

VALUTAZIONE DEL METODO BIOLOGICO UFFICIALE PER LA RICERCA DI BIOTOSSINE LIPOFILE

VALUTATION OF OFFICIAL MOUSE BIOASSAY FOR THE DETECTION OF LIPOPHILIC MARINE TOXINS

Velieri F.¹, Bacchiocchi S.¹, Graziosi T.¹, Latini M.¹, Orletti R.¹, Bacci C.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Sezione di Ancona.

²Dipartimento di Salute Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria – Università di Parma.

SUMMARY

The official biotoxicological (MBA) method for the determination of lipophilic marine toxins shows important gaps with regard to reproducibility, specificity and quality of the data provided and serious ethical contraindications. The Commission Regulation (EU) No 15/2011 establishes the date of December 31, 2014 as the deadline for replacement of the mouse test with a LC-MS/MS method by the laboratories of the member states responsible for the monitoring of marine biotoxins. In order to facilitate the interpretation of the MBA during this transition period, we further evaluated the specificity and selectivity of this assay in comparison with a LC-MS/MS method in detecting lipophilic marine toxins on mussels of the middle Adriatic Sea. Data show a high percentage of false-positive results on MBA due to interference by yessotoxins. It was also possible to evaluate the toxic profile of the samples analyzed.

KEYWORDS

mussels, mouse bioassay (MBA), yessotoxins (YTXs), LC-MS/MS.

INTRODUZIONE

Le biotossine algali sono fonte di seria preoccupazione per il rischio alimentare associato al consumo di prodotti ittici, in particolare di molluschi bivalvi che, in virtù della loro attività filtratoria, possono accumulare e concentrare tali sostanze, veicolandole fino al consumatore.

La vigente normativa europea impone limiti e metodi analitici di rilevazione solo per alcuni gruppi tossici (1, 2); fra questi assumono particolare importanza le cosiddette biotossine lipofile. Queste ultime sono suddivise in quattro classi chimicamente distinte: acido okadaico e dinofisistossine (OA e DTXs), pectenotossine (PTXs), yessotossine (YTXs), azaspiracidi (AZAs). Il metodo d'analisi ufficiale attualmente in vigore per la loro determinazione è il saggio biologico su topo. Tale procedura, però, solleva notevoli perplessità, sia per ragioni di tipo etico, legate all'utilizzo di animali da laboratorio, sia di carattere analitico, a causa della scarsa ripetibilità e specificità e delle limitate informazioni quantitative fornite. La necessità di superare l'utilizzo di saggi *in vivo* è stata recentemente

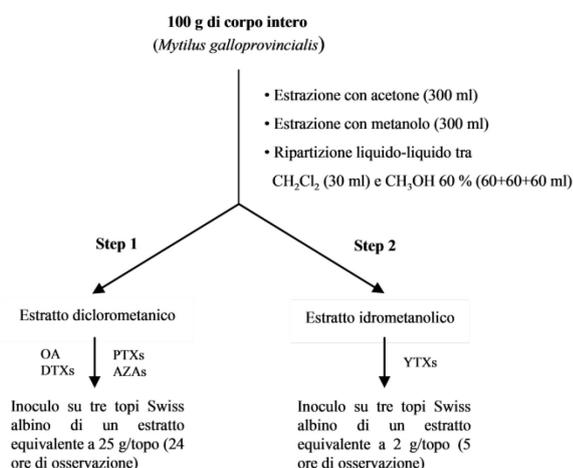
accolta dai legislatori europei che, con l'emanazione del Regolamento (UE) n. 15/2011, hanno imposto come metodo di riferimento, a partire dal 1° luglio 2011, un protocollo di tipo strumentale (3).

Lo stesso documento, tuttavia, prevede una proroga per l'utilizzo di saggi biologici fino al dicembre 2014, nonché l'esecuzione di un monitoraggio periodico volto alla rilevazione di biotossine nuove o sconosciute mediante l'utilizzo del mouse test. Nella prospettiva che molti laboratori ufficiali incaricati della determinazione di tossine algali continueranno ancora ad utilizzare il metodo attuale per i prossimi anni, sono stati effettuati studi per individuare le criticità di tale procedura. A tale scopo sono state effettuate delle prove comparative tra il saggio *in vivo* e un protocollo strumentale, che prevede l'utilizzo di un sistema QQQ-LC-MS/MS (Cromatografo Liquido interfacciato con uno Spettrometro di Massa Triplo Quadrupolo) secondo quanto riportato da Ciminiello *et al.* (7).

Tale approfondimento nasce anche dall'esigenza di caratterizzare le positività al MBA periodicamente riscontrate in mitili dell'Adriatico che,

sulla base dei dati di letteratura, sarebbero presumibilmente da ascrivere a presenza di yessotossine (4, 5, 6, 7).

Figura 1. Protocollo per la determinazione selettiva delle YTXs mediante MBA.



MATERIALI E METODI

34 campioni di mitili prelevati lungo la costa del medio Adriatico nel periodo compreso tra aprile e agosto 2010 sono stati analizzati mediante mouse test, secondo il protocollo 2 della procedura ufficiale (8), previsto per la determinazione selettiva delle yessotossine (Fig. 1). Gli stessi

campioni sono stati analizzati in parallelo con un metodo LC-MS/MS per la determinazione delle biotossine lipofile. 2 g di matrice omogeneizzata sono stati estratti con 9 + 9 ml di metanolo, il volume è stato poi aggiustato a 20 ml. I dati strumentali sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, dotato di sorgente ESI - *electrospray ionization* - (API 3200 Q-TRAP Applied Biosystem), accoppiato ad un sistema HPLC equipaggiato con pompa quaternaria e colonna Luna C18(2), 5 μm x 150 x 2 mm (Phenomenex, CA, USA), termostata a 40 °C. La corsa cromatografica è stata condotta con un programma di eluizione in gradiente, utilizzando come eluenti $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:9) e $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:9), entrambi contenenti ammonio formiato 5 mM e acido formico 0,1%, ad un flusso pari a 0,3 ml/min. Le condizioni spettrometriche applicate sono indicate in Tab. 1. L'identificazione delle biotossine lipofile è stata effettuata per confronto con i tempi di ritenzione degli standard puri disponibili (NRC - Institute for Marine Biosciences, Canada) e con i dati spettrali pubblicati in letteratura. Le tossine ricercate comprendono OA; DTX-1, -2; PTX-1, -2; AZA-1, -2, -3; YTX, 1a-omoYTX, CarbossiYTX, Carbossi-1a-omoYTX, 45-idrossiYTX, 45-idrossi-1a-omoYTX).

Tabella 2. Condizioni strumentali utilizzate per il metodo in LC-MS/MS.

Biotossina	Ioni SIM		Transizioni MRM	T ^d (°C)	IS ^d (V)	DP ^d (V)	EP ^d (V)	CE ^d (eV)	CXP ^d (V)
	Ioni positivi	Ioni negativi	Ioni negativi						
YTX		1141 ^a	1141 > 1061 1061 > 855	200	- 4500	- 100 - 170	- 9	- 50 - 80	- 35 - 40
1a-omoYTX		1155 ^a	1155 > 1075 1075 > 869			- 100 - 170		- 50 - 80	- 35 - 40
CarbossiYTX		1173 ^a	1173 > 1093 1093 > 855			- 100 - 170		- 50 - 80	- 35 - 40
Carbossi-1a-omoYTX		1187 ^a	1187 > 1107 1107 > 869			- 100 - 170		- 50 - 80	- 35 - 40
45-idrossiYTX		1157 ^a	1157 > 1077 1077 > 855			- 100 - 170		- 50 - 80	- 35 - 40
45-idrossi-1a-omoYTX		1171 ^a	1171 > 1091 1091 > 869			- 100 - 170		- 50 - 80	- 35 - 40
OA/DTX-2		803 ^a			- 4500	- 60	- 10		
DTX-1		817 ^a							
PTX-1	892 ^c				5500	60	5		
PTX-2	876 ^c								
AZA-1	842 ^b				5500	60	9		
AZA-2	856 ^b								
AZA-3	828 ^b								

^aioni [M - H], ^bioni [M + H]⁺, ^cioni [M + NH₄]⁺, ^dT = Temperature; IS = Ion Spray Voltage; DP = Declustering Potential; EP = Entrance Potential; CE = Collision Energy; CXP = Cell Exit Potential.

In prima istanza è stato effettuato uno *screening* qualitativo, funzionale alla valutazione del profilo tossico, con un esperimento di tipo SIM (*Single Ion Monitoring*). La quantificazione dei principi tossici riscontrati, invece, è stata effettuata confrontando le aree dei picchi ottenuti monitorando in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) la transizione più caratteristica con quelle delle soluzioni standard acquisite nelle stesse condizioni strumentali.

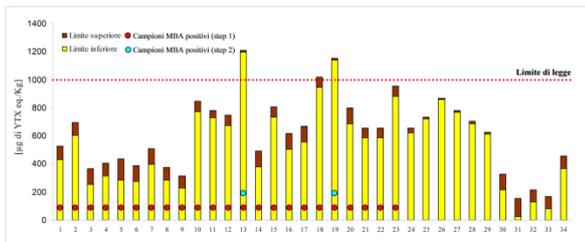
Inoltre gli estratti del MBA di 6 campioni risultati positivi allo step 1, ottenuti attraverso l'applicazione del protocollo 2 di estrazione (Fig. 1), sono stati sottoposti ad indagini strumentale per valutare la reale selettività del metodo nei confronti delle yessotossine.

I dati sono stati statisticamente valutati utilizzando il Test t di Student ($p < 0.05$).

RISULTATI

In nessun campione analizzato sono state rilevate biotossine appartenenti ai gruppi di OA e DTXs, PTXs, AZAs. In tutti i campioni, invece, sono state riscontrate tossine del gruppo delle YTXs, pur se in quantità differenti. E' da evidenziare come nella gran parte dei campioni risultati positivi al MBA in realtà le concentrazioni di YTXs siano inferiori al limite previsto dalla normativa (Fig. 2).

Figura 2. Concentrazione di YTXs totali in ciascun campione analizzato, espressa come μg di YTX equivalenti/kg.



I risultati sono espressi come μg di YTX equivalenti/kg, utilizzando i TEF (fattori di equivalenza tossica) stabiliti dall'EFSA (9) per le YTXs normate (2). Il contributo riferibile alla carbossi-1a-omoYTX, per la quale non è ancora stato stabilito un fattore, è stato calcolato assegnando cautelativamente un TEF pari a 1.

Poiché al momento non esistono indicazioni ufficiali su come gestire i valori che risultano compresi nell'intervallo fra LOD ($14 \mu\text{g}/\text{kg}$) e LOQ ($53 \mu\text{g}/\text{kg}$), si è deciso, in analogia con quanto riferito dall'EFSA (9), di adottare un approccio che consiste nel forzare i valori alle estremità degli intervalli di variazione. In questo modo, per ciascun contributo, il limite inferiore è ottenuto assegnando i valori 0 e LOD, mentre il limite superiore è ottenuto assegnan-

do i valori corrispondenti a LOD e LOQ, rispettivamente per quantità $< \text{LOD}$ e $< \text{LOQ}$.

Nelle Fig. 3 e 4 è riportata la concentrazione media di ciascun analogo appartenente al gruppo delle YTXs nel totale dei campioni, rispettivamente in valore assoluto [$\mu\text{g}/\text{Kg}$] e in termini percentuali: come si osserva la carbossi-1a-omoYTX è l'analogo quantitativamente più rilevante, seguito dalla YTX e dalla relativa forma omo.

Figura 3. Concentrazione di ciascun analogo delle YTXs (media di tutti i campioni analizzati).

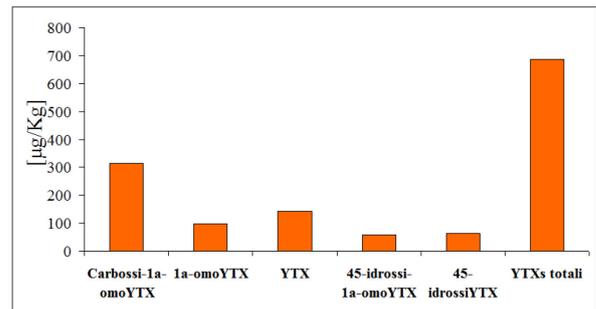
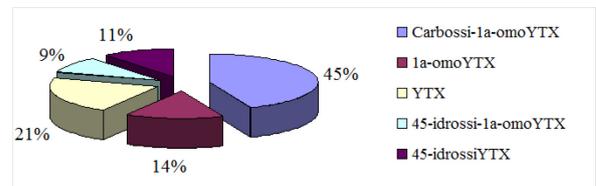
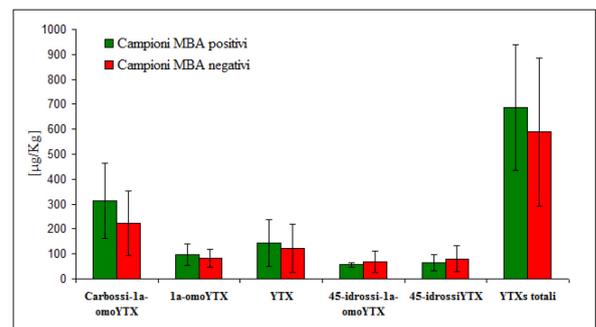


Figura 4. Quantità relativa di ciascun analogo delle yessotossine (media di tutti i campioni analizzati).



L'istogramma di fig. 5 mostra inoltre il confronto fra le concentrazioni medie di YTXs misurate nei campioni con esito positivo e in quelli con esito negativo al MBA. Dall'analisi statistica dei dati si evidenzia come non sussista una differenza significativa fra i due gruppi.

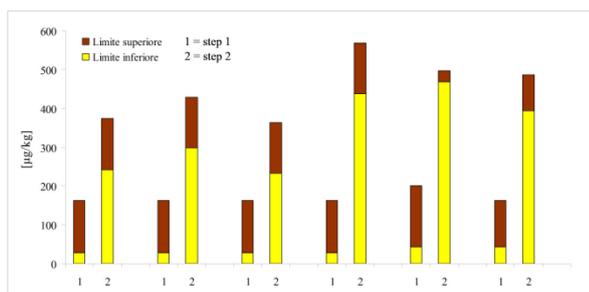
Figura 5. Confronto fra le concentrazioni medie di YTXs nei campioni risultati positivi e negativi al MBA. Le barre di errore mostrate rappresentano $\pm 1 \text{ DS}$.



Nonostante il saggio biotossicologico (Fig. 1) preveda l'isolamento delle YTXs nello step 2,

negli estratti corrispondenti allo step 1 dei 6 campioni utilizzati per valutare la selettività del MBA nei confronti delle yessotossine, è stata osservata la presenza di queste ultime a livelli compresi fra il LOD (14 µg/kg) ed il LOQ (53 µg/kg). Valutando questi dati analogamente a quanto sopra esposto (9), è stata stimata una concentrazione di YTXs negli estratti diclorometanici (step 1) verosimilmente compresa tra 28 e 162 µg/kg, equivalenti a 0.70-4.05 µg inoculati in ciascun topo (Fig. 6).

Figura 6. Concentrazioni di YTXs rilevate nei 2 step del mouse test.



CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il litorale adriatico è notoriamente interessato, fin dalla metà degli anni novanta (4), dalla presenza di specie algali produttrici di YTXs (*Gonyaulax grindleyi*, *Lingulodinium polyedrum* e *Gonyaulax spinifera*). Questo ha determinato, negli ultimi quindici anni, la sostituzione da parte di queste ultime dell'OA e derivati in qualità di principali tossine contaminanti i molluschi bivalvi che vivono nel Mar Adriatico (4, 5, 6, 7). La presenza invece di AZAs non è mai stata segnalata nelle acque dello stesso bacino.

La carbossi-1a-omoYTX è risultata essere, in quasi tutti i campioni analizzati, l'analogo quantitativamente più rilevante, nonostante dati di letteratura (9) non lo considerino tra le forme più frequentemente riscontrabili, al punto che il Regolamento (CE) n. 2074/2005, nonché la relativa modifica (Reg. (UE) n. 15/2011), non annoverano tale composto fra le YTXs da determinare. La normativa prevede comunque l'inclusione dei nuovi analoghi nell'analisi, mediante l'adozione dei TEF suggeriti dall'EFSA, la quale tuttavia non ha ancora potuto esprimere un valore di tossicità equivalente per la carbossi-1a-omoYTX, a causa delle scarse informazioni tossicologiche disponibili (9). Nel presente lavoro alla carbossi-1a-omoYTX è stato attribuito un TEF cautelativo pari a 1. Ciò, con ogni probabilità, comporta una sovrastima della concentrazione di YTXs totali, espressa come µg di YTX equivalenti/kg, dal momento che i pochi dati tossicologici presenti in letteratura sem-

brano indicare una minore tossicità della carbossiYTX e della relativa forma omo rispetto alla capostipite (6). D'altra parte è necessario sottolineare che se tale contributo venisse trascurato, si potrebbero frequentemente avere esiti non concordanti fra la prova strumentale e il saggio biologico, quest'ultimo comunque previsto dal Regolamento (UE) n. 15/2011 per il monitoraggio periodico volto alla rilevazione di tossine nuove o sconosciute.

Sebbene non sia possibile escludere la copresenza di fattori tossici ignoti, è verosimile che l'interferenza delle YTXs riscontrata nello step 1 sia responsabile delle numerose positività al MBA. Infatti, se si considera l'elevata tossicità acuta delle YTXs quando somministrate per via intraperitoneale ($LD_{50} = 1.6-15$ µg di YTX per un topo di 20 g) (10) e i lunghi tempi di morte osservati (nella maggior parte dei casi superiori alle 15 ore dall'inoculo) è plausibile attribuire la morte degli animali a tale fenomeno di interferenza. Va inoltre aggiunto che la sintomatologia neurologica *ante mortem* osservata (spasmi, convulsioni, ecc.) è ben riconducibile ad una intossicazione da YTXs.

In soli due casi (campioni 13 e 19) è stata rilevata una corrispondenza fra l'esito del MBA (positività allo step 2, oltre che allo step 1) e la concentrazione di YTXs, risultata effettivamente superiore al limite di legge. Nonostante l'esiguo numero di campioni, ciò potrebbe confermare l'efficacia del protocollo 2 nel rilevare le YTXs, attraverso lo step 2, solo a concentrazioni uguali o superiori a tale limite.

La mancanza di differenze significative nelle concentrazioni delle YTXs totali, fra i campioni risultati positivi e quelli negativi al MBA, potrebbe trovare spiegazione nell'elevata variabilità associata sia all'efficienza di recupero del metodo estrattivo, sia alla sensibilità individuale dei topi. Pertanto i dati emersi in questa ricerca confermerebbero l'inadeguatezza dei metodi biologici finalizzati ai controlli ufficiali, a causa dell'elevata probabilità di un esito falso positivo. Le considerazioni appena descritte suggeriscono quindi di sostituire quanto prima, nonostante la proroga fino al 31/12/2014, i metodi biologici con il nuovo metodo di riferimento; ciò al fine di limitare i possibili casi di contenzioso tra i laboratori addetti ai controlli ufficiali e i produttori.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 139 del 30 aprile 2004.

2. Regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 338 del 22 dicembre 2005.
3. Regolamento (UE) n. 15/2011 della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 6 del 11 gennaio 2011.
4. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R., Yasumoto, T. (1997). Yessotoxins in mussels of the Northern Adriatic Sea. *Toxicon* 35 (2), 177-183.
5. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Viviani, R. (1999). Isolation of 45-hydroxyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37, 689-693.
6. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Poletti, R., Viviani, R. (2000). Structure determination of carboxyhomoyessotoxin, a new yessotoxin analogue isolated from Adriatic mussels. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 770-774.
7. Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Boschetti, L., Rubini, S., Cangini, M., Pigozzi, S., Poletti, R. (2009). Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea revealed by LC-MS. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.037.
8. Allegato Decreto del Ministero della Salute del 16 maggio 2002. *Gazzetta ufficiale della Repubblica italiana* n. 165 del 16 luglio 2002.
9. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – yessotoxin group. *The EFSA Journal* (2008) 907, 1-62.
10. Munday, R., Aune, T., Rossini, G.P. (2008). Toxicology of the yessotoxins. In L. M. Botana (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection* (Second ed., p.332). CRC Press, Taylor & Francis Group.