

Diaretyczne toksyny morskie jako zagrożenie dla zdrowia konsumenta

MIROSŁAW MICHALSKI

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

Michalski M.

Diarrhetic Shellfish Poisoning as a risk for consumer health

Summary

Shellfish poisoning is caused by a group of toxins developed by planktonic algae (dinoflagellates), upon which the shellfish feed in most cases. The main groups of biotoxins harmful for human beings are: DSP, NSP, ASP and PSP. In the case of DSP, the effects include diarrhea, nausea, vomiting and abdominal pain, and it is found in humans very soon after the ingestion of contaminated bivalve mollusks. They also induce tumors of the stomach. Total quantities (measured in the whole mollusks or any edible part separately) should not exceed the following limit for okadaic acid, dinophysistoxins and pectenotoxins together, 160 micrograms of okadaic acid equivalents per kilogram and for yessotoxins, 1 milligram of yessotoxin equivalent per kilogram. Modern chemical techniques such as immunoassay, phosphatase test or chromatography (HPLC, LC-MS) are very suitable for the detection of DSP.

Keywords: Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), okadaic acid, detection of DSP, shellfish

W związku z rozwijającą się turystyką i otwarciem na świat, umożliwiającym zapoznanie się z innym zwyczajami kulinarnymi, coraz większą popularnością w Polsce cieszą się tzw. owoce morza, w tym małże blaszkoskrzelne (mięczaki). Ma to odzwierciedlenie w zwiększającym się imporcie małży i ich dostępnością w prawie każdym supermarkecie. Coraz więcej restauracji serwuje je w swoim menu, poczynając od świeżych ostryg, a kończąc na pizzach z owocami morza. Import nieprzetworzonych owoców morza w 2008 r. wyniósł 6326 ton, a przetworzonych 2161,3 ton. Po przetworzeniu i reimporcie w kraju pozostało 343 tony świeżych małży i 3965 ton krewetek. Spożywane są małże blaszkoskrzelne, takie jak: ostrygi (*Ostrea edulis*), omułki (*Mytilus edulis*), wongole (*Tapes semidecussatus*), przegrzebki (*Pecten maximus*), sercówki (*Cerastoderma edule*), klamy (*Mercenaria mercenaria*) czy też palurdy (*Ruditapes philippinarum*). Głównymi dostawcami małży na nasz rynek są: Francja, Hiszpania, Dania, Holandia, Norwegia, Irlandia i Włochy.

Źródłem pożywienia dla małży blaszkoskrzelnych są jednokomórkowce (fitoplankton). Plankton może wytworzyć w sprzyjających warunkach związki toksyczne dla ludzi. Są to metabolity wtórne, nie produkowane w sposób ciągły, lecz w określonych warunkach środowiskowych. Szczególnie dużo rozmaitych toksyn jest wytwarzanych w czasie tzw. kwitnienia

wód, czyli nadmiernego i niekontrolowanego wzrostu glonów. Kwitnienie wód nosi również nazwę czerwonego przyływu (red tides), chociaż nie zawsze wody zabarwiają się na czerwono. Mogą się zabarwić również na kolor żółty, zielony, brązowy lub niebieski, w zależności od rodzaju planktonu, jego ilości i głębokości, na jakiej występuje. Ilość i rodzaj wytwarzanych toksyn zmienia się w zależności od warunków środowiskowych. Taki nadmierny wzrost planktonu jest powodowany przez zwiększoną dostępność substancji organicznej (w tym mikroelementów), O_2/CO_2 , obecność światła, odpowiednie temperatury wody czy też zmianę zasolenia. Przyczyną jest zanieczyszczenie środowiska substancjami mineralnymi, ścieki przemysłowe, zmiany klimatyczne czy też ruchy tektoniczne w obszarze dna morskiego (3, 14, 19, 23).

Substancje toksyczne wytwarzane przez glony jednokomórkowe przedostają się do organizmu mięczaków przez przewód pokarmowy wraz z planktonem, który jest ich głównym pożywieniem, a następnie kumulowane są w mięśniach i wątrobo-trzustce. Spożywanie skażonych biotoksynami małży blaszkoskrzelnych jest główną przyczyną zachorowań ludzi. Źródłem biotoksyn morskich mogą być również skorupaki, takie jak: raki, homary czy krewetki oraz szkarłupnie, osłonice i ślimaki morskie (17). Spożywanie tego rodzaju specyficznej żywności nie jest pozbawione pewnego ryzyka związanego z obecnością biotoksyn

morskich powodujących specyficzne zatrucia pokarmowe.

Termin „morskie biotoksyny” oznacza biologiczne substancje trujące, odkładające się w żywych małżach wskutek spożywania przez nie planktonu zawierającego toksyny. Toksyny są tym bardziej niebezpieczne, że ich obecność w mięsie małży przeznaczonych do konsumpcji nie powoduje zmian sensorycznych spożywanego produktu. Tak więc nie ma możliwości odrzucenia spożywanego małża na podstawie oceny zmysłem smaku i zapachu. W krajach będących producentami i eksporterami małży istnieje system nadzoru nad ich hodowlą i dystrybucją. System jest wielostopniowy i zaczyna się od monitorowania na różnych głębokościach substancji odżywczych w wodzie poprzez określenie obecności glonów i ich gatunków, określenie ryzyka obecności biotoksyn w planktonie oraz wystąpienia skażenia małży, a kończy się na centrach oczyszczania skażonych małży. System pozwala dokonać klasyfikacji obszarów produkcyjnych i nie dopuścić do sprzedaży małży z biotoksynami (13, 19, 23, 24, 30).

Główne biotoksyny występujące u mięczaków na terenie Europy to toksyny powodujące paraliż mięśni (PSP – paralytic shellfish poisons), uszkodzające lub upośledzające funkcjonowanie układu nerwowego, neurotoksyny (NSP – neurotoxic shellfish poisoning), toksyny anamnesticzne (ASP – amnesic shellfish poisoning), toksyny wywołujące biegunki (DSP – diarrhoeic shellfish poisons) oraz kwas azaspirowy (AZA) (9, 16, 24, 27).

W niniejszej publikacji omówiono najczęściej występującą grupę toksyn morskich, a mianowicie toksyny wywołujące biegunkę (DSP). Toksyny te stwierdza się w: ostrygach, omułkach, przegrzebkach, sercówkach, kłamach i małżach filipińskich. Biotoksyny te wykryto również w skorupiakach (17, 35). W latach 1999-2004 w Danii stwierdzano obecność toksyn DSP głównie w omułkach (*Mytilus edulis*) i małżu maktrze (*Spisula spp.*), w zakresie stężeń 43-2516 µg/kg mięsa małży (18).

Różnorodność planktonu powoduje, że poszczególne gatunki jednokomórkowców wytwarzają zróżnicowane toksyny. Toksyny diaretyczne (DSP) wytwarzane są przez *Dinoflagellata* – bruzdnice, gromada tobołki, grupa *Protista*, *Dinophysis spp* i *Prorocentrum lima* (główne źródło kwasu okadaikowego (OA) i dinofysistoksyny (DTX), *Dinophysis acuta*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis* i *Dinophysis dens*. Do grupy toksyn DSP zalicza się kwas okadaikowy (OA) i jego pochodne, dinofysistoksyny (DTX1, DTX2, DTX3), yessotoksyny (YTX's), spirolidy (SPX) oraz pektenotoksyny (np. PTX1, PTX2). Dotychczas zidentyfikowano i opisano 15 analogów kwasu okadaikowego. W swojej budowie zawierają grupy ketalowe, oksolany i cykliczne hemiketale (1, 6, 7). Yessotoksyna (YTX) jest wieloeterową toksyną wyizolowaną po raz pierwszy w Mutsu Bay, (Japonia), w 1986 r. z przewo-

du pokarmowego przegrzebka *Patinopecten yessoensis*. Stwierdzono YTX wytworzoną również przez dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* i *Gonyaulax spinifera* (26).

Toksyny diaretyczne są związkami lipofilnymi, gromadzącymi się głównie w tkance tłuszczowej mięczaków i w wątrobo-trzustce. Toksyny z grupy DSP są termostabilne i nie są inaktywowane przez gotowanie. Wykazano, że OA i jest bardziej termoodporny niż DTX2. Kwas okadaikowy zaczyna rozkładać się w temperaturze powyżej 120°C, podczas gdy degradacja DTX2 zaczyna się już w 100°C. W mięsie małży przechowywanym w temperaturach do -80°C toksyny DSP są trwałe i nie tracą swojej aktywności przez kilkanaście miesięcy (5-7, 21). Łączna ilość zawartych morskich biotoksyn (mierzona dla całego małża lub oddzielnie dla części jadalnej) nie może przekroczyć dla kwasu okadaikowego, dinofysistoksyn i pektenotoksyn (DSP) razem 160 mg równoważników kwasu okadaikowego na kilogram mięsa (30). Minimalna dawka toksyny wywołująca biegunkę u dorosłych osób to 40 µg, czyli około 0,5 µg OA/kg masy ciała. Według danych EFSA, przy analizie ryzyka nie powinno się brać pod uwagę częstotliwości spożycia małży, lecz jednorazowo spożywaną porcję. Uważa się, że po spożyciu 400 g małża zawierającego 160 µg równoważnika OA/kg, co odpowiada ekspozycji 64 µg toksyny, a więc dla konsumenta ważącego 60 kg – 1 µg/kg masy ciała, dochodzi do zatrucia organizmu (7). Objawami są: uporczywe biegunki, wymioty, nudności i kurcze żołądka. Objawy te są już widoczne nawet po 30 min. od spożycia skażonego mięsa małży i z reguły zanikają po 3-4 dniach. Stopień nasilenia zatrucia zależy od ilości i rodzaju toksyny, jaka została spożyta. Przy chronicznych zatruciach jest możliwa indukcja zmian nowotworowych żołądka czy też przewodu pokarmowego. W badaniach na szczurach stwierdzono, że OA jest promotorem nowotworów, w stosunku zaś do DTX nie zanotowano ich genotoksyczności. Dinofysistoksyny dodatkowo uszkodzają również wątrobę i mięsień sercowy (10, 38).

Występowanie biotoksyn DSP w Europie jest częste we Włoszech, Norwegii, Portugalii i Hiszpanii. Pectenotoksyny znajdowano również często w glonach i małżach w Australii, Japonii i Nowej Zelandii. W USA nie zanotowano zatruc DSP po spożyciu skażonych toksyną owoców morza, chociaż toksyny te były stwierdzane w glonach. Zatrucia DSP stwierdzano zaś we wschodniej Kanadzie (7, 32). We Francji YTX's i SPX wykrywano w glonach, jednakże dopiero w latach 2004 i 2005 stwierdzono je, stosując metodę LC-MS/MS, w małżach, omułkach (*Mytilus edulis galloprovincialis*), ostrygach (*Crassostrea gigas*), sercówkach (*Cerastoderma edule*) i wongolach (*Ruditapes spp.*) (2). W 1984 r. we Francji około 10 000 osób zatrulo się po spożyciu skażonych mięczaków, w tym małży skażonych toksynami DSP. W większości przypadków za zatrucie odpowiedzialnych jest kilka toksyn występu-

jących w małżach. Pectenotoksyny często występują z kwasem okadaikowym (OA) i jego pochodnymi (11). Pierwsze zatrucia DSP (estry kwasu okadaikowego) w Portugalii stwierdzono latem 2001 r. po spożyciu okładniczek (*Solen marginatus*) oraz po krabów (krab zielony, *Carcinus maenas*). Zawartość OA w pozostałej po konsumpcji porcji mięsa kraba wynosiła 32 µg/100 g mięsa kraba (35). W Antwerpii w 2002 r. zanotowano 403 przypadki zachorowań po spożyciu małży importowanych z Danii (blue mussels, omułków). Stwierdzono objawy charakterystyczne dla zatrucia toksynami DSP. Analiza mikrobiologiczna kału wykluczyła pokarmowe zatrucie bakteryjne i wirusowe. Test na myszach (MBA) wskazał na obecność toksyn wytwarzanych przez glony jednokomórkowe, a przeprowadzona analiza metodą LC-MS potwierdziła obecność toksyn DSP (31).

Biotoksyny morskie można wykrywać wieloma technikami i metodami analitycznymi. Jedną z nich jest test biologiczny na myszach (Mouse Bioassay, MBA) mający zastosowanie dla wszystkich toksyn. Po wyekstrahowaniu roztwór zawierający ewentualnie toksynę jest podawany myszom dootrzewnowo. Identyfikacji toksyn dokonuje się po wystąpieniu charakterystycznych objawów oraz czasu od podania do ewentualnej śmierci zwierzęcia, testy biologiczne są jednakże zastępowane testami alternatywnymi bez użycia zwierząt doświadczalnych. Obecnie metodą referencyjną dla biotoksyn morskich grupy DSP jest test na myszach (29). Szczegółowa metodyka oznaczania toksyn lipofilnych została opracowana przez Unijne Laboratorium Referencyjne Biotoksyn Morskich i jest również dostępna w internecie na stronie <http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/home.shtml> (4, 7, 29). Rozporządzenie unijne dopuszcza użycie wielu metod alternatywnych, takich jak: wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię cieczową (LC), chromatografię cieczową w połączeniu z LC (MS-LC), spektroskopię masową (SM), techniki Elisa czy też testy fosfatazowe (PPIA) (29, 30). Stosowana metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem fluorescencyjnym jest metodą referencyjną (29, 33). Rozwój metod chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas jest bardzo szybki i coraz więcej toksyn morskich można wykrywać pod warunkiem posiadania substancji wzorcowej. Opracowana metoda LC-MS dla kwasu okadaikowego (OA) wykrywa 40 µg OA/kg mięsa małży (22, 34). Toksyny DSP, które są aktualnie oznaczane tą metodą, to kwas azaspirowy (AZA-1), OA-b,c, YTX, PX1, 2, DTX, PTX (6, 20). Badania międzylaboratoryjne techniką LC-MS wskazują, że ta metoda może być metodą referencyjną, która powinna zastąpić MBA przy oznaczaniu toksyn ASP i DSP (12, 15, 20, 28, 37).

Testy Elisa są testami o dużej dokładności i selektywności. Są one dostępne tylko dla tych toksyn, dla których można wyprodukować przeciwciała (8, 33).

Dla kwasu okadaikowego w Belgii jest produkowany test Enzyme Immunoassay for the quantitative analysis of okadaic – LoHormonology, w USA Okadaic Acid (DSP) ELISA, Microtiter Plate-Abraxis. Jako metoda alternatywna testy te stają się coraz bardziej popularne i dostępne. Są wykorzystywane do szybkiego monitoringu skażenia toksynami DSP. W przypadku wyniku dodatniego próbka powinna być potwierdzona metodą referencyjną. Jako metody alternatywne stosuje się również szybkie testy fosfatazowe (np. PP2A, Biosense) lub testy cytotoksyczne. W testach fosfatazowych do oznaczania toksyn DSP zahamowanie fosfatazy (PP2A) jest specyficzne dla grupy OA i DTX's i nie powoduje interferencji z innymi toksynami. Możliwe są dwie opcje testu z zastosowaniem odczytu kolorymetrycznego lub fluorymetrycznego. Stężenie toksyn odczytywane jest z krzywej standardowej. Wymagana jest uprzednia hydroliza próbek celem równoczesnego wykrycia form estrowych. Dostępny test Toxiline Test® zawiera kwas okadaikowy jako standard wewnętrzny. W badaniach międzylaboratoryjnych test uzyskał z-score, parametr określający poprawność i wiarygodność wyniku, w zakresie wyników zadowalających. Wykrywa on toksyny DSP w zakresie od 62,5 do 377 µg OA/kg mięsa małży. W Japonii dostępny jest również „DSP Rapid Kit” do oznaczania analogów kwasu okadaikowego, pozwalający wykryć 0,1 µg OA/g gruczołu trawiennej (6, 25, 36).

W metodach instrumentalnych ważne jest posiadanie czystego związku (biotoksyny) jako materiału odniesienia. W przypadku toksyn wywołujących biegunkę (DSP) sytuacja jest o tyle korzystna, że kilka firm oferuje standardy w formie roztworów alkoholowych, liofilizatów oraz jako homogenizat z omułka wielkiego. Standardy i informacje o nich są dostępne w internecie na stronach: http://www.imb.nrc.ca/crmp/index_e.php; <http://www.merckbiosciences.co.uk/home.asp>; <http://sigmaaldrich.com>; <http://www.axxora.com>; <http://www.wako-chemicals.de>; <http://www.lclabs.com>; <http://www.roche-applied-science.com/index.jsp> czy też <http://www.bluebiotech.de>.

Piśmiennictwo

1. Allingham J. S., Miles C. O., Rayment I.: A structural basis for regulation of actins polymerization by pectenotoxins. *J. Mol. Biol.* 2007, 371, 959-970.
2. Amzil Z., Manoella S., Royer F., Masson N., Abadie E.: Report on the First Detection of Pectenotoxin-2, Spirolide-A and Their Derivatives in French Shellfish. *Mar. Drugs* 2007, 5, 168-179.
3. Anderson D. M.: Red tides. *Sci. American* 1994, 271, 62-68.
4. Anon.: CRLMB, Vigo: EU-Harmonised-SOP-MBA-Lipophilic-Version5-June, Crlmb Protocol, 2009, Crlmb.
5. Anon.: EFSA: Influence of processing on the levels of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks Statement of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2009-00203) Adopted on 25 March 2009. *EFSA Journal* 2009, 1016, 1-10.
6. Anon.: EFSA: Marine biotoxins in shellfish – Okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065A). *EFSA Journal* 2008, 859, 14-41.
7. Anon.: EFSA: Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065C). *EFSA Journal* 2009, 1109, 34-47.
8. Briggs L. R., Miles C. O., Fitzgerald J. M., Ross K. M., Garthwaite I., Towers N. R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of yessotoxin and its analogues. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5836-5842.

9. Cembella A. D., Lamoreux G.: Rev. Int. Oceanogr. Med. 1991, [w:] Egmond H. P. Van: Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. J. Nat. Toxins 1993, 2, 41-83.
10. Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Poletti R.: First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. Toxicon. 1996, 34, 923-935.
11. Durborow R. M.: Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. Occup. Med: State of the Art Reviews. 1999, 14, 373-406.
12. Fux E., Mcmillan D., Bire R., Hess P.: Development of an fan ultra-performance liquid chromatography-mass spektrometry metod for the detection of lipophilic marine toxins. J. Chromatogr. A 2007, 1157, 273-280.
13. Garthwaite I., Ross K. M., Miles C. O., Briggs L. R., Towers N. R., Borrell T., Busby P.: Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand. J. AOAC Int. 2001, 84, 1643-1648.
14. Hallegraef G. M., Anderson D. M., Cembella A. D.: Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33., UNESCO, Rzym 1995.
15. Holland P., McNabb P.: Inter-laboratory Study of an LC-MS Method for ASP&DSP Toxins in Shellfish. Cawthron Report No.790, 2003, Nelson, New Zealand, Cawthron Institute.
16. James K. J., Furey A., Satake M., Yasumoto T.: Azaspiracid Poisoning (AZP): A new shellfish toxic syndrome in Europe. Abstract for the 9th Int. Conf. Algal Blooms, Tasmania, Australia 2000.
17. Jorgensen K., Coldb U., Fischerb K.: Accumulation and depuration of okadaic acid esters in the European green crab (*Carcinus maenas*) during a feeding study. Toxicon 2008, 51, 468-472.
18. Jorgensen K., Scanlon S., Jansen L. B.: Diarrhetic shellfish poisoning toxin esters In Danish blue mussels and surf Clams. Food Add. Contam 2005, 22, 743-751.
19. Lindahl O.: Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment. Proc. IXth Internat. IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Fort Collins, Colorado 1998, s. 409-423.
20. Masselin P., Lassus P., Bardouil M.: High performance liquid chromatography analysis of diarrhoeic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. J. Appl. Phycol. 1992, 4, 385-389.
21. McCarron P., Emteborg H., Hess P.: Freeze-drying for the stabilisation of shellfish toxins in mussel tissue (*Mytilus edulis*) reference materials. Anal. Bioanal. Chem. 2007, 387, 2475-2486.
22. McNabb P., Selwood A. I., Holland P. T., Aasen J., Aune T., Eaglesham G., Hess P., Igarishi M., Quilliam M., Slattery D., Van de Riet J., Van Egmond H., Van den Top H., Yasumoto T.: A Multiresidue LC-MS method for algal toxins in shellfish: validation and inter-laboratory studies. J. AOAC Int. 2005, 88, 761-772.
23. Michalski M.: Paralityczne toksyny morskie jako zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Medycyna Wet. 2007, 63, 1530-1533.
24. Michalski M. M.: Biotoksyny morskie – występowanie i metody analizy. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2006, 13, 16-22.
25. Mounfort D. O.: Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. Toxicon 2001, 39, 383-390.
26. Murata M., Masanori K., Lee J. S., Yasumoto T.: Isolation and structure of Yesso toxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. Tetrahedron Lett. 1987, 28, 5869-5872.
27. Osek J., Wieczorek K., Tatarczak M.: Morskie biotoksyny. Potencjalne zagrożenie zdrowia człowieka. Medycyna Wet. 2006, 62, 370-373.
28. Quilliam M. A., Hess P., Dell'Aversano C.: Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry, [w:] De Koe W. J., Sampson R. A., Van Egmond H. P., Gilbert J., Sabino M., DeKoe W. J.: Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium. Wageningen. IUPAC. The Netherlands 2001, 383-391.
29. Rozporządzenie Komisji WE nr 2074/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. ustanawiające środki wykonawcze w odniesieniu do niektórych produktów objętych rozporządzeniem (WE) nr 853/2004 i do organizacji urzędowych kontroli na mocy rozporządzeń (WE) nr 854/2004 oraz (WE) nr 882/2004, ustanawiające odstępstwa od rozporządzenia (WE) nr 852/2004 i zmieniające rozporządzenia (WE) nr 853/2004 oraz (WE) nr 854/2004. Dz. U. L 338 z 22.12.2005, s. 27.
30. Rozporządzenie WE nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. Dz. U. L 139 z 30.04. 2004, s. 55.
31. Schrijver K. D., Maes I., De Man J.: An outbreak of diarrhoeic shellfish poisoning in Antwerp, Belgium. Euro Surveill 2002, 7, 138-141.
32. Sechet V., Safran P., Hougaard P., Yasumoto T.: Causative species of diarrhoeic shellfish poisoning. Marine Biology 1990, 105, 269-274.
33. Sullivan J. J.: Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: a review. J. Shellfish Res. 1988, 7, 587-595.
34. Suzuki T., Jin T., Shiota Y., Mitsuya T., Okomura Y., Kamiyama T.: Quantification lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. Fish Sci. 2005, 71, 1370-1378.
35. Vale P., Sampayo M. A. de M.: First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. Toxicon 2002, 40, 989-996.
36. Vêytes M. R., Fontal O. I., Leira F., Baptista de Sousa J. M. V., Botana L. M.: A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. Analyt. Biochem. 1997, 248, 258-264.
37. Villar-Gonzales A., Rodrigues-Velasco M. L., Ben-Gigirey B., Yasumoto T., Botana L. M.: Assesment of the hydrolisis process for the determination of okadaic acid-group toxin ester: Presence of okadaic acid 7-O-acyl-ester derivatives in Spanish shellfish. Toxicon 2008, 51, 765-773.
38. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G. K., Clardy J.: Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symposium Series No. 262, [w:] Ragelis E. P.: Seafood Toxins. ACS 1984, 207-214.

Adres autora: dr Mirosław Michalski, ul. Kościuszki 19/3, 24-100 Puławy;
e-mail: mmichal@piwet.pulawy.pl