

Applicazione ed ottimizzazione di un saggio emolitico per quantificare la palitossina nei mitili

V. Brovedani¹, M. Pelin¹, K. Varello², E. Bozzetta², S. Sosa¹, A. Tubaro¹

¹Dip. di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Torino

La palitossina (PLTX) ed i suoi analoghi sono dei composti marini non proteici altamente tossici, inizialmente individuati in coralli del genere *Palythoa* e successivamente in microalghe e/o cianobatteri dei generi *Ostreopsis* e *Trychodesmium*. Attraverso la catena trofica, queste tossine possono accumularsi in organismi marini eduli e causare intossicazioni alimentari nell'uomo. In aree tropicali e subtropicali, intossicazioni anche fatali sono state associate al consumo di pesci e crostacei contaminati. Nel Mar Mediterraneo, invece, le palitossine sono state rilevate in molluschi ed echinodermi, in concomitanza alla presenza di *Ostreopsis* cf. *ovata*, ma non sono stati documentati casi di intossicazioni alimentari attribuibili a tali composti. Nonostante l'elevata tossicità, queste tossine non sono ancora regolamentate, anche se l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha suggerito un limite di 30 µg/Kg polpa di molluschi. L'EFSA evidenzia, inoltre, la necessità di sviluppare metodi sensibili, rapidi ed economici, per rilevare e quantificare le palitossine nei prodotti ittici. Il saggio emolitico, basato sulla capacità della PLTX di convertire la Na⁺/K⁺ ATPasi di membrana in un canale ionico specifico che determina la lisi dell'eritrocita, è un metodo funzionale in grado di rilevare le palitossine, ma non vi è un protocollo generale di esecuzione ed il saggio non è stato caratterizzato per quantificare le tossine nei molluschi. Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di ottimizzare e caratterizzare il saggio emolitico per la quantificazione della PLTX nei mitili, utilizzando eritrociti umani.

Considerando la possibilità di utilizzare il sangue o gli eritrociti purificati, l'influenza di alcuni ioni sulla lisi e della temperatura sulla lisi eritrocitaria indotta dalla PLTX, le condizioni ottimali per l'esecuzione del saggio emolitico prevedono l'incubazione degli eritrociti umani con la PLTX (2.5×10^{-8} M - 3.9×10^{-10} M) in un tampone fosfato salino di Dulbecco privo di ioni K⁺, per 5 ore a 41 °C. In queste condizioni, il saggio emolitico è caratterizzato da un limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) della PLTX pari a 2.36×10^{-10} M e 6.09×10^{-10} M, rispettivamente. Il saggio emolitico è accurato (*bias* percentuale medio: -0.8%), ripetibile (RSDr, deviazione standard relativa di ripetibilità intragiornaliera ed intergiornaliera: 15% e 6%, rispettivamente) ed in grado di rilevare alcuni analoghi della PLTX. La sua specificità nei confronti delle palitossine è stata confermata mediante neutralizzazione dell'emolisi con ouabaina (100 µM) e, parzialmente, con un anticorpo monoclonale anti-PLTX (50 µg/ml). Ulteriori studi sono in corso per valutare l'applicabilità del saggio per quantificare le palitossine in matrici complesse, come quella dei molluschi.