

Morskie biotoksyny – potencjalne zagrożenie zdrowia człowieka

JACEK OSEK, KINGA WIECZOREK, MAGDALENA TATARCZAK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J., Wieczorek K., Tatarczak M.

Seafood as potential source of poisoning by marine biotoxins

Summary

In the last decades, the frequency, intensity and distribution of harmful marine microalgae which produce toxins seem to be increasing. Of the estimated 5 000 living species of algae belonging to phytoplankton, only about 40 species produce toxins. Microscopic toxic algae are an important component of the shellfish diet. This fact together with the expanding seafood industry causes health hazards and great economic losses in different regions all over the world. Consequently, sporadic algal blooms in areas where shellfish are traditionally gathered or commercially farmed require a control system to ensure consumer safety. When humans eat seafood contaminated by marine biotoxins they may suffer a variety of gastrointestinal and neurological illnesses. The longest-known and most infamous group of marine toxins is that responsible for Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). The primary neurotoxin is saxitoxin which can cause respiratory paralysis. Classically, the mouse bioassay has been used to detect shellfish toxins. However, efforts have been directed toward the development of a suitable chemical assay for toxicity which would be more sensitive and reproducible. Modern techniques, for instance immunoassay, chromatography, or tissue culture test, are very promising for such an application.

Keywords: microalgae, marine biotoxins, shellfish

W ostatnim okresie w piśmiennictwie pojawia się coraz więcej informacji o zatruciach wywołanych toksynami obecnymi w różnego rodzaju owocach morza. Jest to istotny problem, ponieważ zwiększa się międzynarodowy handel tymi artykułami. Mając to na względzie, nie można jednoznacznie stwierdzić, że istnieją kraje wolne od takiego zagrożenia. Toksyny wytwarzane przez wykwity niektórych gatunków glonów, a następnie kumulowane w wielu organizmach morskich, nie są dla nich szkodliwe, natomiast ich konsumpcja przez człowieka może doprowadzić do szeregu chorób. Toksynogenne skorupiaki nie różnią się organoleptycznie od nietoksycznych owoców morza, a zawarte w nich niepożądane substancje nie są inaktywowane w trakcie ewentualnych procesów kulinarnych (gotowanie, pieczenie) (2, 25). Z tego też względu, w celu zapewnienia bezpieczeństwa zdrowia publicznego, niezbędne jest monitorowanie wód przybrzeżnych, w których występują toksynotwórcze glony oraz zapewnienie czystości owoców morza przeznaczonych do konsumpcji. Wagę tego problemu doceniono w Unii Europejskiej, której szereg aktów prawnych reguluje m.in. kwestie jakości wody morskiej używanej do produkcji skorupiaków, właściwych wa-

runków ich zbioru i przetwarzania, a także badania w kierunku biotoksyn (3-5, 7-9). Ponadto zgodnie z Dyrektywą z 1993 r. (6) kraje członkowskie UE zobowiązane zostały do utworzenia laboratoriów referencyjnych, których zadaniem jest koordynacja badań dotyczących morskich biotoksyn. Z uwagi na członkostwo Polski w UE od 1 maja 2004 r. powyższe prawodawstwo zaczęło obowiązywać również w naszym kraju. Takie laboratorium zostało utworzone w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach. Jego zadaniem jest m.in. nadzór merytoryczny nad krajowymi ośrodkami diagnostycznymi prowadzącymi badania biotoksyn, organizacja testów sprawdzających, jak też wykonywanie badań odwoławczych.

Trujące glony i skażone nimi owoce morza występują w wodach przybrzeżnych na całym świecie. Wyizolowano i scharakteryzowano wiele wytwarzanych przez nie biotoksyn, których najważniejsze cechy przedstawiono w tab. 1.

Najbardziej istotne zatrucia na tle biotoksyn morskich można podzielić na kilka grup, według charakterystycznych objawów klinicznych: paralityczne (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP), zatrucie typu Cigu-

Tab. 1. Najważniejsze biotoksyny morskie

Toksyna	Rodzaj intoksykacji*	Obszary występowania	LD ₅₀ (µg/kg)	Dopuszczalna dawka toksyny (µg/100 g)**
Saksytoksyna (STX)	PSP	USA Azja Ameryka Południowa Europa	10	80
Ciguatoksyna (CTX)	CFP	Obszary tropikane	0,25-0,9	3,5
Kwas okadaikowy (OA)	DSP	Japonia Europa	200	16
Brewetoksyna (BTX)	NSP	Floryda Meksyk Nowa Zelandia	200	80
Kwas domoikowy (DA)	ASP	Kanada USA Morze Północne	120	2000

Objaśnienia: * – szczegóły w tekście; ** – normy Unii Europejskiej

atera (Ciguatera Fish Poisoning, CFP), biegunkowe (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP), neurotoksyczne (Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP) oraz amnestyczne (Amnestic Shellfish Poisoning, ASP).

Zatrucia paralityczne. Zwane są też porażeniami, a wywołane przez szereg toksyn, z których największe znaczenie posiada saksytoksyna (saxitoxin, STX). Nazwa jej pochodzi od mięczaka, z którego po raz pierwszy została wyizolowana – *Saxidomus* (cyt. 12). STX jest jedną z najbardziej niebezpiecznych dla ludzi biotoksyn morskich. Wykazano, że LD₅₀ dla myszy po podaniu parenteralnym jest na poziomie 3-10 µg/kg, a przy aplikacji doustnej – ok. 260 µg/kg (24). Stwierdzono również, że w okresie letnim niektóre gatunki małży są w stanie skumulować ogromne ilości STX, nawet w granicach 50 000 MU (ok. 9 mg) w jednym osobniku. Z tego też względu jeden małż może zawierać nawet kilka dawek śmiertelnych dla człowieka [<http://www.who.edu>].

Mechanizm działania STX polega na blokowaniu przepływu jonów sodu w kanałach błonowych, mających istotne znaczenie w przekazywaniu impulsów nerwowych, co w konsekwencji prowadzi do paraliżu oddechowego. Objawy chorobowe mogą wystąpić nawet w ciągu 5-30 minut po spożyciu toksycznych owoców morza. W zależności od spożytej dawki toksyny – rozwijają się zaburzenia ruchowe, bóle głowy, trudności w połykaniu, objawy ze strony układu pokarmowego, a także porażenia mięśni gładkich. W przypadku braku interwencji lekarskiej zgon spowodowany uduszeniem może nastąpić w ciągu 2-12 godzin. Śmiertelność na tle PSP wynosi w granicach 10%, chociaż w 1987 r. w Gwatemali zanotowano ponad 50% zejść śmiertelnych po spożyciu małży przez dzieci (23). Hallegraeff (11) podaje, że w skali globalnej rocznie ok. 2000 osób ulega zatruciu toksynami PSP przy średniej śmiertelności ok. 15%.

Pierwsze próby oznaczania toksyn z grupy PSP wykonali w 1937 r. Sommer i Meyer (26), stosując

test na myszach. Odczyn ten jest nadal stosowany w wielu laboratoriach, zwłaszcza do określania poziomu saksytoksyny. Jest to jednocześnie jedyne badanie posiadające międzynarodową akceptację do oznaczania toksyn paralitycznych. Zaletą testu jest łatwość jego wykonania, natomiast wadą – stosunkowo niska czułość (limit detekcji na poziomie 40 µg/100 g małży) (13). Alternatywą dla testu mysiego są analizy chemiczne, zwłaszcza wysoko wydajna chromatografia cieczowa (HPLC) z detektorem fluorescencyjnym. Charakteryzuje się ona wyższą, w stosunku do testu biologicznego, czułością (10-20 µg/100 g) (22). Do identyfikacji toksyn PSP używa się także innych metod, np. opartych na odczynach komórkowych *in vitro* (limit wykrywalności ok. 2 µg/100 g) lub też testów immunologicznych (ELISA) (14, 24).

Zatrucia typu Ciguatera (CFP). Notuje się je po spożyciu niektórych gatunków ryb, w których tkance mięśniowej nagromadziły się cigua- i maitotoksyny (ciguatoxin – CTX, maitotoxin – MTX). CTX stanowią grupę polieterydów, rozpuszczalnych w tłuszczach, termostabilnych substancji chemicznych. Maitotoksyny mają podobną strukturę, ale w odróżnieniu od CTX są rozpuszczalne w wodzie, a także bardziej toksyczne (18). Stwierdzono, że intoksykacje typu CFP dotyczą rocznie ok. 25 tysięcy osób (20). Potencjalne zagrożenie stanowią zwłaszcza ryby, takie jak: pstrąg koralowy, granik, makrela, łosoś, a także barrakuda. Sprzedaż tych ostatnich do konsumpcji dla ludzi jest zakazana na Florydzie, ponieważ 1/3 z nich jest skażona ciguatoksyną (18).

Mechanizm działania ciguatoksyny polega na aktywowaniu zależnych od potencjału jonowego kanałów sodowych, mających szczególne znaczenie w przekazywaniu impulsów nerwowych. W wyniku działania toksyny wzrasta nadmiernie przepuszczalność błony cytoplazmatycznej dla jonów sodu, efektem czego są zaburzenia homeostazy komórkowej i upośledzenia funkcji neuronów (20).

Objawy chorobowe CFP mogą pojawić się nawet w 30 minut po spożyciu zatrutych ryb i początkowo są to: biegunka, wymioty i bóle brzucha, a następnie zaburzenia neurologiczne, do których należą: odwrócenie odczuwalności temperatur, bóle mięśniowe, zawroty głowy, stany lękowe, pocenie się oraz drętwienie i mrowienie w ustach i palcach. Zanotowano przypadki paraliżu i śmierci. Czas powrotu do zdrowia jest różny i trwa od kilku tygodni do wielu lat. Do tej pory nie znaleziono skutecznego antidotum, natomiast dobre efekty lecznicze daje odpowiednio wczesne zastosowanie mannitolu (19, 20).

Identyfikacja toksyn grupy CFP jest stosunkowo trudna, gdyż nie są dostępne proste testy chemiczne do pomiaru poziomu cigua- i maitotoksyny w mięsie rybim. Podawanie kotom lub mangustom podejrzanych

ryb czy też testy na myszach są pracochłonne i niehumanitarne, dlatego prowadzi się badania nad wykorzystaniem chromatografii (HPLC/MS) i testów immunologicznych (RIA, ELISA), a także technik z użyciem hodowli komórkowych (18, 20).

Zatrucia biegunkowe (DSP). Wywołane są przez kwas okadaikowy (okadaic acid, OA) oraz szereg jego pochodnych określanych jako dinofysistoksyny (DTX), yessotoksyny (YTX) oraz pektenotoksyny (PTX). Efekt biegunkowy obserwuje się po spożyciu toksyn OA i DTX, podczas gdy odmiany PTX i YTX są odpowiedzialne odpowiednio za martwicę śledziony i zmiany strukturalne włókien mięśnia sercowego. Mechanizm działania toksyn OA i DTX na poziomie komórkowym sprowadza się zwykle do hamowania aktywności fosfataz białkowych (1).

Intoksykacje po spożyciu skorupiaków, zawierających toksyczne pochodne kwasu okadaikowego, po raz pierwszy zanotowano w latach 60. i 70. XX wieku w Holandii i Japonii (16). Objawy kliniczne (szybko występujące nudności, wymioty, biegunka), z uwagi na swoją niespecyficzność, mogą być często mylone z jelitowymi zakażeniami bakteryjnymi, a przez to rzeczywista liczba przypadków DSP u ludzi jest często zaniżona. W przeciwieństwie do zatruc PSP, nie zanotowano zejść śmiertelnych po spożyciu owoców morza zanieczyszczonych OA lub jego pochodnymi. Choroba zwykle samoistnie ustępuje w ciągu 3 dni, jednak w niektórych przypadkach mogą rozwijać się wtórne zmiany nowotworowe żołądka. Z badań wykonanych w Nowej Zelandii wynika, że średni poziom kwasu okadaikowego w niektórych badanych małżach wynosił 45 µg/100 g. Uważa się, że dawka tolerowana przez człowieka sięga 160 µg/kg masy ciała (1).

Identyfikacja toksyn DSP możliwa jest metodami biologicznymi, chemicznymi lub immunologicznymi. Zamiast typowego badania na myszach stosuje się w tym przypadku testy na szczurach, którym doustnie podaje się izolowane gruczoły trawienne małży i ocenia objawy biegunki oraz konsystencję i ilość wydalanego kału (16). Również ta metoda jest coraz częściej zastępowana przez analizę chemiczną OA i jego pochodnych przy użyciu HPLC w połączeniu z detekcją fluorometryczną. Problemem związanym z tą techniką jest brak oczyszczonych standardów toksyn DSP. W ostatnich latach do rutynowych badań toksyn OA i DTX używa się testów ELISA (UBE Industries, Japonia i Rougier Bio-tech., Kanada). Ich dużą zaletą jest możliwość standaryzacji i użycia w różnych laboratoriach, wadą – stosunkowo niski limit detekcji i specyficzności (1).

Zatrucia neurotoksyczne (NSP). Są notowane u ludzi po spożyciu toksynogennych owoców morza hodowanych w wodach przybrzeżnych Ameryki Północnej. Występują tam często charakterystyczne czerwone zakwity jednokomórkowych organizmów z gromady *Pyrrophyta* (bruzdnice), a zwłaszcza gatunku *Karenia brevis*. Wytwarzane przez nie substancje tok-

syczne stanowią grupę związków określaną jako brevetoksyny (brevetoxins, BTX). Oddziałują one silnie na układ nerwowy poprzez depolaryzację błon neuronów, co powoduje niekontrolowany napływ jonów sodu do wnętrza komórki. Mechanizm działania toksyny BTX i wywołane przez nią objawy są podobne jak w przypadku CFP, ale przeważają zaburzenia ze strony układu nerwowego i pokarmowego. Skażone BTX są zwykle różnego rodzaju małże. Ilość zawartych w nich toksyn może wynosić 78-120 µg/mg, natomiast LD₅₀ dla myszy waha się w granicach od 0,15 do 0,21 mg/kg. Pod wpływem fal morskich i wiatru bruzdnice łatwo otwierają się, powodując tym samym uwalnianie trujących aerozoli, które wywołują u ludzi objawy podobne do astmy. Nie zanotowano do tej pory przypadków śmiertelnych na tle NSP, a wyzdrowienie po intoksykacji następuje zazwyczaj w ciągu kilku dni (10).

Zatrucia amnestyczne (ASP). Są efektem toksyn wytwarzanych przez różne gatunki okrzemek. Plankton ten wytwarza czynną substancję toksyczną – kwas domoikowy (domoic acid, DA). Pierwsze przypadki ASP zanotowano w 1987 r. w Kanadzie, kiedy po spożyciu małży zachorowały 123 osoby. Spośród nich 19 osób hospitalizowano, 4 z nich zmarły (15). Od tego czasu prowadzi się monitorowanie występowania okrzemek w wodzie i obecności DA w mięczakach, jednak substancja ta może także być kumulowana w organizmach ryb czy raków, co stanowi poważne zagrożenie dla konsumentów. Związek ten na poziomie komórkowym wpływa na zaburzenia przepływu jonów sodu i wapnia oraz blokowanie niektórych receptorów błonowych. Efektem tego mogą być szybko rozwijające się nudności, bóle brzucha i biegunka. W poważnych przypadkach występują również objawy neurologiczne, zwykle w ciągu 48 godzin od spożycia, takie jak: bóle głowy, ataki apopleksji, dezorientacja, utrata pamięci krótkotrwałej, trudności w oddychaniu i śpiączka. Nie jest znana minimalna dawka DA potrzebna do wywołania objawów chorobowych, ale w przypadku wspomnianego zatrucia w Kanadzie stwierdzono obecność tego związku w granicach 300-1200 µg/g małży (1, 21).

Identyfikację toksyn ASP przeprowadza się metodami biologicznymi, chemicznymi lub immunologicznymi. W przypadku obecności kwasu domoikowego myszy doświadczały typowe objawy świądu. Z powodu stosunkowo niskiej czułości odczynu (reakcja zwierząt tylko w przypadku koncentracji DA > 40 mg/g) oraz ze względów humanitarnych metoda biologiczna nie jest szerzej stosowana. W niektórych laboratoriach do identyfikacji toksyn z grupy ASP używa się odczynu wiązania kwasu domoikowego z receptorem synaptycznym komórek nerwowych szczurów. Test ten wymaga jednak specjalistycznej aparatury i z tego względu nie znajduje szerszego zastosowania. W rutynowym oznaczaniu toksyn ASP największe znaczenie mają obecnie analityczne metody che-

miczne, a szczególnie wysoko wydajna chromatografia cieczowa (HPLC). Technika ta umożliwia wykrycie już ok. 18 pg DA w 1 ml wody morskiej oraz, po odpowiedniej modyfikacji, 20-30 ng/g małży. Jest to limit wystarczający do zapewnienia ochrony zdrowia konsumentów (17). Do innych metod stosowanych przy detekcji kwasu domoikowego należą: elektrofoza kapilarna, chromatografia gazowa lub cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS, LC-MS) oraz dostępny w ofercie handlowej test AP ELISA (Biosense Laboratories, Norwegia). W tym ostatnim przypadku limit detekcji nie jest zbyt wysoki (ok. 20 µg/g), ale wynik uzyskuje się w ciągu 1,5 godziny.

Podsumowanie

Konsumpcja owoców morza staje się w ostatnich latach coraz bardziej popularna również w krajach takich jak Polska. Toksynogenne małże, krewetki czy ostrygi mogą jednak spowodować szereg poważnych zaburzeń zdrowotnych, szczególnie pokarmowych i neurologicznych, a nawet zejścia śmiertelne. Dlatego też niezbędna jest kontrola toksykologiczna stanu wód, w których występują lub są hodowane skorupiaki, a także badanie przeznaczonych do konsumpcji owoców morza na obecność biotoksyn. Najczęściej stosowaną do tego celu techniką są testy biologiczne na myszach. Ostatnio prowadzone są na coraz szerszą skalę próby wykorzystania innych metod diagnostycznych, takich jak wysoko sprawna chromatografia cieczowa (HPLC) czy ELISA, charakteryzujących się nie tylko odpowiednim poziomem detekcji, ale również wysoką specyficznością w porównaniu z testami na zwierzętach. Tego typu analizy są niezbędne dla zapewnienia ochrony zdrowia konsumentów.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Australia New Zealand Food Authority: Shellfish toxins in food, a toxicological review and risk assessment. Tech. Rep. Series no. 14, 2001.
2. Daranas A. H., Norte M., Fernandez J. J.: Toxic marine microalgae. *Toxicol.* 2001, 39, 1101-1132.
3. Decyzja Komisji 96/77/EC z 18 stycznia 1996 r. określająca warunki zdrowotne zbierania i przetwarzania niektórych małży pozyskiwanych z obszarów, w których poziom toksyny porażającej przekracza limit przewidziany w dyrektywie 91/492/EEC.
4. Decyzja Komisji 2002/225/EC z 15 marca 2002 r. ustanawiająca szczegółowe przepisy dotyczące dyrektywy 91/492/EEC odnośnie maksymalnych poziomów oraz metod analizowania niektórych toksyn pochodzenia morskiego u mięczaków dwuskorupowych, szkarłupni, osłonic i brzuchonogów morskich.
5. Decyzja Komisji 2002/226/EC z 15 marca 2002 r. ustalająca szczegółowe przepisy dotyczące zbioru oraz przetwarzania niektórych mięczaków morskich przekraczających próg ASP ustalony dyrektywą 91/492/EEC.
6. Decyzja Rady 93/383/EEC z 14 czerwca 1993 r. dotycząca laboratoriów referencyjnych odpowiedzialnych za monitoring biotoksyn pochodzenia morskiego.
7. Dyrektywa 79/923/EEC z 30 października 1979 r. w sprawie wymaganej jakości wód, w których żyją skorupiaki.
8. Dyrektywa 91/492/EEC z 15 lipca 1991 r. ustanawiająca warunki zdrowotne produkcji i wprowadzenia na rynek żywych mięczaków dwuskorupowych.
9. Dyrektywa 97/61/EC z 20 października 1997 r. zmieniająca załącznik do dyrektywy 91/492/EEC poprzez wprowadzenie dokumentu rejestrującego, zawierającego informacje o statusie zdrowotnym ferm skorupiaków oraz ewentualnych procesach oczyszczających wykonywanych w stosunku do mięczaków przed umieszczeniem ich na rynku.
10. Gallagher P., Shinnick-Gallagher P.: Effect of G. breve toxin in the rat phrenic nerve diaphragm preparation. *Br. J. Pharm.* 1980, 69, 367-372.
11. Hallegraef G. M.: A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 1993, 32, 79-99.
12. Hallegraef G. M.: Harmful algal blooms a global review. *Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides UNESCO, Paris* 1995, 33, 1-22.
13. Hungerford J. M., Weckell M. M.: Analytical methods for marine toxins. *Handbook of Natural Toxins* 1992, 7, 416-473.
14. Indrasena W. M., Gill T. A.: Fluorometric detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Anal. Biochem.* 1998, 264, 230-236.
15. Iverson F., Truelove J.: Toxicology and seafood toxins: domoic acid. *Nat. Toxins* 1994, 5, 334-339.
16. Kat M.: Dinophysis acuminata blooms, the distinct cause of Dutch mussel poisoning. *Toxic Dinoflagellates. Elsevier, Amsterdam* 1985, s. 73-77.
17. Lawrence J. F., Charbonneau C. F., Menard C., Quilliam M. A., Sim P. G.: Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists. *J. Chromatogr.* 1989, 13, 349-356.
18. Lehane L., Lewis R. J.: Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 91-125.
19. Lewis R. J.: Ciguaterins are potent ichthyotoxins. *Toxicol.* 1992, 30, 207-211.
20. Lewis R. J.: The changing face of ciguatera. *Toxicol.* 2001, 39, 97-106.
21. Novelli A., Kispert T., Fernandez-Sanchez A., Zitko V.: Domoic acid-containing toxic mussels produce neurotoxicity in neuronal cultures through a synergism between excitatory amino acids. *Brain Res.* 1992, 577, 41-48.
22. Oshima Y., Sugino K., Yasumoto T.: Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. *Mycotoxins and Phycotoxins. Elsevier, Amsterdam* 1988, 319-326.
23. Rodrigue D. C., Etzel R. A., Hall S., de Porras E., Velasquez O. H., Tauxe R. V., Kilbourne E. M., Blake P. A.: Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990, 42, 267-271.
24. Schantz E. J.: Chemistry and biology of saxitoxins and related toxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986, 479, 15-23.
25. Shumway S. E.: Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.* 1995, 3, 1-31.
26. Sommer H., Meyer K. F.: Paralytic shell-fish poisoning. *Am. Med. Ass. Arch. Pathol.* 1937, 24, 560-598.

Adres autora: prof. dr hab. Jacek Osek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: josek@piwet.pulawy.pl