

**ДО
БЪЛГАРСКИЯТ ФОКАЛЕН
ЦЕНТЪР ПРИ EFSA**

НАУЧНО СТАНОВИЩЕ

**Относно: Оценка на риска от морски биотоксини в морски
храни, предлагани на пазара в България**

Проф. д-р Йордан Гогов ,

**Ръководител на Националния референтен център по безопасност на
хранителните продукти**

**Национален диагностичен научно-изследователски
ветеринарномедицински институт - София**

Резюме

Извършен е експертен анализ относно оценката на риска от морски биотоксини в морски храни, предлагани на пазара в България. Направен е преглед на класификацията, видовия състав и характеристиката на основните биотоксини, които са обект на мониторинг и контрол при добива и реализацията на морски храни в държавите членки на ЕС, както и в някои трети страни.

Биотоксините се акумулират в морските храни – предимно в молюски с филтърно хранене (миди, стриди, пектени) и риби като създават потенциален здравен риск за консуматора.

В становището е представена актуална информация за наличие на токсичен фитопланктон в Черно море и идентификация на някои видове морски биотоксини в черноморски миди (*Mytilus galloprovincialis*)

Оценката на риска е проведена систематично за всяка група морски биотоксини (PSP, DSP, ASP, MCP, AZA и CFP) в четири стъпки: определяне на опасността, характеристика на опасността, оценка на въздействието при излагане на съответната опасност (доза/отговор) и характеристика на риска.

Въз основа на експертния анализ за оценката на риска са формулирани основните проблеми и препоръки с цел гарантиране безопасността на морските храни, предлагани на пазара в България по отношение на морските биотоксини.

SCIENTIFIC OPINION

**Subject: Risk assessment of marine biotoxins in marine foods
marketed in the Bulgaria**

Prof dr Yordan Gogov, DVM, PhD',

Head of National Reference Center on Food Safety

National Diagnostic Research Veterinary Institute - Sofia

Summary

An expert analysis regarding the risk assessment of marine biotoxins in marine foods marketed in the Bulgaria have been performed. A review was made on the classification, species and main characteristics of biotoxins, which are subject of monitoring and control in production and marketing in the EU Member States and in certain third countries.

The biotoxins can accumulate in sea foods – mollusks with filter-feeding (mussels, oysters, cockles, scallops) and pose a health risk to humans if contaminated shellfish are consumed.

In the opinion is presented actual information for toxic phytoplankton in Black sea, as well as identification of some kinds of marine biotoxins in Black sea mussels (*Mytilus galloprovincialis*)

The risk assessment is carried out systematically for each group of marine biotoxins (PSP, DSP, ASP, NCP, AZA and CFP) in four steps: identifying danger, characteristic of the danger, impact assessment on exposure to the hazard (dose/response) and risk characterization.

On the base an expert analysis for the risk assessment we set out the key issues and recommendations for ensuring the safety of marine foods (on marine biotoxins) offered for marketed in the Bulgaria.

Морските биотоксини са отровни вещества, акумулирани от двучерупчестите мекотели в резултат на храненето с планктон, съдържащ токсини (9). Известно е, че микроскопичните планктонни алги са важен елемент от филтърното хранене на двучерупчестите мекотели (стриди, миди, пектени), обект на интензивна търговия в целия свят. От съществуващите около 5000 морски алги, 300 се оценяват като рискови по отношение продукцията на различни токсични субстанции.

Във връзка с това при производството и търговията с двучерупчести мекотели в глобален мащаб са въведени строги мерки, гарантиращи здравната безопасност на консуматора. Част от тези мерки включват системен мониторинг на токсичния фикопланктон във водите от производствените райони и трансферните зони, одобрени предварително от компетентните органи, както и мониторинг на живите двучерупчести мекотели за съдържание на морски биотоксини (15). Пробовземането е съобразено с технологичните особености на отглеждане и периодите на събиране на мекотелите в отделните райони. Отчитат се и възможните колебания в географското разпределение на токсичния фикопланктон.

Оценката на риска от морски биотоксини в двучерупчестите мекотели предлагани на пазара, е обект на задълбочен анализ, основан на мултинационални научни разработки в тясно сътрудничество с експерти на Европейския орган по безопасност на храните (EFSA) в ЕС. Европейската комисия поиска от EFSA да оцени пределните норми за различните видове регулирани и нерегулирани морски биотоксини в черупкови организми,

както и на съществуващите методи за анализ в законодателството на ЕС (17,18,21). Това е необходимо, за да бъде направен научно обоснован доклад, свързан с оценката на риска.

Изготвянето на оценката на риска е научно обоснован процес, включващ 4 етапа:

1. Определяне на опасността
2. Характеристика на опасността
3. Оценка на въздействието (доза/отговор)
4. Характеристика на риска.

1. Определяне на опасността

Опасността е наличие или условие за наличие на определен агент, който има потенциална възможност да предизвика неблагоприятен ефект върху човешкото здраве. Морските биотоксини са токсични агенти, които могат да предизвикат увреждане здравето на консуматора след консумация на контаминирани молюски.

Съвременната класификация на морските биотоксини се основава на химичната им структура и специфичните клинични симптоми представени в следните групи:

1. Паралитичен токсин (PSP)
2. Диаричен токсин (DSP)
3. Амнезиев токсин (ASP)
4. Невротоксин (NSP)
5. Азоспирациден токсин (AZA)
6. Сигуатера токсин (CFP).

Паралитичния токсин (PSP), наричан още “сакситоксин”, предизвиква паралитично отравяне след консумация на молюски (стриди, миди и др.) от рискови райони. Токсинът блокира движението на

натриевите йони през клетъчните мембрани, при което се нарушава предаването на нервните импулси. Настъпва парализа на мускулите и кардиоваскуларен шок.

Този токсин се продуцира от голям брой микроскопични алги (динофлагелати) с представители на род: *Alexandrium* (*A. tamarensis*, *A. minutum*, *A. catannella*, *A. fraterculus*, *A. fundiense*, *A. cohorticula*), род *Pyrodinium* (*P. bahamen*), род *Gymnodinium* (*G. catenatum*), някои видове родофити и синьо-зелени водорасли. При определени условия количеството на токсичните алги се увеличава значително върху повърхността на морската вода и е известно като “цъфтеж” или “червени прилив” (red tide) поради видимата промяна в цвета на водата (10,11,12). Често пъти оцветяването на водата е нееднородно с различни нюанси – от жълто-зелено до кафяво или синьо, в зависимост от вида и концентрацията на фикопланктона. Доказано е, че «експлозивния растеж» на токсичните алги е резултат от комплексното влияние на редица фактори – климат, соленост и температура на водата, скорост на вятъра, динамика на морските течения, битово и индустриално замърсяване на крайбрежните акватории и т.н. (22,23).

Проведените наблюдения върху разпространението на токсичния фикопланктон показват, че съществуват видове, които «нормално» не образуват токсини, но при дефицит на определени вещества (фосфор) се развива процес на «културална еутрофикация» и възможност за синтез на токсини (10,23,24). При своето развитие молюските филтрират огромни количества морска вода. Чрез нея токсичните алги попадат в организма, където се натрупва сакситоксин.

Диаричния токсин (DSP) предизвиква токсикоза с диаричен синдром, гадене, повръщане и коремни болки след консумация на рискови двучерупчести мекотели (стриди, миди, пектени). При този комплексен

токсин се наблюдава разнообразна биологична активност, поради неговата структурна нееднородност.

Класификацията на DSP-токсина включва 3 групи. В първата група са т.нар. кисели токсини – оокадаична киселина (OA) и съответните деривати, определени като динофизистоксини (DTX-1, DTX-2 и DTX-3). Във втората група са включени “неутрални токсини”, съдържащи полиетерни лактони, дефинирани като пектенотоксини (PTX-1, PTX-2, PTX-3, PTX-4, PTX-5, PTX-6 и PTX-7). Към третата група се отнасят токсини, съдържащи сулфатирани полиетери и техните деривати, известни като йесотоксини. В състава на DSP-токсина, освен полиетери са установени и липофилни съставки.

Доказано е че оокадаичната киселина и динофизистоксините оказват стимулиращ ефект върху туморната активност, както и генотоксично и имунотоксично действие в организма на опитни животни. Като източник на DSP-токсини се посочват голям брой динофлагелати от род *Dynophysis* (*D. fortii*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *D. tripas*, *D. hastate*, *D. saculus*), род *Prorocentrum* (*P. arenarium*, *P. concavum*, *P. lima*, *P. redfieldi*), род *Prorocentrum* (*P. oceanicum*, *P. pellucidum*) и род *Protoceratium* (*P. reticulatum*) (23,24).

Амнезиевия токсин (ASP) причинява специфична интоксикация с клиника на коремни болки, повръщане, дезориентация и амнезия. Описан е и като отравяне с молюски, съдържащи домоена киселина (DA), образувана от някои диатомни видове фикопланктон.

Първоначално DA е открита като химично съединение в макроалги от вида *Chondria armata*, а по-късно и в диатомни алги от род *Pseudo-nitzschia*. Изследванията върху състава на домоената киселина и нейните изомери – изодомоена киселина (A, B, C, D, E, F, G и H), създадоха възможност за изясняване на токсикологичната им характеристика. Основни продуценти на DA са токсични алги от род *Pseudo-nitzschia* (*P.*

delicatissima, *P. multiceris*, *P. pungens*). Способност за синтез на DA е регистриран и при някои други макроалги (*Alsidium corallinum*), диатомни алги (*Amphora coffaeformis*) и червени водорасли (*Chondria baileyana*). Сезонен цъфтеж на *Pseudo-nitzschia* spp. е описан при повишаване на температурата на морската вода в граници от 15 до 25⁰C.(3,10)

Невротоксина (NSP) предизвиква симптоми на стомашно-чревно разстройство, инхалационна недостатъчност (астма), бронхоспазми, парестезии и дерматит. Клиничните признаци се проявяват от 30 min. до 3 h след консумация на контаминирани морски храни и продължават няколко дни. Причината за описаната интоксикация е наличието на бревитоксин (BTX) в молюски, използвани за храна. Досега BTX не са открити в черупчести и риби от Европейският регион. Установяването обаче на водорасли продуциращи BTX и разширяване на тенденцията за “цъфтежи” не изключват възможността от появата им и в Европа.

Източник на бревитоксин са динофлагелати от вида *Gymnodinium breve* (11,12) и представители на родовете *Chatonella*, *Fibrocapsa*, *Gonyostomum* и *Haramonas* Тези алги синтезират вещества с действие на токсични аерозоли. Количеството им се определя в зависимост от климатичните условия и температурата на морската вода, осигуряващи интензивно развитие на динофлагелатите. Феноменът на “червени приливи” от *Gymnodinium breve* е наблюдаван през периода 1992-1993 г. в крайбрежието на Флорида, САЩ и Мексиканския залив.

Изследванията върху химическия състав и свойствата на бревитоксина, доказва, че той се състои от два типа (А и В). Представена е и химическата структура на някои аналози на бревитоксина (BTX-B1, BTX-B2, BTX-B3 и BTX-B4) в контаминирани молюски.(9) Като рискови се посочват двучерупчести мекотели от родовете *Astrovenus* и *Perna*.

Бревитоксините са мастноразтворими, циклични полиетерни невротоксини. Продукция на бревиподобни токсини е регистрирана и при 4 вида алги от клас *Raphidophyceae* (рафидофити).

Азаспирацидният токсин (AZA) причинява клинични симптоми на гадене повръщане, стомашни крампи и диаричен синдром, подобен на този при DSP токсина. Източникът на азаспирациден токсин все още не е изяснен. Проучванията на някои автори (9) макар и не категорични дават основания да се предположи, че динофлагелати от вида *Protoceratium grassipes* и рода *Protoperdinium* могат да образуват азаспирациден токсин.

За интоксикация с този биотоксин се съобщава за първи път през 1995 г. в Холандия при хора, консумирали култивирани миди от вида *Mytilus edulis*, внос от Ирландия. Наблюдаваните симптоми са били близки до тези, описани при диаричния токсин, но алги, продуциращи DSP токсин в пробите вода не са открити. Направените допълнителни анализи сочат за наличие на нов вид биотоксин – азаспирацид със специфична химическа структура.(14) По-късно са установени и негови аналози – от AZA₂ до AZA₅.Наличие на азаспирациден токсин е доказано в миденото месо на инкриминираните миди. Последните данни показват, че са диференцирани 20 различни аналози на AZA.

Проведеният разширен мониторинг след 2001 г. в Ирландия дава подробна информация за наличието на AZA в различни двучерупчести мекотели използвани за храна.. Освен в миди AZA се доказва и в стриди от вида *C. gigas*

Сигуатератоксин (CFP) предизвиква сигуатерово рибно отравяне. Като причина е описано наличието на сигуатеров токсин, акумулиран в хранителната верига от малки растителноядни риби около кораловите рифове, които служат за храна на големи хищни риби. Интоксикацията настъпва след консумация на такива тропически хищни риби от хора в тропическите райони.

Сигуатеровото отравяне (CFP) е комплексно и протича с разнообразни симптоми и клинични прояви от страна на стомашно-чревния тракт (гадене, повръщане, диария), на нервната система (изтръпвания, сърбежи) и сърдечно-съдовата система (понижаване на кръвното налягане, брадикардия) и др. В тежки случаи първите симптоми се появяват 30 min. след консумация на контаминираната риба, а при по-леките след 24- 48 h. Смъртта настъпва от сърдечна и дихателна недостатъчност. Наличната информация показва, че сигуатеровото отравяне е най-честата хранителна интоксикация от риба в света, като броят на засегнатите лица е от 10 000 до 50 000 годишно.

Източник на биотоксина са динофлагелати от вида *Gambierdiscus toxicus*, които се срещат свободно в седиментите от субтропичната и тропичната рифна система. Те синтезират два типа токсини:

- а) водноразтворим – maitotoxin (MTX_s)
- б) мастноразтворим – ciguatoxin (CTX_s).

Последният се среща в две форми – Pacific ciguatoxin (P-CTX-1, P-CTX-2 и P-CTX-3) и Caribbean ciguatoxin (CTX-1 и CTX-2) според местоположението на географските райони.(9) Токсините от групата на CFP са доста разнообразни. Досега са идентифицирани 20 аналози на P-CTX.

Напоследък определен интерес представляват проучванията върху морските биотоксини – циклични имини в черупчести мекотели. Тази група обхваща спиролиди (SPX_s), гимнодимини (GYM_s), пинатоксини (Pn-TX_s) и птериатоксини (PtTX_s). Спиролидите се продуцират от двукамшични *Alexandrium ostenfeldii*, а гимнодимините - от *Karenia selliformis*. Пинатоксините и птериатоксините все още не са напълно идентифицирани. Съществува налична информация, че спиролидите, гимнодимините, пинатоксините и птериатоксините, както и някои други имини (CL_s) като пророцентролидите и спиропророцентримините са

макроциклични съединения с имин (двойна връзка въглерод-азот) и спиро-свързаните етерни части. Поради сходство в химичната структура и токсичността им за мишки, тези различни групи токсини са обединени в една група. Има данни, че те се намират в някои микроалги и/или черупчести мекотели в определени части от Световния океан, но за сега не се свързват с интоксикации при хора.(19)

2. Характеристика на опасността

Повишената консумация на различни молюски и риби, както и недостатъчният контрол върху биологичните опасности от тези храни са причина за нарастване броя на хранителните интоксикации в световен мащаб.

Характеризирането на специфичните опасности е свързано с доброто познаване на техния произход, диагностиката и възможностите за елиминирането им от хранителната верига. Сложните взаимоотношения в екосистемата на морските пространства, голямото разнообразие на фикопланктон, молюски, риби и други хидробионти значително затруднява навременното характеризиране на потенциалните опасности. Като основна причина се посочва наличието на токсичен фикопланктон в производствените и трансферни райони. В това отношение може да бъде полезен правилно организиран мониторинг. Известно е, че планктонните популации са частични и преходни. На практика е много трудно да се установи корелация между количеството на наличния фикопланктон и нивото на морските биотоксини в молюските (10,11). Един от най-сериозните проблеми е липсата на достатъчно актуална информация за биологията на вредните алги. Слабото познаване на планктонните популации и физиологичните особености на голяма част от токсичните водорасли в регионалните крайбрежни води е констатирано от редица експерти.(9)

По-голямо внимание се отделя за предсказването на планктонния “цъфтеж”. Токсичните цъфтежи са динамични и комплексни, но не винаги достатъчно информативни за цъфтежното начало. Разчита се предимно на рутинните мониторингови програми, включващи идентификация и преброяване на токсичните видове алги в проби морска вода. Освен това прилаганите микроскопски методи са твърде бавни и отнемат значително време. От лабораторните екипи се изискват специфични таксономични умения и добра подготовка.

Наблюденията върху токсичния фикопланктон се използват като фокус за установяване на конкретна токсичност, но сами по себе си те не са достатъчни за предприемане на професионални решения. Една от причините за това са честите пропуски в мониторинговите програми, които не отразяват реално потенциалните опасности от нови планктонни цъфтежи. Резултатът от некоординираните действия е възникване на хранителни интоксикации след консумация на контаминирани молюски от “наблюдаваните” райони. Индикатори за ефектите от излагането на евентуална опасност не винаги се откриват, поради несъвършенството на редица от използваните аналитични методи и наличието на сложни смеси от морски биотоксини (9).

Наред с мониторинга върху морските алги голямо значение за характера на опасността имат и наблюденията при добива на молюските. В процеса на филтриране динофлагелатните клетки и цисти преминават в езофагуса и стомаха на двучерупчестите мекотели. Заедно с тях постъпват и токсините, които преминават от храносмилателната система в мускулатурата на молюските. Натрупването на токсини при отделните видове хидробионти протича с различна скорост и зависи от редица фактори, свързани с условията и качеството на водната среда. Установени са и сезонни различия в нивата на токсините в отделните анатомичните части на молюските (11,12).

За контрол на морските биотоксини са въведени специфични лимити, които са в тясна връзка с методите за екстракция и детекция на съответната група токсични вещества. Доказано е, че биологичните тестова (in vivo) с мишки и плъхове не са достатъчно чувствителни и показват голяма вариабилност при отчитане на резултатите във времето на тяхното провеждане.

Изпитани са и редица имунодиагностични методи - RIA, ELISA (главно за детекция на OA и DTX-1). Като най-перспективни се очертават химичните методи – TLC, GC, МЕКС (с UV детектор), LC-EST-MS, LC-MS и HPLC. Тези методи дават възможност за откриване на ниски количества биотоксини, при това с висока селективност и структурно разделяне на природно лабилните токсини. Секвенирането на сложни смеси е бързо, прецизно и необходимо, както и за потвърждаване химичната структура на познати токсични субстанции, така и на нови видове морски биотоксини.

Определен успех има и по отношение на осигуряването на сертифицирани референтни материали за специализираните лаборатории. Като надежден и съвременен нов подход се очертава и усъвършенстването на биосензори за едновременна детекция на голям брой токсини.

Апробирането и въвеждането на бързи аналитични методи може да ускори диагностиката и да разшири базата данни в информационната мрежа. Тези данни трябва да включват основните параметри за характеристиката на токсичния агент: химично наименование, основни физични и химични свойства, класификация, произход, токсичен ефект и регулаторен лимит (9).

3. Оценка на въздействието (доза/отговор) при излагане на опасност

Независимо от многобройните съобщения за възникване на заболяване след консумация на контаминирани с морски биотоксини молюски и риби, е много трудно да се получат достоверни данни за тяхната токсичност при хора. При сакситоксините са идентифицирани повече от 30 аналози, от които най-токсични се оценяват STX, NeoSTX, GTX1 и dc-STX. Като пример се представят големите колебания в наблюдаваната токсичност на PSP токсина при човека (12,16,23). Според експертите това се дължи не само на различната чувствителност към токсина при отделните лица, но и от състава на съответния токсин в изпитваната проба. Токсиновият профил се влияе както от вида и количеството на консумираните молюски, така и от начина на техния добив.

Токсикологичната база данни за токсините от групата STX е ограничена до изследвания на острата токсичност след интраперитонеално инжектиране на опитни животни. Токсичните дози най-често са оценявани по отношение на регламентирания допуск или неговото значително превишаване. Изискването за репрезентативност не е задължително, тъй като STX токсина не се разпространява равномерно до крайните лотове при отделните видове молюски. За целите на мониторинга се използва метода на HPLC и множители на токсичен еквивалент (TEFs) за изразяване на откритите аналози като STX еквивалент.. Няма данни за хронично въздействие за тези токсини при животни и хора, поради което на този етап не е определен поносим дневен прием (TDI). Поради острата токсичност на STX токсините Панелът за контаминанти в хранителната верига (CONTAM) при EFSA предлага остра референтна доза (ARfD) от 0.5 mg/STX еквивалент/kg телесно тегло, изхпождайки от профилите на токсините и броят на аналозите, както и от чувствителността на прилаганите аналитични методи. Налага се извода, че е налице значителна несигурност при определяне на експозицията за STX и рисковете свързани

с консумацията на мекотели . Съществуват и различия в условията на екстракция на токсините от месото на моллюските. Прилагането на алтернативни техники в т.ч. и биомолекулярни е перспективно. Някои от тях са подходящи за скринингови и потвърдителни анализи, но все още не са валидирани в междулабораторни изследвания по одобрени протоколи, поради което е невъзможно да бъдат реално оценени и сравнени с официалните методи.

Разнообразието от биологична активност при DSP-токсина е причина за някои диагностични проблеми.(9,24) Въпреки че пектенотоксините и йесотоксините предизвикват остра токсичност при мишки след интраперитонеално въвеждане, тяхната орална токсичност за човека е все още непозната (9).

Подобни трудности се констатират при NSP-токсина и по-специално за бревитоксините. Липсват системни изследвания за тези токсини при експерименти с опитни животни, които да определят поносимия дневен прием (TDI). Изхождайки от острата токсичност на ВТХ експертите от Панела CONTAM на EFSA считат, че е необходимо да определи остра референтна доза (ARfD) за ВТХ. Установено , че освен по орален път тези токсини постъпват и инхалаторно (аерозолни бревитоксини) или чрез директен (дермален) контакт с контаминирана морска вода. Токсичните ефекти имат специфична характеристика и въздействие върху човека, при което са трудни за оценяване. Все още наличните данни за токсичност на бревитоксините са ограничени. Проведени са остри опити с мишки, но острите дермални, инхалационни, биологични експерименти не са достатъчни за формулиране на категорични научно обосновани заключения. Все още липсват актуални данни за хроничната токсичност на ВТХ , поради което е трудно да се оценява риска за тяхната токсичност в черупчести мекотели предлагани на пазара в ЕС. Използваният биологичен тест с мишки за детекция на ВТХ в черупчести мекотели

показва слаба специфичност и не осигурява достатъчна информация за токсинния профил. Отсъстват и официално валидирани методи за доказване на ВТХ.(20)

В Европейският съюз не са въведени норми за токсини от групата на СТХ, но законодателството въвежда изисквания за проверки с цел поемане на гаранция от бизнес-операторите, че рибните продукти предлагани на пазара не съдържат сигуатоксин. Токсикологичната информация за СТХ е недостатъчна и се отнася главно до изпитване на острата токсичност след интравенозно инжектиране на опитни животни.. До момента не са публикувани експериментални данни за хроничният ефект, въз основа на които да се изчисли поносимия дневен прием (TDI) . Има съобщения за случаи на СFP в Тихоокеанския регион след консумация на риба съдържаща еквивалента на 0.1-5 mg P-СТХ-/kg месо от риба. За сега е трудно да се коментира риска свързан с експозиция на токсини от групата СТХ в риби, достигащи на пазара в ЕС.

Отчитайки важността за оценка на въздействието доза/отговор при излагане на опасност от морски биотоксини EFSA излезе със специално научно становище относно количеството реалистична (средно голяма порция) от черупкови организми, използвани като храна с цел установяване на допустими нива за токсините (21). Въз основа на наличните данни за потребление, експертите от панела на EFSA за контаминанти в хранителната верига, определиха порцията 400 g месо от молюски като достатъчно обективно количество за консумация в Европа, което да се използва като база при оценката на риска.

4. Характеристика на риска

Мониторингът на фикопланктона, двучерупчестите мекотели и риби за съдържание на морски биотоксини е съществен за характеристиката и управлението на риска. Прилагането на съвременни и достоверни методи

за детекция на токсините е важно условие за контрол на установените лимити в европейското законодателство.

През м. юли 2006 г. Европейската комисия поиска от EFSA да изготви научно становище за оценка на сегашните максимално допустими граници и методи за анализ на различните видове биотоксини, както са определени в законодателството на ЕС, включително и новооткрити токсини. Последното от поредицата становища беше публикувано на 24.07.2009г.

За доказване на липофилните биотоксини се използва биологичния тест с мишки и плъхове. Според експертите на EFSA биологичния тест притежава редица недостатъци и не е подходящ за целите на официалния контрол, поради голямата вариабилност на резултатите, ограничената специфичност и ниският капацитет за детекция на липофилните токсини.. Неотдавна бяха разработени алтернативни техники за определяне на морските биотоксини с възможности за откриване на по-ниски стойности. Тези техники са изпитани в рамките на задълбочени изследвания преди тяхното утвърждаване. Като пример може да се посочи метода на течна хроматография-масова спектрометрия (LC-MS/MS), който е утвърден под ръководството на Референтната лаборатория за морски биотоксини в ЕС, по време на междулабораторно изпитване за утвърждаване на метода, проведено от държавите членки. Апробираният метод следва да се прилага като референтен за откриване на липофилни токсини и да се използва в рутинната лабораторна практика при официалния контрол на всеки етап от хранителната верига, както и при самоконтрола, провеждан от бизнес операторите на морски храни.

Освен посочения метод за детекция на липофилни токсини може да се прилагат и други техники при условие, че съответстват на критериите за ефективност на метода определен от Референтната лаборатория на ЕС. Такива методи трябва да са утвърдени на вътрешно-лабораторно ниво и да

са изпитани успешно чрез призната схема за тестване на тяхната ефективност. При спорни резултати като референтен метод се прилага LC-MS/MS, определен от CRL.

Все пак Европейската комисия счита, че за определен период от време може да продължи използването на биологичния метод докато страните членки се подготвят за прилагане на химическия метод. След това биологичният тест може да се използва само при периодичния мониторинг на производствените райони и трансферните зони за откриване на нови или на неизвестни видове морски биотоксини. Посочените мерки са в съответствие със становището на Постоянният комитет по хранителната верига и здравето на животните в ЕС.

В Регламент (ЕС) №2074/2005, Приложение III (7) са въведени следните признати методи за изпитване и откриване на морски биотоксини в двучерупчести мекотели:

1. Метод за откриване на PSP-токсин в ядливите части на мекотелите по биологичен метод. Като алтернатива може да се използва метода на Lawtence (АОАС оф. метод 2005.06). При спорни резултати като референтен се прилага биологичния метод.

2. Метод за откриване на ASP-токсин в ядливите части на мекотелите чрез HPLC или ELISA (АОАС оф. метод 2006.02). При съмнителни резултати като референтен метод се използва HPLC.

3. Метод за откриване на липофилни токсини с LC-MS/MS (изменен с Регламент (ЕС) № 15/2011 (8), с който се определят най-малко следните съединения:

а) токсини от групата окадаична киселина : ОА, DTX1, DTX2 , DTX3 в ключително и техните естери;

б) токсини от групата на пектенотоксините: РТХ1 и РТХ2;

в) токсини от групата на йесотоксините: УТХ, 45 ОН УТХ, хомо УТХ и 45 ОН хомо УТХ;

г) токсини от групата на азаспирацидите: AZA1, AZA2 и AZA3.

Общата токсична еквивалентност се изчислява като се използват факторите за токсична еквивалентност (TEFs), препоръчани от EFSA.

Ако се открият нови аналози от значение за общественото здраве, следва да бъдат включени в анализа

В Регламент (ЕС) №2074/2005 (7) са установени подробни правила за прилагане на биологичните методи с мишки и плъхове за детекция на някои групи токсини.

За да се позволи на държавите членки да приспособят техниките си си към метода LC-MS/MS, (както е определен в Регламент (ЕС) №15/2011) се допуска до 31.12.2014 г. да бъде използвана серия от процедури с мишки за изследвания, различни в тестовата порция (хепатопанкреас или цяло тяло), и разтвори за екстракция и пречистване за откриване на морски биотоксини, посочени в глава V, т.2, букви в), г) и д) от раздел VII на Приложение III към Регламент (ЕС) №853/2004.

Съгласно здравните стандарти за живи двучерупчести мекотели, определени с Регламент (ЕС) №853/2004 (15), количеството на общите морски токсини не трябва да превишава следните лимити:

1. PSP-токсин – 800 µg/kg,
2. ASP токсин - 20 mg/kg домоена киселина,
3. OA, DTX и PTX (общо) – 160 eq.µg OA/kg,
4. YTX – 1 eq.µg/kg и 5. AZA – 160 eq.µg/kg азаспирацид.

Анализ на актуалната информация за риска от биотоксини в морски продукти от Черно море

1.Проучвания върху нови видове фитопланктон в Черно море

През последните години в различни акватории на Черно море все по-често се регистрират нови нехарактерни видове фитопланктон

(1,2,4,5,6,25,26). Редица изследователи свързват този факт с баластните води пренасяни от търговските кораби (1,5,6).

Неотдавна бше установено, че в Украинското черноморско крайбрежие от известните 28 вида фитопланктон - 5 са пренесени с баластни води от корабите пристигащи от умерено тропическите ширини на Атлантическия, Тихия, Индийския океан и Средиземно море (*Gymnodinium uberrimum*, *Spatulodinium pseudonoctiluca*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium ef. aureolum*, *Alexandrium pseudogoniaulax*.) (5) Някои от планктонните видове алги, откривани преди това само в северозападната част на Черно море и в района на Босфора, вече се установяват в северните и североизточните акватории

Последният преглед на фитопланктона в североизточните райони на Черно море е извършен от Вершинин и сътр. (2), Verschinin and Morton (25), Verschinin et al. (26) през периода 2000-2006 г. , които доказват някои нови потенциално токсични видове динофити и диатомни алги като *Alexandrium minutum*, *Protoperidinium ponticum*, *Pseudo-nitzschia pungens* и др. Заселването и масовият растеж на тези видове създава реален риск от негативни последици за водната среда и човешкото здраве. Според Сеничева (4) успешното аклиматизиране на новите видове алги ще доведе до значително разнообразие в хранителната база на хидробионтите в Черно море. Появата на токсични видове алги създава опасност за живота на морските обитатели, които използват за храна фитопланктон, като и интоксикации при хора след консумация на контаминирани с морски биотоксини храни.

В тази връзка важен елемент от веригата за разпространение на опасни видове алги в Черно море е ролята на баластните води от транспортните кораби. Наред с това се констатира значително увеличение на количеството фосфорни и азотни съединения постъпващи в Черно море чрез големите реки – Дунав, Днепър и Днестър, което се отразява

върху развитието на фитопланктона . Рискът от настъпване на сериозни неблагоприятни промени в екосистемата на Черно море изисква провеждане на постоянен мониторинг върху динамиката и видовия състав на фитопланктона в крайбрежните черноморски зони и баластните води от транспортните съдове.

2.Проучвания върху наличието на морски биотоксини в молюски от Черно море

Проучванията върху разпространението на нови видове фитопланктон в Черно море са тясно свързани с изследванията за наличие на морски биотоксини в някои мекотели използвани за храна. При анализ на проби (хепатопанкреас)от култивирани черноморски миди(*Mytilus galloprovincialis*), улов от кавказкото крайбрежие на Черно море Morton et al.(13) доказват високо съдържание на йесотоксин(ҮТХ),карбокси-йесотоксин (СООН-ҮТХ), 45-хидрокси-йесотоксин (45-ОН-ҮТХ) и хомо-йесотоксин (homoҮТХ). Като потенциален източник на йесото ксин се посочват установените в региона два вида динофлагелати *Lingulodinium polyedrum* и *Gonyaulax spinifera*.

Освен доминиращият йесотоксин (98%) в мидите са открити и малки количества други биотоксини – пектенотоксини (РТХ2, РТХ2_{sa}, РТХ1/11 и РТХ1/11_{sa}) – 1.8% и окадаична киселина (ОА) – 0.2%.

През периода 2009-2011г са проведени изследвания за наличие на амнезиев токсин (ASP) в култивирани миди (*Mytilus galloprovincialis*) от 7 ферми на българското черноморско крайбрежие (3). Установени са ниски концентрации на домоена киселина (DA) - от 0.02 до 0.55 mg/kg. Продължават проучванията за наличие на други видове биотоксини в двучерупчести мекотели от северната и южна част на българското крайбрежие

Контролът за токсичен фитопланктон и морски биотоксини в живите двучерупчести мекотелиот производствените райони и

трансферните зони се извършва в съответствие с изискванията на Регламент (ЕС) №853/2004, Приложение III, раздел VII(15); Регламент (ЕС) №854/2004(16), Приложение II и Регламент (ЕС) №2074/2005, Приложение III (7), изменен с Регламент (ЕС) № 15/2011.(8)

Литература

1. **Александров, Б.** (2004) Проблема переноса водный организмов с судами и некоторые подходы к оценке риска новых инвазий. Морск. Эколог. Журн., Т.3, №1, 5 -16.
2. **Вершинин, А., А. Моручков** (2003) Потенциально-токсичные водорасли в прибрежном фитопланктоне северо-восточной части Черного моря. Экология моря, Вып. 64, 45 -50.3
3. **Пенева, В., Й. Гогов, Г. Калинова, А. Славова** (2011) Приложение на течнохроматографски метод за определяне на амнезиев токсин в двучерупчести мекотели. Юбилейна научна сесия “110 години НДНИВМИ”, Сборник доклади и постери, 210 -213.
4. **Сеничева, М.** (2002) Новые и редкие для Черного моря виды диатомовых динофитовых водораслей,. Экология моря, Вып. 62, 25 - 29.
5. **Теренько, Л.** (2005) Новые для Черного моря виды *Dinophyta*, .Альгология,Т 15, №2, 236 -245.
6. **Ясакова, О.** (2010) Новые виды в составе фитопланктона Северо-восточной части Черного моря. Российский Журнал Биологических Инвазий №4, 90-97.
7. **Commission Regulation (EC) №2074/2005** of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) №853/2004 of European Parliament and the Council and for the

organization of official controls under Regulation (EC) № 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) № 882/2004 of the Council, derogating from Regulation (EC) № 852/2004 of the European Parliament and the Council and amending Regulations (EC) № 853/2004 and Regulations (EC) № 854/2004.

8. **Commission Regulation (EU) №15/2011** of 10 January 2011 amending Regulation (EC)№ 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve mollusks.
9. **Egmond, H., M. Van Apeldoorn, G. Speijers** (2004). Marine biotoxins, FAO, paper 80, 278 p.
- 10.**Hallengraeff, G., D. Anderson, A. Cembella** (1995) Manual on harmful marine microalgae, IOC, Manuals and Guides №33, UNESCO.
- 11.**Lindahl, O.** (1998) Occurrence and monitoring of harmful algae in marine environment. In M. Miraglia, H. van Egmond, C. Bera, J. Gilbert (1998) Mycotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety. Proceeding of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, pp. 409-423.
- 12.**Mons, M. , H. van Egmond, G. Peijers** (1998) Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802
- 13.**Morton, S., A. Vershinin, T. Leighfield, L. Smith, M. Quilliam** (2007) Identification of yessotoxin in mussels from the Caucasian Black sea Coast of the Russian Federation, *Toxicon*, 50:581-584.
- 14.**Opinion of the Scientific** on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids. *The EFSA Journal* (2008); 723,1-52.
- 15.**Regulation (EC) № 853/2004** of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin.

- 16.Regulation (EC) № 854/2004** of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption
- 17.Scientific Opinion** of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Saxitoxin Group. The EFSA Journal (2009), 1019, 1-76.
- 18.Scientific Opinion** of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Sumarary on regulated marine biotoxins. The EFSA Journal (2009), 1306, 1-23.
- 19.Scientific Opinion** on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spiuroolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). The EFSA Journal (2000); 8, (6):1628.
- 20.Scientific Opinion** on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group. The EFSA Journal (2010), 8,(7):1677.
- 21.Scientific Opinion** of the Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM): Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data. The EFSA Journal (2010), 1706, 1-20.
- 22.Siu, G., M. Young, D. Chan** (1997) Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catanella*. Hydrobiologia 352: 117-148.
- 23.Van Egmond, H., T. Aune, P. Lassus, G. Speijers, M. Waldock** (1993) Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. J. Nat. Toxins, 2: 41-83.
- 24.Van Egmond, H.G. Speijers** (1999) Nature toxins II. Phycotoxins. In Van der Heijden, K. et al. International Food Safety Handbook Science, Int. Regulation and Control, pp. 357-368.

- 25. Vershinin, A., S. Morton** (2005) *Protoperidinium ponticum* sp. Nov. (Dinophyceae) from North-East Black Sea . *Botanica marina*, 48, 244-247.
- 26. Vershinin, A., S. Morton , T. Leighfield et al.** (2006) *Alexandrium* in the Black Sea – identity, ecology and PSP toxicity. *African Journal of Marine Science*, 28, № 2, 209-213.