



Instituto de  
Salud Pública  
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile



SEMINARIO  
INTERNACIONAL  
DE SALUD PÚBLICA  
Y MAREA ROJA

Puerto Varas 23 - 24 Agosto 2017

# Producción de saxitoxina como material de referencia certificado para la vigilancia y control de las intoxicaciones por fenómenos algales nocivos

**Dr. Abel Vásquez V.**

---

# Los medios internacionales reaccionan a la "catástrofe" de la marea roja en Chiloé

## Los diarios del mundo han destacado el hecho de que los pescadores se han aislado del continente para protestar contra el gobierno.

14:33 hrs. Jueves 05, Mayo 2016

Resolución N° 656 @seremisalud10 informa nuevas áreas afectadas con #MareaRoja #RegiónLosLagos



Chiloé archipelago residents isolate selves to protest Chilean government

Published May 04, 2016 / EFE

What started as a protest by fishermen over the prohibition on fishing due to a red tide of toxic algae on Wednesday transformed itself into a social movement to isolate Chile's Chiloé archipelago from the continent.

On this third day of demonstrations, Chiloé residents blocked the nine main roads on the archipelago's largest island and denied entry to people and cargo via the channel that unites them with the mainland.

Pen's 'El Chapo,' wanted for 101

El Salvador prosecutor accuses



Tabla 1: Metodologías Analíticas utilizadas por el Laboratorio de Toxinas Marinas y Micotoxinas Instituto de Salud Pública de Chile.

Biotoxina		Metodología Analítica
VPM	Bioensayo	AOAC Official Method 959.08
VDM	Bioensayo	Standard Operating Procedure for detection of Okadaic acid, Dinophysistoxins and Pectenotoxins by Mouse Bioassay. (Basado en el método de Yasumoto et al., 1984). Versión 4.0 (Abril 2007) Laboratorio de Referencia de la Comunidad Europea.
VAM	HPLC	Foodstuffs – Determination of Domoic Acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection CEN/TC 275 European Standard.

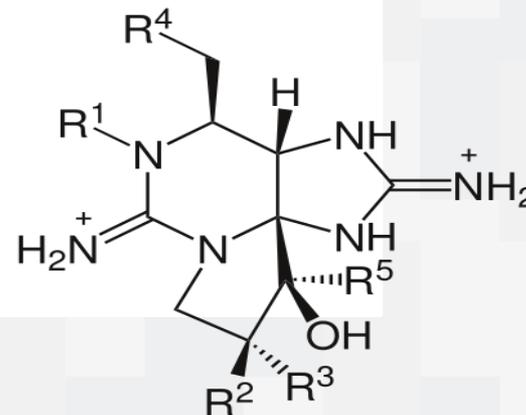
Fuente: Laboratorio Toxinas Marinas y Micotoxinas, Instituto de Salud Pública de Chile.

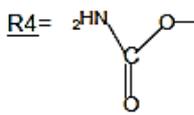
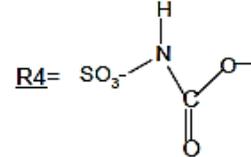
**En el año 2016, la Red de Laboratorios de Salud Pública realizó 62.635 análisis, representando un aumento del 47,9% en comparación al año 2015, debido a la magnitud del evento FAN del año 2016. El Laboratorio de Toxinas Marinas y Micotoxinas del ISP realizó 998 análisis, 58,9% de aumento.**

**Comunicación personal de Lorena Delgado  
Laboratorio de Toxinas Marinas y Micotoxinas del ISP**

# Toxinas *Paralizantes* de Mariscos (TPM)

## Saxitoxina (STX)



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> = 	R <sub>4</sub> = 	R <sub>4</sub> = OH	R <sub>4</sub> = H
			carbamate toxins	N-sulfo-carbamoyl toxins	decarbamoyl toxins	deoxy-decarbamoyl toxins
H	H	H	STX	GNTX5(B1)	dcSTX	doSTX
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GNTX2	C1	dcGNTX2	
H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GNTX3	C2	dcGNTX3	
OH	H	H	neoSTX	GNTX6(B2)	dcneoSTX	doneoSTX
OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GNTX1	C3	dcGNTX1	doGNTX1
OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GNTX4	C4	dcGNTX4	

# Materials de Referencia Certificados para STX

Institute for Biotoxin Metrology,  
National Research Council  
Canada, NRCC, Halifax, Nova  
Scotia, Canada



National Institute of Standards  
and Technology (USA).





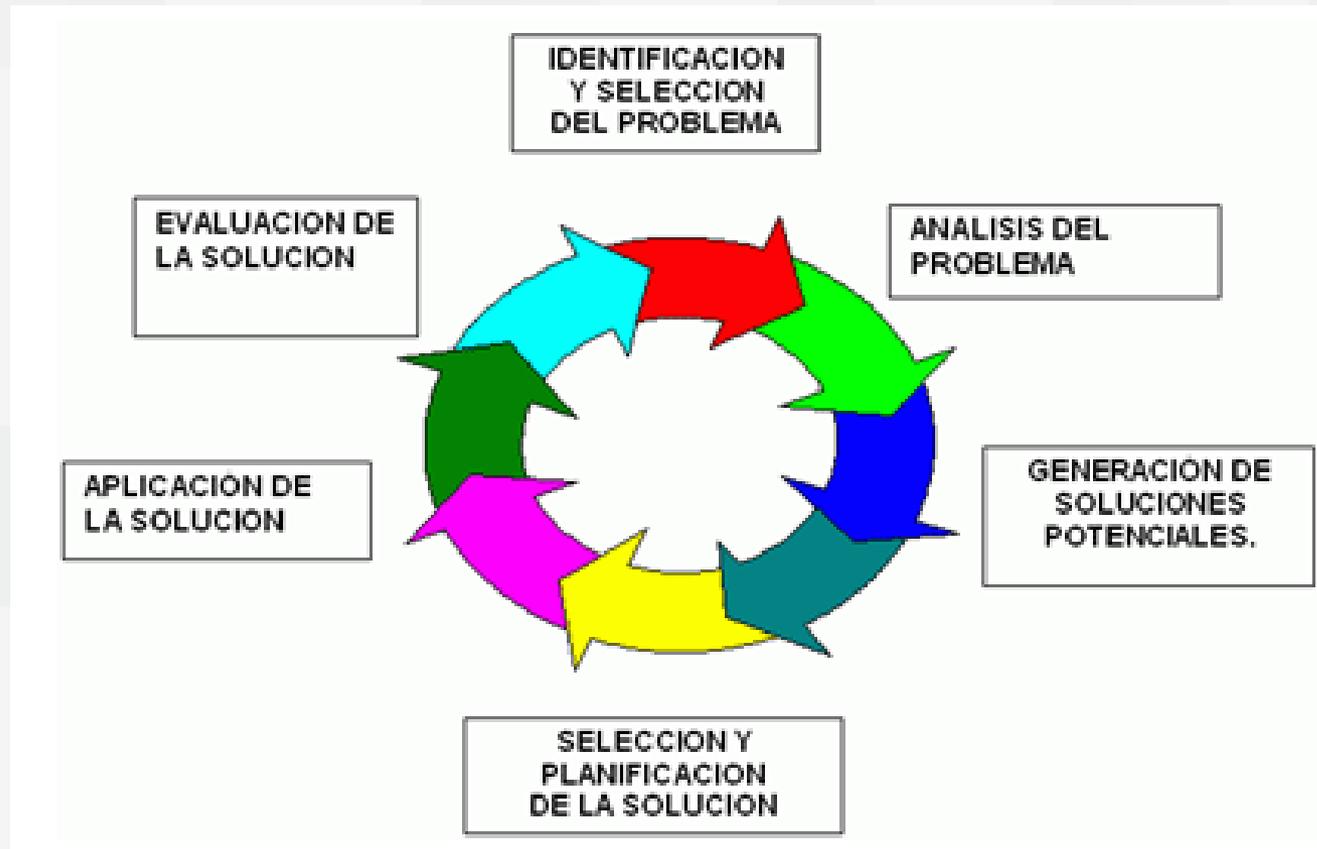


**Sección de Biotecnología**

# PROBLEMA



# OPORTUNIDAD



## Método de la A.O.A.C



## Extracción de proteínas y grasas



## Purificación HPLC



## HPLC-MS-MS



## Caracterización Biológica

Subsecretaría  
de Salud  
Pública



MR07I1004

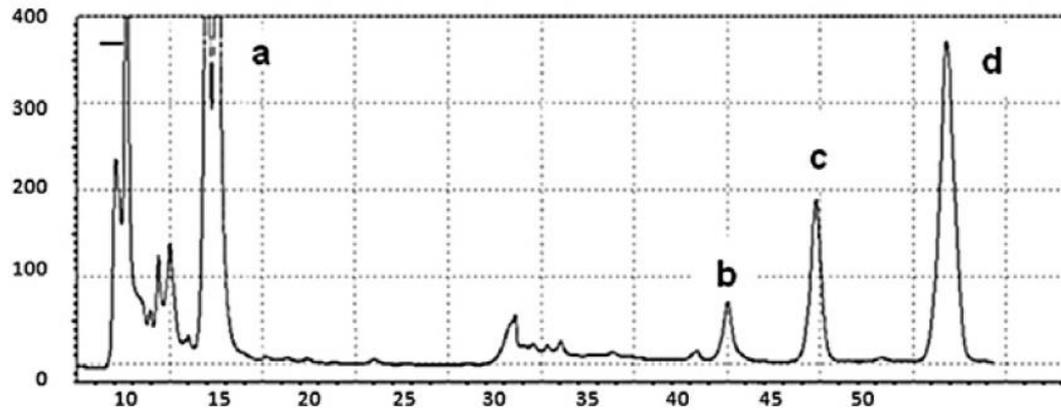


FONDEF  
Fondo de Fomento al Desarrollo  
Científico y Tecnológico

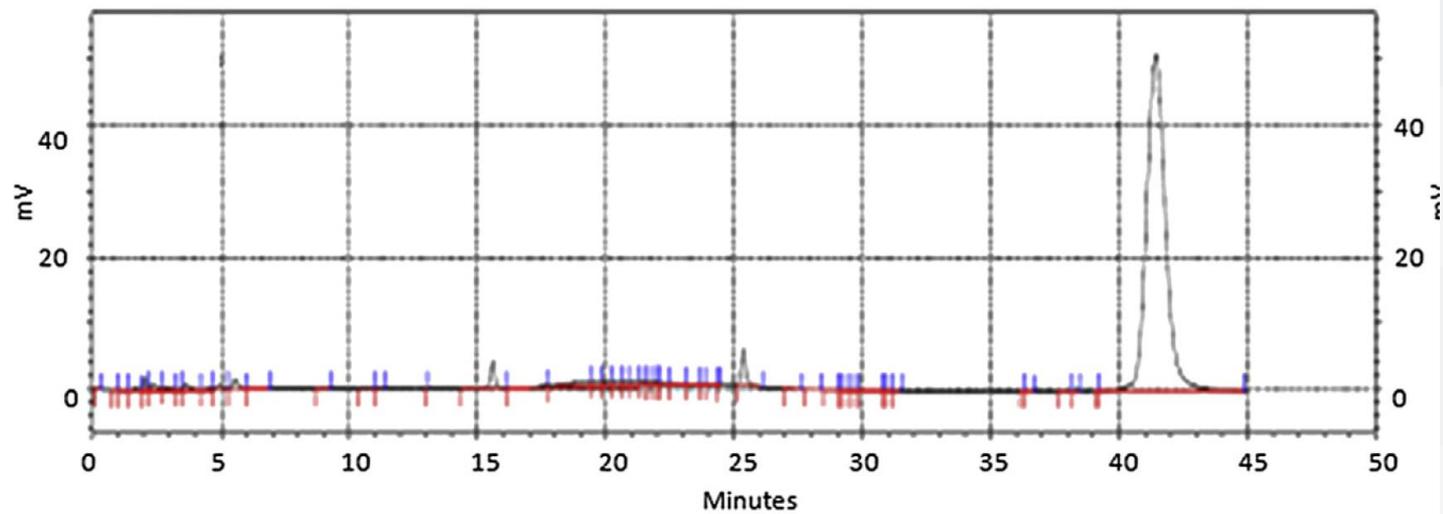


<b>Extracto Chorito</b>	<b>Concentración aprox. (<math>\mu\text{g}/100 \text{ g}</math> de carne)</b>
<b>1</b>	<b>3653</b>
<b>2</b>	<b>13986</b>
<b>3</b>	<b>21225</b>
<b>4</b>	<b>9561</b>
<b>5</b>	<b>2964</b>
<b>6</b>	<b>3972</b>
<b>7</b>	<b>3912</b>
<b>8</b>	<b>13376</b>
<b>9</b>	<b>3137</b>

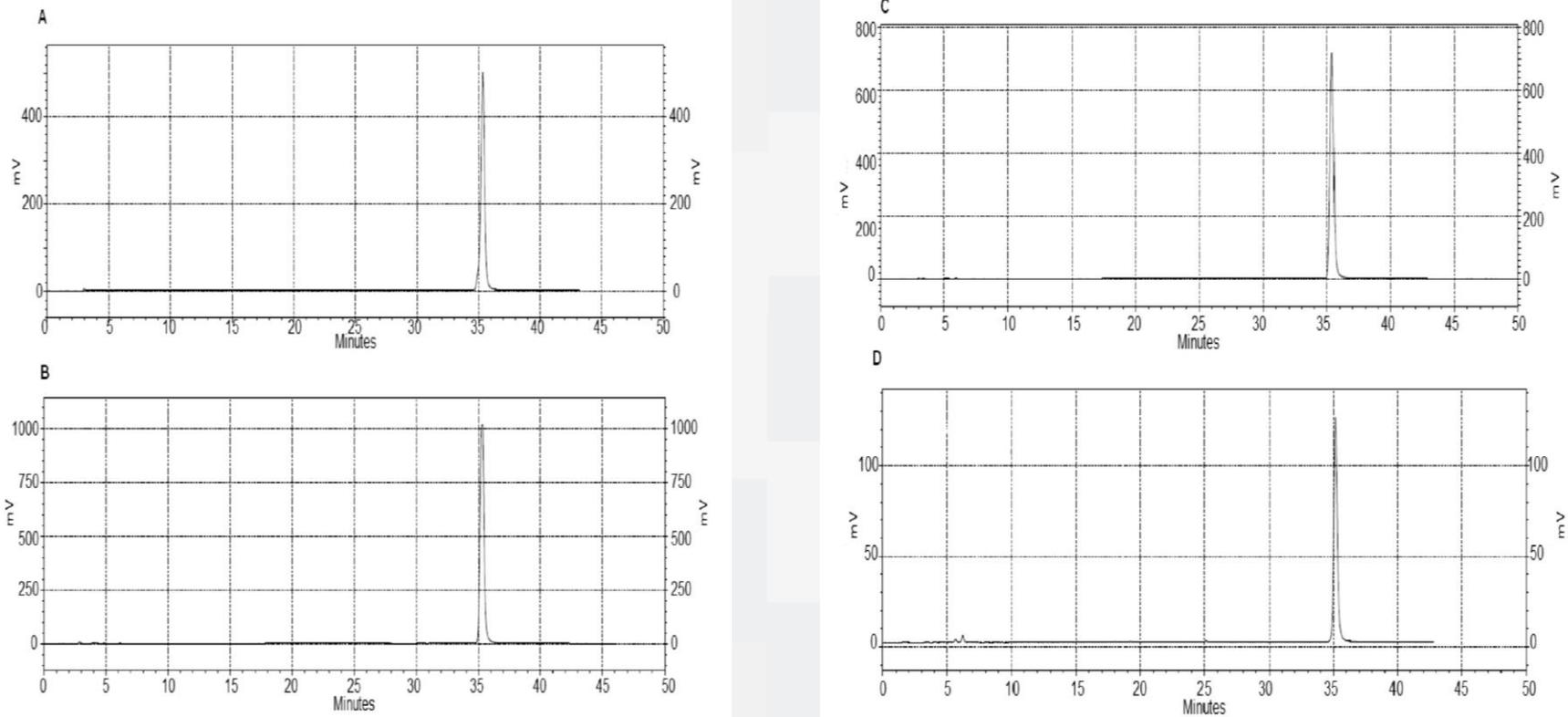
**Volumen total aprox: 6 Lt**



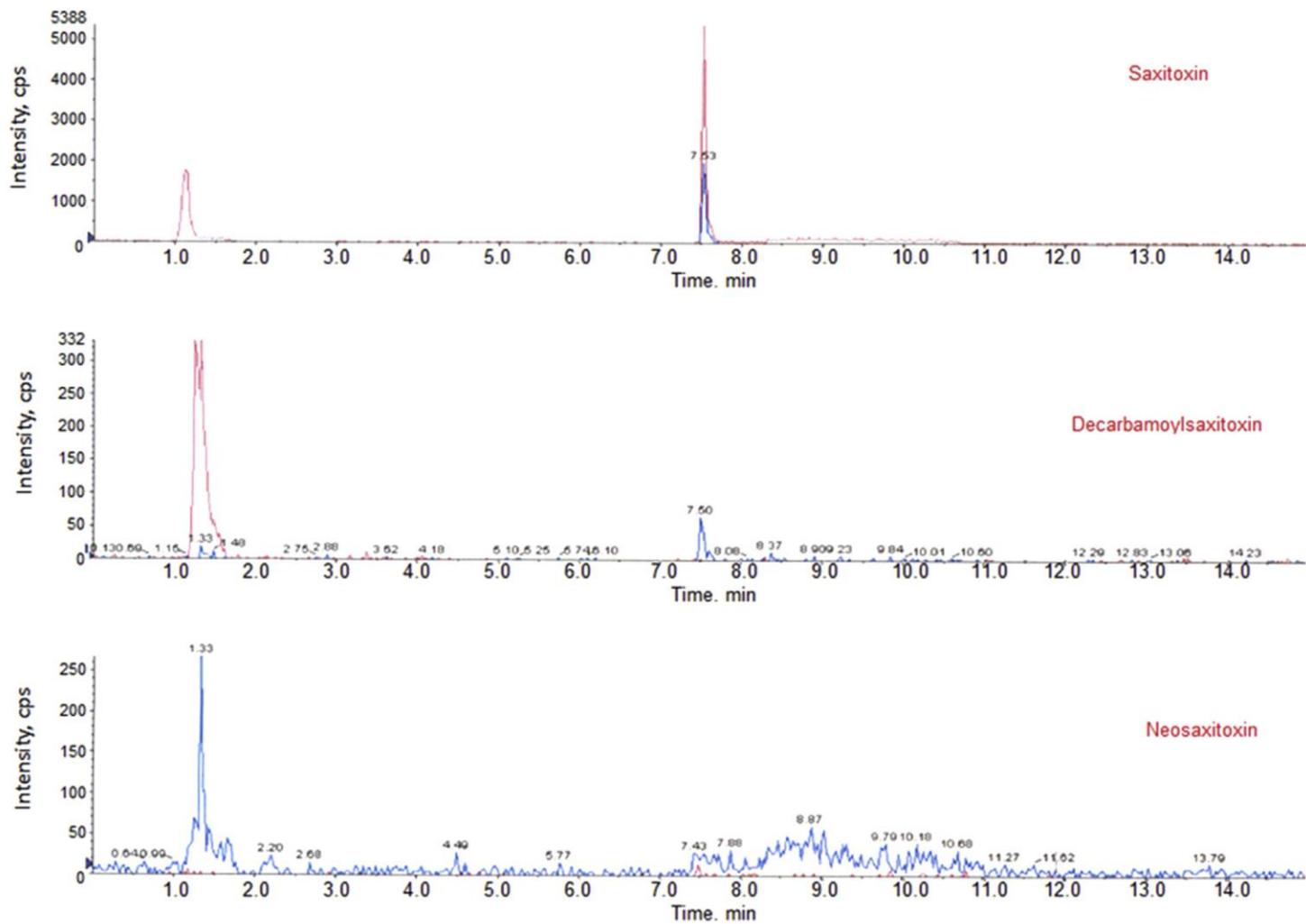
**Fig. 1.** Chromatogram obtained by HPLC semi-preparative method of *M. chilensis* total extract. We can observe different PSP toxin, like GTX (a), Neo (b), dcSTX (c) and STX (d).



**Fig. 2.** Chromatogram obtained by *HPLC semi-preparative method* of NRC STX standard, 0.25 µg/mL.



**Fig. 3.** Chromatograms obtained by HPLC analytic method of STX. In chromatograms, a, b and c we can observe fractions of STX purified from *M. chilensis*, collected from HPLC semi-preparative method at retention time 43, 44 and 45 min respectively. Chromatogram d shows the analysis of the NRC STX standard.



**Fig. 5.** Chromatogram of HPLC–MS–MS 0.25  $\mu\text{g/mL}$  of STX purified from muscle of *Mytilus chilensis* extracted from southern Chile. Method for STX, dcSTX and Neo (from top to bottom).

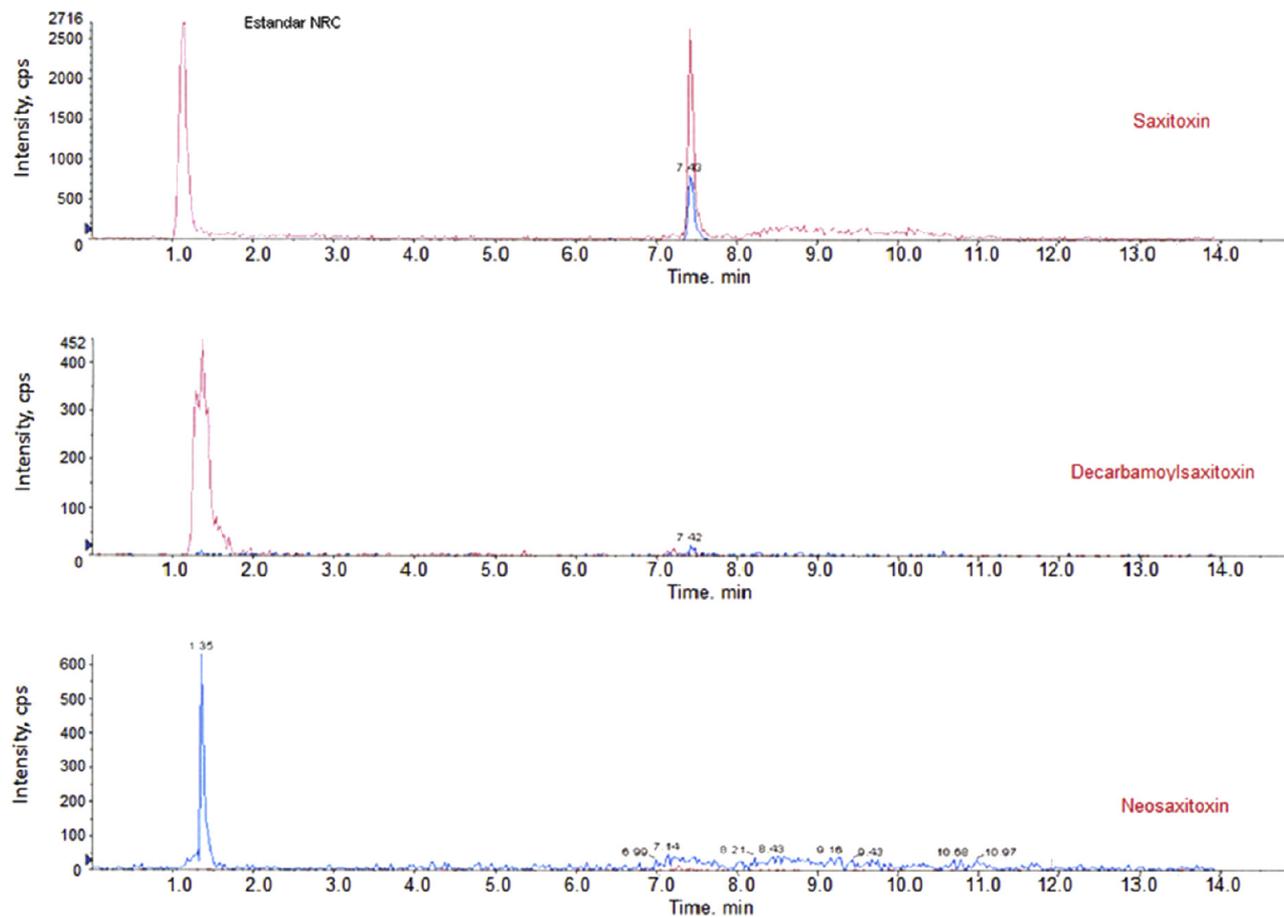
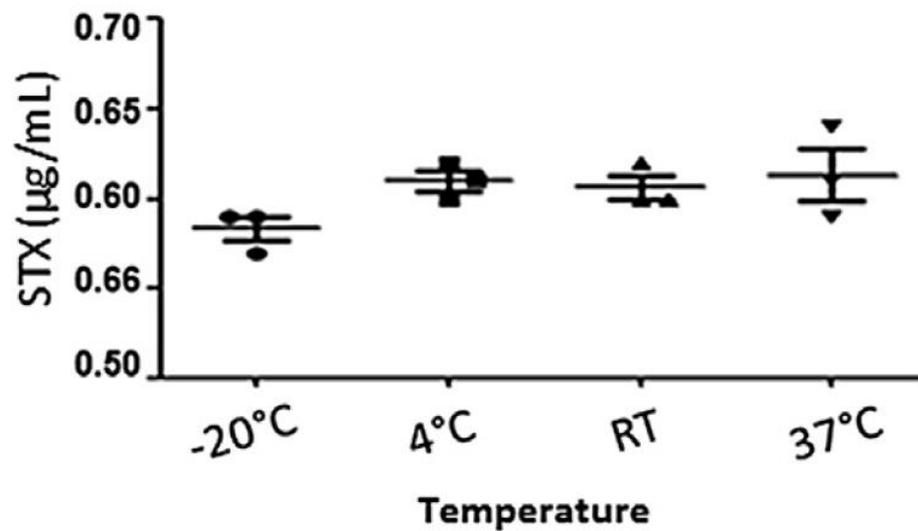
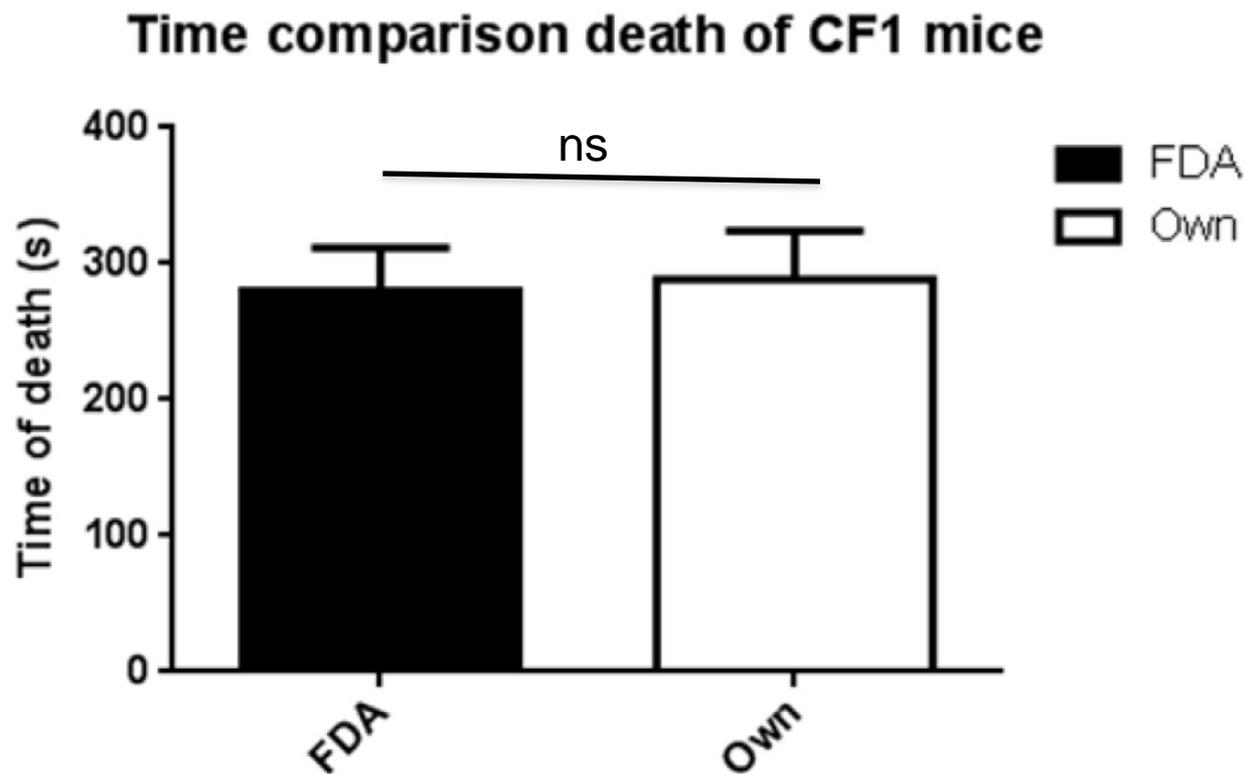


Fig. 6. Chromatogram in HPLC–MS–MS of NRC STX standard. Method for STX, dcSTX and Neo (from top to bottom).



**Fig. 7.** Analyses by HPLC using the analytic method of STX purified from *M. chilensis* stored at different temperatures and times (1, 15 and 30 days each one).



**Fig. 8.** STX analysis by mouse bioassay. We observe the time of death in CF1 mice injected with both STX, distributed by FDA and purified from muscle of *M. chilensis*.

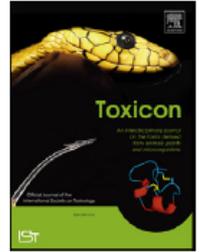


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



## Purification and characterization of saxitoxin from *Mytilus chilensis* of southern Chile



D.P. Rubio <sup>a</sup>, L.G. Roa <sup>b</sup>, D.A. Soto <sup>a</sup>, F.J. Velasquez <sup>a</sup>, N.A. Gregorcic <sup>a</sup>, J.A. Soto <sup>a, d, e</sup>,  
M.C. Martinez <sup>c</sup>, A.M. Kalergis <sup>d, e</sup>, A.E. Vasquez <sup>a, d, \*</sup>

<sup>a</sup> Sección de Biotecnología, Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile, Chile

<sup>b</sup> Sección de Química y Alimentos, Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile, Chile

<sup>c</sup> Sección Microbiología de Alimentos, Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile, Chile

<sup>d</sup> Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy, Chile

<sup>e</sup> Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile



COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

**Proyecto IT 16I10057**

**“PRODUCCION DE SAXITOXINA COMO MATERIAL DE  
REFERENCIA PARA LA VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS  
INTOXICACIONES POR FENOMENOS ALGALES  
NOCTIVOS”**

Producción de saxitoxina como material de referencia certificado para la  
vigilancia y control de las intoxicaciones por fenómenos algales nocivos

Abel Vásquez Veloso  
Instituto de Salud Pública

Jorge Yáñez S  
Universidad de Concepción



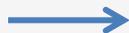
Universidad de Concepción

Subsecretaría  
de Salud  
Pública

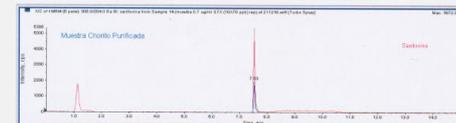
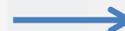




Desarrollo y estandarización del protocolo de HPLC Semipreparativo



Purificación de STX a escala piloto y de producción.



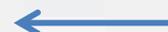
Análisis de la purificación de STX por LC-MS-MS y bioensayo.



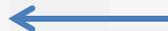
Homologación lotes por Bioensayo.



Test de homogeneidad y estabilidad



Caracterización de STX Purificada por HPLC Preparativo y LC-MS-MS



Certificación nacional e internacional del estándar de STX



**Dr. Abel Vásquez Veloso**

**Jefe Sección de Biotecnología  
Departamento de Salud Ambiental  
Instituto de Salud Pública de Chile**

**[avasquez@ispch.cl](mailto:avasquez@ispch.cl)**

**Material de referencia (RM)** - Material, suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, que se ha establecido para ser adecuado para su uso previsto en un proceso de medición

RM es un término genérico.

Las propiedades pueden ser cuantitativas o cualitativas, p. Identidad de sustancias o especies.

**Material de referencia certificado (CRM)** - Material de referencia caracterizado por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas, **acompañado de un certificado que proporciona el valor de la propiedad especificada**, su incertidumbre asociada y una declaración de trazabilidad metrológica

El concepto de valor incluye atributos cualitativos como identidad o secuencia. Las incertidumbres para tales atributos pueden expresarse como probabilidades.

Los procedimientos válidos desde el punto de vista metrológico para la producción y certificación de materiales de referencia se encuentran en, entre otras, las Guías ISO 34 y 35.

La Guía ISO 31 proporciona orientación sobre el contenido de los certificados.