

Actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas

María L. Rodríguez-Velasco, Begoña Ben-Gigirey,
Adriano Villar-González y Luis M. Botana.
*Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM),
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN),
Estación Marítima s/n, 36200 Vigo.*

Resumen

El Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria en Vigo es Laboratorio Comunitario de Referencia para el control de las biotoxinas marinas (LCRBM), lo que conlleva unas tareas de coordinación y liderazgo en el análisis de biotoxinas marinas en el marco de la Unión Europea. Por otro lado, el LCRBM es también el Laboratorio Nacional de Referencia (LNRBM) en España. Las funciones que como LCR y como LNR le asigna la legislación europea, incluyen labores de coordinación de actividades de los laboratorios europeos o nacionales, según el caso, en la aplicación de los métodos oficiales de análisis de biotoxinas marinas. Entre ellas, la organización de ensayos comparativos y su adecuado seguimiento de acuerdo con los protocolos internacionalmente reconocidos; así como la provisión de información, formación y asistencia científico-técnica a los laboratorios nacionales de control oficial, a los laboratorios de la red europea, a las autoridades competentes y a los Países Terceros. En el presente trabajo, se describen las diferentes actividades llevadas a cabo por el LCRBM, en especial, en cuanto a la organización de ensayos comparativos para la determinación de toxinas PSP y lipofílicas, dirigidos a la red europea y nacional, así como todas aquellas actividades encaminadas a la armonización de los métodos que se vienen aplicando y al desarrollo y validación de nuevos métodos analíticos alternativos al bioensayo en ratón, por tratarse de una urgente necesidad en este campo de la seguridad alimentaria.

Introducción

El Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo [1], sobre los controles oficiales de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales, establece como necesaria la designación de laboratorios comunitarios y nacionales de referencia con el fin de contribuir a que los resultados de los análisis sean de elevada calidad y uniformes. En sus artículos 32 y 33 el citado Reglamento establece, respectivamente, las responsabilidades y requisitos de los laboratorios comunitarios y nacionales de referencia. El Reglamento (CE) nº 776/2006 [2] designa al Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria en Vigo como Laboratorio Comunitario de Referencia para el control de las

biotoxinas marinas (LCRBM). Por otro lado, el LCRBM es, a su vez, laboratorio nacional de referencia en España (LNRBM). Las funciones asignadas al LCRBM son, por tanto, las de coordinar y liderar las actividades relacionadas con el control, desarrollo de métodos analíticos, etc, de las biotoxinas marinas en España y en la Unión Europea. Entre dichas funciones se encuentran: 1) proporcionar a los LNR los detalles de los métodos analíticos, en especial de los métodos de referencia; 2) coordinar la aplicación de dichos métodos mediante la organización de ensayos comparativos, asegurando un adecuado seguimiento de los mismos; 3) coordinar la investigación de nuevos métodos analíticos e informar de los avances; 4) organizar cursos de formación inicial y continua dirigidos al personal de los LNR y a expertos de países en desarrollo; 5) proporcionar a la Comisión asistencia científica y técnica, sobre todo en los casos en que un Estado miembro cuestione los resultados de los análisis; 6) colaborar con los laboratorios encargados de realizar los análisis en terceros países.

Dentro de las actividades de coordinación, provisión de asistencia técnica y formación, el LCRBM viene organizando Grupos de Trabajo en los que participan diferentes expertos en la materia, que se proponen a medida que las necesidades analíticas y científicas van emergiendo en el campo de las biotoxinas marinas. Actualmente, están en marcha cuatro Grupos de Trabajo:

Grupo de Trabajo Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS) para toxinas lipofílicas, cuyo objetivo es la validación de un método de LC-MS para el análisis simultáneo de los distintos grupos de toxinas lipofílicas reguladas en la Unión Europea [3].

Grupo de Trabajo Bioensayo para toxinas lipofílicas, con el objetivo de establecer un protocolo de trabajo armonizado a nivel europeo para el análisis de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón, actual método de referencia para el control de este tipo de toxinas [4].

Grupo de Trabajo sobre determinación de toxinas PSP por el método de HPLC (AOAC 2005.06), recientemente aprobado en Europa como método de detección alternativo para el control oficial de este tipo de toxinas [5].

Grupo de Trabajo sobre Palitoxinas, al haberse identificado en la última reunión general de LNR de la red europea como un problema a tener en cuenta debido a la reciente descripción de la presencia de este tipo de toxinas en el Mediterráneo [6,7].

Una importante actividad que el LCRBM lleva a cabo es la organización de ejercicios intercomparativos con el objeto de evaluar la aptitud de los laboratorios de la red europea y nacional en la aplicación de los métodos de control de ficotoxinas, así como valorar la equivalencia de los distintos métodos de ensayo utilizados (bioensayo y métodos alternativos). Durante el año 2006, el LCRBM organizó dos tipos de estudios interlaboratorio: 1) ejercicio para la determinación de toxinas paralizantes y 2) ejercicio para la determinación de toxinas lipofílicas.

Materiales y métodos

Laboratorios participantes en los ejercicios intercomparativos 2006.

En el ejercicio para la determinación de toxinas paralizantes participaron 20 laboratorios (14 laboratorios de la red europea y 6 laboratorios nacionales); mientras que en el ejercicio para toxinas lipofílicas participaron un total de 17 laboratorios (11 europeos y 6 nacionales).

Materiales de estudio. Dos muestras de cuerpo entero de mejillón homogeneizado (*Mytilus galloprovincialis*) procedentes de las rías gallegas e identificadas como CRL/06/P/07 Y CRL/06/P/08, fueron enviadas a los participantes en el ejercicio de determinación de toxinas PSP.

Para el estudio de toxinas lipofílicas, los participantes recibieron dos muestras de cuerpo entero de mejillón homogeneizado (*Mytilus galloprovincialis*), procedentes de las rías gallegas e identificadas como CRL/06/L/01 Y CRL/06/L/02.

En todos los casos los materiales fueron recibidos frescos en el LCRBM, donde se limpiaron y abrieron; tras su homogeneización se distribuyeron en alícuotas, que se conservaron congeladas a aproximadamente -24 °C hasta su envío o análisis.

Los estudios de estabilidad y homogeneidad se realizaron por HPLC para las toxinas PSP y LC-MS para las toxinas lipofílicas, de acuerdo con las normas internacionalmente reconocidas [8,9], comprobándose que todos los materiales cumplían con los criterios establecidos al respecto.

Metodologías utilizadas por los laboratorios participantes. En el caso del ejercicio interlaboratorio para toxinas PSP, los participantes utilizaron tanto el método de referencia de bioensayo en ratón (AOAC 959.08) como otros métodos alternativos reconocidos, como es el caso del método de HPLC-Fluorescencia (AOAC 2005.06) y no reconocidos (ELISA y Jellet).

Los métodos utilizados por los participantes en el estudio para toxinas lipofílicas fueron el bioensayo en ratón y dos técnicas alternativas: LC-MS y/o ensayo de inhibición de fosfatasa por fluorescencia (a través del kit comercial Toxiline DSP).

Evaluación de los resultados. Para el estudio estadístico de los resultados de los ejercicios (en el caso de resultados cuantitativos), en primer lugar se procedió a la identificación de resultados no válidos y/o resultados discrepantes (test de Dixon $\alpha = 0,05$). Tras ello, se determinó “el valor asignado” como valor consenso de los participantes tras la eliminación de resultados discrepantes. Para la evaluación de la aptitud de los laboratorios se calculó el valor del parámetro Z-score [10]. Para esta evaluación se consideró que si $|z| \leq 2$ el resultado era satisfactorio; si $2 < |z| < 3$ el resultado era cuestionable; si $|z| \geq 3$ el resultado no era satisfactorio.

Resultados y discusión

Las Tablas 1 y 2 muestran, respectivamente, los resultados obtenidos para las muestras CRL/06/P/07 y CRL/06/P/08 por los laboratorios participantes en el ejercicio intercomparativo para la determinación de toxinas paralizantes, por los distintos métodos empleados, así como la evaluación de su aptitud a través del cálculo de los valores de Z-score. La muestra CRL/06/P/07, resultó ser una muestra negativa (< límite de detección) por bioensayo en ratón, mientras que con el método cromatográfico se cuantificaron algunas toxinas PSP, obteniéndose en todos los casos una toxicidad inferior al límite establecido por la legislación europea (80 µg equivalentes de STX/100g). Para la muestra CRL/06/P/08, dos participantes obtuvieron resultados no satisfactorios en la evaluación de su aptitud; en el caso del laboratorio N° 16, se pudo haber debido al ajuste de extracto clorhídrico en la extracción del bioensayo a un pH no adecuado (pH en torno a 2,5), al que los derivados N-sulfo-carbamoyl, presentes en esta muestra, pudieron ser hidrolizados a sus derivados carbamato, más tóxicos, favoreciendo la sobreestimación de la toxicidad en el bioensayo en ratón. El laboratorio N° 3 obtuvo para las dos muestras del estudio un resultado insatisfactorio que posteriormente fue identificado como debido a un error en las unidades de expresión de resultados.

MUESTRA CRL/06/P/07, valor asignado: 25.76 µg eq. STX.2HCl/100g, DER: 85.05%			
Código laboratorio	Método	Resultado µg eq. STX.2HCl/100g	Z-score
1	HPLC	17.6	-0,91
2	HPLC	11.0	-1,64
3	HPLC	376.6	38,91
4	ELISA	15.0	-1,19
5	HPLC	9.0	-1,86
6	HPLC	6.9	-2,09
7	HPLC	77.2	5,70
8	ELISA	42.8	1,89
9	HPLC	18.0	-0,86
10	HPLC	35.8	1,11
14	HPLC	6.8	-2,10
16	MBA	43.3	1,95

Tabla 1. Resultados obtenidos por los participantes para la muestra CRL/06/P/07 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas PSP y evaluación de su aptitud.

MUESTRA CRL/06/P/08, valor asignado: 204.0 µg eq. STX.2HCl/100g, DER: 50.75%			
Código laboratorio	Método	Resultado µg eq. STX.2HCl/100g	Z-score
1	HPLC	123.2	-1,13
3	ELISA	2429.3	31,17
4	HPLC	101.0	-1,44
	MBA	154.0	-0,70
5	HPLC	87.0	-1,64
6	MBA	184.3	-0,28
	MBA (pH 2.45-2.55)	339.5	1,90
7	HPLC	156.5	-0,67
	MBA	254.0	0,70
8	ELISA	344.8	1,97
	MBA	360.5	2,19
9	HPLC	136.0	-0,95
10	HPLC	65.2	-1,94
	MBA	167.0	-0,52
12	MBA	117.0	-1,22
13	MBA	128.0	-1,06
15	MBA	143	-0,85
16	MBA	663.8	6,44
17	MBA	185	-0,27
18	MBA	351	2,06
19	MBA	356	2,13
20	MBA	327	1,72

Tabla 2. Resultados obtenidos por los participantes para la muestra CRL/06/P/08 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas PSP y evaluación de su aptitud.

En las Tablas 3, 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos por los participantes en el ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón, LC-MS y ensayo de inhibición de fosfatasa, respectivamente. Aunque en la muestra CRL/06/L/02 ninguno de los 11 laboratorios que utilizó LC-MS encontró toxinas lipofílicas y los tres laboratorios que usaron el kit Toxiline DSP obtuvieron un resultado inferior al límite de detección, 9 de 12 laboratorios que estudiaron esta muestra por bioensayo en ratón, tuvieron un resultado positivo. Por tratarse de una muestra adquirida en el mercado y a la vista de los resultados obtenidos, el resultado de bioensayo podría ser un falso positivo. Posteriores estudios en el LCRBM con esta muestra no consiguieron determinar la razón de este hallazgo. La muestra CRL/06/L/01 era una muestra altamente contaminada con ácido okadaico, DTX2 y ésteres de ambos, para la que los resultados obtenidos por todos los métodos empleados fueron muy homogéneos, aunque 2 de los 11 laboratorios que la estudiaron por LC-MS tuvieron resultados discrepantes y 1 de los 12 laboratorios que utilizó bioensayo en ratón obtuvo un resultado negativo, que pudo ser debido a la utilización de un protocolo no adecuado.

Código laboratorio	MUESTRA CRL/06/L/01 ⁽¹⁾	MUESTRA CRL/06/L/02 ⁽¹⁾
4	POSITIVO	POSITIVO
6	POSITIVO	POSITIVO
7	POSITIVO	POSITIVO
8	POSITIVO	POSITIVO
10	POSITIVO	NEGATIVO
11	POSITIVO	NEGATIVO
15	POSITIVO	POSITIVO
16	-	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO
18	POSITIVO	POSITIVO
19	NEGATIVO	NEGATIVO
20	POSITIVO	POSITIVO

⁽¹⁾Resultado Positivo o Negativo, de acuerdo con los límites establecidos por el Reglamento (EC) 853/2004, según lo descrito en el Reglamento (EC) 2074/2005.

Tabla 3. Resultados obtenidos por los participantes para las muestras CRL/06/L/01 y CRL/06/L/02 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón.

Valor asignado: 2929 µg equivalentes AO total/kg, DE: 356, DER: 12%				
Código laboratorio	µg equiv AO /kg		ésteres (%)	Z-score
	Libre	Total		
01*	423	807	48	-5,96
02	320	2578	88	-0,99
04	464	3288	80	1,01
05	379	2923	87	-0,02
06	460	2947	84	0,05
7	401	3180	87	0,70
09*	578	5455	89	7,09
10	446	2243	80	-1,93
11	435	3063	86	0,37
17*	680	713	5	-6,23
21	403	3217	87	0,81

*Resultados discrepantes

Tabla 4. Resultados obtenidos para la muestra CRL/06/L/01 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas por LC-MS y evaluación de la aptitud de los laboratorios.

Código laboratorio	µg equivalentes AO total/kg	
	CRL/06/L/01	CRL/06/L/02
02	> 300	< 85.5
08	> 300	< 85.5
15	> 300	< 85.5

Tabla 5. Resultados obtenidos para las muestras CRL/06/L/01 y CRL/06/L/02 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas mediante el ensayo de inhibición de fosfatasa (Toxiline DSP kit).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por DG SANCO (Comisión Europea, Bruselas) y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

El LCRBM quiere agradecer a INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia) y a la asociación gallega de productores de mejillón SOCOMGAL por el suministro de material tóxico para estos estudios.

Referencias

- [1] Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L165, 1–141.
- [2] Reglamento (CE) nº 776/2006 de la Comisión, de 23 de Mayo de 2006. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L136, 3–8.
- [3] Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L139, 55–205.
- [4] Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión, de 5 de Diciembre de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 27–59.
- [5] Reglamento (CE) nº 1664/2006 de la Comisión, de 6 de Noviembre de 2006. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L320, 13–45.
- [6] CRLMB, Minutes of the IX Meeting of EU-CRL/NRLs for Marine Biotoxins, Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins, Galway, Ireland, 23-24 November 2006.
- [7] Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, GS., Tartaglione, L., Grillo, C., and Merchiorre, N. 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical chemistry*. 78: 6154-6159.
- [8] Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. 2006. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*. 78:145–196.
- [9] International Organization for Standardization. 2005. ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, Geneva, Switzerland.
- [10] ISO/IEC Guide 43-1: 1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons. Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.