

Toksini školjkaša

Ribarić¹, B., L. Kozačinski¹, B. Njari¹, Ž. Cvrtila¹

pregledni rad

Sažetak

Dvoljušturni školjkaši, filtracijom hrane, mogu akumulirati velike količine toksina porijeklom od fitoplanktonskih algi. Školjkaši kontaminirani ovim toksinima, potpuno su zdravi bez vidljivih promjena. Toksini, nakon konzumacije školjkaša, mogu u ljudi uzrokovati 5 sindroma: ASP, PSP, DSP, NSP i AZP. U Hrvatskom zakonodavstvu toksini koji uzrokuju AZP trovanje svrstani su pod toksine DSP skupine. ASP trovanje karakterizirano je gubitkom pamćenja, PSP paralizom, a DSP i AZP dijarejom. NSP trovanje javlja se na obalama Sjeverne i Južne Amerike i Novom Zelandu te je karakterizirano neurološkim simptomima. Na području Republike Hrvatske ustanovljeni su toksini ASP, PSP i DSP skupine i alge koje ih produciraju. Za detekciju toksina ASP skupine koristi se HPLC-UV, za PSP skupinu biološki pokus na miševima i HPLC-FL, a za toksine DSP skupine biološki pokus na miševima. Pravilnicima je propisana učestalost uzorkovanja morske vode na fitoplanktonski sastav i školjkaša na toksine te je propisana maksimalna dopuštena količina toksina u jestivim djelovima školjkaša.

Ključne riječi: školjkaši, onečišćenja, toksini

Uvod

Školjkaši, pripadnici roda *Mollusca*, razreda *Bivalvia*, morski i slatkovodni su organizmi koji se hrane filtracijom (Matoničkin i sur., 1998). U Republici Hrvatskoj najviše se uzgajaju dagnja (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*) te se s njima potrošači najviše i susreću (Anon., 2011). Uzgoj školjkaša provodi se u nekoliko faza koje se sastoje od njihova prikupljanja na kolektore, a potom razvrstavanja i punjenja u pergolare u kojima se uzgajaju do konzumne veličine (Bogut i sur., 2006.).

Osnovnu hranu dvoljuštarnih školjkaša predstavljaju planktonske alge. Zbog karakterističnog hranjenja školjkaša filtracijom, oni su u mogućnosti akumulirati velike količine toksina koje ove alge produciraju. Školjkaši najčešće akumuliraju toksine za vrijeme cvjetanja mora odnosno pojačanog razmnožavanja određene alge. Smatra se da alge toksine produciraju radi borbe pro-

tiv predatora i preraštavanja drugim organizmima (Anon., 2004 a). Toksine najčešće produciraju dinoflagelati sa izuzetkom domoične kiseline koju producira dijatomeja, odnosno alga kremenjašica. Školjkaši koji akumuliraju toksine potpuno su zdravi i bez vanjskih promjena (Croonenberghs, 2000.). Toksini se prema svojoj strukturi dijele na 8 glavnih skupina: skupina azaspiracida (AZA), skupina brevetoksina (BTX), skupina cikličkih imina, skupina domoične kiseline (DA), skupina okadaične kiseline (OA), skupina pektentoksina (PTX), skupina saksitoksina (STX) i skupina yessotoksina (YTX) (Toyofuku, 2006).

U ljudi, kao posljedica konzumacije kontaminiranih školjkaša, javljaju se sljedeći sindromi: ASP (Amnesic shellfish poisoning)- trovanje školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja, PSP (Paralytic shellfish poisoning)- trovanje školjkašima koje uzrokuje paralizu, DSP (Diarrheic

shellfish poisoning)- trovanje školjkašima koje uzrokuje diareju, NSP (Neurotoxic shellfish poisoning)- neurotoksično trovanje školjkašima i AZP (Azaspiracid poisoning)- azaspiracidno trovanje školjkašima (Aune, 2008).

ASP (Amnesic shellfish poisoning) - trovanje školjkašima koje uzrokuje gubitak pamćenja

ASP trovanje prvi put se pojavilo 1987.g. na Otoku Princa Edwarda, Kanada. Trovanje se pojavilo nakon konzumacije školjkaša vrste *Mytilus edulis* (Leftley i Hannah, 2008). Toksin koji je prouzročio ovo trovanje naziva se domoična kiselina (DA) i potječe od alga kremenjašica roda *Pseudo-nitzschia sp.* i *Nitzschia sp.* (Kotaki, 2008). Od roda *Pseudo-nitzschia* za Europu su najvažnije vrste *P. australis*, *P. multiseriis* i *P. serata* (Thessen, 2010). Od roda *Nitzschia* jedina vrsta koja producira domoičnu kiselinu je *N. navis-varingica* koja se nalazi

¹ Bruno Ribarić, student; dr. sc. Lidija Kozačinski, redovita profesorica; dr. sc. Bela Njari, redoviti profesor u trajnom zvanju; dr. sc. Željka Cvrtila Fleck, docentica; Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Heinzelova 55, Zagreb

u Azijskim morima i nije dovoljno proučena (Kotaki, 2008). DA spada u skupinu aminokiselina koji se nazivaju kanoidi. Oni su klasificirani kao neuroekscitatori koji se upliću u neurotransmisiju (Quilliam, 2003). DA je hidrosolubilna, ciklična aminokiselina po strukturi vrlo slična neurotoksičnoj kainskoj kiselini. Postoji više izomera ove kiseline (epi-DA, A, B, C, D, E, F, G, H i dr.) od kojih nisu svi detektirani u tkivu školjkaša (ANONN., 2009.). Pokusima je utvrđeno da se u tkivu školjkaša DA najviše akumulira u probavnoj žlijezdi, zatim u bubregu i škragama, dok su najmanje količine pronađene u gonadama, mišićima i vezivnom tkivu (ANONN. 2004.a).

U ljudskom organizmu DA se slabo resorbira iz probavnog trakta, sporo se širi organizmom, a potom vrlo sporo pinocitozom prelazi hematoencefalnu barijeru i prodire u mozak (Doucette i Tasker, 2008, Ramsdell, 2007). DA se veže na vezno mjesto glutaminske kiseline na N-metil-D-aspartat (NMDA) receptoru sa svake strane sinapse. Tako dovodi do otvaranja natrijevih kanala, ulaska natrija u stanicu i depolarizacije neurona te otvaranja kalcijevih kanala i povećanja intracelularnog kalcija. Zbog povećane količine kalcija dolazi do trajne aktivacije o njemu ovisnih enzima što trošenjem energije dovodi do odumiranja stanica. Lezije se najviše nalaze u hipokampusu, dijelu mozga odgovornom za pamćenje (Mos, 2000; Rossini i Hess, 2010; van Apeldorn i sur., 1999).

Za detekciju DA koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa ultravioletnom detekcijom (HPLC-UV) po Quilliam et al. (1995). Ukupna količina DA u jestivim dijelovima školjkaša, utvrđena ovom metodom, ne smije prelaziti 20 mg/kg (Anon., 2004b). Izuzetak ovom pravilu su pripadnici roda *Pectinidae* (češljači) kod kojih je dopuštena količina DA do 250 mg/kg

pod uvjetom da se uklone probavna žlijezda, meka tkiva i drugi onečišćeni dijelovi, a za konzumaciju koriste samo mišić aduktor i gonade ako u njima nije utvrđena DA u količini većoj od 20 mg/kg (Anon., 2009b).

Provođeni su razni pokusi smanjenja DA u mesu kontaminiranih školjkaša. Tako je utvrđeno da se prilikom kuhanja mala količina DA gubi. Ova pojava objašnjena je gubitkom hidrosolubilne DA u okolnoj vodi (McCarron i Hess, 2005; Reberda i sur., 2009). Utvrđeno je da se određena količina DA gubi i prilikom konzerviranja, međutim veća količina prelazi u ambalažu te na taj način predstavlja prijetnju potrošačima (Vietes i Cabado, 2008).

Trovanje DA očituje se u ljudi gastrointestinalnim i neurološkim simptomima. U ranoj fazi, do 24 sata od konzumacije, dolazi do povraćanja, abdominalnih grčeva, proljeva i mučnine. U ozbiljnijih slučajeva, unutar 48 sati od konzumacije, dolazi do neuroloških simptoma: glavobolja, vrtoglavica, facijalna paraliza, napadaji, kratkotrajna amnezija, poteškoće u disanju i koma. Neurološki simptomi mogu trajati mjesecima, a čak dovesti i do smrti (Rossini i Hess, 2010; Moeller, 2000).

PSP (Paralytic shellfish poisoning) – trovanje školjkašima koje uzrokuje paralizu

Paralitičko trovanje školjkašima poznato je stotinama godina te je uzrokovano skupinom saksitoksina (STX). Saksitoksine najviše produciraju dinoflagelati roda *Alexandrium* (Aune, 2008). Od dinoflagelata roda *Alexandrium* najveće količine saksitoksina produciraju *A. minutum*, *A. tamarensis*, *A. catanella* i dr. (Anon., 2004a). Također produkcija je utvrđena i u drugih dinoflagelata i nekolicine cijanobakterija (Wiese i sur., 2010).

Saksitoksin je jedan od najpotentnijih morskih toksina. Postoji 57 toksina unutar ove skupine. Oni su svi slične strukture, derivati su STX-a i prema svojoj strukturi dijele se na 4 skupine: karbamatnu, N-sulfo-karbamoilnu, dekarbamoilnu i na skupinu hidroksiliranih saksitoksina (Anon., 2009c; Wiese i sur., 2010). Svi saksitoksini su hidrosolubilni i termostabilni. Međutim analozi saksitoksina raspadaju se u alkaličnim uvjetima. Najtoksičniji i najstabilniji je saksitoksin (STX) dok se u tkivu školjkaša najčešće pronalaze neosaksitoksin i gonyautotoksin (Kodama i Sato, 2008; Shimizu, 2002). U školjkaša saksitoksini se najviše akumuliraju u želucu i crijevima (96%). Nakon konzumacije saksitoksini se resorbiraju već u bukalnoj sluznici, a potom krvlju odlaze u sve organe uključujući mozak. Saksitoksini onemogućavaju djelovanje naponom reguliranih natrijevih kanala na stijenci neurona što dovodi do nemogućnosti provođenja akcijskog potencijala. Tako ne dolazi do provođenja živčanog impulsa pa nastupa paraliza (Anon., 2004a).

Saksitoksini se detektiraju biološkim pokusom na miševima prema AOAC i metodom tekućinske kromatografije sa fluorescentnom detekcijom (HPLC-FL) po AOAC (Anon., 2004b). Budući da je HPLC metoda prekomplikirana za rutinsku uporabu za detekciju saksitoksina više se upotrebljava biološki pokus na miševima (Yakes i sur., 2010). On se provodi tako da se iz 100 - 150 g tkiva školjkaša pripremi uzorak koji se intraperitonealno aplicira u količini od 1 ml u 2-3 miša težine 19-21g. Miševi se pomno promatraju te se mjeri vrijeme od aplikacije do smrti miša koja je obilježena njegovim zadnjim inspirijem. Prema vremenu preživljavanja miša izračunava se količina otrova po 100g tkiva školjkaša (Anon., 2000). Ukupna količina saksitoksina u jestivim dijelovima školjkaša, utvrđena biološkim poku-

som na mješevima ili HPLC ne smije prelaziti 80 µg/100g (Anon., 2004b).

Lagos i sur. (2001), patentirali su postupak za detoksifikaciju zagađenih školjkaša na razinu dopuštenu zakonom. Postupak je baziran na nestabilnosti pojedinih analoga saksitoksina u alkalnim uvjetima i gubitku određene količine toksina dehidracijom tkiva. Konzerviranjem se može reducirati količina toksina u slučajevima kada je zagađenost relativno niska. Tako se u Španjolskoj određeni školjkaši mogu prikupljati i do količine od 300µ/100g saksitoksina u tkivu u slučaju da se konzerviraju i potom testiraju (Vietes i Cabado, 2008).

Simptomi trovanja se vrlo brzo razvijaju, unutar 30 minuta po konzumaciji. Očituju se parestezijom i tupošću koji počinju sa ustima, jezikom i licem pa prelaze na vrat, ruke i noge. Kao jači simptomi dolaze nemogućnost razgovjetnog govora, manjak koordinacije i opća slabost. Kao kasni simptom javlja se paraliza dišnog sustava sa posljedičnom asfiksijom koja može dovesti i do smrti (Halstead i Schantz, 1984; Rossini i Hess, 2010).

DSP (Diarrheic shellfish poisoning) – trovanje školjkašima koje uzrokuje diareju

Ovo trovanje prvi puta je opisano 70-tih godina prošloga stoljeća u Japanu i Nizozemskoj. Prouzročeno je toksinima koje produciraju dinoflagelati roda *Dinophysis* i *Prorocentrum*. Toksini se dijele na više skupina: 1. okadaična kiselina (OA) i njeni derivati dinophysitoksini (DTX), 2. pectenotoksini (PTX) i 3. yessotoksini (YTX) (ANONN., 2004.a).

Dinoflagelati roda *Dinophysis* češće se pronalaze u Europskim morima i to vrste *D. acuta* i *D. acuminata*, dok se vrste roda *Prorocentrum* više pronalaze u Japanu (OTERO, 2009.)

OA i njezini derivati dinophysitoksini su lipofilni, termostabilni polieterski spojevi. Postoje 3 dinophysitoksina i to DTX 1, 2 i 3. OA, DTX1 i DTX2 razlikuju se po položaju i broju metilnih skupina, dok DTX3 predstavlja derivate OA, DTX1 i DTX2 esterificirane sa nezasićenim i zasićenim masnim kiselinama (Anon., 2007a). OA i njezini derivati nakupljaju se u masnome tkivu školjkaša (Anon., 2004a). Masovno se resorbiraju unutar probavnog trakta te se brzo krvlju šire u sva tkiva. Oni su specifični inhibitori enzima serin/treonin fosfataze 1 i 2A (PP1 i PP2A) koji reguliraju stupanj proteinske fosforilacije i defosforilacije. Inhibicija ovih enzima dovodi do brzog povećanja fosforiliranih proteina. Tako dolazi do fosforilacije aktinskih filamenata koji održavaju integritet čvrstih međustaničnih spojeva između epitelnih stanica tankog crijeva. Njihovom fosforilacijom onemogućena je resorpcija iz crijeva te dolazi do pasivnog gubitka tekućine. Uz dijareičko, pokusima je utvrđeno i tumorsko promotivno, imunosupresivno i mutageno djelovanje (Tubaro i sur., 2008).

Pectenotoksini (PTX) pripadaju skupini makrolidnih polieterskih laktona (Leftley i Hannah, 2008). Otkriveni su zahvaljujući brzom letalnom učinku na miševima nakon intraperitonealne aplikacije lipofilnih ekstrakata školjkaša. Do sada je pronađeno 15 vrsta pectenotoksina (Anon., 2009d). Smatra se da su svi nastali transformacijom PTX2 u probavnoj žlijezdi školjkaša (Anon., 2004a). Pokusima na miševima ustanovljena je mala resorpcija iz probavnog trakta (Anon., 2009d). Iako se u početku smatralo da pectenotoksini pripadaju skupini okadaične kiseline, kasnije je dokazano da oni ne inhibiraju enzime PP1 i PP2A. Unatoč maloj oralnoj toksičnosti, intraperitonealno aplicirani uzrokuju smrt u miševa te predstavljaju stalnu opasnost od lažno pozitivnih rezultata prilikom

detekcije DSP toksina. Iako nije dokazana toksičnost za ljude, pectenotoksini se ne smiju isključiti kao potencijalni uzročnici DSP trovanja (España i Vilariño, 2008).

Yessotoksini (YTX) se sastoje od 11 lančano spojenih eterskih prstenova, nezasićenog postranog lanca i dva sulfatna estera. Postoji više od 90 analoga ovih toksina dok je samo nekolicina proučena. Pokusima na miševima ustanovljena je vrlo mala resorpcija iz probavnog trakta (Anon., 2008). Ovi toksini ne uzrokuju diareju i u usporedbi sa okadaičnom kiselinom i njenim derivatima puno slabije inhibiraju enzim PP2A. Ne postoji niti jedan zabilježen slučaj trovanja yessotoksinima u ljudi. Zbog toga smatra se da ovi toksini ne pripadaju toksinima koji uzrokuju DSP trovanje, međutim zbog svog letalnog učinka na miševima predstavljaju konstantnu opasnost od lažno pozitivnih rezultata (Ciminello i Fattorusso, 2008). Simptomi u miševa nakon intraperitonealne aplikacije slični su onima pri aplikaciji saksitoksina (Paz i sur., 2008).

Toksini DSP skupine dokazuju se biološkim pokusom na miševima prema Yasumoto et al., 1995. (Anon., 2004b). Za ovaj pokus kao pretraživački materijal uzima se 25 g probavne žlijezde (hepatopankreasa). Nakon što se uzorak pripremi, intraperitonealno se aplicira u količini od 1 ml u 3 miša težine 19-21 g. Miševi se promatraju 24 sata te, ukoliko uginu 2 od 3 miša uzorak se smatra pozitivnim na prisutnost okadaične kiseline, dinophysitoksina i pectenotoksina u količini većoj od maksimalno dopuštene. Da se u uzorku nalaze yessotoksini može se posumnjati ukoliko miševi prilikom ugibanja pokazuju znakove slične onima kod testiranja na saksitoksine (konvulzije, skakanje) (Anon., 2007b). Najviša količina biotoksina koji uzrokuju diareju u jestivim dijelovima školjkaša ne smije prelaziti 160µg okadaične

kiseline, dinophysitoksina i pectenotoksina na 1000 g mesa školjkaša, odnosno 1 mg yessotoksina na 1000 g mesa školjkaša (Anon., 2004b).

Reboreda i sur. (2009) pokusom nad dagnjama nisu uspjeli smanjiti količinu okadaične kiseline u tkivu. Tako postupkom smrzavanja-odmrzavanja nije postignuta redukcija toksina što je i bilo očekivano zbog lipofilne naravi okadaične kiseline i njenih derivata. Postupak termalne obrade je naprotiv povećao količinu toksina u tkivu. Naime kuhanjem je došlo do dehidracije tkiva, dok je ukupna količina toksina ostala nepromijenjena.

Mccaronn i sur. (2008) pokusima sterilizacije dokazali su da se okadaična kiselina i njezini derivati, unatoč termostabilnosti, razgrađuju prilikom kuhanja na visokim temperaturama kroz dulje vremensko razdoblje. Tako se DTX2 počeo značajno razgrađivati na temperaturi od 100°C, a okadaična kiselina na 130°C.

Simptomi DSP trovanja javljaju se unutar jednog sata od konzumacije. Karakterizirani su mučninom, abdominalnim grčevima, povraćanjem i diarejom. Ovi simptomi obično nestaju unutar nekoliko dana. Nisu zabilježene dugotrajne posljedice niti smrtni slučajevi povezani sa DSP trovanjem (Rossini i Hess, 2010).

NSP (Neurotoxic shellfish poisoning) – neurotoksično trovanje školjkašima

Neurotoksično trovanje školjkašima javlja se na području Meksičkog zaljeva, istočne obale Floride, obale Sjeverne Karoline i na Novom Zelandu. Ono je uzrokovano brevetoksinima koje proizvodi dinoflagelat *Karenia brevis* (Anon., 2004a; Watkins i sur., 2008). Toksini su toksični za ljude, ali i za ribe te morske sisavce i ptice. Tako se prilikom masovnog ugibanja ovih životinja može po-

sumnjati na cvjetanje ove alge (Watkins i sur., 2008.).

Brevetoksini (BTX) su neurotoksični polieterski toksini. Termostabilni su, liposoubilni i stabilni pri svim uvjetima pH. Postoje 2 tipa brevetoksina: tip A i tip B koji se razlikuju po kemijskoj strukturi. Od njih nastaju analozi biotransformacijom u školjkašima za koje nije utvrđena ihtiotoksičnost (Anon., 2004a; Hess i Rossini, 2010; Ramsdell, 2008). Zbog svoje liposolubilnosti lako se resorbiraju iz probavnog trakta i brzo šire organizmom. Brevetoksini se vežu na posebno vezno mjesto na naponom reguliranim natrijevim kanalima. Dovode do pojačanog ulaska natrija u stanicu što dovodi do provođenja akcijskog potencijala i nekontroliranog provođenja živčanog impulsa. S vremenom stanice izgube sposobnost ekscitacije i dolazi do paralize (Hess i Rossini, 2010). Brevetoksini se dokazuju biološkim pokusom na miševima, a prema zakonskim propisima SAD-a maksimalna dopuštena količina u jestivim dijelovima školjkaša iznosi 80µg/100g (Watkins i sur., 2008).

Simptomi trovanja javljaju se najčešće 3 do 4 sata od konzumacije. Simptomi su gastrointestinalni i živčani, a većina oboljelih opisuje mješovite multiple simptome. Od gastrointestinalnih simptoma javljaju se mučnina, povraćanje i diareja. Ipak, češće se opisuju neurološki simptomi poput trnaca i tuposti usana i lica, a ponekad i ekstremiteta. Neurološki simptomi traju dulje od gastrointestinalnih. Nisu zabilježeni smrtni slučajevi povezani sa ovim trovanjem i oboljeli se obično oporave u narednih 48 sati (Rossini i Hess, 2010; Watkins i sur., 2008).

AZP (Azaspiracid poisoning) – Azaspiracidno trovanje školjkašima

Trovanje se prvi puta pojavilo

1995. godine u Nizozemskoj a bilo je karakterizirano simptomima karakterističnima za DSP. Analizom morske vode i školjkaša nisu detektirani niti dinoflagelati producenti DSP toksina niti sami toksini. Kemijskim analizama ustanovljeno je da se radi o jedinstvenom toksinu nazvanom azaspiracid. Od dinoflagelata, azaspiracid jedino je pronađen u vrste *Protoperidinium crassipes*. Unatoč tome smatra se da je ovaj organizam samo vektor, a kao potencijalni producenti spominju se cijanobakterije i bakterije (Anon., 200a; Twiner i sur., 2007).

Azaspiracidi su polieterski spojevi koji su ime dobili po svojim kemijskim karakteristikama. Oni su ciklički amini (AZA skupina) koji se sastoje od jedinstvenog spiralnog prstena (SPIRO) te sadrže karboksilnu kiselinsku skupinu (ACID). Postoji 27 analoga azaspiracida od kojih je samo u pet kemijska struktura točno utvrđena: AZA1, AZA2, AZA3, AZA4 i AZA5 (Twiner i sur., 2007).

Pokusima na miševima ustanovljeno je da se azaspiracidi po oralnom unosu distribuiraju cijelim organizmom osim mozga (Anon., 2008b). Točan mehanizam djelovanja nije poznat, međutim *in vitro* pokusima dokazane su alteracije na citoskeletu brojnih stanica i nagomilavanje fragmentirane forme E-kadherina koji je odgovoran za međustaničnu adheziju. Ove promjene mogu se povezati sa pojavom diareje (Anon., 2008b; Rossini i Hess, 2010).

Azaspiracidi su u hrvatskom zakonodavstvu svrstani pod toksine DSP skupine te se detektiraju istim analitičkim metodama (biološki pokus na miševima; Yasumoto i sur., 1995.; Anon., 2004b). Prilikom provođenja ovoga postupka da se u uzorku nalaze azaspiracidi posumnjati ćemo ukoliko miševi pokazuju neobične simptome poput skakanja, grebanja i progresivne paralize. Problem ovo-

ga pokusa je njegova neselektivnosti za azaspiracide. Uz to, problem leži i u činjenici da se azaspiracidi akumuliraju u probavnoj žlijezdi od 0 do 40 %, a poznato je da se ona koristi kao pretraživajući materijal (James i sur., 2008). Najveća količina azaspiracida u jestivim dijelovima školjkaša ne smije prijeći 160 µg/1000g mesa (Anon., 2004b).

Hess i sur. (2005) pokusima su na kontaminiranim školjkašima dokazali da se oni ne razgrađuju pri temperaturama koje se koriste prilikom kuhanja te se gubitkom vode njihova količina u mesu dvostruko povećala. Klinička slika AZP trovanja vrlo je slična onoj DSP trovanja i očituje se istim kliničkim simptomima (andominalni bolovi, mučnina, dijareja i povraćanje) koji prolaze kroz nekoliko dana. Nisu zabilježeni smrtni slučajevi niti dugotrajne posljedice povezane sa ovim trovanjem (Anon., 2004a).

Zakonska regulativa i pojavnost u RH

Prema Pravilniku o higijeni hrane životinjskog podrijetla propisane su maksimalne dopuštene količine biotoksina u živim školjkašima:

- za biotoksin koji uzrokuje paralizu (Paralytic Shellfish Poison – PSP): 800 mikrograma na kilogram;
- za biotoksin koji uzrokuje gubitak pamćenja (Amnesic Shellfish Poison – ASP): 20 miligrama domoične kiseline na kilogram;
- za okadaičnu kiselinu, dinopysistoksine i pectenotoksine zajedno: 160 mikrograma ekvivalenta okadaične kiseline na kilogram;
- za yesotoksine: 1 miligram ekvivalenta yesotoksina na kilogram;
- za azaspiracide: 160 mikrograma ekvivalenta azaspiracida na kilogram (Anon., 2007c).

Prema Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša predviđe-

no je tjedno uzrokovanje školjkaša na prisustvo domoične kiseline, saksitoksina i toksina DSP skupine (i azaspiracida) (Anon., 2010).

Ukoliko se analizom uzoraka živih školjkaša utvrdi prisutnost biotoksina u vrijednostima višim od onih propisanih pravilnikom obveza je laboratorija o tome obavjestiti nadležnu veterinarsku inspekciju koja će informaciju prosljediti proizvođačima, sakupljačima i dr. Donosi se rješenje o zabrani izlovljavanja, sakupljanja i stavljanja u promet živih školjkaša izlovljenih u pozitivnom području. Potrebno je obaviti uzorkovanje živih školjkaša svakih 48 sati, dok utvrđena količina biotoksina bude ispod propisanih granica. Zatvoreno proizvodno područje može se otvoriti tek nakon dva uzastopna nalaza s rezultatima biotoksina ispod propisane granice (Anon., 200b).

Toksičnost školjkaša na Jadranu prvi puta je zabilježena 1989. g. kada se radilo o DSP trovanju koje se pojavilo sjevernom, talijanskom dijelu (Čadež i Teskeredžić, 2005). Novija istraživanja pokazala su da se u Jadranskom moru najviše pronalazi dinoflagelat vrste *Dinophysis Fortii* te da je okadaična kiselina glavni toksin ove skupine. Uz nju uočeni su i pectenotoksini (Gladan i sur., 2011.). Domoična kiselina prvi puta se pojavila u siječnju 2006. g. čemu je prethodilo cvjetanje alge *Pseudo-nitzschia sp.* Međutim, detektirana je u niskim koncentracijama koje nisu štetne po ljudsko zdravlje (Ujević i sur., 2010). *A. minutum* prvi je puta, na hrvatskom dijelu Jadrana, pronađen 1992. g., dok je u obliku cisti pronađen još 1989. g. Tijekom ljetnih mjeseci zabilježeni su nalazi saksitoksina u Jadranu u Kaštelanskom zaljevu (Čadež i Teskeredžić, 2005).

Zaključak

Školjkaši, unatoč svom povoljnom kemijskom sastavu i pozitivnom utjecaju na zdravlje, predstavljaju realnu opasnost po zdravlje ljudi. Bi-

otoksini kojima potencijalno mogu biti kontaminirani, ne uzrokuju u njih vidljive promjene. Isto tako, zahvaljujući svojoj termostabilnosti, oni se ne mogu ukloniti iz tkiva uobičajenom kulinarskom obradom. Stoga, vrlo je važna kontrola morske vode na fitoplanktonski sastav i školjkaša na prisutnost toksina. Pri tome, jedan zaseban problem predstavljaju školjkaši prikupljeni na divljim uzgajalištima. Uz sve navedeno, možemo reći da je rizik za zdravlje ljudi relativno nizak budući da su prehrambene navike potrošača u Republici Hrvatskoj takve da oni konzumiraju manje od 8 kg riba i školjkaša godišnje.

* Rad je izvadak iz diplomskog rada Ribarić, B. (2011): Školjkaši kao hrana. (mentor: doc. dr. sc. Željka Cvrtila Fleck).

Literatura

Anonimno (2000): AOAC Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison. Biological Method. First Action 1959. Final Action.

Anonimno (2004a): FAO Food And Nutrition Paper 80. Marine biotoxins. Food and agriculture organization of the United Nations. Rome, 2004. 1, 2, 5, 14-18, 24, 25, 53, 66, 67, 71, 111, 137, 145-150, 173.

Anonimno (2004b): Pravilnik o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjkaša (NN 117/2004).

Anonimno (2007a): Scientific opinion. Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal 589. 1-62.

Anonimno (2007b): Stanard Operating Procedure for detection of Okadaic acid, Dinophysitoxins and Pectenotoxins by Mouse Bioassay.

Anonimno (2007c): Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (99/07).

Anonimno (2008a): Scientific opinion. Marine biotoxins in shellfish – yessotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal 907. 1-62.

Anonimno (2008b): Scientific opinion. Marine biotoxins in shellfish - Azaspiracid group. Scientific Opinion of the Panel on Contami-

Shellfish toxins

Summary

By filter-feeding, bivalve shellfish can accumulate large quantities of toxins from phytoplankton algae. The shellfish contaminated by these toxins are completely healthy, without visible changes. After consuming shellfish, toxins can cause five syndromes with people: ASP, PSP, DSP, NSP and AZP. Toxins which cause AZP poisoning are classified as DSP toxins in Croatian legislation. ASP poisoning is characterized by the loss of memory, PSP paralysis, and DSP and AZP are characterized by a diarrhea. NSP poisoning appears at the coasts of North and South America and New Zealand and it is characterized by neurological symptoms. ASP, PSP and DSP toxins, and algae that produce them are found in the area of the Republic of Croatia. HPLC-UV is used for detection of toxins of ASP group, biological experiment on mice and HPLC-FL for PSP, and biological experiment on mice is used for toxins of DSP group. Ordinances proscribe the frequency of sampling sea water for phytoplankton content and shellfish for toxins, and maximum permissible toxin levels in edible parts of shellfish.

Keywords: shellfish, pollution, toxins

Toxine bei Krebstieren

Zusammenfassung

In der Arbeit sind die Charakteristiken der Toxine bei Krebstieren, deren mikrobiologische Verschmutzungen und die chemische Zusammensetzung des Krebstierfleisches mit dem Rückblick auf die mögliche Anwesenheit der Schwermetalle, beschrieben. Syndrome der Vergiftung mit Biotoxinen sind bei Menschen ASP (Vergiftung mit Krebstieren, die einen Gedächtnisschwund verursacht), PSP (Vergiftung mit Krebstieren, die Paralyse verursacht), DSP (Vergiftung mit Krebstieren, die Diärese verursacht), NSP (neurotoxische Vergiftung mit Krebstieren) und AZP (Azaspirazid Vergiftung mit Krebstieren). Auf dem Gebiet Kroatiens melden sich ASP, PSP und DSP. Krebstiere können mit Mikroorganismen kontaminiert werden. Von den Virusgruppen sind am häufigsten das Hepatitisvirus A und Noroviruse, von den Bakterien sind das Sallmonella sp., Vibrio sp., Shigella sp. und Campylobacter sp. Die Kontamination mit Schwermetallen entsteht meistens nach Verschmutzung des Meeres mit industriellem, landwirtschaftlichem und urbanem Abfall. Am gefährlichsten für die menschliche Gesundheit sind Schwermetalle Hg, As, Cd und Pb. Das Krebstierfleisch stellt ein wertvolles Nahrungsmittel dar, weil es wenig Fett enthält, und weil es eine gute Eiweißquelle ist, die größtenteils aus essenziellen Aminosäuren bestehen. Außerdem befinden sich im Fleisch Omega (Ω)-3 Fettsäuren, verschiedene Minerale (Fe, Zn, Cu), Vitamine (B12) und Phyto-sterole, die die Cholesterinresorption aus dem menschlichen Darm vermindern.

Schlüsselwörter: Krebstiere, Verschmutzungen, Toxine, Mikroorganismen, Schwermetalle

Tossine nei molluschi bivalvi

Somario

I molluschi di due valve, filtrando il cibo, sono capaci di accumulare grandi quantità di tossine derivanti dalle alghe fitoplanctoniche. Gli organismi bivalvi, anche se sono contaminati di queste tossine, sono completamente sani e non mostrano nessun cambio. Le tossine, dopo esser state consumate dai bivalvi, potenzialmente causano 5 sindromi dagli uomini: ASP, PSP, DSP, NSP e AZP. Nella legislazione croata, le tossine che causano l'intossicazione AZP appartengono alla classifica di tossine del gruppo DSP. L'amnesia è il segno tipico dell'intossicazione di tipo ASP, e quando c'è il PSP succede anche la paralisi. La diarrea è tipica per il DSP e l'AZP. L'intossicazione tipo NSP appare sulle coste dell'America Settentrionale e l'America Latina, ma anche sulla Nuova Zelanda, seguita dai problemi neurologici. Sul territorio di Repubblica di Croazia sono state trovate le tossine del gruppo ASP, PSP e DSP, e le alghe che le producono. Per determinare le tossine del gruppo ASP viene usato l'HPLC-UV, per il gruppo PSP e per gli esami biologici ai quali sottopongono i topi si usa l'HPLC-FL, e anche determinare le tossine del gruppo DSP si fanno gli esami biologici sui topi. Vari regolamenti determinano la frequenza con la quale si fa il campionamento dell'acqua dal mare sulla composizione fitoplanctonica, e anche il campionamento di molluschi bivalvi sulle tossine, ed è determinata anche la quantità massima di tossine nelle parti commestibili di molluschi bivalvi.

Parole chiave: molluschi bivalvi, inquinamento, tossine

nants in the Food chain. The EFSA Journal 723. 1-52.

Anonimno (2009a): Scientific opinion. Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal 1181. 1-61.

Anonimno (2009b): Pravilnik o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (118/2009).

Anonimno (2009.c): Pravilnik o posebnim zdravstvenim uvjetima za izlov i preradu određenih vrsta školjkaša u kojima razina biotoksina koji uzrokuje gubitak pamćenja (Amne-

sic Shellfish Poison – ASP) prelazi vrijednost određenu Pravilnikom o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 152/09).

Anonimno (2009d): Scientific opinion. Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, The EFSA Journal 1019. 1-76.

Anonimno (2009e): Scientific opinion. Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal 1109. 1-47.

Anonimno (2010): Plan praćenja kakvoće

mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (NN 37/10).

Anonimno (2011): Marikultura. <http://www.mps.hr/ribarstvo/default.aspx?id=14>

Aune, T. (2008): Risk Assessment of Marine Toxins. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 5, 6, 8.

Bogut, I., Z. Adámek, L. Horváth, I. Katavić (2006.): Ribogojstvo 2. Uzgoj toplovdnih vrsta riba. Uzgoj salmonidnih vrsta riba. Marikultura. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J.J. Strossmajera u Osijeku, 2006. 399.

- Ciminiello, P., E. Fattorusso** (2008): Chemistry, Metabolism, and Chemical Analysis. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 287, 288.
- Croonenberghs, R. E.** (2010): Contamination in Shellfish-Growing Areas. Marine & freshwater products handbook. Technomic publishing CO., INC. Lancaster. Basel, 2000. 665, 667-669, 682.
- Čadež, V., E. Teskeredžić,** (2005): Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja - zoonoze. Ribarstvo 63, (4), 2005. 135-145.
- Doucette, T. A., R. A. Tasker** (2008): Domoic Acid: Detection Methods, Pharmacology, and Toxicology. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 399, 408, 409.
- Espiña, B., N. Vilariño** (2008): Pharmacology of Pectenotoxins Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 361, 363-365.
- Halstead, B. W., E. J. Schantz** (1984): Paralytic shellfish poisoning. World health organization Geneva, 1984. 37, 38.
- Hess, P., L. Nguyen, J. Aasen, M. Keogh, J. Kilcoyne, P. Mccaron, T. Aune** (2005): Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Toxicon* 46. 62-71.
- James, K. J., G. Fernández, A. Furey, A. O'driscoll** (2008.): Azaspiracids: Chemistry, Bioconversion, and Determination. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 767, 768.
- Kodama, M., S. Sato** (2008): Metabolism of Paralytic Shellfish Toxin Incorporated into Bivalves. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 165-169.
- Kotaki, Y.** (2008): Ecobiology of Amnesic Shellfish Toxin Producing Diatoms. Seafood and Freshwater toxins. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 383.
- Lagos, N., M. Rutman, J. Blamey, M. P. Ocaranza, M. Chiong, J. P. Hinrichsen, C. Lopez** (2001): Procedure for detoxification of shellfish, contaminated with paralytic shellfish toxins.
- Leftley, J. W., F. Hannah** (2008): Phycotoxins in Seafood. Bioactive Compounds in Foods. Blackwell Publishing, 2008. 65, 68, 77-80.
- Matoničkin, I., I. Habdija, B. Primc-Habdija** (1998): Beskralješnjaci. Biologija nižih avertebata. III. prerađeno i dopunjeno izdanje. Školska knjiga. Zagreb, 1998. 593, 595-597.
- Mccarron, P., P. Hess** (2005): Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Toxicon* 47. 473-479.
- Mccaron, P., J. Kilcoyne, P. Hess** (2008): Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysitoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 51. 1081-1089.
- Moeller, P. D. R.** (2000): Shellfish Toxins. Marine & freshwater products handbook. Technomic Publishing CO., INC. Lancaster. Basel, 2000. 727-729.
- Mos, L.** (2000): Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9. 79-85.
- Otero, J. J. G.** (2008): Epidemiological Impact of Diarrhetic Toxins. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 59.
- Quilliam, M. A.** (2003): Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP). Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology. Vol. 11, Chapter 9. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO). Paris, 2003. 247-266.
- Paz, B., A. H. Daranas, J. J. Fernandez, J. M. Franco, P. Riobo, M. Norte** (2007): Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Marine Drugs* 6. 73-102.
- Ramsdell, J. S.** (2007): The Molecular and Integrative Basis to Domoic Acid Toxicity. Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry. Blackwell Publishing, 2007. 224-226.
- Reboreda, A., A. Alfonso, L. M. Botana, J. Lago, A. G. Cabado, M. Chapela, J. M. Vieites** (2009): Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* 55. 235-243.
- Rossini, G.P., P. Hess** (2010): Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Volume 2: Clinical Toxicology, 2010. 73, 83, 87, 89, 93, 94, 102, 103, 104.
- Shimizu, Y.** (2002): Biosynthesis of Important Marine Toxins of Microorganism Origins. Handbook of Neurotoxicology. Volume 1, 2002. 257.
- Thessen, A.** (2010): Pseudo-nitzschia. <http://diatoms.lifedesks.org/pages/990>.
- Toyofuku, H.** (2006): Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin* 52. 1735-1745.
- Tubaro, A., A. Bornancin, J. Hungerford, S. Sosa** (2008): Pharmacology and Toxicology of Diarrhetic Shellfish Toxins. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 231-239.
- Twiner, M. J., G. J. Doucette, P. Hess, N. Rehmann** (2007): Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts. *Marine Drugs* 6. 39-72.
- Ujević, I., Ž. Ninčević-Gladan R Roje, S. Skejić, J. Arapov, I. Marasović** (2010): Domoic Acid - A New Toxin in the Croatian Adriatic Shellfish Toxin Profile. *Molecules* 2010. 15. 6835-6849.
- van Apeldoorn, M. E., G. J. A. Speijers, H. P. van Egmond** (1999): Amnesic shellfish poisoning. National institute of public health and the environment. 27.
- Vieites, J. M., A. G. Cabado** (2008): Incidence of Marine Toxin on Industrial Activity. Seafood and Freshwater toxins. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. London. New York, 2008. 914, 915.
- Watkins, S.M., L. E Fleming, R. Hammond, A. Reich** (2008): Neurotoxic Shellfish Poisoning. *Marine Drugs* 6. 431-455.
- Wiese, M., P. M. D'Agostino, T. K. Mihali, M. C. Moffitt, B. A. Neilan** (2010): Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8. 2185-2211.
- Yakes, B. J., K. Campbell, C. T. Elliot, S. L. Degrasse, S. A. Haughey, S. Prezioso** (2010): An improved immunoassay for detection of saxitoxin by surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 156. 805, 806.

Dostavljeno: 12.2.2012.

Prihvaćeno: 12.3.2012.

