



Presenza di Tetrodotossina in molluschi: identificazione rapida tramite reazione immunoenzimatica

E. Daniso, S. Susmel, F. Tulli

Dipartimento di Scienze Agro Alimentari, Ambientali ed Animali - Università degli studi di Udine

Keywords: Biotossine, Mitili, ELISA



OPPORTUNITÀ PER UNA CRESCITA SOSTENIBILE



Introduzione

La tetrodotossina (TTX) è una neurotossina non proteica (LD50 0,1 mg/kg) che si lega selettivamente ai canali di trasporto del sodio (Na⁺), interferendo o inibendo il loro corretto funzionamento. Sono stati isolati più di 30 differenti batteri e microalghe marine capaci di produrre TTX e diversi suoi analoghi con differenti livelli di tossicità, come *Procentrum minimum* o *Roseobacter* spp. e *Vibrio* spp. La TTX viene normalmente rilevata in tessuti di animali marini della famiglia dei Tetraodontidae che la accumulano poiché resistenti al loro effetto neurotossico. Tuttavia, la sua presenza solitamente comune nelle acque calde tropicali, negli ultimi anni è stata riscontrata anche nelle acque dei paesi europei, incluse quelle del Mar Mediterraneo dove è stata rilevata in molluschi Bivalvie e Gasteropodi.

I sintomi provocati da TTX sono diversi, tra cui vomito, mal di testa, stanchezza muscolare e nei casi più gravi, arresto cardiaco o respiratorio. Non essendo attualmente antidoti ed essendo una tossina termostabile che non provoca alterazioni del profilo organolettico del prodotto contaminato, l'intossicazione da TTX è trattata con terapie di supporto e si mettono in atto azioni di monitoraggio e controllo quali forme di prevenzione. L'EFSA ha indicato un valore di concentrazione pari a 44 µg di TTX (e/o quantità tossica equivalente dei suoi analoghi) per kg di polpa di molluschi come concentrazione soglia che non dovrebbe provocare effetti negativi sull'uomo.

La determinazione qualitativa e quantitativa della molecola e dei suoi analoghi è condotta mediante LC-MS / MS. In alternativa sono stati sviluppati metodi di rilevazione su base immunoenzimatica per un **controllo rapido** e nel presente lavoro, nell'ottica di semplificare la determinazione analitica, viene presentato il lavoro di ottimizzazione di un sistema ELISA per la rilevazione della TTX in molluschi bivalvi.



Figura 1: Rappresentazione del saggio di competizione anticorpale ELISA : **A)** coating del pozzetto con l'antigene; **B)** reazione dell'anticorpo primario con antigene immobilizzato; **C)** anticorpi secondari marcati con HRP che si legano agli anticorpi primari.

	ng/ml di tossina	Densità ottica
Controllo	0	1,207 ±0,094
Tetrodotossina	50	0,711 ±0,057
Yessotossina	50	1,101 ±0,017
Saxitossina	50	1,121 ±0,047
Acido Domoico	50	1,088 ±0,062
Acido Okadaico	50	1,091 ±0,019

Figura 2. Effetto della composizione della soluzione di estrazione sulla sensibilità della determinazione

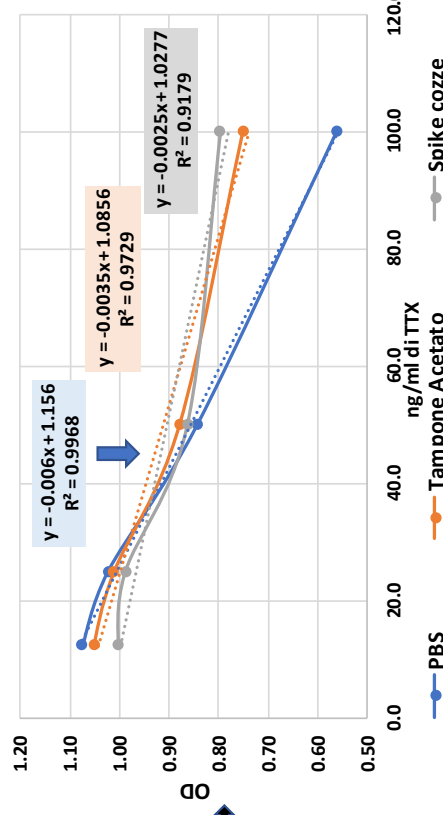


Tabella 1: Valore di Densità ottica (OD) di campioni ottenuti in ELISA testando diverse tossine per valutare la specificità dell'anticorpo. I dati sono riportati come media ±deviazione standard (n=3)

Conclusioni

In tutte e tre le situazioni esaminate, compreso l'inoculo sperimentale di mitilo, non viene osservata una differenza significativa del segnale per il valore soglia corrispondente al valore di 44 µg/kg suggerito come cut-off dall'EFSA e indicato nella **Figura 2** (freccia blu), che si attesta intorno a valori di OD pari a 0,913 ± 0,019. Pertanto, tutti i campioni con un valore di OD < 0,913 sono da considerarsi positivi, mentre quelli > 0,913 negativi, permettendo un rapido screening preliminare del campione analizzato. I campioni che presentassero un valore di OD intorno a 0,913±0,913 dovranno essere analizzati nuovamente e/o considerati come positivi. I risultati ottenuti, preliminari ma utili poiché hanno permesso di individuare le condizioni ottimali di lavoro, necessitano di ulteriori investigazioni per la conferma della loro robustezza e validazione.