

Neurotoksyczne biotoksyny morskie jako zagrożenie dla zdrowia konsumenta

MIROŚLAW MICHALSKI, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 18.02.2015

Zaakceptowano 01.09.2015

Michalski M., Osek J.

Neurotoxic shellfish poisoning as a risk for consumer health

Summary

The main groups of biotoxins harmful for human are: DSP, NSP, ASP and PSP. Neurotoxic shellfish poisoning (NSP) is caused by consumption of molluscan shellfish contaminated with brevetoxins (BTXs) primarily produced by dinoflagellate, *Karenia brevis*. In case of intoxication by brevetoxin and their isomers, among the possible effects are paresthesia (tingling), reversal of hot-cold temperature sensation, myalgia (muscle pain), vertigo, ataxia (loss of coordination), abdominal pain, nausea, diarrhea, headache, bradycardia (slow heart rate), and dilated pupils. In total, quantities (measured in the whole body or any edible part separately) cannot exceed the following limit for brevetoxins, i.e. 0.8 mg/kg. Modern techniques such as immunoassay, phosphatase test or chromatography (HPLC, LC-MS) are quite suitable for detection of BTXs.

Keywords: Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP), brevetoxin, shellfish, chromatography

Coraz większą popularnością wśród konsumentów w Polsce, oprócz ryb i produktów rybnych, cieszą się owoce morza, w tym małże blaszkoskrzelne (mięczaki). Większość gatunków zasiedla przybrzeżne płytczynny w wodach morskich we wszystkich strefach geograficznych, stanowiąc główny element fauny dennej. Małże mniej licznie występują w głębinach morskich i w wodach słodkich lub słonawych. Żyją na różnych głębokościach – od wód bardzo płytkich po głębokie, do 250 m. Import świeżych i mrożonych małży do Polski w 2013 r. wyniósł 7,3 tys. ton. Głównymi dostawcami są kraje europejskie, takie jak: Francja, Hiszpania, Dania, Holandia, Norwegia, Irlandia i Włochy (28). Najwięcej z przeznaczonych do spożycia małży należy do rzędów *Veneroidea*, *Mytiloidea*, *Ostreoidea* i *Arcoidea*. Hoduje się i spożywa małże blaszkoskrzelne, takie jak: ostrygi (*Ostrea edulis*), omułki (*Mytilus edulis*), przegrzebki (*Pecten maximus*), sercówki (*Cerastoderma edule*), małże wenus północny (*Mercenaria mercenaria*), małże filipińskie (*Ruditapes philippinarum*), nożeńce atlantyckie (*Ensis directus*), małże (*Myretrix lyrata*) oraz grzebolinki (*Glycymeris glycymeris*) (12).

Plankton wytwarza w pewnych warunkach związki toksyczne kumulujące się w ich komórkach. Jest on podstawowym pożywieniem dla mięczaków blaszkoskrzelnych (dwuskorupkowych) oraz larw sko-

rupiaków. W ten sposób toksyny przedostają się do organizmu mięczaków, które są następnie spożywane przez ludzi, powodując ich zatrucie. Toksyny (morskie biotoksyny) są metabolitami wtórnymi, nieprodukowanymi w sposób ciągły, lecz w określonych warunkach środowiskowych, w czasie tzw. kwitnienia wód (red tides), czyli nadmiernego i niekontrolowanego wzrostu glonów (25, 34). Ilość i rodzaj wytwarzanych toksyn zmienia się w zależności od rodzaju i zagęszczenia jednokomórkowców, dostępności substancji organicznych (w tym mikroelementów), O_2/CO_2 , obecności światła, temperatury wody oraz zmian zasolenia. Główną przyczyną zakwitów jest zanieczyszczenie środowiska wodnego substancjami mineralnymi oraz ściekami przemysłowymi, a także zmiany klimatyczne czy też zakłócenia hydrograficzne i ruchy tektoniczne w obszarze dna morskiego, powodujące przemieszanie się warstw wody (4, 17, 23).

Określenie „morskie biotoksyny” oznacza biologiczne substancje trujące odkładające się w żywych małżach wskutek pobierania przez nie planktonu zawierającego toksyny, które następnie kumulowane są w mięśniach i wątrobotrzustce (4, 37). Spożywanie skażonych biotoksynami małży blaszkoskrzelnych jest główną przyczyną zachorowań ludzi, jednakże ich obecność, w tym brewetoksyn, odnotowano u wielu gatunków skorupiaków, takich jak: raki, homary, kre-

wetki oraz w szkarłupniach, osłonicach i ślimakach morskich (21, 31, 42). Konsumpcja tego rodzaju specyficznej żywności nie jest więc pozbawiona pewnego ryzyka związanego z obecnością biotoksyn morskich powodujących zatrucia pokarmowe. Toksyny są bardzo niebezpieczne dla zdrowia konsumenta z uwagi na swoją termostabilność, a ich obecność w mięsie małży nie powoduje zmian sensorycznych spożywanego produktu, co mogłoby informować konsumenta o możliwości zatrucia. W krajach, w których produkcja i eksport małży stanowią istotną pozycję w budżecie państwa, istnieje szczelny system nadzoru nad ich hodowlą i dystrybucją. Jest on wielostopniowy i zaczyna się od monitorowania substancji odżywczych na różnych głębokościach obszaru produkcyjnego (morza), poprzez określenie obecności glonów i ich gatunków, określenie obecności biotoksyn w planktonie oraz skażenia biotoksynami małży. System ten pozwala dokonać klasyfikacji obszarów produkcyjnych i nie dopuścić do sprzedaży małży zawierających biotoksyny (23, 25, 26).

Główne biotoksyny morskie występujące u mięczaków to toksyny paraliżujące (paralytic shellfish poisoning, PSP), neurotoksyny (neurotoxic shellfish poisoning, NSP), toksyny anamnesticzne (amnesic shellfish poisoning, ASP), wywołujące biegunki (diarrhetic shellfish poisoning DSP) oraz kwas azaspirowy (azaspiracid, AZA) wywołujący również biegunki (8, 9, 25). W niniejszej publikacji omówiono neurotoksyny, czyli biotoksyny wywołujące zaburzenia ze strony układu nerwowego. W tej grupie biotoksyn morskich aktywną substancją jest brewetoksyna (BTX) i jej izomery.

Brewetoksyna jest produkowana przez planktonowe brudnice (*Dinoflagella*, *Gymnodinium breve*) należące do rodzaju *Karenia*: *K. brevis*, *K. digitata*, *K. longicanalis*, *K. mikimotoi*, występujące głównie w wodach Zatoki Meksykańskiej. To tutaj zanotowano pierwsze zakwity wód w latach czterdziestych dziewiętnastego wieku. Neurotoksyny są wytwarzane również przez gatunki należące do rodzaju *Rhaphidophyceae*: *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica*, *Heterosigma akashiwo*, występujące głównie w wodach Pacyfiku (11, 17, 18, 40, 42, 44).

Podobnie jak w przypadku innych morskich toksyn, zawartości BTX w mięsie małży nie można zmniejszyć przez płukanie, gotowanie czy też mrożenie. BTX jest toksyną pozbawioną smaku i zapachu, a więc nie może być wykryta sensorycznie. Jest ciepłooporna i kwasooporna oraz rozpuszczalna w tłuszczach (lipofilna). Z chemicznego punktu widzenia BTX jest cyklicznym polieterem o masie cząsteczkowej około 900. Na podstawie różnic w strukturze chemicznej i biotoksyczności BTX dzieli się na dwa podtypy związków: A (PbTx-1 i PbTx-7) i B (PbTx-2, PbTx-3 i PbTx-9) (7, 38). BTX produkowana przez *K. brevis* jest częściowo uwalniana do wody, co powoduje

u ludzi podrażnienia i spowolnienie oddychania w następstwie wdychania mgiełki morskiej zawierającej brewetoksynę. Występują wtedy objawy astmopodobne o różnym natężeniu, w zależności od stężenia toksyny, czasu ekspozycji i wrażliwości osobniczej (7, 9, 17, 30). Dla biotoksyn neurotycznych określono ich maksymalną dopuszczalną zawartość w mięsie małży (mierzoną dla całego małża lub oddzielnie dla części jadalnej) na 0,8 mg/kg (jako PbTx-2), co odpowiada 20 jednostkom mysim MU/100 g mięsa małży (1 MU = 4,0 µg PbTx-2) (37, 42).

Brewetoksyna jest łatwo absorbowana, szczególnie w mięśniach szkieletowych, wątrobie, nerkach i płucach. Blokuje również kanały jonowe w układzie nerwowym, co powoduje depolaryzację błon neuronów i niekontrolowany napływ jonów sodu do wnętrza komórki (12, 14). Występujące w trakcie zatrucia łagodne i umiarkowane nudności, wymioty i biegunka są często zgłaszane lekarzowi, chociaż nie są one głównymi objawami intoksykacji. Rozwój objawów następuje w ciągu kilku minut do kilku godzin. Najpierw pojawiają się drętwienie i mrowienie w ustach oraz kończynach, trudności w przełykaniu, dreszcze, mdłości, biegunka, odrętwienie, bóle brzucha i suchość w ustach, a następnie reakcje neurologiczne, takie jak: trudności w oddychaniu, podwójne widzenie, zawroty głowy i brak koordynacji ruchu w wyniku oddziaływania na sympatyczny i parasympatyczny układ nerwowy. Może wystąpić częściowy paraliż kończyn. Zostało również opisane odwrócenie czucia ciepła i zimna, podobnie jak przy zatruciu ciguatoksyną. Przy dużej ilości spożytej BTX następuje blokowanie przewodnictwa nerwowego, wiotczenie mięśni przepony i śmierć przez uduszenie (10, 11, 13, 35, 41, 42).

Obecność oraz zatrucia brewetoksyną zanotowano po spożyciu omułek nowozelandzkich, sercówek, omułek, ślimaków oraz małży (*Donax variabilis*). Epidemiologia NSP nie jest dobrze udokumentowana, ponieważ jest stosunkowo rzadkim zatruciem. Większość informacji składa się z krótkiego opisu przebiegu choroby i czynnika sprawczego (42). Pojedyncze dane o zachorowaniach po spożyciu małży z wód Zatoki Meksykańskiej raportowano 1995 r. (2 przypadki), w 1996 r. (trzy przypadki), dwa zachorowania w 2001 r. oraz 4 zatrucia w 2005 r. (1, 28, 32, 42). Masowy rozwój organizmów tworzących zakwity wystąpił w latach 1992-1993 w rejonie północnej Nowej Zelandii, czego skutkiem było zarejestrowanie w ciągu kilku tygodni 180 zatruc konsumentów małżami (20). Brewetoksyna jest toksyczna również dla ryb. Spowodowała liczne zatrucia neurotoksyczne, wymieranie ryb morskich i hodowlanych, morskich bezkręgowców i ssaków, w tym delfinów (2, 16, 22). W Europie nie stwierdzono zatruc po spożyciu małży skażonych brewetoksyną, jednak w Niemczech, Francji, Grecji, Holandii, Portugalii i Hiszpanii wykryto obecność planktonu wytwarzającego tę toksynę (7).

Biotoksyny morskie, w tym BTX, 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 dootrzewnowo myszom. Zwierzęta obserwuje się przez 6 godzin. Identyfikacji toksyn dokonuje się na podstawie wystąpienia charakterystycznych objawów oraz oceny czasu od podania do ewentualnej śmierci zwierzęcia. Wynik podaje się w tzw. jednostkach mysich (MU, mouse units) na 100 gramów mięsa małży. Jedna jednostka dla BTX odpowiada ilości toksyny, która przeciętnie zabija 50% badanych zwierząt w ciągu 930 minut (3, 11, 15). Zgodnie ze światową tendencją zakazu stosowania testów biologicznych na zwierzętach, następuje szybki rozwój testów immunoenzymatycznych i metod czysto chemicznych, takich jak: wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię cieczową (LC), chromatografię cieczową w połączeniu ze spektrofotometrią mas (MS-LC), spektroskopia masowa (MS) lub techniki ELISA (5, 15). Dostępna jest również metoda chromatografii kapilarnej w połączeniu z detekcją fluorometryczną, która pozwala na rozdzielanie i wykrycie wszystkich izomerów BTX. Jest ona ponad 100 razy czulsza od chromatografii cieczowej, umożliwia identyfikację śladowych ilości BTX w planktonie i mięsie, co ma również kluczowe znaczenie dla zrozumienia metabolizmu toksyn i ich działania (40, 46). Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem fluorescencyjnym jest metodą referencyjną (19, 24). W przypadku zastosowania technik alternatywnych, po uzyskaniu wyniku dodatniego próbka powinna być potwierdzona metodą referencyjną. Testy ELISA cechują się dużą czułością i specyficznością, są one jednak dostępne tylko dla toksyn, dla których można wyprodukować przeciwciała. W USA opracowano w 2002 r. test ELISA pozwalający wykryć brewetoksynę w ostrygach w ilości 2,5 µg/100 g mięsa małży (29). Dostępny jest również zestaw immunoenzymatyczny (firmy Abraxis) pozwalający oznaczyć brewetoksynę w wodzie morskiej, mięsie małży i skorupiaków w czasie krótszym niż 2 godziny, bez wystąpienia reakcji krzyżowych. Granica wykrywalności tej metody wynosi 0,05 ng/ml w wodzie i 22,5 ng/g w mięsie małży lub skorupiaków. ELISA jest bardzo czułą metodą do wykrywania brewetoksyn w złożonych matrycach. Jest bardzo skuteczna w diagnozowaniu zatrucia brewetoksyną zwierząt i ludzi oraz badaniu dróg przenoszenia się brewetoksyn i ich wpływu na środowisko (11, 42). Test radioimmunologiczny (RIA) jest kolejną techniką stosowaną do wykrywania i oznaczania BTX. RIA nie jest w stanie rozpoznać wszystkich kongenerów brewetoksyn w porównaniu z LC/MS, niemniej jednak technika ta pozwala wykryć większą część całkowitej zawartości brewetoksyny w porównaniu z metodą

biologiczną (MBA) w przypadku badania wody morskiej czy mięsa małży. Brewetoksynę można również oznaczać testem biologicznym na rybach *Gambusia affinis* (FBA) (5, 6, 11, 33).

Rzeczywisty rozwój metod chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas jest bardzo szybki i przy ich pomocy można wykrywać coraz więcej biotoksyn morskich, w tym BTX i jej pochodnych. Informacje o niezbędnych do tego celu standardach są dostępne na stronach m.in. <http://www.noaa.gov/>, <http://www.foodstandards.gov.au>. Uniwersytet w Północnej Karolinie (Wilmington, USA) udostępnia materiały odniesienia BTX's, roztwory kalibracyjne oraz mięso małży z brewetoksyną jako certyfikowane materiały odniesienia (CRM).

Piśmiennictwo

1. Ahmed F. E.: Naturally occurring seafood toxins. *Toxin Rev.* 1991, 10, 263-287.
2. Ahmed M. D. S., Arakawa O., Onoue Y.: Toxicity of cultured *Chattonella marina*. [w:] Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C. (red.): Harmful marine algal blooms. Lavosier Intercept Ltd. Pub., Paris 1995, s. 499-504.
3. American Public Health Association. Method for the bioassay of Gymnodinium breve toxin(s) in shellfish. In Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish, 4th Edition. American Public Health Association: Washington, DC, USA 1970, s. 61-66.
4. Anderson D. M.: Red tides. *Sci. American* 1994, 271, 62-68.
5. Baden D. G., Adams D. J.: Brevetoxins: chemistry, mechanism of action and methods of detection, [w:] Botana L. M.: Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. Marcel Dekker, New York 2000, s. 505-532.
6. Baden D. G., Melinek R., Sechet V., Trainer V. L., Schultz D. R., Rein K. S., Tomas C. R., Delgado J., Hale L.: Modified immunoassays for polyether toxins: implications of biological matrices, metabolic states and epitope recognition. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 499-508.
7. Benson J. M., Tischler D. L., Baden D. G.: Uptake, distribution, and excretion of breve toxin administered to rats by intratracheal instillation. *J. Toxicol. Environ. Health A* 1999, 56, 345-355.
8. Białczak J., Lechowski Z., Bober B.: Toksyny syntetyzowane przez morskie glony. *Wiad. Botan.* 2009, 53, 31-51.
9. Cembella A. D., Lamoreux G.: Rev. Int. Oceanogr. Med. 1991, [w:] Egmond H. P. V.: Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 1993, 2, 41-83.
10. Dechraoui M. Y., Naar J., Pauillac S., Légrand A. M.: Ciguatera toxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 1993, 7, 125-143.
11. EFSA (European Food Safety Authority): Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group. *EFSA J.* 2010, 8, 1-29.
12. Facts and figures on the Common Fisheries Policy – Basic statistical data – 2012 Edition, Luxembourg: Publications Office of the European Union, Fisheries 2012, 28.
13. Friedman M. A., Fleming L. E., Fernandez M., Bienfang P., Schrank K., Dickey R., Bottein M.-Y., Backer L., Ayyar R., Weisman R., Watkins S., Granade R., Reich A.: Ciguatera fish poisoning: Treatment, prevention and management. *Mar. Drugs* 2008, 6, 456-479.
14. Gallagher J. P., Shinnick-Gallagher P.: Effect of Gymnodinium breve toxin in the rat phrenic nerve diaphragm preparation. *Br. J. Pharmacol.* 1980, 69, 367-372.
15. Garthwaite I., Ross K. M., Poli., Towers N. R.: Comparison of immunoassay, cellular and classical mouse bioassay methods for detection of neurotoxic shellfish toxins. ACS (American Chemical Society) Symposium Series 1996, 621, 404-412.
16. Geraci J. R.: Clinical investigation of the 1987-1988 mass mortality of bottlenose dolphins along the U.S. central and south Atlantic coast. Final report to National Marine Fisheries Service and U.S. Navy, Office of Naval Research and Marine Mammal Commission, Washington DC 1989.
17. Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D.: Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33., UNESCO, Rzym 1995, s. 1-22.
18. Hansen G., Daugbjerg N., Henriksen P.: Comparative study of Gymnodinium mikimotoi and Gymnodinium aureolum, comb. nov. (= Gyrodinium aureolum)

- based on morphology, pigment composition and molecular data. *J. Phycol.* 2000, 36, 394-410.
19. *Hua Y., Lu W., Henry M. S., Pierce R. H., Cole R. B.*: Online high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of brevetoxins in 'red tide' algae. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1815-1823.
 20. *Ishida H., Muramatsu N., Nukay H., Kosuge T., Tsuji K.*: Study on neurotoxic shellfish poisoning involving the oyster, *Crassostrea gigas*, in New Zealand. *Toxicon* 1996, 34, 1050-1053.
 21. *Jorgensen K., Cold 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.
 22. *Landsberg J. H.*: The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* 2002, 10, 113-390.
 23. *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.
 24. *McNabb P. S., Selwood A. I., Van Ginkel R., Boundy M., Holland P. T.*: Determination of brevetoxins in shellfish by LC/MS/MS: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* 2012, 95, 1097-1105.
 25. *Michalski M.*: Biotoksyny morskie – występowanie i metody analizy. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2006, 13, 16-22.
 26. *Morohashi A., Satake M., Naoki H., Kaspar H. F., Oshima Y., Yasumoto T.*: Brevetoxin B4 isolated from greenshell mussels, *Perna canaliculus*, the major toxin involved in NSP in New Zealand. *Nat. Toxins* 1999, 7, 45-48.
 27. *Morris P. D., Campbell D. S., Taylor T. J., Freeman J. I.*: Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. *Am. J. Pub. Health* 1991, 81, 471-474.
 28. Morski Instytut Rybacki – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Ekonomiki Rybackiej: *Morska gospodarka rybna w 2013 r.* Gdynia, 2014, s. 33.
 29. *Naar J., Bourdelais A., Tomas C., Kubanek J., Whitney P. L., Flewelling L., Steidinger K., Lancaster J., Baden D. G.*: A competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium Breve*) in seawater, shellfish, and mammalian body fluid. *Environ. Health Persp.* 2002, 110, 179-185.
 30. *Perce R., Henry M., Blum P. C., Paynes S.*: *Gymnodinium breve* toxins without cells: intracellular and cellular toxins, [w:] Hallengraef G., Blackburn S. I., Bolch C. J., Lewis R. J. (red.): *Harmful algal blooms 2000.* Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris 2001, s. 421-424.
 31. *Plakas S. M., Wang Z., El Said K. R., Jester E. L. E., Granade H. R., Flewelling L., Scott P., Dickey R. W.*: Brevetoxin metabolism and elimination in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) after controlled exposure to *Karenia brevis*. *Toxicon* 2004, 44, 677-685.
 32. *Poli M. A., Musser S. M., Dickey R. W., Eilers P. P., Hall S.*: Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: A case study from Florida. *Toxicon* 2000, 38, 981-993.
 33. *Poli M. A., Rein K. S., Baden D. G.*: Radioimmunoassay for PbTx-2-type brevetoxins: epitope specificity of two anti-PbTx sera. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 538-542.
 34. *Quilliam M. A.*: Committee on natural toxins and food allergens – phycotoxins. *J. AOAC Int.* 2001, 84, 194-201.
 35. *Ramsdell J. S.*: The molecular and integrative basis to mammalian brevetoxin toxicity, [w:] Botana L., Hui Y. H. (red.): *Phycotoxins: chemistry and biochemistry.* Blackwell Publishing, Ames, I. A. 2007, s. 400-410.
 36. *Rein K. S., Syder R. V.*: The biosynthesis of polyketide metabolites by dinophlagellates. *Adv. Appl. Microbiol.* 2006, 59, 93-125.
 37. 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 852/2004, 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.
 38. Rozporządzenie Komisji 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 30.4.2004*, s. 55.
 39. *Shea D.*: Analysis of brevetoxins by micellar electrokinetic capillary chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 1997, 18, 277-283.
 40. *Steidinger K. A.*: The effects of *Gymnodinium breve* toxin on estuarine animals, [w:] Martin D. F., Padilla G. M. (red.): *Marine pharmacognosy.* Academic Press, New York 1973, s. 179-202.
 41. *Tempelton C. B., Poli M. A., Leclaire R. D.*: Cardiorespiratory effects of brevetoxin (PbTx-2) in conscious tethered rats. *Toxicon* 1989, 27, 1043-1049.
 42. *Watkins S. M., Reich A., Fleming L. E., Hammond R.*: Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar. Drugs* 2008, 6, 431-455.
 43. *Yang Z. B., Tokayama H., Matsuoku K., Hodgkiss I. J.*: *Karenia digitata* spp. nov. (Gymnodiales, Dinophyceae), a new harmful algal bloom species from the coastal water of west Japan and Hong Kong. *Phycologia* 2000, 39, 463-470.
 44. *Zhang X., Zhang Z.*: Capillary electrophoresis-based immunoassay for the determination of brevetoxin-B in shellfish using electrochemical detection. *J. Chromatogr. Sci.* 2013, 51, 107-111.

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