), 231-236.
- Whitney, P.L., Delgado, J.A. & Baden, D.G.** 1997. Complex behavior of marine animal tissue extracts in the competitive binding assay of brevetoxins with rat brain synaptosomes. *Nat. Toxins* 5: 193-200.
- Whyte, J.N.C., Davis, J.C. & Forbes, J.R.** 1997. Harmful algae in Canadian waters and management strategies. *Ocean Res.* 19(2): 161-171.
- Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A. & Bardouil, M.** 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11: 35-43.
- Willoughby, R., Sheehan, E. & Mitrovich, S.** 1998. *A global view of LC/MS. How to solve your most challenging analytical problems*. Pittsburg, Pennsylvania, Global View Publishing. 1st Edition.
- Windust, A.J., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C. & MacLachlin, J.L.** 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Mar. Biol.* 126: 19-25.
- Windust A.J., Quilliam M.A., Wright J.L.C. & McLachlan J.L.** 1997. Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassioria weissflogii*. *Toxicon* 35(11): 1591-1603.
- Wright, J.L.C.** 1995. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Research International* 28(4): 347-358.
- Wright, J.L.C. & Quilliam, M.A.** 1995. 7. Methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisons. *In* Hallegraeff, G.M. et al. eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO. pp.113-133.

Wright, J.L.C., Boyd, R.K., De Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V.P., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J. & Dewar, D. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* 67: 481-490.

Xi, D., Peng, Y.G. & Ramsdell, J.S. 1997. Domoic Acid is a Potent Neurotoxin to Neonatal Rats. *Nat. Toxins* 5(2): 74-79.

Yan T., Zhou M., Fu M., Wang Y., Yu R. & Li J. 2001. Inhibition of Egg Hatching Success and Larvae Survival of the Scallop, *Chlamys Farreri*, associated with Exposure to Cells and Cell Fragments of the Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense*. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 106. IOC UNESCO, Paris.

Yasumoto, T. & Satake, M. 1998. New toxins and their toxicological evaluations. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. & T. Wyatt, eds. 1997. *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*, (June 1999, Vigo, Spain), pp. 461-464. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Yasumoto, T. & Takizawa, A. 1997. Fluorimetric measurement of Yessotoxins in Shellfish by High-pressure Liquid Chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61(10): 1775-1777.

Yasumoto, T., Oshima, Y. & Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tokohu District. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44(11): 1249-1255.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K. & Clardy, J. 1984a. Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symposium Series No. 262. In Ragelis, E.P. ed. *Seafood Toxins*, pp. 207-214. American Chemical Society Symposium Series.

Yasumoto, T., Raj, U. & Bagnis, R. 1984b. Seafood poisoning in tropical regions. Lab of Food Hyg., Fac. of Agric., Tohoku Univ., Japan. In Juranovic, L.R. and Park, D.L. 1991 Food born toxins of marine origin *In ciguatera*. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 117: 51-94.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K. & Clardy, J. 1985. Diarrhetic Shellfish Toxins. *Tetrahedron* 41(6): 1019-1025.

Yasumoto, T., Satake, M., Fukui, M., Nagai, H., Murata, M., Legrand, A.M. 1993. A turning point in ciguatera study. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 455-461. Elsevier, New York.

Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K. & Sugiyama, K. 1995. Determinations of marine toxins in foods. *J. AOAC Int.* U(2): 574-582.

Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T. & Naoki, H. 2000. Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 4988-4989.

- Yasumoto, T., Igarashi, T. & Satake, M.** 2001. Chemistry of phycotoxins-Structural elucidation. In De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & M. Sabino, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 465-474. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
- Yokoyama, A., Murata, M., Oshima, Y., Iwashita, T. & Yasumoto, T.** 1988. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist from a marine dinoflagellate. *J. Biochem.* 104(2): 184-187.
- Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y.** 1997a. Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. *Toxicon* 35(3): 423-431.
- Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y., Nishio, S., Shida, Y. & Noguchi, T.** 1997b. Two new isomers from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon* 35(2): 205-212.
- Zhang, F. & Dickman, M.** 1999. Mid-ocean exchange of container vessel ballast water. 1: Seasonal factors affecting the transport of harmful diatoms and dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176: 243-251.
- Zhao, J., Lembeye, G., Cenci, G., Wall, B. & Yasumoto, T.** 1993. Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu, eds. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 587-592. Amsterdam, Elsevier.
- Zhao, J.Y., Thibault, P. & Quilliam, M.A.** 1997. Analysis of domoic acid and isomers in seafood by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 268-276.
- Zhijun, T. et al.** 2001. The Effects of *Alexandrium tamarensis* on Survival, Growth and Reproduction of *Neomysis Awatschensis*. In Zhu, M., Zou, Y., Cheong L., & S. Hall, eds. *Proceedings of the Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation* (November 2001, Qingdao, China), p. 94. IOC UNESCO, Paris.
- Zhou, Z.H., Komiyama, M., Terao, K. & Shimada, Y.** 1994. Effects of Pectenotoxin-1 on Liver Cells In Vitro. *Nat. Toxins* 2: 132-135.
- Zhou, M., Li, J., Luckas, B., Yu, R., Yan, T., Hummert, C. & Kastrup, S.** 1999. A recent shellfish toxin investigation in China. *Mar. Poll. Bull.* 39(2): 331-334.
- Zou, Y., Zhu, M. & Wu, R.** 2001. Accumulation and Depuration of Paralytic Shellfish Poisons (PSP) in Chinese Scallop *Chlamys farrerei*. In Book of Abstracts, Second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation (12-16 November, Qingdao, China), p.122.

Para más información:

Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias

Dirección de Alimentación y Nutrición

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

Viale delle Terme di Caracalla

00100 Roma, Italia

Fax: (+39) 06 57054593

Correo electrónico: food-quality@fao.org

Sitio internet: <http://www.fao.org>

Este estudio ofrece una extensa revisión de diferentes aspectos relacionados con cinco síndromes de intoxicación por mariscos (intoxicación paralítica por mariscos, intoxicación diarreica por mariscos, intoxicación amnésica por mariscos, intoxicación neurológica por mariscos e intoxicación azapiracida por mariscos) y un síndrome de intoxicación por pescados. Se analizan en detalle diversos aspectos de los síndromes, las toxinas responsables producidas por organismos marinos, las estructuras químicas y los métodos de análisis, hábitat y presencia de los organismos productores de toxinas, estudios de caso y reglamentaciones vigentes. Se han realizado evaluaciones de riesgo basadas para cada toxina y elaborado recomendaciones para una mejor gestión de los riesgos, que permita reducir los efectos perjudiciales de estas toxinas en la salud pública.