

Amnestyczne biotoksyny 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.

Amnesic marine toxins as a risk for consumer health

Summary

Polish consumers show increasing interest in “frutti di mare”, including molluscs, which are another potential source of food poisoning. Biotoxins enter the organism of a mollusc through its digestive tract together with plankton, which is its main food, and accumulate in the muscles and hepatopancreas. The main marine biotoxins are diuretic toxins causing diarrhoea, toxins affecting the nervous system, amnesic toxins, and paralytic toxins. Amnesic toxins, causing Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), are produced by marine algae such as diatoms and red algae: *Chondria* spp. Symptoms of ASP in humans occur 24 hours after the consumption of contaminated shellfish in mild poisoning, and from ½ to 6 hours in acute poisoning. The symptoms of poisoning include nausea, vomiting, abdominal cramps, dizziness, headache, confusion, breathing difficulties, and coma. A characteristic symptom of ASP is a usual short-term memory loss. In most cases, neurological symptoms disappear after 48 hours. Some of the symptoms, such as memory problems, may persist even up to 100 days. Mortality is at 4%. The total quantity of amnesic toxins in the whole mussel or any of its edible parts must not exceed 20 mg/kg of mussel meat. Amnesic toxins are detected by chromatographic techniques (HPLC) combined with mass spectrometry and by alternative methods, such as ELISA, phosphatase tests, capillary electrophoresis, and immunochromatography.

Keywords: Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), domoic acid, detection of ASP, molluscs

Po wejściu do Unii Europejskiej rozszerzyła się znacznie w naszym kraju oferta żywnościowa. Pojawiły się nowe rodzaje żywności, dotychczas dostępne sporadycznie. Są to m.in. produkty pochodzenia morskiego, głównie skorupiaki i mięczaki. Polacy w porównaniu z konsumentami zachodnich krajów Unii nie są ich smakoszami. Bardziej akceptowane są skorupiaki, głównie krewetki, langusty, homary i kraby, zwłaszcza wśród klienteli wybranych restauracji. Mniejszym zainteresowaniem cieszą się natomiast mięczaki, wśród których najbardziej znane są kalmary i różnego rodzaju małże, oferowane również jako żywe. Wśród importowanych mrozonek popularnością cieszą się mieszanki „frutti di mare” (pakowane i luzem, na wagę) oraz mrożone krewetki, które ostatnio coraz częściej oferowane są jako krewetki świeże lub mrożone. Większość mięczaków dostarczanych na nasz rynek pochodzi z krajów UE. Świeże mięczaki sprowadzane są głównie z Niemiec, Norwegii, Francji, Hiszpanii, Belgii i Holandii. Przedmiotem importu są ostrygi (*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* i *angulata*), omułki (*Mytilus edulis*), wongole (*Tapes semi-*

decussatus), przegrzebki (*Pecten maximus*), sercówki (*Cerastoderma edule*), klamy (*Mercenaria mercenaria*), małże venus (*Myretrix lyrata*) czy też palurdy (*Ruditapes philippinarium*) (39, 40). W ramach handlu wspólnotowego sprowadzane są mrożone krewetki o wartości blisko 9,5 mln euro. Polska importuje skorupiaki także bezpośrednio spoza państw Europy, głównie z Bangladeszu, Indii, Wietnamu, Chin, Tajlandii, Indonezji, Kanady, Singapuru i Nigerii. Wielkość dostaw przetworzonych i nieprzetworzonych owoców morza w 2009 r. wyniosła ponad 8 tys. ton (Kulikowski T.: <http://www.portalspozywczy.pl/inne/ryby/artykuly/rynek-mrozonych-owocow-morza-w-polsce,26754.html>, 2010).

Małże blaszkoskrzelne żywią się wyłącznie fitoplanktonem, który może wytworzyć w sprzyjających warunkach środowiskowych związki toksyczne dla ludzi. Szczególnie dużo rozmaitych toksyn jest wytwarzanych przez plankton w czasie tzw. kwitnienia wód, czyli nadmiernego i niekontrolowanego jego wzrostu. Kwitnienie wód nosi również nazwę czerwonego przyływu (red tides), chociaż nie zawsze

wody barwią 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. Nadmierny wzrost planktonu jest powodowany przez zwiększoną dostępność substancji organicznej (w tym mikroelementów), O₂/CO₂, obecność światła, odpowiednią temperaturę wody czy też zmianę zasolenia wody. Przyczyną zmian środowiska wodnego, w którym żyje plankton, jest zanieczyszczenie substancjami mineralnymi i organicznymi przez ścieki przemysłowe, zmiany klimatyczne lub ruchy tektoniczne w obszarze dna morskiego (1, 39, 40). Toksyny przedostają się do organizmu mięczaków przez przewód pokarmowy wraz z planktonem, który jest ich głównym pożywieniem, a następnie kumulowane są w mięśniach i wątrobotrzustce. Źródłem biotoksyn morskich mogą być również skorupiaki, takie jak: raki, homary czy krewetki oraz szkarłupnie, osłonice i ślimaki morskie (26). Spożywanie tego rodzaju żywności nie jest pozbawione pewnego ryzyka związanego z obecnością biotoksyn morskich powodujących specyficzne zatrucia pokarmowe. Termin „morskie biotoksyny” oznacza substancje trujące odkładające się w żywych małżach, zwłaszcza wskutek spożywania przez nie planktonu zawierającego toksyny (47). Biotoksyny są bez smaku i bez zapachu, a więc nie powodują zmian sensorycznych w produkcie przygotowanym do zjedzenia. Konsument nie ma zatem możliwości odrzucenia spożywanych małży na podstawie ich cech organoleptycznych. Powinien więc istnieć szczelny system kontroli dopuszczający małże do obrotu. Istniejący w krajach producenckich nadzór nad hodowlą i dystrybucją owoców morza jest systemem wielostopniowym i zaczyna się od monitorowania na różnych głębokościach substancji odżywczych znajdujących się w wodzie poprzez określenie obecności glonów i ich gatunków, określenie ryzyka obecności biotoksyn w planktonie oraz wystąpienia skażenia małży, a kończy się w zakładach oczyszczania skażonych małży. System pozwala dokonać klasyfikacji obszarów produkcyjnych i nie dopuścić do sprzedaży małży z biotoksynami (40, 46, 47).

Główne biotoksyny występujące u mięczaków na terenie Europy to toksyny powodujące paraliż mięśni (PSP – paralytic shellfish poisons), toksyny uszkadzające lub upośledzające funkcjonowanie układu nerwowego – neurotoksyny (NSP – neurotoxic shellfish poisoning), toksyny amnestyczne (ASP – amnesic shellfish poisoning), toksyny wywołujące biegunki (DSP – diarrhoeic shellfish poisons) oraz kwas azaspirowy (AZA) (24, 33, 40, 42, 52).

W niniejszej publikacji omówiono grupę amnestycznych biotoksyn morskich, a mianowicie toksyny działające na układ nerwowy i powodujące zaburzenia pamięci (Amnesic Shellfish Poisoning – ASP). Dla biotoksyn amnestycznych określono ich maksymalną dopuszczalną zawartość w mięsie małż (mierzoną dla całej małży lub oddzielnie dla części jadalnej), wyno-

sząca 20 miligramów kwasu domoikowego na kilogram (45-47).

Różnorodność planktonu powoduje, że poszczególne gatunki jednokomórkowców wytwarzają zróżnicowane toksyny. Toksyny amnestyczne (ASP) wytwarzane są przez czerwone algi morskie: *Chondria armata*, *Chondria baileyana*, *Digenea simplex*, *Amansia glomerata*, *Alsidium corallinum*, *Vidalia obtusiloba* oraz okrzemki *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia navis-varingica*, *Pseudo-nitzschia muliteries*, *P. pseudodelicatissima*, *P. australis*, *Nitzschia navis-varingica*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. galaxiae*, *P. pseudodelicatissima*, *P. turgidula*, *P. seriata*. Okrzemek *Pseudo-nitzschia* jest jednak głównym jednokomórkowcem wytwarzającym kwas domoikowy (DA) i jego pochodne (4, 22, 24, 34). Do grupy toksyn ASP zalicza się kwas domoikowy, który po raz pierwszy wyizolowany został w 1958 r. w Japonii z czerwonych makroalg *Chondria armata* oraz epidomoikowy (51). Głównym związkem toksycznym w grupie biotoksyn amnestycznych jest kwas domoikowy, izodomoikowy i ich analogi – kwasy izodomoikowe A÷H (13, 55). Kwas domoikowy jest neurotoksycznym trikarboksylowym kwasem aminowym, o strukturze zbliżonej do kwasu glutaminowego i kainowego. Jest polarnym związkiem rozpuszczalnym w wodzie, niebiałkowym kwasem pobudzającym (transmitterem), opornym na działanie podwyższonej temperatury. W roztworach soli fizjologicznej nie ulega degradacji pod wpływem światła (24, 25).

Toksyny amnestyczne stwierdzano w większości gatunków małży, a mianowicie w: przegrzebkach, ostrygach, omułkach, małgiewi piasokołazie, okładniczkach oraz sercówkach. Wykryto również ich obecność w krabach czy też w sardynkach (9, 52, 53). Biotoksyny ASP wykryto w małżach po raz pierwszy w Irlandii, w grudniu 1999 r., gdzie 55% zbadanych przegrzebków zawierało kwas domoikowy w ilości przewyższającej dopuszczalny limit. Maksymalna ilość DA w tym przypadku wyniosła 2820 µm/g. Kwas domoikowy znajdowano również często małżach występujących w Kanadzie, Australii, Japonii i Nowej Zelandii. Był on także przyczyną masowej śmierci ptaków morskich, ryb i ssaków morskich (lwy morskie i walenie) (33, 48, 49, 54).

Toksyny amnestyczne są rozpuszczalne w wodzie, a w związku z tym są usuwane z organizmu małży poprzez wymywanie ich czystą wodą. Proces taki (puryfikacja małży) jest stosowany w specjalnych zakładach oczyszczania tych mięczaków, które są pozyskiwane z obszarów produkcyjnych kategorii (klasy) B. Biotoksyny bardzo łatwo wymywane są z omułek (*Mytilus edulis*) i piasokołazów (*Mya arenaria*), znacznie trudniej z czerwonych małży (*Volsella modiolus*) i z przegrzebka atlantyckiego (*Placopecten magellanicus*), u którego toksyna gromadzi się głównie w wątrobotrzustce (23, 50).

Objawy zatrucia u ludzi występują po 24 godzinach od spożycia małży przy łagodnym i od 0,5 do 6 godzin

przy ostrym zatruciu. Cechują się nudnościami, wymiotami oraz skurczami brzuszными. Charakterystyczna jest z reguły krótkotrwała utrata pamięci, utrzymująca się do kilku dni. W większości przypadków neurologiczne symptomy ustępują zwykle po 48 godzinach po spożyciu małży. Niektóre objawy, jak np. kłopoty z pamięcią, mogą się jednakże utrzymywać nawet do 100 dni. Inne symptomy to zawroty i bóle głowy, dezorientacja, trudności w oddychaniu i śpiączka. Śmiertelność wynosi 4%. Objawy występujące po spożyciu małży są podobne do choroby Alzheimera. Przy lekkiej formie zatrucia i u konsumentów nie mających problemów z nerkami następuje całkowite wyzdrowienie już po kilku dniach. Przy zatruciu znacznego stopnia, gdy organizm nie jest w stanie szybko usunąć kwasu domoikowego, może wystąpić dodatkowo poważne, trwałe uszkodzenie mózgu (15, 20, 24).

Pierwszy udokumentowany przypadek zatrucia kwasem domoikowym miał miejsce w 1987 r. w Kanadzie, w rejonie Kardigan River, po spożyciu omułek. Trzy osoby zmarły, a u ponad stu innych stwierdzono poważne zmiany neurologiczne i istotne zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Stężenie DA w mięsie małży w tym przypadku wyniosło powyżej 20 mg/kg. Omułki zawierały do 790 µg DA/g. W USA w latach 1991-1993 udokumentowano pierwsze zatrucia kwasem domoikowym po spożyciu małży zbieranych na plażach Washington State Beach. Wśród zarejestrowanych dotychczas około 150 przypadków zatruc ASP w 107 wystąpiły objawy kliniczne. W 76% zachorowań stwierdzono wymioty, w 50% skurcze i bóle brzucha, a biegunkę w 42% przypadków. Wśród objawów neurologicznych stwierdzono silne bóle głowy oraz tymczasową utratę krótkotrwałej pamięci. Napady śpiączki, obfitą wydzielinę z dróg oddechowych i kłopoty z ciśnieniem odczuwało 43% chorych i wymagały one leczenia szpitalnego. Trzech pacjentów w wieku powyżej 55 roku życia zmarło po 11-24 dniach po spożyciu małży (5, 7).

Biotoksyny morskie można wykrywać wieloma technikami i metodami analitycznymi. Metoda referencyjna dla oznaczania kwasu domoikowego jest określona w rozporządzeniu (WE) nr 2074/2005 (45, 46). Dokument ten ustanawia metody analityczne wykrywania toksyny powodującej amnezję w jadalnych częściach mięczaków. Metodą referencyjną jest z urzędu metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem UV lub fluorescencyjnym. Metody HPLC powinny spełniać następujące wymagania: granica wykrywalności (LOD) na poziomie 0,2-1 mg DA/kg i granica oznaczalności (LOQ) wynosząca 1-2,5 mg DA/kg, adekwatnie dla kwasu domoikowego o epidomoikowego. Warunki te spełniają uznane metody HPLC: AOAC metoda 991.26 i CEN 14176 (2, 47). Metoda 2006.02 ASP ELISA, wymieniona w rozporządzeniu WE 2074/2005, a opublikowana w Dzienniku AOAC w czerwcu 2006 r., powinna być

uważana za alternatywną metodę badania przesiewowego w stosunku do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) dla celów wykrywania ASP w żywych małżach. Zaletą metody ELISA jest możliwość przebadania dużej liczby próbek przy niskim nakładzie środków finansowych (45-47).

Szybki rozwój metod chromatograficznych (cieczowej i gazowej), w różnej konfiguracji detekcji, pozwala wykrywać i identyfikować coraz więcej biotoksyn morskich pod warunkiem posiadania substancji wzorcowej. Najbardziej popularną metodą jest metoda Quilliana, HPLC z detektorem UV, odczyt przy długości fali 242 nm, z późniejszymi modyfikacjami uwzględniającymi użycie innych detektorów (2, 11, 16, 43). Istnieje szereg modyfikacji metod chromatograficznych w połączeniu ze spektrometrią mas pozwalających oznaczyć kwas domoikowy (10, 12, 21, 38). HPLC w połączeniu z metodami radioimmunologicznymi znalazła również zastosowanie w oznaczaniu DA w rozmaitych próbkach biologicznych (32, 53).

Tradycyjny test biologiczny na myszach (Mouse Bioassay – MBA) może mieć także zastosowanie do wykrywania toksyny ASP, jednakże metoda ta jest zastępowana metodami instrumentalnymi. Coraz popularniejsze stają się tzw. metody alternatywne, w tym gotowe testy do oznaczania poszczególnych toksyn. Testy te są już dostępne i stosunkowo tanie w porównaniu z metodami referencyjnymi. Są wykorzystywane do szybkiego monitoringu skażenia toksynami ASP (6, 18, 28). Testy Elisa są testami o dużej dokładności i selektywności. Są one dostępne tylko dla tych toksyn, dla których można wyprodukować przeciwciała (3, 19, 27, 29, 30).

Uznanym testem jest Biosense ASP Direct cELISA test (Biosense Laboratories, Szwecja), który jest oficjalną metodą alternatywną dla DA, AOAC® Official MethodSM 2006.02 (30, 45). Porównując Test Biosense z metodami referencyjnymi i HPLC stwierdzono przydatność testu ELISA jako metody screeningowej w monitoringu biotoksynowym (18). Dostępny jest również komercyjny test ELISA firmy Laboratory of Hormonology (Belgia) – Enzyme Immunoassay for the Quantative Analysis of Domoic Acid. Zastosowane w teście przeciwciała nie wykazują reakcji krzyżowych z innymi biotoksynami morskimi, takimi jak: DSP (kwas okadaikowy), DTX-1, DTX-2, saksytoksyna (PSP), neosaksytoksyna i gonyatoksyny (GTX 2/3, 1/4). W przypadku otrzymania wyniku dodatniego lub wątpliwego testami ELISA, próbki powinny być potwierdzone metodą referencyjną, HPLC (45-47).

Komercyjny immunochromatograficzny test Jellett^R-Test ASP (poprzednio MIST AlertTM), w którym porównywana jest obecność i zabarwienie paska po aplikacji kropli ekstraktu na plastikowy pasek z okienkiem, oparty jest na przeciwciałach. Test wykrywa poniżej 20 mg DA/kg mięsa małży, a więc poniżej dopuszczalnego limitu i ma zastosowanie do badań przesiewowych/monitoringowych w Kanadzie i USA. Ana-

logiczny test jest produkowany dla toksyn PSP. Konieczne są porównania testu Jelett ASP z metodami referencyjnymi, a więc LC-UV, HPLC lub LC-MS (35, 44).

Opracowano również metody kolorymetryczne, które jednak nie znalazły zastosowania z powodu skomplikowanej procedury analitycznej oraz niskiej detekcji (14). Techniki elektroforetyczne pozwalają wykryć i określić rodzaj toksyny amnestycznej stosunkowo tanio, jednakże przygotowanie próbki i jej oczyszczenie w stopniu umożliwiającym uniknięcie interferencji substancji balastowych przy rozdziale ograniczają ich zastosowanie. Technika ta jako metoda alternatywna może znaleźć szersze zastosowanie w laboratoriach monitorujących obecność ASP w środowisku, glonach i małżach (17, 31, 41). Przyszłościową metodą wykrywania i oznaczania biotoksyn morskich, w tym amnestycznych, wydaje się zastosowanie biosensorów (33).

W badaniach międzylaboratoryjnych lub porównawczych (PT) brak jest certyfikowanych materiałów odniesienia ze względu na niestabilność analitu oraz brak odpowiedniej ilości naturalnego materiału biologicznego (skażone mięso małży), jednakże wstępne badania wskazują na otrzymanie certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM) w formie liofilizatów lub utrwalań za pomocą promieniowania gamma (37, 38). Jak dotychczas badania międzylaboratoryjne prowadzone są przez Unijne Laboratorium Referencyjne w zakresie Biotoksyn Morskich (EURLMB) w Vigo, Hiszpania, na materiale naturalnie skażonym przez toksynę ASP, otrzymanym od Krajowych Laboratoriów Referencyjnych, jako pozostałości po badaniach.

W metodach instrumentalnych ważne jest posiadanie czystego związku (biotoksyny) jako materiału odniesienia. W przypadku toksyn amnestycznych (ASP) dostępny jest w NRC-CNRS, Kanada, kwas domoikowy w formie roztworu acetonil/woda (<http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/programs/imb/cmp.html>). Kwas domoikowy w formie stałej oferuje z kolei Sigma (<http://sigmaaldrich.com>) i BioVectra Inc. (<http://biovectra.com>). W firmie Calbiochem-Novabiochem Corp. dostępne jest sproszkowane mięso omułka (*Mytilus edulis*) zawierającego DA (<http://www.merckbio-science.co.uk/home.asp>). Dostępny jest również materiał referencyjny w formie sterylizowanego homogenatu mięsa małży w NRC-CNRS, Kanada (http://www.imb.nrc.ca/crmp.index_e.php). Są to materiały nie certyfikowane. Jedynie NRCC oferuje certyfikowany materiał odniesienia (CRM) do kalibracji HPLC, w postaci tkanki małży lub roztworu o znanej zawartości DA i epiDA (3).

O ważności tematyki pozostałości biotoksyn świadczą prowadzone lub zakończone projekty w ramach Unijnych Programów Ramowych V-VII, takie jak np. ASPOX (ASP toxicology), Biotop, DetecTox czy też STREP BIOTOX EU FP6. Problem biotoksyn w żywności pochodzenia morskiego jest szczególnie ważny

dla krajów, gdzie produkcja małży i skorupiaków jest ważną gałęzią przemysłu i przynosi istotne wpływy do budżetu również z racji ich eksportu lub handlu z innymi krajami.

Piśmiennictwo

1. Anderson D. M.: Red tides. Sci. American 1994, 271, 62-68.
2. Anon.: EFSA. Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2006-065H) Adopted on 2 July 2009 The EFSA Journal 2009, 1181, 1-61.
3. Anon.: EFSA. Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine bio toxins. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA Journal 2009, 1306, 1-23.
4. Bates S. S.: Domoic acid-producing diatoms: another genus added. J. Phycol. 2000, 36, 978-983.
5. Bates S. S., Bird C. J., de Freitas A. S. W., Foxall R., Gilgan M., Hanic L. A., Johnson G. R., McCulloch A. W., Odense P., Pocklington R.: Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1989, 46, 1203-1215.
6. Beani L. C., Bianchi F., Guerrini L., Pistocchi R., Tomasini M. C., Ceredi A., Milandri A., Poletti R., Boni L.: High sensitivity bioassay of paralytic (PSP) and amnesic (ASP) algal toxins based on the fluorimetric detection of Ca²⁺ in rat cortical primary cultures. Toxicon 2000, 38, 1283-1297.
7. Berre Le M., Kane M.: Biosensor-based assay for domoic acid: comparison of performance using polyclonal, monoclonal, and recombinant antibodies. Analyt. Lett. 2006, 39, 1587-1598. (Special Issue: Second International Workshop on „Biosensors for Food Safety and Environment Monitoring”, Agadir, Morocco, 2005).
8. Bird C. J., Wright J. L. C.: The shellfish toxin domoic acid. World Aquaculture 1989, 20, 40-41.
9. Bogan Y. M., Harkin A. L., Gillespie J., Kennedy D. J., Hess P., Slater J. W.: The influence of size on domoic acid concentration in king scallop, *Pecten maximus* (L.) Harmful Algae 2007, 6, 15-28.
10. Boyd R., Hogge L., Jamieson W., McLaren J., Quilliam M., Sim P., Thibault P., Wright J.: The role of mass spectrometry combined with reversed phase HPLC in the identification of an unusual shellfish toxin. Proc. Am. Soc. Mass. Spectr. 1988, 36, 165-168.
11. Cervantes C. R. C., Alfonso P. M., Duran B. R., Vidal L., Leao M., Gago M.: Application of precolumn oxidation HPLC method with fluorescence detection to evaluate saxitoxin levels in discrete brain regions of rats. Toxicon 2007, 49, 89-99.
12. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G. S., Tartaglione L., Quilliam M. A., Tubaro A., Poletti R.: Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 19, 2030-2038.
13. Clayden J., Read B., Hebditch K. R.: Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. Tetrahedron 2005, 61, 5713-5724.
14. Dallinga-Hannemann L., Liebezeit G., Zeeck E.: New approaches for fast and sensitive detection of non-protein amino acids (kainic acid and domoic acid) by using modified protein and amine colour tests. [w:] Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C.: Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Sci. Publ., Paris 1995, 279-284.
15. Durborow R. M.: Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. Occup. Med. State Art Reviews. 1999, 14, 373-406.
16. Duxbury M.: Liquid chromatographic determination of Amnesic Shellfish Poison in mussels. J. Chem. Education 2000, 77, 1319-1324.
17. Gago-Martínez A., Leão J. M., Piñeiro N., Carballed E., Vaquero E., Nogueiras M., Rodríguez-Vázquez J. A.: An application of capillary electrophoresis for the analysis of algal toxins from the aquatic environment. Internat. J. Env. Anal. Chem. 2003, 83, 443-456.
18. Garet E., Gonza A., Fernandes L., Lago L., Vientes J. M., Cabado A. G.: Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Reference Methods for the Detection of Shellfish Hydrophilic Toxins in Several Presentations of Seafood. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 1410-1415.
19. Garthwaite L., 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.
20. Kimberly K., Grant S., Burbacher T. M., Faustman E. M., Grattan L.: Domoic acid: Neurobehavioral consequences of exposure to a prevalent marine biotoxins. Neurotoxicol. Teratol. 2010, 32, 132-141.

21. *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.
22. *Holland P. T., Selwood A. I., Mountfort D. O., Wilkins A. L., McNabb P., Rhodes L. L., Doucette G. J., Mikulski C. M., King K. L.*: Isodomoic acid C, an unusual amnesic shellfish poisoning toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chem. Res. Toxicol.* 2005, 18, 814-816.
23. *Horner R. A., Kusske M. B., Moynihan B. P., Skinner R. N., Wekell J. C.*: Retention of domoic acid by pacific razor clams, *siliqua patula*: preliminary study. *Journal of Shellfish Res.* 1993, 12, 451-456.
24. *Jeffery B., Barlow T., Moizer K., Paul S., Boyle C.*: Review Amnesic shellfish Poison. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 545-557.
25. *Johannessen J. N.*: Stability of domoic acid in saline dosing solutions. *Journal of AOAC Internat.* 2000, 83, 411-412.
26. *Jorgensen K., Coldb U., Fischerb K.*: Accumulation and depuration of okadaic acid esters in the European green crab (*Carcinus maenas*) during a feeding study. *Toxicol.* 2008, 51, 468-472.
27. *Kania M., Hock B.*: Development of monoclonal antibodies to domoic acid for the detection of domoic acid in blue mussel (*Mytilus edulis*) tissue by ELISA. *Analytical Let.* 2002, 35, 855-868.
28. *Kania M., Kreuzer M., Moore E., Pravda M., Hock B., Guilbault G.*: Development of polyclonal antibodies against domoic acid for their use in electrochemical biosensors. *Analytical Let.* 2003, 36, 1851-1863.
29. *Kawatsu K., Hamato Y., Noguchi T.*: Determination of Domoic Acid in Japanese Mussels by Enzyme Immunoassay. *AOAC Internat.* 2000, 83, 1384-1386.
30. *Kleivdal H., Kristiansen S. I., Nilsen M. V., Goksyr A., Briggs L., Holland P., McNabb P.*: Determination of domoic acid toxins in shellfish by biosense ASP ELISA – a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 1011-1027.
31. *Kvasnicka F., Sevcik R., Voldrich M.*: Determination of domoic acid by on-line coupled capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 255-258.
32. *Lawrence J. F., Cleroux C., Truelove J. F.*: Comparison of high-performance liquid chromatography with radioimmunoassay for the determination of domoic acid in biological samples. *J. Chromatogr. A* 1994, 662, 173-177.
33. *Lefebvre K. A., Barga S., Kieckhefer T., Silver M. W.*: From sand dabs to blue whales: the pervasiveness of domoic acid. *Toxicol.* 2002, 40, 971-977.
34. *Lefebvre K. A., Robertson A.*: Domoic acid and human exposure risks: A review *Toxicol.* 2010, 56, 218-230.
35. *Mackintosh F. H., Smith E. A.*: Evaluation of MIST Alert™ rapid test kits for the detection of paralytic and amnesic shellfish poisoning toxins in shellfish. *J. Shellfish Res.* 2002, 21, 455-460.
36. *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, 7, 2475-2486.
37. *McCarron P., Kotterman M., de Boer J., Rehmann R., Hess P.*: Feasibility of gamma irradiation as a stabilisation technique in the preparation of tissue reference materials for a range of shellfish toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 7, 2487-2493.
38. *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.
39. *Michalski M.*: Diaretyczne toksyny morskie (DSP) jako zagrożenie dla zdrowia konsumenta. *Medycyna Wet.* 2010, 66, 530-533.
40. *Michalski M. M.*: Biotoksyny morskie – występowanie i metody analizy. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2006, 13, 16-22.
41. *Nguyen A. L., Luong J. H. T., Masson C.*: Capillary electrophoresis for detection and quantitation of domoic acid in mussels. *Analyt. Let.* 1990, 23, 1621-1634.
42. *Osek J., Wieczorek K., Tatarczak M.*: Morskie biotoksyny. Potencjalne zagrożenie zdrowia człowieka. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 370-373.
43. *Quilliam M. A., Xie M., Hardstaff W. R.*: Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Internat.* 1995, 78, 543-554.
44. *Rafuse C., Cembella A., Laycock M., Jellett J.*: Rapid monitoring of toxic phytoplankton and zooplankton with a lateral-flow immunochromatographic assay for ASP and PSP toxins. *Harmful Algae* 2004, 5, 309-311.
45. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1244/2007 z dnia 24 października 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2074/2005 w sprawie środków wykonawczych w odniesieniu do niektórych produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi oraz ustanawiające szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w zakresie badania mięsa.
46. 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, str. 27), z późniejszymi zmianami.
47. Rozporządzenie WE nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególnie przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz. U. L 139 z 30.4.2004, str. 55), z późniejszymi zmianami.
48. *Sierra B. A., Palafox-Urbe M., Grajales-Montiel J., Cruz-Villacorta A., Ochoa J. L.*: Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicol.* 1997, 35, 447-453.
49. *Silvagni P. A., Lowestine L. J., Spraker T., Lipscomb T. P., Gulland F. M. D.*: Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Pathol.* 2005, 42, 184-191.
50. *Smith E. A., Papapanagiotou E. P., Brown N. A., Stobo L. A., Gallacher S., Shanks A. M.*: Effect of storage on amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in king scallops (*Pecten maximus*). *Harmful Algae* 2006, 5, 9-19.
51. *Takemoto T., Daigo K.*: Constituents of *Chondria armata* and their pharmacological effects. *Arch. Pharmacol.* 1960, 293, 627-633.
52. *Vale P., Botelho M. J., Rodrigues S. M., Gomes S. S., Sampayo M. A. M.*: Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986-2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae* 2008, 7, 11-25.
53. *Vale P., Sampayo M. A.*: Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicol.* 2001, 39, 893-904.
54. *Work T. M., Barr B., Beale A. M., Fritz L., Quilliam M. A., Wright J. L. C.*: Epidemiology of domoic acid poisoning in Brown Pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt Cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J. Zoo Wildl. Med.* 1993, 24, 54-62.
55. *Wright J., Quilliam M.*: Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poison, [w:] Hallegraef G., Anderson D., Cembella A., Enevoldson H. (eds.): Manual on Harmful Marine Microalgae. IOCMaterials and Guides No. 33, 1995, 113-133.

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