



Hrvatska agencija za
poljoprivredu i hranu

Croatian Agency for
Agriculture and Food

L'Agence Croate pour
l'Agriculture et l'Alimentation



KLASA:642-01/23-01/4
URBROJ:396-08-03/02-24-37
Osijek, 12.0žujka 2024 godine

ZNANSTVENO MIŠLJENJE
O MORSKIM BIOTOKSINIMA U ŠKOLJKAŠIMA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Brigita Hengl, Jasenka Petrić, Andrea Gross – Bošković, Ivana Ujević, Eddy Listeš,
Tanja Bogdanović, Natalija Džafić, Kristina Kvirgić

CENTAR ZA SIGURNOST HRANE

Ivana Gundulića 36b, 31000 Osijek, tel: +385 31 214 900, e-mail: csh@hapih.hr, www.hapih.hr

MB:2528614, OIB: 35506269186, IBAN: HR1210010051863000160

Dokument izrađen temeljem zahtjeva Centra za sigurnost hrane

Usvojeno 11.03.2024

Dostupno na: [Upisnik znanstvenih mišljenja - Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu \(hapih.hr\)](#)

Korespondencija: info.csh@hapih.hr

Klasa: 642-01/23-01/4

Ur. Broj: 396-08-03/02-24-37

ČLANOVI *AD HOC* STRUČNOG TIJELA - AUTORI

1. dr. sc. Brigita Hengl, Centar za sigurnost hrane, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu – predsjednica Stručnog tijela
2. dr. sc. Jasenka Petrić, Centar za sigurnost hrane, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu – zamjenica predsjednice
3. Andrea Gross – Bošković, dipl.ing.preh.teh. i biotech., Centar za sigurnost hrane, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
4. dr. sc. Ivana Ujević, Institut za oceanografiju i ribarstvo
5. dr. sc. Eddy Listeš, Hrvatski veterinarski institut, podružnica Veterinarski zavod Split
6. dr. sc. Tanja Bogdanović, Hrvatski veterinarski institut, podružnica Veterinarski zavod Split
7. dr. sc. Natalija Džafić, Hrvatski veterinarski institut, podružnica Veterinarski zavod Rijeka
8. dr. sc. Kristina Kvirgić, dipl. san. ing., Hrvatski veterinarski institut, podružnica Veterinarski zavod Rijeka

Izjave o sukobu interesa:

Autori nisu bili u izravnom ili neizravnom, financijskom, gospodarskom ili bilo kojem drugom osobnom interesu koji bi se mogao smatrati štetnim za njihovu nepristranost i neovisnost u okviru izrade ovog dokumenta.

Zahvale:

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Centar za sigurnost hrane zahvaljuje se dr. sc. Ranki Šimić na potpori prilikom izrade ovog znanstvenog mišljenja u dijelu koji je vezan za zakonodavstvo, te članovima *ad hoc* stručnog tijela za donošenje Znanstvenog mišljenja o morskim biotoksinima u Republici Hrvatskoj na doprinosu prilikom izrade ovo Znanstvenog mišljenja.

Predloženo citiranje:

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, *Ad hoc* stručno tijelo, Hengl B, Petrić J, Gross Bošković A, Ujević I, Listeš E, Bogdanović T, Džafić N, Kvirgić K, 2024. Znanstveno mišljenje o morskim biotoksinima u školjkašima u Republici Hrvatskoj.

Sažetak

Morski biotoksini su termostabilni prirodni organski spojevi, produkti toksičnih vrsta fitoplanktona ili njihovi derivati koji se nakupljaju u školjkašima, ribama i drugim morskim organizmima.

Prema strukturi spadaju u neproteinske toksine, a prema topljivosti dijele se na topljive u vodi (hidrofilne) i na one topljive u mastima (lipofilne). Propisima EU i RH u pogledu najvećih dopuštenih količina (NDK) u živim školjkašima obuhvaćeno je više skupina: azaspiracidi (AZA), okadaična skupina (okadaična kiselina i dinofizistoksini), jesotoksini (YTX), domoična i epi-domoična kiselina (DA) i paralitički toksini (PSP).

Lipofilni toksini (LT) okadaične skupine i azaspiracidi izazivaju trovanja koja se očituju simptomima probavnog sustava, poput mučnine, povraćanja, grčeva i proljeva. Simptomi se javljaju već 30 minuta do nekoliko sati nakon konzumiranja kontaminiranih školjkaša i traju u prosjeku tri dana. Jesotoksini su lipofilni morski biotoksini za koje nije dokazano da uzrokuju trovanja ljudi, međutim aplicirani pokusnim životinjama intraperitonealno iskazuju velik toksični učinak (EFSA, 2009.a). Isto se odnosi i na pektenotoksine (PTX) za koje su utvrđene akutne referentne doze (ARfD) (EFSA, 2009.b), ali nisu više obuhvaćeni propisima EU i RH koji se odnose na NDK.

Hidrofilni morski biotoksini (HT) su neurotoksini domoična i epi-domoična kiselina, te skupina paralitičkih morskih biotoksina koji mogu izazvati ozbiljna trovanja ljudi, ponekad sa smrtnim ishodom. Trovanje DA izaziva simptome probavnog sustava, ali i neurološke simptome kao što su dezorijentiranost, zbunjenost, promjena ponašanja, glavobolja, konvulzije i koma (Todd, 1993.; Perl i sur., 1990). U najtežim slučajevima dolazi do mišićne paralize i gušenja, a smrt nastupa zbog gušenja uslijed respiratorne paralize i kolapsa srčanožilnog sustava, najčešće unutar dvanaest sati (Prakash i sur., 1971).

Morski biotoksini nakupljaju se u školjkašima, a kako su termostabilni, štetno djelovanje na zdravlje ljudi ispoljava se akutno, nakon konzumacije u slučaju kada su prisutni u školjkašima u koncentracijama u kojima mogu imati štetni utjecaj na zdravlje. Slučajevi trovanja ljudi se često ne prijavljuju nadležnim zdravstvenim ustanovama, jer iako neugodni, uglavnom prolaze bez potrebe za liječničkom intervencijom. Iz tog se razloga stječe dojam da su slučajevi trovanja morskim biotoksinima iznimno rijetki.

U Republici Hrvatskoj (RH) se već godinama provodi kontinuirani monitoring morskih biotoksina u školjkašima. Uzorkuju se slijedeće vrste školjkaša: dagnje (*Mytilus galloprovincialis*), vongole (*Venerupis decussata*), kamenice (*Ostrea edulis*), kapice (*Aequipecten opercularis*), rumenke (*Callista chione*) i prnjavice (*Venus verrucosa*).

U ovom znanstvenom mišljenju obrađeni su rezultati monitoringa koji se provodio u vremenu od 2017. do 2022. godine za skupinu amnezijских morskih biotoksina (ASP), za skupinu azaspiracida (AZA), za skupinu morskih biotoksina okadaične kiseline (OA), za skupinu paralitičkih morskih biotoksina (PSP) i za skupinu jesotoksina (YTX).

Kako bi se utvrdila stvarna izloženost konzumenata morskim biotoksinima iz školjkaša korišten je izračun prosječnih vrijednosti za UB, MB, LB scenarij i za najveću koncentraciju koji su kombinirani s najvećim unosom školjkaša koji je izračunat prema podacima o prehranbenim navikama u RH koje su prikupljene 2011/12. godine. Osim toga procijenjena je izloženost u slučaju pretpostavke da se u školjkašima nalazi najveća zakonski dopuštena količina (NDK),

te u slučaju s korigiranom veličinom porcije zbog mogućeg utjecaja termičke obrade na koncentraciju morskih biotoksina, za koje se koristila veličina porcije od 400 g koju je koristila EFSA prilikom izrade svojih znanstvenih mišljenja, u kojima je uspostavila trenutne akutne referentne doze (ARfD) za svaki od praćenih morskih biotoksina.

Procjena izloženosti za AZA nije napravljena iz razloga što ovaj morski biotoksin nije utvrđen niti u jednom uzorku u praćenom vremenu u količini iznad limita detekcije/kvantifikacije (LOD/LOQ). Stoga se može zaključiti da je rizik za konzumente u ovom slučaju zanemariv.

Procjena izloženosti za ASP u pretpostavljenom slučaju konzumacije predložene EFSA-ine porcije i u slučaju koncentracije koja je jednaka vrijednosti NDK, može dovesti do unosa ASP koji prelazi vrijednost ARfD-a. ASP je kvantificiran u nekim uzorcima, ali niti u jednom nije imao koncentraciju jednaku ili veću od NDK. Stoga se rizik u ovom slučaju može smatrati zanemarivim.

Procjena izloženosti za OA ukazuje na mogućnost unosa OA većeg od ARfD u određenim slučajevima, od kojih je najizvjesniji slučaj najveće koncentracije i konzumacije najveće porcije u RH za dagnje, što znači da postoji rizik za konzumente. Koncentracija za OA osim što je utvrđena iznad LOD/LOQ, utvrđena je i u vrijednosti iznad NDK u 2,22 % uzoraka dagnji, 0,62 % uzoraka kamenica i 0,15 % uzoraka kapica.

Procjena izloženosti za PSP ukazuje na mogućnost unosa PSP većeg od ARfD u određenim slučajevima, od kojih je najizvjesniji slučaj najveće koncentracije i konzumacije najveće porcije u RH za dagnje, što znači da postoji rizik za konzumente. Koncentracija za PSP osim što je utvrđena iznad LOD/LOQ, utvrđena je i u vrijednosti iznad NDK u 0,51 % uzoraka dagnji i 0,31 % uzoraka kapica.

Procjena izloženosti za YTX nije niti u jednom slučaju dovela do unosa YTX koji prelazi vrijednost ARfD-a. YTX je kvantificiran u nekim uzorcima, ali niti u jednom nije imao koncentraciju jednaku ili veću od NDK. Stoga se rizik u ovom slučaju može smatrati zanemarivim.

Prilikom tumačenja rezultata ovog znanstvenog mišljenja, mora se uzeti u obzir kako su uzorci čiji su rezultati analiza na morske biotoksine obrađeni u ovom znanstvenom mišljenju uzorkovani na mjestu uzgoja/izlova školjkaša i kako se ti školjkaši nisu niti našli na tržištu, te kako u ovim slučajevima konzumenti nisu bili niti izloženi morskim biotoksinima. To upravo i jest svrha i opravdanje opsežnog monitoringa koji se provodi i za koji je, uz određena poboljšanja, dana preporuka za njegov nastavak.

Ključne riječi: Morski biotoksini, školjkaši, procjena izloženosti

Summary

Marine biotoxins are thermostable, mostly non-protein molecules with different chemical components. According to solubility, they are divided into water-soluble (hydrophilic) and fat-soluble (lipophilic). The regulations of the EU and the Republic of Croatia regarding the maximum limits (ML) in live shellfish cover several groups: azaspiracids (AZA), okadaic group (okadaic acid and dinophysistoxins), yessotoxins (YTX), domoic and epi-domoic acid (DA) and paralytic toxins (PSP).

Lipophilic toxins (LT) of the okadaic group and azaspiracids cause poisoning manifested by symptoms of the digestive system, such as nausea, vomiting, spasm and diarrhea. Symptoms appear as early as 30 minutes to several hours after consuming contaminated shellfish and last approximately for three days. Yessotoxins are lipophilic marine biotoxins that have not been proven to cause human poisoning, however, when applied to experimental animals intraperitoneally, they show a high toxic effect (EFSA, 2009a). The same applies to pectenotoxins (PTX) for which acute reference doses (ARfD) have been determined (EFSA, 2009b), but are no longer covered by EU and Croatian regulations related to ML.

Hydrophilic marine biotoxins (HT) are the neurotoxins domoic (DA) and epi-domoic acid, and a group of paralytic marine biotoxins that can cause serious poisoning in humans, sometimes with a fatal outcome. DA poisoning causes gastrointestinal symptoms, but also neurological symptoms such as disorientation, confusion, behavioral changes, headache, convulsions and coma (Todd, 1993; Perl et al., 1990). In the most severe cases, muscle paralysis and suffocation occur, and death occurs due to suffocation due to respiratory paralysis and collapse of the cardiovascular system, usually within twelve hours (Prakash et al., 1971).

Marine biotoxins accumulate in shellfish, and as they are thermostable, the harmful effect on human health is manifested acutely, after consumption, in the case when they are present in shellfish in concentrations where they can have a harmful effect on health. Cases of human poisoning are often not reported to the competent health institutions, because although unpleasant, they mostly pass without the need for medical intervention. For this reason, one gets the impression that cases of poisoning by marine biotoxins are extremely rare.

In the Republic of Croatia, continuous monitoring of marine biotoxins in shellfish has been carried out for years. The following types of shellfish are sampled: mussels (*Mytilus galloprovincialis*), clams (*Venerupis decussata*), oysters (*Ostrea edulis*), queen scallops (*Aequipecten opercularis*), smooth clam (*Callista chione*) and warty venus (*Venus verrucosa*).

This scientific opinion represents the results of the monitoring carried out between 2017 and 2022 for the group of amnesic marine biotoxins (ASP), for the group of azaspiracids (AZA), for the group of marine biotoxins of okadaic acid (OA), for the group of paralytic of marine biotoxins (PSP) and for the group of yessotoxins (YTX).

In order to determine the actual exposure of consumers to marine biotoxins from shellfish, the calculation of average values for the UB, MB, LB scenario and for the highest concentration was used, which were combined with the highest intake of shellfish, which was calculated according to food consumption data in the Republic of Croatia that were collected in 2011/12 years. In addition, the exposure was assessed in the case of the assumption that shellfish contain the maximum legally permitted amount (ML), as well as the case with the corrected portion size due to the possible influence of heat treatment on the concentration of marine biotoxins, and the portion size of 400 g used by EFSA when preparing of its scientific opinions,

in which it established current acute reference doses (ARfD) for each of the marine biotoxins monitored.

An exposure assessment for AZA was not made because this marine biotoxin was not detected in any sample during the monitored time in an amount above the limit of detection/quantification (LOD/LOQ). Therefore, it can be concluded that the risk for consumers in this case is negligible.

An exposure assessment for ASP in the assumed case of consumption of the proposed EFSA portion and in the case of a concentration equal to the NDK value, may lead to an intake of ASP that exceeds the ARfD value. ASP was quantified in some samples, but none had a concentration equal to or higher than ML. Therefore, the risk in this case can be considered negligible.

The exposure assessment for OA indicates the possibility of intake of OA greater than the ARfD in certain cases, the most certain of which is the case of the highest concentration and consumption of the largest portion in the Republic of Croatia for mussels, which means that there is a risk for consumers. The concentration for OA, in addition to being found above the LOD/LOQ, was also found to be above the ML in 2.22% of mussel samples, 0.62% of oyster samples and 0.15% of scallop samples.

The exposure assessment for PSP indicates the possibility of intake of PSP higher than the ARfD in certain cases, the most certain of which is the case of the highest concentration and consumption of the largest portion in the Republic of Croatia for mussels, which means that there is a risk for consumers. The concentration for PSP, in addition to being above the LOD/LOQ, was also above the ML in 0.51% of mussel samples and 0.31% of scallop samples.

The exposure assessment for YTX did not lead to YTX intake exceeding the ARfD value in any case. YTX was quantified in some samples, but none had a concentration equal to or greater than ML. Therefore, the risk in this case can be considered negligible.

When interpreting the results of this scientific opinion, it must be taken into account that the samples analyzed for marine biotoxins were collected directly from the shellfish breeding/harvesting areas for monitoring purposes. It's important to note that these shellfish weren't placed on the market, meaning consumers weren't exposed to marine biotoxins from these samples. This underscores the purpose and justification of the currently conducted extensive monitoring programme. Furthermore, recommendations for its continuation have been made, with certain improvements suggested.

Key words: Marine biotoxins, shellfish, exposure assessment

SADRŽAJ

Sažetak	1
Summary	3
1. Uvod.....	7
1.1. Pozadina slučaja.....	7
1.2. Zakonodavni okvir.....	7
1.2.1. Propisane metode laboratorijskih analiza morskih biotoksina	10
1.2.2. Najveće dopuštene vrijednosti.....	10
1.2.3. Postupanje u slučaju nesukladnih vrijednosti.....	11
2. Podaci i metodologije	13
2.1. Podaci.....	13
2.1.1. Podaci o pojavnosti i koncentracijama morskih biotoksina.....	13
2.1.2. Podaci o prehrambenim navikama	17
2.1.3. Normativ porcije dagnji u restoranu	20
2.2. Metodologije	20
2.2.1. Prikupljanje uzoraka školjkaša	20
2.2.2. Analitičke metode	24
2.2.3. Procjena izloženosti	25
2.2.4. Utjecaj termičke obrade na procjenu izloženosti.....	25
2.2.5. Vrijednosti za procjenu štetnog utjecaja na zdravlje	26
3. Identifikacija opasnosti	28
3.1. Pojavnost toksičnih fitoplanktona i morskih biotoksina	28
3.2. Razlika u kumulaciji morskih biotoksina među vektorima	30
3.3. Skupina amnezjskih toksina	31
3.4. Skupina azaspiracida	31
3.5. Okadaična skupina	32
3.6. Skupina paralitičkih toksina	32
3.7. Skupina jesotoksina	33
3.8. Novi morski biotoksini	33
4. Karakterizacija opasnosti.....	35
4.1. Skupina amnezjskih toksina	35
4.2. Skupina azaspiracida	35
4.3. Okadaična skupina	36
4.4. Skupina pektenotoksina	37
4.5. Skupina paralitičkih toksina	38

4.6.	Skupina jesotoksina	38
5.	Procjena izloženosti	40
6.	Karakterizacija rizika	51
7.	Nesigurnosti	53
8.	Zaključci	54
8.1.	AZA skupina	54
8.2.	ASP skupina	54
8.3.	OA skupina	54
8.4.	PSP skupina	55
8.5.	YTX skupina	565
9.	Preporuke	57
10.	Literatura	58
11.	Rječnik.....	73
12.	Skraćenice.....	74
13.	Popis tablica	76
14.	Popis slika	77

1. Uvod

1.1. Pozadina slučaja

Toksične vrste fitoplanktona imaju sposobnost proizvodnje morskih biotoksina. Najčešći vektor prijenosa morskih biotoksina u ljudski organizam su školjkaši jer se hrane filtriranjem morske vode i tako nakupljaju planktonske organizme uključujući i toksične mikroalge, ukoliko su prisutne u stupcu vode. Prijenosom kroz hranidbeni lanac morski biotoksini nakupljeni u školjkašima mogu imati štetan utjecaj na zdravlje ljudi nakon konzumacije školjkaša i proizvoda od školjkaša.

Kako bi se postigla najveća moguća razina zaštite zdravlja potrošača od najveće je važnosti uspostaviti kontinuirano praćenje abundancije (brojnosti) toksičnih vrsta i količine morskih biotoksina u uzorcima školjkaša iz uzgojnih i izlovnih područja na tjednoj razini.

U Republici Hrvatskoj monitoring morskih biotoksina u školjkašima kontinuirano se provodi godinama temeljem Plana praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša, kojeg svake godine donosi Ministarstvo poljoprivrede.

Rezultati laboratorijskih analiza vezani za koncentracije morskih biotoksina u uzorcima školjkaša uzorkovanih tijekom provedbe monitoringa školjkaša u Republici Hrvatskoj nisu do sada analizirani u kontekstu procjene prehranbene izloženosti i karakteriziranja rizika. Zbog toga je HAPIH na vlastitu inicijativu inicirao izradu ovog znanstvenog mišljenja, u kojem su obrađeni rezultati monitoringa školjkaša iz šestogodišnjeg vremenskog razdoblja (od 2017. do 2022. godine), kako bi se utvrdila prisutnost morskih biotoksina u školjkašima i procijenila izloženost konzumenata, odnosno procijenio rizik štetnog utjecaja na zdravlje konzumenata.

Za potrebe izrade ovog znanstvenog mišljenja HAPIH je osnovao multidisciplinarno i multiinstitucionalno *ad hoc* stručno tijelo. Odluka o osnivanju *ad hoc* stručnog tijela za donošenje Znanstvenog mišljenja o morskim biotoksinima u školjkašima u Republici Hrvatskoj donesena je 25. travnja 2023. godine (KLASA: 642-01/23-01/4; URBROJ:396-08-01/04-23-5).

1.2. Zakonodavni okvir

Na temelju Zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu („Narodne novine“, broj 83/22) te Zakona o hrani („Narodne novine“, broj 18/23), Ministar nadležan za poljoprivredu donosi za svaku kalendarsku godinu *Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša*¹ (u daljnjem tekstu Plan). Planom su određeni način uzorkovanja, geografski raspored točaka i učestalost uzorkovanja koja osigurava reprezentativnost rezultata analiza za određeno klasificirano proizvodno područje ili područje za ponovno polaganje.

Plan se izrađuje u skladu s člankom 57. i 61. Provedbene uredbe Komisije (EU) 2019/627 od 15. ožujka 2019. o utvrđivanju ujednačenog praktičnog uređenja za provedbu službenih kontrola proizvoda životinjskog podrijetla namijenjenih prehrani ljudi u skladu s Uredbom (EU)

¹ [Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša \(PDF\)](#)

2017/625 Europskog parlamenta i Vijeća i o izmjeni Uredbe Komisije (EZ) br. 2074/2005 u pogledu službenih kontrola, kojom su među ostalim određene i priznate analitičke metode za dokazivanje morskih biotoksina kako bi se provjerilo da se ne prekoračuju njihove granične vrijednosti utvrđene u odjeljku VII. poglavlju V. točki 2. Priloga III. Uredbe (EZ) br. 853/2004 od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla.

U Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog Parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla propisane su metode i najveće dopuštene količine pojedinih skupina morskih biotoksina. Uzorkovanje se provodi u skladu s Pravilnikom o mikrobiološkoj klasifikaciji i posebnim pravilima higijene živih školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje („Narodne novine“, broj 126/22) koje se primjenjuju od 2.1.2023. Istim pravilnikom stavljeni su izvan snage Pravilnik o posebnim pravilima organizacije i provedbe službenih kontrola koje se provode na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša („Narodne novine“, broj 82/14) i Pravilnik o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša („Narodne novine“, broj 118/09).

U Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog Parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla propisane su metode i najveće dopuštene količine pojedinih skupina morskih biotoksina, a Pravilnikom o mikrobiološkoj klasifikaciji i posebnim pravilima higijene živih školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje („Narodne novine“, broj 126/22) koje se primjenjuju od 2.1.2023. raspisana su detaljna pravila postupanja u slučaju kada rezultati praćenja pokažu da nisu zadovoljene zdravstvene norme za žive školjkaše, žive bodljikaše, žive plaštenjake i žive morske puževe namijenjene prehrani ljudi te detaljna pravila za mikrobiološku klasifikaciju proizvodnih područja i područja za ponovno polaganje živih školjkaša. Istim pravilnikom izvan snage su stavljeni Pravilnik o posebnim pravilima organizacije i provedbe službenih kontrola koje se provode na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša („Narodne novine“, broj 82/14) i Pravilnik o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša („Narodne novine“, broj 118/09).

Plan i nadzor nad Planom provode se u skladu s člankom 24. Zakona o službenim kontrolama i drugim službenim aktivnostima koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja, zdravlju bilja i sredstvima za zaštitu bilja („Narodne novine“, broj 52/21).

U Tablica 1 prikazane su skupine morskih biotoksina, biotoksini koji ju čine, te engleski i hrvatski nazivi biotoksina.

Tablica 1. Podjela morskih biotoksina s engleskim i hrvatskim nazivom te skraćenim nazivom

Skupina biotoksina	Skraćeni naziv ^(a)	Engleski naziv biotoksina	Hrvatski naziv biotoksina
Amnezijski toksini	DA	Domoic acid	Domoična kiselina
	Epi-DA	Epi-domoic acid	Epi-domoična kiselina
ASP			
Skupina Azaspiracida	AZA1	Azaspiracid 1	Azaspiracid 1
AZA	AZA2	Azaspiracid 2	Azaspiracid 2
	AZA3	Azaspiracid 3	Azaspiracid 3
Okadaična skupina	OA	Okadaic acid	Okadaična kiselina
OA	DTX1	Dinophysistoxin 1	Dinofizistoksin 1
	DTX2	Dinophysistoxin 2	Dinofizistoksin 2
	STX	Saxitoxin	Saksitoksin
	dcSTX	Decarbamoylsaxitoxin	Dekarbamoilsaksitoksin
	GTX2	Gonyautoxin-2	Goniautoksin-2
	GTX3	Gonyautoxin-3	Goniautoksin-3
	dc GTX2	Decarbamoylgonyautoxin-2	Dekarbamoilgoniautoksin-2
	dc GTX3	Decarbamoylgonyautoxin-3	Dekarbamoilgoniautoksin-3
	C1	Decarbamoylgonyautoxin-1	N-sulfokarbamoilgoniautoksin 1
	C2	Decarbamoylgonyautoxin-2	N-sulfokarbamoilgoniautoksin 2
	C3	N-sulfokarbamoilgonyautoxin-3	N-sulfokarbamoilgoniautoksin 3
	C4	N-sulfokarbamoilgonyautoxin-4	N-sulfokarbamoilgoniautoksin 4
Paralitički toksini	NEO	N-sulfokarbamoilgonyautoxin-5	N-sulfokarbamoilgoniautoksin 5
PSP	dcNEO	N-sulfokarbamoilgonyautoxin-6	N-sulfokarbamoilgoniautoksin 6
	GTX1	Neosaxitoxin	Neosaksitoksin
	GTX4	Decarbamoylneosaxitoxin	Dekarbamoilneosaksitoksin
	GTX5	Gonyautoxin-1	Goniautoksin-1
	GTX6	Gonyautoxin-4	Goniautoksin-4
		Gonyautoxin-5	Goniautoksin-5
		Gonyautoxin-6	Goniautoksin-6
Skupina jesotoksina	YTX	Yessotoxin	Jesotoksin
YTX	homo-YTX	Homoyessotoxin	Homo-jesotoksin
	45-OHYTX	45-hydroxyessotoxin	45-hidroksijesotoksin
	45-OHhomo-YTX	45-hydroxyhomoyessotoxin	45-hidroksihomojesotoksin

1.2.1. Propisane metode laboratorijskih analiza morskih biotoksina

Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla u članku 11. stavku 4. navodi donošenje provedbenih mjera za priznate metode testiranja za dokazivanje morskih biotoksina u živim školjkašima. Na temelju spomenute Uredbe, Provedbena uredba (EU) 2019/627 u Prilogu V. navodi metode za dokazivanje morskih biotoksina u školjkašima koji uzrokuju paralizu (PSP; Poglavlje I), za dokazivanje biotoksina u školjkašima koji izazivaju gubitak pamćenja (Poglavlje II), za dokazivanje lipofilnih morskih biotoksina (Poglavlje III) te za dokazivanje novih ili novoprisutnih morskih biotoksina (Poglavlje IV).

1.2.2. Najveće dopuštene vrijednosti

Zakonom propisane najveće dopuštene vrijednosti za morske biotoksine navedene su u Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o posebnim higijenskim zahtjevima za hranu životinjskog podrijetla. Kako su se vrijednosti mijenjale od kada je Uredba donesena, moraju se uzeti u obzir izmjene i nadopune, između ostalog i DELEGIRANA UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/1374 od 12. travnja 2021. o izmjeni Priloga III. Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o posebnim higijenskim zahtjevima za hranu životinjskog podrijetla (c) gdje se u poglavlju IV. dijelu A točka 1. zamjenjuje sljedećim: „1. Prije početka pročišćavanja žive školjke moraju biti čiste od mulja i nakupljene nečistoće te, prema potrebi, isprane čistom vodom.” (d) u poglavlju V. točki 2.: (a) točka (a) zamjenjuje se sljedećim: „(a) za otrov koji uzrokuje paralizu (*Paralytic Shellfish Poison – PSP*): 800 mikrograma ekvivalenta saksitoksina diHCl na kilogram;” (b) točka (c) zamjenjuje se sljedećim: „(c) za okadaičnu kiselinu i dinofizistoksine zajedno: 160 mikrograma ekvivalenta okadaične kiseline na kilogram;”.

U Tablica 2 navedene su zakonski postavljene vrijednosti za skupine morskih biotoksina, izražene kao ekvivalenti biotoksina po kg mesa školjkaša.

Tablica 2. Zakonski postavljene najveće dopuštene vrijednosti za morske biotoksine

Skupina morskih biotoksina	NDK ^(a)	Izražavanje rezultata
ASP	20	mg DA / kg
AZA	160	µg AZA ekv. ^(b) / kg
OA	160	µg OA ekv./ kg
PSP	800	µg STX diHCl ekv./ kg
YTX	3,75	mg YTX ekv./ kg

(a): najveća dopuštena količina; (b): ekvivalent

S obzirom na različit toksični potencijal analoga, sama kvantifikacija pojedinih analoga u školjkašima nije dovoljna da bi se utvrdila sukladnost sa zakonodavstvom propisanim NDK. Potrebno je znati relativnu toksičnost analoga u odnosu na referentni toksin skupine, tzv. faktor ekvivalentne toksičnosti (TEF, engl. *Toxicity Equivalency Factor*), koji predstavlja omjer toksičnosti komponente neke kemijske skupine istog načina djelovanja, u odnosu na referentni toksin iste skupine (Botana i sur., 2010).

Za izračun ukupne ekvivalentne toksičnosti upotrebljavaju se faktori ekvivalentne toksičnosti koje je preporučila Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) 2009. godine (EFSA, 2009d) ili druge ažurirane preporuke EFSA-e, a važeći su navedeni u Tablici 3.

Tablica 3. Faktori ekvivalentne toksičnosti morskih biotoksina

Skupina morskih biotoksina	Biotoksin	TEF ^(a)	Izražavanje rezultata
AZA	AZA1	1	µg AZA ekv. ^(b) / kg
	AZA2	1,8	
	AZA3	1,4	
OA	OA	1	µg OA ekv./ kg
	DTX1	1	
	DTX2	0,6	
PSP	STX	1	µg STX diHCl ekv./ kg
	dcSTX	1	
	GTX2	0,4	
	GTX3	0,6	
	dc GTX2	0,2	
	dc GTX3	0,4	
	C1	0,1	
	C2	0,1	
	C3	0,1	
	C4	0,1	
	NEO	1	
	dcNEO	0,4	
	GTX1	1	
GTX4	0,7		
GTX5	0,1		
GTX6	0,1		
YTX	YTX	1	mg YTX ekv./ kg
	homo YTX	1	
	45 OH YTX	1	
	45 OH homo YTX	0,5	

(a): faktor ekvivalentne toksičnosti; (b): ekvivalent

1.2.3. Postupanje u slučaju nesukladnih vrijednosti

Postupanje veterinarskih inspektora Državnog inspektorata u slučaju nesukladnih rezultata morskih biotoksina u uzorcima živih školjkaša propisano je člankom 15. Pravilnika o mikrobiološkoj klasifikaciji i posebnim pravilima higijene živih školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje („Narodne novine“, broj 126/22) u kojem se navodi:

„(1) Kada se u redovitom uzorku živih školjkaša utvrdi vrijednost rezultata pretrage koje prekoračuju granične vrijednosti za morske biotoksine veterinarski inspektor:

– odmah po saznanju obavještava elektroničkom poštom ili telefonom registrirane proizvođače i sakupljače u odnosnoj zoni/području, odgovorne osobe u odobrenim centrima za pročišćavanje i otpremnim centrima te delegirana tijela, o čemu sastavlja službenu zabilješku

– donosi rješenje u pisanom obliku najkasnije 24 sata od zaprimanja obavijesti o prekoračenju granične vrijednosti za morske biotoksine u mesu živih školjkaša, kojim naređuje:

a) zatvaranje predmetnog proizvodnog područja i njegovih zona u skladu s člankom 62. stavkom 1. Provedbene uredbe Komisije (EU) 2019/627

b) povlačenje i po potrebi opoziv s tržišta svih pošiljaka živih školjkaša s predmetnog proizvodnog područja i njegovih zona, sakupljenih i otpremljenih na dan redovitog uzorkovanja i dane do izdavanja predmetnog rješenja

c) uzorkovanja živih školjkaša radi pretrage na biotoksine u mesu živih školjkaša u predmetnom području, u razmaku od najmanje 72 sata od uzorkovanja redovitog uzorka čiji je rezultat prekoračio granične vrijednosti za morske biotoksine, dok dva uzastopna analitička rezultata ne budu ispod propisanih graničnih vrijednosti u skladu s člankom 63. stavkom 2. Provedbene uredbe Komisije (EU) 2019/627 ili dok rezultat jednog jedinog uzorkovanja ne bude ispod propisanih graničnih vrijednosti ukoliko postoje pouzdani podaci koji pokazuju da se toksičnost smanjuje, u skladu s člankom 63. stavkom 4. Provedbene uredbe Komisije (EU) 2019/627.

(2) Ukoliko su zadovoljeni uvjeti iz članka 63. stavka 2. Provedbene uredbe Komisije (EU) 2019/627 veterinarski inspektor donosi rješenje u pisanom obliku kojim dozvoljava izlov i/ili sakupljanje u predmetnom području.

(3) Veterinarski inspektor rješenja iz stavka 1. i 2. ovoga članka dostavlja proizvođačima i sakupljačima u predmetnom području i njegovim zonama, odgovornim osobama u odobrenim centrima za pročišćavanje i otpremnim centrima te delegiranim tijelima, nadležnom Zavodu za javno zdravstvo, područnim obrtničkim komorama, Ministarstvu unutarnjih poslova – Pomorskoj policiji, ribarskoj inspekciji Ministarstva poljoprivrede, voditeljima Službi veterinarske inspekcije Područnih ureda Državnog inspektorata te Ministarstvu poljoprivrede – Upravi nadležnoj za veterinarstvo i sigurnost hrane.

(4) Ukoliko se propisano sedmodnevno uzorkovanje vremenski podudara sa uzorkovanjem iz stavka 1. podstavka 2. točke c. ovoga članka uzima se jedan uzorak.“

2. Podaci i metodologije

2.1. Podaci

2.1.1. Podaci o pojavnosti i koncentracijama morskih biotoksina

Podaci o morskim biotoksinima prikupljaju se na temelju godišnjih planova monitoringa na nacionalnom nivou kao što je opisano u poglavlju 20. Za potrebu izrade ovog Znanstvenog mišljenja korišteni su podaci prikupljeni u šestogodišnjem vremenskom razdoblju, 2017. – 2022. godine. Podaci za spomenuto razdoblje nalaze se u bazi *Strengthening of Centres for Aquaculture production and Safety surveillance in Adriatic Cross-border Countries* (CAPS 2 baza; <https://www.caps2.eu/caps2/>) kojoj pristup imaju djelatnici Ministarstva poljoprivrede – Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane, Hrvatskog veterinarskog instituta i Instituta za oceanografiju i ribarstvo, uz prethodno odobrenje pristupa.

U Tablicama 4 - 7 prikazani su rezultati deskriptivne statistike za grupe morskih biotoksina prema školjkašima u kojima su utvrđeni. Podaci su prikazani za ukupan broj uzoraka, broj uzoraka u kojima je utvrđena vrijednost iznad LOD ili LOQ, postotak uzoraka u kojima je utvrđena vrijednost iznad LOD ili LOQ, prosječne vrijednosti koncentracija izračunatih za UB, MB i LB scenarij te najveća izmjerena vrijednost. Za neke morske biotoksine utvrđena je koncentracija jednaka ili viša od najveće dopuštene vrijednosti koje su zakonski propisane, te je u tim slučajevima u tablici prikazan broj takvih uzoraka i udio u ukupnom broju uzoraka. S obzirom da rezultati za morske biotoksine dolaze iz tri odvojena laboratorija, od kojih svaki ima različite LOD i LOQ vrijednosti (Tablica 10), za potrebe izračuna u ovom znanstvenom mišljenju, uvaženi su rezultati ovih vrijednosti prema rezultatima unesenim u bazu podatka. To znači da su korištene tri različite vrijednosti za LOD/LOQ. Probno je napravljen izračun u kojem su se vrijednosti svele na zajedničku vrijednost, a to je bila najveća utvrđena vrijednost (npr. za ASP (mg/kg) LOD u HVI RI iznosi 0,1, LOQ u HVI ST iznosi 0,2, a LOQ u IZOR-u iznosi 0,1025 – u ovom bi slučaju najveća vrijednost bila 0,2 mg/kg). Međutim, kako je razlika među pojedinačnim vrijednostima velika, tako dobivena prosječna vrijednost dosta se razlikovala od prosječne vrijednosti u slučaju kada su se koristile tri različite vrijednosti. To je upućivalo na nepotrebni izračun precijenjene izloženosti, te se odustalo od takvog pristupa.

Deskriptivna statistika podataka nije prikazana za skupinu morskih biotoksina AZA iz razloga što među dobivenim rezultatima nije bio niti jedan uzorak s utvrđenom koncentracijom iznad LOQ-a i LOD-a, tj. uopće s utvrđenom vrijednosti.

Ukupno je na ASP uzorkovano 8156 uzoraka školjkaša (Tablica 4) od čega najviše dagnji (6650), kapica (686), rumenki (320), prnjavica (255), kamenica (161) te vongola (6). Za sve školjkaše utvrđeno je da je mali broj uzoraka imao ASP vrijednost iznad LOD/LOQ, dok niti jedan nije imao vrijednost iznad propisanog NDK. Ovi su rezultati različiti od rezultata navedenih u Izvještaju Znanstvenog odbora Irske agencije za sigurnost hrane (2016) koja je navela kako je u 2013. godini u čak 8,84 % uzoraka utvrđena koncentracija ASP bila iznad zakonske granice, te kako je u uzorcima Jakovljevih kapica (*Pecten maximus*) u promatranom razdoblju 2011.- 2013. ASP utvrđen 68 – 84 % slučajeva. U istom razdoblju ASP je utvrđen u dagnjama (*Mytilus edulis*) u 8 - 12 % slučajeva, dok je NDK bio premašen u 1,41 – 3,49 % slučajeva. Mali udio uzoraka čija je koncentracija ASP bila iznad LOD/LOQ vrijednosti u monitoringu u Hrvatskoj razlog je što nije utvrđena značajnost između prosječnih vrijednosti za

UB, MB i LB scenarij, te se u tumačenju rezultata može očekivati podcijenjenost izloženosti, ukoliko se koristi LB, odnosno precijenjenost izloženosti, ukoliko se koristiti UB scenarij.

Tablica 4. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za ASP u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)

Vrsta školjkaša	N ^(a)	N>LOD /LOQ ^(b)	% ^(c)	UB ^(d)	MB ^(e)	LB ^(f)	MAX ^(g)
Dagnja (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	6650	27	0,41	0,147	0,075	0,004	2,84
Vongola (<i>Venerupis decussata</i>)	6	0	0	0,103	0,051	0,000	LOD/LOQ
Kamenica (<i>Ostrea edulis</i>)	162	1	0,62	0,114	0,064	0,015	1,47
Kapice (<i>Aequipecten opercularis</i>)	702	13	1,85	0,105	0,056	0,008	0,43
Rumenka (<i>Callista chione</i>)	320	1	0,32	0,200	0,100	0,001	0,21
Prnjavica (<i>Venus verrucosa</i>)	255	8	3,14	0,117	0,067	0,018	1,273

(a): ukupni broj uzoraka; (b): broj uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (c): postotak broja uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (d): prosječna vrijednost scenarija gornje granice izloženosti (mg/kg); (e): prosječna vrijednost scenarija srednje granice izloženosti (mg/kg); (f): prosječna vrijednost scenarija niže granice izloženosti (mg/kg); (g): najveća izmjerena vrijednost (mg/kg)

Iz prijavljenih podataka za OA (Tablica 5) vidi se da je prikupljeno najviše uzoraka dagnji (6728), a najmanje vongola (6). U vongola, rumenki i prnjavica nije bilo uzoraka u kojem je utvrđena koncentracija OA bila jednaka ili viša od LOD/LOQ, te niti jedan uzorak nije imao vrijednost iznad propisane NDK. U dagnji je u 5,98 % uzoraka utvrđena koncentracija iznad LOD/LOQ, u kamenica u 6,83 %, u kapica u 12,83 %, a utvrđen je i manji broj uzoraka čija je koncentracija bila iznad NDK, kako slijedi u 2,22 %, u 0,62 % i u 0,15 %. Manji udio uzoraka iznad LOD/LOQ razlog je što nije utvrđena značajnost između prosječnih vrijednosti za UB, MB i LB scenarij, te se prilikom korištenja bilo kojeg scenarija za određene školjkaše može očekivati podcijenjenost izloženosti, ukoliko se koristi LB scenarij, odnosno precijenjenost izloženosti, ukoliko se koristiti UB scenarij.

Iz prijavljenih podataka za PSP (Tablica 6) vidi se da je prikupljeno najviše uzoraka dagnji (6644), a najmanje vongola (6). U vongola, kamenica, kapica i prnjavica nije bilo uzoraka u kojem je utvrđena koncentracija PSP bila jednaka ili viša od LOD/LOQ, te niti jedan uzorak nije imao vrijednost iznad propisane NDK. U dagnji je u 0,51 % uzoraka utvrđena koncentracija iznad LOD/LOQ, a u rumenki u 0,31 %. Samo je u tri (3) uzorka dagnji koncentracija bila iznad NDK, dok za uzorke ostalih školjkaša nije bilo takvih slučajeva. Manji udio uzoraka iznad LOD/LOQ razlog je što nije utvrđena značajnost između prosječnih vrijednosti za UB, MB i LB scenarij, te se prilikom korištenja bilo kojeg scenarija za određene školjkaše može očekivati podcijenjenost izloženosti, ukoliko se koristi LB scenarij, odnosno precijenjenost izloženosti, ukoliko se koristiti UB scenarij.

Tablica 5. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za OA u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)

Vrsta školjkaša	N ^(a)	N>LOD /LOQ ^(b)	% ^(c)	N ^{>} NDK ^(d)	N>NDK % ^(e)	UB ^(f)	MB ^(g)	LB ^(h)	MAX ⁽ⁱ⁾
Dagnja (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	6728	399	5,98	149	2,22	44,355	27,395	10,436	883,88
Vongola (<i>Venerupis decussata</i>)	6	0	0	0	0	11,625	5,813	0,000	0
Kamenica (<i>Ostrea edulis</i>)	161	11	6,83	1	0,62	48,410	26,750	5,090	165,23
Kapica (<i>Aequipecten opercularis</i>)	686	88	12,83	1	0,15	51,070	30,730	10,390	171,48
Rumenka (<i>Callista chione</i>)	320	0	0	0	0	47,000	23,500	0,000	0
Prnjavica (<i>Venus verrucosa</i>)	255	0	0	0	0	11,625	5,813	0,000	0

(a): ukupni broj uzoraka; (b): broj uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (c): postotak broja uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (d): broj uzoraka veći od najveće dopuštene vrijednosti; (e): postotak broja uzoraka veći od najveće dopuštene vrijednosti; (f): prosječna vrijednost scenarija gornje granice izloženosti (µg/kg); (g): prosječna vrijednost scenarija srednje granice izloženosti (µg/kg); (h): prosječna vrijednost scenarija niže granice izloženosti (µg/kg); (i): najveća izmjerena vrijednost (µg/kg)

Tablica 6. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za PSP u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)

Vrsta školjkaša	N ^(a)	N>LOD /LOQ ^(b)	% ^(c)	N>NDK ^(d)	N>NDK % ^(e)	UB ^(f)	MB ^(g)	LB ^(h)	MAX ⁽ⁱ⁾
Dagnja (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	6644	34	0,51	3	0,45	116,070	58,890	1,710	1723,20
Vongola (<i>Venerupis decussata</i>)	6	0	0	0	0	15,006	7,503	0,000	0
Kamenica (<i>Ostrea edulis</i>)	162	0	0	0	0	202,000	101,000	0,000	0
Kapica (<i>Aequipecten opercularis</i>)	702	0	0	0	0	202,000	101,000	0,000	0
Rumenka (<i>Callista chione</i>)	320	1	0,31	0	0	126,052	63,249	0,000	142,6
Prnjavica (<i>Venus verrucosa</i>)	255	0	0	0	0	15,006	7,503	0,000	0

(a): ukupni broj uzoraka; (b): broj uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (c): postotak broja uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (d): broj uzoraka veći od najveće dopuštene vrijednosti; (e): postotak broja uzoraka veći od najveće dopuštene vrijednosti; (f): prosječna vrijednost scenarija gornje granice izloženosti (µg/kg); (g): prosječna vrijednost scenarija srednje granice izloženosti (µg/kg); (h): prosječna vrijednost scenarija niže granice izloženosti (µg/kg); (i): najveća izmjerena vrijednost (µg/kg)

Iz prijavljenih podataka za YTX (Tablica 7) vidi se da je prikupljeno najviše uzoraka dagnji (6729), a najmanje vongola (6). U svih vrsta školjkaša bilo je uzoraka u kojima je utvrđena koncentracija YTX bila jednaka ili viša od LOD/LOQ, ali niti jedan uzorak nije imao vrijednost iznad propisane NDK vrijednosti. Utvrđena je koncentracija iznad LOD/LOQ, u 22,48 % uzoraka dagnji, vongolama u 50 % (radi se svega o ukupno 6 uzoraka!), u kamenicama 4,35 %, u kopicama 37,17 %, u rumenkama u 1,56 %, te u prnjavicama 1,18 %. Kako je veliki broj uzoraka imao vrijednost koncentracije manju od LOD/LOQ vrijednosti, izračunate su prosječne vrijednosti koristeći se UB, MB i LB scenarijem. Korištenjem scenarija za određene školjkaše može se očekivati podcijenjenost izloženosti, ukoliko se koristi LB scenarij, odnosno precijenjenost izloženosti, ukoliko se koristiti UB scenarij, te su iz tog su razloga prilikom izračuna izloženosti korištena sva ti scenarija.

Tablica 7. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za YTX u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)

Vrsta školjkaša	N ^(a)	N>LOD /LOQ ^(b)	% ^(c)	UB ^(d)	MB ^(e)	LB ^(f)	MAX ^(g)
Dagnja (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	6729	1513	22,48	0,063	0,051	0,038	3,09
Vongola (<i>Venerupis decussata</i>)	6	3	50	0,090	0,086	0,083	0,3115
Kamenica (<i>Ostrea edulis</i>)	161	7	4,35	0,052	0,028	0,004	0,17
Kapica (<i>Aequipecten opercularis</i>)	686	255	37,17	0,087	0,071	0,056	0,8
Rumenka (<i>Callista chione</i>)	320	5	1,56	0,033	0,018	0,003	0,51
Prnjavica (<i>Venus verrucosa</i>)	255	3	1,18	0,013	0,006	0,000	0,0352

(a): ukupni broj uzoraka; (b): broj uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (c): postotak broja uzoraka veći od limita detekcije ili limita kvantifikacije; (d): prosječna vrijednost scenarija gornje granice izloženosti (mg/kg); (e): prosječna vrijednost scenarija srednje granice izloženosti (mg/kg); (f): prosječna vrijednost scenarija niže granice izloženosti (mg/kg); (g): najveća izmjerena vrijednost (mg/kg)

2.1.2. Podaci o prehranbenim navikama

Podaci o prehranbenim navikama prikupljeni su u okviru nacionalnog prikupljanja podataka o prehranbenim navikama koje je u Hrvatskoj provedeno 2011/2012. godine na 2002 ispitanika (HAPIH, 2011; 2012). Istraživanje je provedeno u skladu s EFSA-inim preporukama (EFSA, 2009c), na odrasloj populaciji (18-64 godine) u dva razdoblja (prvi dio u jesen 2011., drugi dio u ljeto 2012. na reprezentativnom uzorku od 2002 ispitanika. Primijenjena je metoda 24-satnog prisjećanja te je u svakom razdoblju anketa provedena za dva radna dana (između kojih je razmak morao biti najmanje dva tjedna) i jedan dan vikenda.

U Tablica 8 navedeni su podaci koji se odnose na spol, dob, tjelesnu masu, vrstu obroka, mjesto konzumacije, kategoriju hrane, konzumiranje hrane, način pripreme te podatke o količini sirove i konzumirane hrane. Prijavljena količina hrane napravljena je na temelju

procjene ispitanika. Važan podatak iz prehrambenih navika su „Sastojci obroka“ koji su kod ovih ispitanika identični s podacima koji se nalaze u koloni „Konzumirana hrana“.

U Tablica 8 u koloni „Količina jela (g)“ navedena je količina ukupnog jela koju je ispitanik konzumirao u kuhanom stanju iz koje je preko opisa u receptu određena količina dagnji. U koloni „Količina kuhanog sastojka“ naveden je udio tog sastojka dobiven izračunom preko recepta. „Količina sirovog sastojka (g)“ je izračunom dobivena količina sirovog sastojka koji je kao takav korišten za pripremu jela. „Jestivi dio (g/kg t.m.)“ je količina kuhanog sastojka podijeljena s tjelesnom masom ispitanika, a to je ujedno i količina hrane koju je ispitanik unio jednim obrokom po kilogramu tjelesne mase (za potrebe izračuna akutne izloženosti).

Tablica 8. Podaci o prehrambenim navikama za ispitanike koji su prijavili da su konzumirali školjkaše

RB ^(a)	Spol	Dob	t.m. ^(b)	Vrsta obroka	Mjesto	Kategorija	Konzumirana hrana	Način pripreme	Količina jela (g) ^(c)	Količina kuhanog sastojka (g)	Količina sirovog sastojka (g)	Kuhani jestivi dio (g/kg t.m.) ^(g)
1/1 ^(d)	Ž ^(e)	39	71	neodređen	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	kuhano/ pirjano	300	87,266	363,607	1,23
1/2 ^(d)	Ž	39	71	snack	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	300	32,494	162,469	0,46
2	M ^(f)	22	94	ručak	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	kuhano/ pirjano	100	29,089	121,202	0,31
3	Ž	50	70	ručak	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	300	11,060	55,298	0,16
4	M	51	75	večera	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	430	15,852	79,261	0,21
5	M	32	89	večera	izvan kuće	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	kuhano/ pirjano	300	77,008	385,040	0,87
6	Ž	37	80	večera	izvan kuće	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	kuhano/ pirjano	250	64,173	320,867	0,8
7	M	27	98	ručak	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	350	12,903	64,515	0,13
8	M	29	100	snack	izvan kuće	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	250	9,216	46,082	0,09
9	M	58	87	ručak	izvan kuće	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	450	16,589	82,947	0,19
10	M	45	90	večera	izvan kuće	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	100	3,687	18,433	0,04
11	Ž	30	60	ručak	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	250	16,609	83,043	0,28
12	Ž	56	60	snack	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	pirjano	500	18,433	92,164	0,31
13	M	53	88	snack	kuća	dagње	Dagnje, kuhane, vagano sa školjkom	kuhano/ pirjano	300	87,266	363,607	0,99

(a): redni broj; (b): tjelesna masa; (c): gram; (d): isti ispitanik koji je u dva navrata prijavio da je konzumirao dagње; (e): žena; (f): muškarac; (g) količina kuhanog sastojka podijeljena s tjelesnom masom ispitanika

2.1.3. Normativ porcije dagnji u restoranu

Prema dostupnim literaturnim podacima, normativ za restorane za potrebe serviranja kuhanih dagnji (školjkaša) bi bio 500-1000 g po osobi. Spomenuta količina obuhvaća jestivo tkivo školjkaša (JTŠ) i nejestivi dio. Bognar (2002) navodi kako JTŠ dio iznosi 20 % za dagnje (jedine školjke, kuhane) odnosno 100-200 g jestivog tkiva školjkaša čini porciju dagnji.

Standardizirana, općeprihvatljiva ujednačena količina nije propisana, te se uz veća ili manja odstupanja od spomenute (500-1000 g po osobi) može naći na različitim web izvorima (The National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA); The United States Department of Agriculture (USDA); [Blue Mussels - Chefs Resources \(chefs-resources.com\)](http://chefs-resources.com)).

Normativi se mogu naći i po raznim knjigama o kuharstvu i kulinarskim web stranicama, ili stranicama tvrtki koje se bave prodajom ili ugostiteljstvom.

EFSA je u izradi svojih mišljenja koristila veličinu porcije od 400 g jestivog dijela, koju nije do sada revidirala (EFSA, 2010a), kao veliko serviranje, pri čemu je uzimala u obzir tjelesnu masu osobe od 60 kg.

2.2. Metodologije

2.2.1. Prikupljanje uzoraka školjkaša

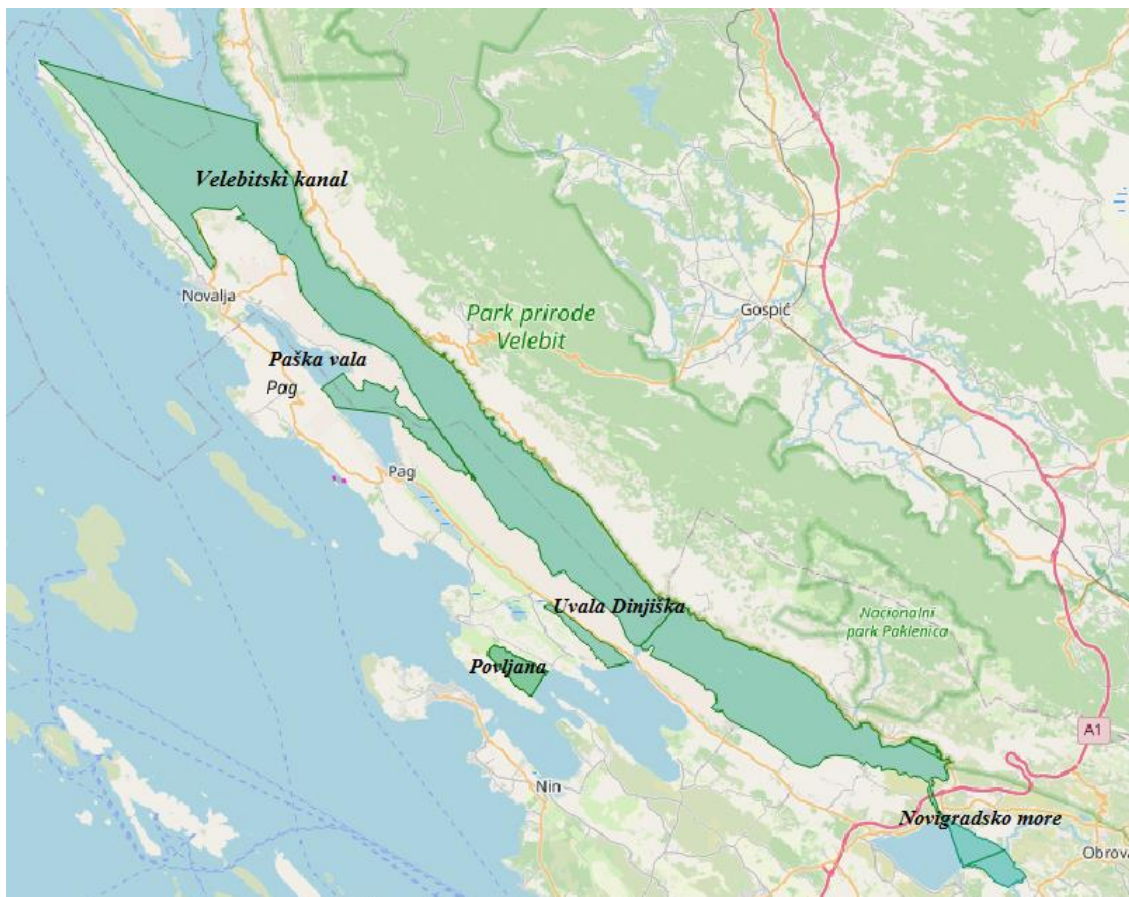
Uzorkovanje školjkaša za određivanje morskih biotoksina provodi se sukladno *Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša*, koji se donosi svake godine, a u njemu su navedena i područja u kojima se obavlja uzorkovanje, zajedno sa zemljopisnim koordinatama tog područja, te učestalost uzorkovanja za svako područje, a također je opisan i način uzorkovanja, kako je to primjerice navedeno u Planu praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša u 2024. godini.

U Planu je opisano da se uzorkovanje školjkaša obavlja na način uobičajen za komercijalno izlovljavanje. Školjkaši koji su uzgojeni na vertikalnim linijama (pergolarima) i košarama, uzorkuju se na tri razine (vrh, sredina i dno). Uzorci sa tri razine se pomiješaju kako bi se dobio jedan reprezentativan uzorak od 2 kg iste vrste školjkaša. Uzorkovanje školjkaša koji žive na morskom dnu i koji se izlovljavaju specifičnim ribolovnim alatima smještenim na ribarskim brodovima (ramponi, mušulari, dredže) obavlja se horizontalnim povlačenjem alata po izlovnom području na način da kontrolna točka bude u sredini površine obuhvaćene povlačenjem u radijusu do 200 m. Od ukupnog ulova školjkaša za uzorak se uzima 2 kg. U slučaju izlova različitih vrsta školjkaša, ako nije odabrana referentna vrsta, uzima se uzorak od najbrojnije (iste) vrste školjaka, odnosno one koja zadovoljava potrebe kromatografskih analiza u smislu količine. Uzorkovanje školjkaša koji žive na morskom dnu i koji se izlovljavaju ronjenjem, obavlja se ronjenjem i skupljanjem po morskom dnu u radijusu do 50 m od kontrolne točke. Školjkaši se pakiraju u mrežice sitnog oka, a potom u plastične vrećice. Način pakiranja mora biti takav da štiti uzorak od izvanjske kontaminacije i spriječi ispuštanje međuljuštune tekućine u okolinu kako ne bi došlo do međusobne kontaminacije. Uzorak se označava jednoznačnom, nebrisivom oznakom, te se prijenosnim hladnjakom doprema u laboratorij u najkraćem mogućem roku. Kamenice i kapice se pakiraju na način da im je konkavni dio ljuštune okrenut prema dolje, kako bi se spriječilo ispuštanje međuljuštune tekućine.

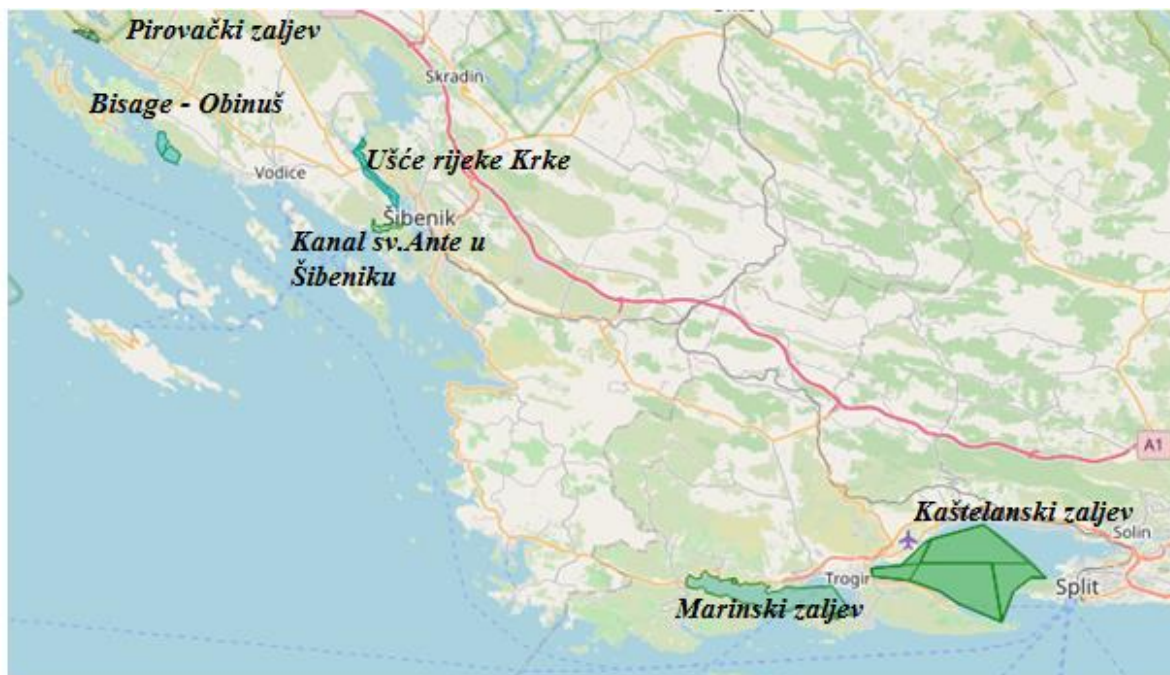
Na Slikama 1 – 4 prikazana su izlovnna i uzgojna područja u Jadranskom moru u kojima se prikupljaju uzorci školjkaša.



Slika 1. Izlovnna područja: Zapadna obala Istre 1, 2 i 3; Istočna obala Istre 1 i 2. Uzgojna područja: Savudrijska vala, Vabriga, Limski zaljev, Medulinski zaljev, Uvala Budava i Raški zaljev (preuzeto i modificirano s <https://www.caps2.eu/caps2/>)



Slika 2. Izlovnna područja: Velebitski kanal, Paška vala, Povljana. Uzgojna područja: Uvala Dinjiška, Povljana i Novigradsko more (preuzeto i modificirano s <https://www.caps2.eu/caps2/>)



Slika 3. Izlovna područja: Kanal sv. Ante u Šibeniku, Izlovno područje Marinski zaljev, Kaštelanski zaljev. Uzgojna područja: Pirovački zaljev, Bisage - Obinuš, Ušće rijeke Krke, Marinski zaljev. (preuzeto i modificirano sa <https://www.caps2.eu/caps2/>)



Slika 4. Uzgojno područje: Škoj. Izlovno i uzgojno područje: Malostonski zaljev. (preuzeto i modificirano sa <https://www.caps2.eu/caps2/>)

Uzorke školjkaša za pretrage na morske biotoksine uzima i dostavlja, ili uzimanje i dostavu organizira, nadležni veterinarski inspektor. U slučajevima vremenskih nepogoda i drugih nepredviđenih okolnosti uzorkovanje školjkaša za određivanje morskih biotoksina mora se obaviti čim nepovoljne okolnosti budu uklonjene.

2.2.2. Analitičke metode

Određivanje skupine PSP provedeno je primjenom predkolonske oksidacije i tekućinske kromatografije (LC) u sprezi s fluorescencijskim detektorom (AOAC, 2005.). Metoda se temelji na ekstrakciji toksina octenom kiselinom, odjeljivanjem na čvrstoj fazi (C-18), te frakcioniranjem na kationskim kolonicama (COOH) zatim njihovom oksidacijom (ekstrakata) perjodatom (IO_4^-) i vodikovim peroksidom (H_2O_2). Određivanje domoične kiseline provedeno je primjenom standardne operativne procedure Europskog referentnog laboratorija za morske biotoksine (EURLMB) temeljene na metodi autora Quilliam i sur. iz 1995. god. (EURLMB, 2008.). Domoična kiselina (DA) i epi-domoična kiselina (epi-DA) odredile su se LC-UV metodom nakon ekstrakcije vodenom otopinom metanola te pročišćavanja i koncentriranja ekstrakata na čvrstoj fazi sa snažnom anionskom izmjenom. Rezultat je izražen kao zbroj DA i epi-DA u mg DA/kg. Određivanje LT provedeno je primjenom standardne operativne procedure EURLMB (2015.). Metoda se temelji na ekstrakciji lipofilnih toksina metanolom, te direktnoj kvantifikaciji skupina YTX, AZA, PTX i slobodne OA skupine, primjenom LC-MS/MS tehnike. Određivanje ukupne (esterificirane) OA skupine provedeno je nakon alkalne hidrolize ekstrakata.

Opisane metode (Tablica 9) su priznate metode za dokazivanje morskih biotoksina u živim školjkašima temeljem Provedbene Uredbe Komisije (EU) 2019/627.

Tablica 9. Analitičke metode za određivanje morskih biotoksina

Skupina biotoksina	Metoda analize	Regulativa
ASP (hidro)	Quilliam et al, (1995), J.AOAC,78, pp. 209-214 HPLC/UV	EU no 2019/627 Prilog V poglavlje II referentna metoda HPLC/UV stavak c
AZA (lipo)	EU-RL-MB-SOP Lipophilic marine biotoksins LC MS/MS, Version 5, January 2015	EU no 2019/627 Prilog V poglavlje III referentna metoda EURL LC MS/MS stavak A
OA (lipo)	EU-RL-MB-SOP Lipophilic marine biotoksins LC MS/MS, Version 5, January 2015	EU no 2019/627 Prilog V poglavlje III referentna metoda EURL LC MS/MS stavak A
PSP (hidro)	AOAC Official method 2005.06, First Action 2005	EU no 2019/627 Prilog V poglavlje I referentna metoda EN ISO 14526 dio A stavak c
YTX (lipo)	EU-RL-MB-SOP Lipophilic marine biotoksins LC MS/MS, Version 5, January 2015	EU no 2019/627 Prilog V poglavlje III referentna metoda EURL LC MS/MS stavak A

Analiza uzoraka provodi se u tri prostorno odvojena laboratorija, u Hrvatskom veterinarskom institutu - podružnica Rijeka (HVI RI), Hrvatskom veterinarskom institutu - podružnica Split (HVI ST) i Institutu za oceanografiju i ribarstvo, Split (IZOR). U tri laboratorija verifikacijom metoda utvrđeni su različiti limiti detekcije (LOD) i/ili limiti kvantifikacije (LOQ) koji su navedeni u Tablici 10.

Tablica 10. Limiti detekcije i limiti kvantifikacije biotoksina u pojedinim laboratorijima

Laboratorij	HVI RI ^(b)	HVI ST ^(c)	IZOR ^(d)
Biotoksin (izražavanje rezultata) / vrsta limita	LOD ^(e)	LOQ ^(f)	LOQ ^(f)
ASP (mg/kg)	0,10	0,20	0,10
AZA(μg AZA ekv.^(a)/kg)	31,70	31,00	9,71
OA (μg OA ekv./kg)	46,50	47,00	11,62
PSP (μg STXdiHCl ekv./kg)	202,00	126,00	15,00
YTX (mg YTX ekv./kg)	0,05	0,03	0,01

(a): ekvivalent; (b): Hrvatski veterinarski institut - podružnica Rijeka; (c): Hrvatski veterinarski institut - podružnica Split; (d): Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split; (e): limit detekcije; (f): limit kvantifikacije

2.2.3. Procjena izloženosti

Procjena izloženosti napravljena je u programu Microsoft® Excel® za Microsoft 365 MSO (verzija 2401 64-bitna verzija 16.0.17231.20236), koristeći deterministički pristup semi-kvantitativne procjene u kojem se za procjenu koriste vrijednosti prosječnog unosa hrane dobivene iz istraživanja o prehrambenim navikama odrasle populacije u RH (HAPIH, 2011; 2012), dok se za vrijednost kontaminacije koristi prosječna vrijednost utvrđena za određeni kontaminant. U ovom slučaju radi se o kontaminantima morskim biotoksinima.

Kako je za pojedine morske biotoksine prisutan veći broj uzoraka kod kojih nije kvantificirana vrijednost, prosječne vrijednosti su za svaki kontaminant izračunate korištenjem tri scenarija, UB (engl. *upper bound*) scenarij s gornjom granicom, MB (engl. *middle bound*) scenarij sa srednjom granicom i LB (engl. *lower bound*) scenarij s donjom granicom.

Osim za prehrambene navike stanovništva u RH, napravljena je procjena izloženosti i na slučaju u kojem je korištena veličina porcije od 400 g koju je koristila EFSA u svojim procjenama izloženosti (EFSA, 2010a), te procjena koja je obuhvatila veličinu EFSA-ine porcije kombiniranu s prosječnom tjelesnom masom hrvatskih konzumenata školjkaša. Kako u RH postoje podaci o prehrambenim navikama odrasle populacije samo za dagnje, za ostale školjkaše je korištena veličina porcije od 400 g prema EFSA-inom pristupu.

2.2.4. Utjecaj termičke obrade na procjenu izloženosti

Prema mišljenju EFSA-e (2009; 2009d; 2009e; 2009f) tijekom termičke obrade dolazi do promjena u koncentraciji morskih biotoksina u tkivu školjkaša uslijed gubitka vode, redistribucije među tkivima, te interkonverzije među analogima. Intenzitet promjena ovisi o vrsti toksina, načinu i trajanju termičke obrade kao i vrsti školjkaša.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na povećanje koncentracije OA do 80 % u termički obrađenim školjkašima koje je izazvano gubitkom vode (EFSA, 2009.d; McCarron i sur., 2008), kao i dvostruko povećanje koncentracije AZA (Hess i sur., 2005). Iako za YTX i PTX nema podataka o utjecaju termičke obrade na njihovu koncentraciju, pretpostavlja se da je utjecaj na sve lipofilne morske biotoksine jednak (EFSA, 2009.d). Također, u slučaju AZA zamijećeno je povećanje ukupne toksičnosti uslijed konverzije manje toksičnog AZA17 u toksičniji AZA3 (McCarron i sur., 2009).

U slučaju hidrofilnih PSP toksina i DA zamijećeno je smanjenje koncentracije uslijed otpuštanja vode iz tkiva i s njome dijela toksina (EFSA, 2009; EFSA, 2009e). Iako istraživanja ukazuju na smanjenje koncentracije DA prisutne u hepatopankreasu, istovremeno dolazi do njenog povećanja u ostalim tkivima (Leira i sur., 1998; McCarron i Hess, 2006). Povećanje koncentracije uočeno je i kod vrsta kod kojih je manji gubitak DA putem otpuštanja vode, zbog koncentriranja morskih biotoksina uslijed manje mase tkiva nakon termičke obrade (Vidal i sur., 2009). Tijekom termičke obrade pri nižim pH vrijednostima uočena je i interkonverzija manje toksičnih PSP toksina u toksičnije analoge (Indrasena i Gill, 2000; Wong i sur., 2009).

Na temelju spomenutih EFSA-ih mišljenja, prilikom računanja izloženosti u Izvještaju Znanstvenog odbora Irske agencije za sigurnost hrane (2016), korišten je faktor pretvorbe veličine porcije od 1,49 čime je uvećana prijavljena porcija. Ovaj je pristup korišten je i u Hrvatskoj te je kao slučaj 2 prikazan u poglavlju 40 u Tablicama 12 - 15 za skupine morskih biotoksina.

2.2.5. Vrijednosti za procjenu štetnog utjecaja na zdravlje

Obveza zaštite potrošača usklađena je sa zahtjevima utvrđenim europskim i hrvatskim zakonodavstvom. Zakonom su propisane vrijednosti za najveće dopuštene količine (NDK) (Tablica 2 i Tablica 11) koje se primjenjuju kod monitoringa školjkaša. Provođenjem Plana monitoringa osigurava se da se svi školjkaši iz proizvodnih područja testiraju na toksine školjkaša, koji se mogu nalaziti u njima, i otkriju prije nego što postanu opasnost za potrošače. Praćenje toksina školjkaša temelji se na najboljim dostupnim znanstvenim dokazima i provodi se na neovisan, objektivan i transparentan način. Ukoliko se nalaze u količinama koje su niže od zakonski propisanih, školjkaši se mogu nalaziti na tržištu. Međutim, moraju se poduzimati mjere kojima se utječe na smanjivanje prisutnosti morskih biotoksina u njima. Ukoliko su utvrđene vrijednosti više, školjkaši ne smiju uopće doći na tržište.

Osim ovih vrijednosti, za procjenu štetnog utjecaja na zdravlje ljudi koristi se akutna referentna doza (engl. *Acute reference dose*; ARfD), u slučaju kada tvari mogu imati akutni utjecaj na zdravlje, što je slučaj kod načina djelovanja morskih biotoksina. U slučaju utvrđivanja količine toksina u školjkašima u koncentraciji koja je veća od ARfD može se očekivati štetni utjecaj na zdravlje potrošača. NDK i ARfD (Tablica 11) se razlikuju jer imaju različitu primjenu i različito se izražavaju, odnosno NDK se utvrđuje po kilogramu mesa školjkaša, dok se ARfD određuje po kilogramu tjelesne mase konzumenta te je osjetno niža od NDK.

S obzirom da se štetno djelovanje morskih biotoksina na zdravlje konzumenata ne očituje njihovim kumuliranjem u tijelu, isključuje se kronična izloženost ovim tvarima. Iz tog se razloga kod procjene ne može koristiti vrijednost dnevnog unosa. Takva vrijednost nije niti postavljena za morske biotoksine.

Tablica 11. Zakonom propisane vrijednosti NDK u EU (izražene kao ekvivalenti toksina po kg jestivog tkiva školjkaša) i akutne referentne doze (ARfD) (izražene kao ekvivalenti toksina po kilogramu tjelesne mase)

Skupina morskih biotoksina	NDK ^(a)	ARfD ^(b)
ASP (hidro)	20 mg DA/kg	30 µg DA/kg t.m.
AZA (lipo)	160 µg AZA ekv. ^(c) /kg	0,2 µg AZA ekv./kg t.m.
OA (lipo)	160 µg OA ekv./kg	0,3 µg OA ekv./kg t.m.
PSP (hidro)	800 µg STXdiHCl ekv./kg	0,5 µg STX ekv./kg t.m.
YTX (lipo)	3,75 mg YTX ekv./kg	25 µg YTX ekv./kg t.m.

(a): najveća dopuštena količina; (b): akutna referentna doza; (c): ekvivalent

3. Identifikacija opasnosti

Morski biotoksini su termostabilni, uglavnom neproteinski organski spojevi poput alkaloida, cikličkih peptida, polietera, imina te heterocikličkih aminokiselina (Sharma i sur., 2014). Prema topljivosti dijele se na one topljive u vodi (hidrofilne) i na topljive u mastima (lipofilne). Prema sličnosti u kemijskoj strukturi i mehanizmu toksičnog djelovanja dijele se u više skupina. Propisima Europske unije (EU) i Republike Hrvatske (RH) definirane su najveće dopuštene količine (NDK) u živim školjkašima za azaspiracide (AZA), okadaičnu skupinu (okadaična kiselina i dinofizistoksini), jesotoksine (YTX), domoičnu i epi-domoičnu kiselina (DA) i paralitičke toksine (PSP).

Lipofilni morski biotoksini (LT) okadaične skupine i azaspiracidi izazivaju trovanja koja se očituju simptomima povezanim s probavnim sustavom, poput mučnine, povraćanja, grčeva i proljeva. Simptomi se javljaju već 30 minuta do nekoliko sati nakon konzumiranja kontaminiranih školjkaša i traju u prosjeku tri dana. Mogu biti iscrpljujući, ali nemaju smrtni ishod (EFSA, 2008a). Jesotoksini su lipofilni morski biotoksini za koje nije dokazano da uzrokuju trovanja ljudi, međutim aplicirani pokusnim životinjama intraperitonealno iskazuju velik toksični učinak (EFSA, 2009a). Isto se odnosi i na pektenotoksine za koje su utvrđene akutne referentne doze (ARfD) (EFSA, 2009b), ali nisu više obuhvaćeni propisima EU i RH koji se odnose na NDK.

Hidrofilni morski biotoksini (HT) su neurotoksini domoična i epi-domoična kiselina te skupina paralitičkih morskih biotoksina koji mogu izazvati ozbiljna trovanja ljudi, ponekad sa smrtnim ishodom. Trovanje s DA popraćeno je simptomima vezanim za probavni sustav, i neurološkim simptomima kao što su dezorijentiranost, zbunjenost, promjena ponašanja, glavobolja, konvulzije i koma (Todd, 1993; Perl i sur., 1990). Trovanje s PSP najčešće započinje probavnim simptomima, glavoboljom, parestezijom u području usne šupljine koja se širi. U težim slučajevima parestezija prelazi u obamrlost što dovodi do otežanog izvođenja voljnih pokreta, opće slabosti, osjećaja lebdenja, tahikardije, poteškoća u disanju i govoru. U najtežim slučajevima dolazi do mišićne paralize i gušenja, a smrt nastupa zbog gušenja uslijed respiratorne paralize i kolapsa srčano žilnog sustava, najčešće unutar dvanaest sati (Prakash i sur., 1971).

3.1. Pojavnost toksičnih fitoplanktona i morskih biotoksina

Toksične vrste fitoplanktona imaju sposobnost proizvodnje morskih biotoksina koji prijenosom kroz hranidbeni lanac mogu djelovati na zdravlje ljudi. Najčešći vektor prijenosa morskih biotoksina u ljudski organizam su školjkaši jer se hrane filtriranjem morske vode i tako nakupljaju planktonske organizme uključujući i toksične mikroalge ukoliko su prisutne u stupcu vode. Iz tog se razloga provodi redovito praćenje abundancije (brojnosti) toksičnih vrsta fitoplanktona i količine morskih biotoksina u uzorcima školjkaša iz uzgojnih i izlovnih područja na tjednoj razini.

Glavni predstavnik ASP biotoksina je DA, i uzročnik je amnezijskog trovanja školjkašima. DA proizvode neke vrste dijatomeja roda *Pseudo-nitzschia*. Ove dijatomeje se prate u obalnim vodama Jadrana u okviru nacionalnog monitoring programa. Porast brojnosti ovih vrsta iznad vrijednosti navedenih u Vodiču Europskog referentnog laboratorija za morske biotoksine (EU-RL-MB, 2019) ne rezultira uvijek pojavom morskih biotoksina skupine ASP u školjkašima. Razlog tome je sastav vrsta roda *Pseudo-nitzschia*. Vrste roda *Pseudo-nitzschia* stvaraju

lančaste kolonije i redovite su u sastavu fitoplanktonske zajednice Jadranskog mora. Do sada je opisano oko pedeset vrsta ovog roda. Prema IOC-UNESCO Referentnoj listi štetnih fitoplanktonskih vrsta, 26 vrsta ovog roda je toksično odnosno ima sposobnost proizvodnje DA. Intenzivna istraživanja ASP-a u morskom ekosustavu, pokazala su da je prisustvo DA u korelaciji s pojavom više vrsta roda *Pseudo-nitzschia* (*P.*), uključujući *P. australis* (Fire i sur. 2009), *P. pseudodelicatissima* (Pan i sur. 2001), *P. pungens* (Trainer, 2002), *P. seriata* (Fehling i sur. 2004), *P. calliantha* (Besiktepe i sur. 2008), *P. multiseriata* (Baugh i sur. 2006) i *P. fraudulenta* (Besiktepe i sur. 2008; Cusack i sur. 2022). Osim navedenih morskih dijatomeja roda *Pseudo-nitzschia*, DA proizvode crvene alge iz roda *Chondria* (Kotaki i sur. 2004). Sposobnost ove vrste da proizvodi DA otkrivena je 1987. godine nakon masovnog trovanja ljudi u Kanadi kada se otrovalo 107 ljudi od kojih je troje preminulo (Wright i dr., 1989; Todd 1993). U hrvatskim vodama DA je po prvi put detektirana u uzorcima dagnji iz uzgajališta srednjeg Jadrana, u siječnju 2006. godine (Ujević i sur. 2010). Prisutnost DA povezana je s povećanom abundancijom *Pseudo-nitzschia* spp. u vodenom stupcu, dok su abiotski uvjeti bili niska temperatura i salinitet. Utvrđena maksimalna koncentracija DA iznosila je 6,5486 mg ekv./kg (granica detekcije 0,1025 mg ekv./kg). DA je uglavnom zabilježena u uzorcima dagnji iz srednjeg Jadrana i prnjavica iz Kaštelanskog zaljeva (Ujević i sur., 2010).

Azaspiracide (AZA), lipofilne morske biotoksine, koji se nakupljaju u jestivom tkivu školjkaša proizvode vrste roda *Azadinium* (*A.*) i *Amphidoma*. AZA su skupina lipofilnih biotoksina koja je zadnja otkrivena. Prva intoksikacija ljudi AZA dogodila se 1995. g. u Nizozemskoj nakon konzumacije kontaminiranih dagnji iz Irske, sa simptomima sličnim dijaretičkom trovanju školjkašima (McMahon i Silke, 1996). Poznato je više od 60 analoga, a samo su morski biotoksini AZA1, AZA2 i AZA3 regulirani u Europi i na međunarodnoj razini (Krock i sur., 2019). Budući da je dinoflagelat *A. spinosum* vrlo malen (12-16 µm), teško ga je identificirati pomoću svjetlosnog mikroskopa, stoga su razvijene molekularne tehnike za otkrivanje DNK specifične za vrstu. *Azadinium* vrste prisutne su u različitim okolišnim uvjetima, u područjima tropske klime, umjerene pa do subarktičke klime, ali su također prisutne u obalnim i otvorenim morskim vodama (Adams i sur., 2020). Iako su vrste roda *Azadinium* pronađene u vodama Jadrana, u mekom tkivu školjkaša u periodu 2017. – 2022. AZA toksini nisu detektirani.

Okadaičnu kiselinu i njezine derivate dinofizistoksine (DTX) i pektenotoksine (PTX), uzročnike dijaretičkog trovanja školjkašima, proizvode dinoflagelati roda *Dinophysis* (*D.*) (Yasumoto i sur., 1985). Trovanja nakon konzumacije školjkaša, koja su se dogodila 1976. i 1977. godine u sjeveroistočnom Japanu dovele su do opisa ove skupine biotoksina i identifikacije dinoflagelata *Dinophysis fortii* kao proizvođača tih biotoksina (Yasumoto i sur., 1978, Yasumoto i sur., 1980). Vrste roda *Dinophysis* su kozmopoliske vrste prisutne u tropskim, umjereno toplim i hladnim morskim vodama, i obalnim morskim vodama s unosom slatke vode (Reguera i sur., 2012). Neke *Dinophysis* spp., poput *D. miles* (Marasigan i sur., 2001; Gull i Saifullah, 2010) i *D. norvegica* (Carpenter i sur., 1995; Subba Rao i sur., 1993), pronađene su samo u tropskim i bočatim vodama. *D. caudata* i *D. tripos*, prisutne su u tropskim i subtropskim vodama, ali mogu biti prisutne u hladnijim vodama Norveške (Johnsen i Lømsland, 2010). *D. acuta* se pojavljuje u kasno ljeto i jesen u atlantskim vodama Španjolske (Jaén i sur., 2009) i Irske (Raine i sur., 2010), u vodama Novog Zelanda (MacKenzie, 1992) i u čileanskim fjordovima (Lembeye i sur., 1993). *D. acuminata*, *D. sacculus* i *D. ovum*, pojavljuju se diljem svijeta u priobalnim vodama s unosom slatke vode. Pojava vrsta roda *Dinophysis* prati se u okviru nacionalnog monitoring programa i određene su vrste *D. caudata*, *D. fortii*, *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. infundibulum* i *Phalacroma* (*Ph.*) *rotundatum*, *Ph. mitra*, i *Phalacroma* spp. koje mogu

proizvoditi lipofilne morske biotoksine. Godine 2021. porast brojnosti vrste *D. fortii* uzrokovao je pojavu morskih biotoksina okadaične kiseline u školjkašima u sjevernom Jadranu u jesenskom razdoblju. Morski biotoksini koji uzrokuju DSP trovanje u školjkašima iz Jadrana su prvi put zabilježeni 1989. godine u sjevernom Jadranu (Boni i sur., 1992), dok su u istočnom dijelu Jadrana prvi put određeni u dagnjama iz Kaštelanskog zaljeva 1994. i 1995. godine (Marasović i sur., 1998; Orhanović i sur., 1996).

STX i njegove analoge, koji izazivaju paralitičko trovanje školjkašima, proizvode morski dinoflagelati roda *Alexandrium* (A.) i *Gymnodinium* (G.) (EFSA, 2009b). *A. minutum*, *A. catenella*, *A. tamarense* i *G. catenatum* pojavljuju se u umjereno toplim, subtropskim i tropskim obalnim vodama diljem svijeta (Parker i sur., 2002; Lim i Ogata, 2005). „Cvjetanje“ vrsta *Alexandrium* evidentirano je u različitim područjima, npr. Japanu (Kodama, 2010), Sredozemnom moru (Karydis i Kitsiou, 2012), Kini (Douding i sur., 2014), Argentinskom moru (Fabro i sur., 2017), Australiji (Ajani i sur., 2017) i Beringovom moru (Natsuike i sur., 2017). Posljedica „cvjetanja“ *A. minutum* u malezijskim vodama, bila je proizvodnja, a zatim akumulacija PSP toksina u školjkašima te nakon njihove konzumacije, trovanje osoba koje su konzumirale toksične školjkaša, što je rezultiralo hospitalizacijom šest osoba i jednim smrtnim ishodom (Lim i Ogata, 2005). U profilu toksina koje proizvodi *A. minutum* dominiraju GTX1 i GTX4, a u tragovima su prisutni GTX2 i GTX3 (Negri et al., 2003). Autori Baikho Kim i sur. (2016) ustanovili su da stanice *A. pacificum* u kulturama s ograničenim fosfatom proizvode više PSP toksina i raznovrsniji profil PSP toksina, nego stanice ograničene dušikom, pri najvećim stopama rasta. U Jadranu su zabilježene vrste *A. minutum* i *A. tamarense*, najčešće u hladnijem dijelu godine (siječanj-travanj)(Ujević i sur., 2012).

Vrste koje proizvode YTX su *Lingulodinium* (L.) *polyedra*, *Protoceratium reticulatum* i *Gonyaulax* (G.) *spinifera*. *L. polyedra* primarni je izvorni organizam za produkciju YTX (Paz i sur., 2004). Dinoflagelati *G. spinifera* i *L. polyedra* pojavljuju se u Jadranu u periodu od siječnja do rujna, a najviše u periodu od svibnja do kolovoza. U istom periodu je određen YTX, koji je najzastupljeniji morski biotoksin u školjkašima Jadrana, uglavnom u uzorcima dagnji iz Jadrana, dok ga prnjavice i rumenke uglavnom ne sadrže. YTX su uz lipofilne morske biotoksine, OA i dinofizistoksine, povezani s dijaretičnim trovanjem školjkašima (DSP), jer se često istovremeno ekstrahiraju s OA i dinofizistoksinom, i daju pozitivne rezultate primjenom biološkog testa na miševima. Međutim, YTX za razliku od njih ne uzrokuju probavne smetnje niti inhibiciju protein fosfataze, već su jaki citotoksini (Pérez-Gómez i sur., 2006).

3.2. Razlika u kumulaciji morskih biotoksina među vektorima

Mnogi morski organizmi kumuliraju morske biotoksine u svom tkivu i na taj način postaju njihovi vektori u prehrambenom lancu. Zabilježena je njihova kumulacija u organizmima poput rakova, glavonožaca, puževa, velikih i planktivornih riba, no zbog specifičnog načina hranidbe – filtracije velikih količina vode u kojoj obitavaju, najčešći su vektori školjkaši (Costa i sur., 2017; Oyaneder-Terrazas i sur., 2017; Saeed i sur., 2017; Farabegoli i sur., 2018). Među različitim vrstama školjkaša uočene su razlike u pojavnosti i kumulaciji morskih biotoksina, čak i među vrstama koje potječu s istog područja i koje su bile izložene jednakom okolišnom i antropogenom utjecaju (Roje-Busatto i Ujević, 2014; Orellana i sur., 2017; Ujević i sur., 2019; Kvirgić i sur., 2021; 2022; 2023). Ove razlike proizlaze iz različitosti u apsorpciji, metaboliziranju i brzini depuracije morskih biotoksina, a osim o vrsti školjkaša ovise i o vrsti toksina (Donovan

i sur., 2008; Mafra i sur., 2010a; 2010b.; Álvarez i sur., 2015; 2020; Blanco 2018; Andres i sur., 2019; Dhanji-Rapkova i sur., 2019; Blanco i sur., 2021). Unatoč navedenim razlikama, dagnje su vrsta koja se najčešće koristi za praćenje pojavnosti morskih biotoksina. U RH su uz kamenice najeksploatiranija vrsta školjkaša (Matić-Skoko i sur., 2017), ali i jedina vrsta za koju je evidentirana konzumacija od strane hrvatskih potrošača (Tablica 8), a prema podacima dvogodišnjeg istraživanja o prehrambenim navikama odrasle populacije u RH (HAPIH, 2011; 2012).

3.3. Skupina amnezijskih toksina

Glavni predstavnik ASP skupine morskih biotoksina je domoična kiselina (DA). DA proizvode, tijekom procesa fotosinteze, dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia*, ali i *Nitzschia* vrste (Kotaki i sur., 2000; Tan i sur., 2016). DA je hidrofilna aminokiselina (Tasker, 2021). Njenu strukturu čine 2,3,4 trisupstituirani pirolidinski prsten s imino skupinom, tri karboksilne skupine zahvaljujući kojima molekula ima veliki ionizacijski potencijal i topivost, te elektronski bogata konjugirana dvostruka veza koja je ključna za njenu biološku aktivnost. Do sada je otkriveno osam izomera, C5`epimer i dva laktone (La Barre i sur., 2014). Umjereno je termostabilna i ne uništava se kuhanjem, već prelazi u C5`epimer jednake toksičnosti, dok izlaganjem UV zračenju dolazi do fotodegradacije u manje toksične izomere i dekarboksilirane derivate (Quilliam, 2003; Bouillon i sur., 2008). Najčešći vektori DA su školjkaši poput dagnji, britvastih školjaka, češljača i kamenica (Amzil i sur., 2001; Vale i Sampayo, 2001; James i sur., 2005.; Farabegoli i sur., 2018), no detektirana je i u drugim morskim organizmima poput rakova, sitne plave ribe (EFSA, 2009.f), hobotnica, sipa (Lopes i sur., 2013), planktonskih rakova, planktivorne ribe (Saeed i sur., 2017) i mješčičnica (López-Rivera i sur., 2009; Kvrđić i sur., 2022). U hrvatskom dijelu Jadrana, domoična je kiselina prvi put pronađena u dagnjama podrijetlom iz sjevernog Jadrana 2005. godine (Ljubešić i sur., 2011). Ubrzo zatim u više vrsta školjkaša iz srednjeg Jadrana u siječnju 2006. godine, a najviše koncentracije DA izmjerene su u veljači nakon velikih oborina i porasta brojnosti dijatomeja *Pseudo-nitzschia spp.*, no još uvijek znatno niže od NDK (Ujević i sur., 2010). Od tada se pojavljuje sporadično, u niskim koncentracijama (Ujević i sur., 2019; Kvrđić i sur., 2022, Kvrđić, 2023).

3.4. Skupina azaspiracida

AZA su lipofilni morski biotoksini koje proizvode dinoflagelati roda *Azadinium* i *Amphidoma* (Krock i sur., 2009; Krock i sur., 2012; Tillmann i sur., 2014). Njihovu strukturu čini polieterska okosnica karakteristična za morske biotoksine koje proizvode dinoflagelati, s jedinstvenim strukturnim karakteristikama. Molekula sadrži tri spiro spoja, heterocikličku amino skupinu i terminalno smještenu alifatsku karboksilnu skupinu (Satake i sur., 1998; Nicolaou i sur., 2006.a; Nicolaou i sur., 2006b). Skupinu čini najmanje 30 analoga, no trenutno su zakonodavstvom regulirane NDK navedene samo za AZA1, AZA2 i AZA3 (Hess i sur., 2016) koji su se do sad jedini pojavljivali u koncentracijama koje mogu ugroziti zdravlje potrošača (EFSA 2008.b). No postoje istraživanja koja ukazuju da tijekom termičke obrade dolazi do konverzije manje toksičnih analoga koji nisu obuhvaćeni zakonodavstvom, u toksičnije analoge (AZA17 i 19 prelaze u AZA3 i 6) (McCarron i sur., 2008). U Jadranskom moru pojavljuju se rijetko i u niskim koncentracijama. U RH prvi put je potvrđena njihova prisutnost u školjkašima podrijetlom iz južnog Jadrana 2017. godine (Talić i sur., 2020). AZA se najčešće kumuliraju u dagnjama (Furey i sur., 2010), međutim, mogu se nakupljati i u drugim vrstama školjkaša poput kamenica i kapica (Hess i sur., 2003). Njihova kumulacija u tkivu školjkaša razlikuje se u

odnosu na ostale polieterske morske biotoksine jer toksičnost nije uvijek ograničena na probavnu žlijezdu, te je tijekom produljene izloženosti visokim koncentracijama uočen prijenos morskih biotoksina u druga tkiva (Magdalena i sur., 2003), a podložni su i biokonverziji (Rehmann i sur., 2008; McCarron i sur., 2009; O'Driscoll i sur., 2011).

3.5. Okadaična skupina

OA i njeni strukturni analozi dinofizistoksini (DTX1, DTX2), (Reguera i sur., 2014) su policikličke polieterske karboksilne kiseline (Sosa i Tubaro, 2016; Caruana i Amzil, 2018). OA je prvi put izolirana iz morske spužve *Halichondria okadae* po kojoj je i dobila ime, potom iz spužve *Halichondria melanodocia* (Tachibana i sur., 1981), međutim, kasnije je ustanovljeno da potječe od dinoflagelata. Morske biotoksine ove skupine proizvode dinoflagelati rodova *Prorocentrum*, *Phalacroma* i *Dinophysis* (Sosa i Tubaro, 2016; Stonik i Stonik, 2016). U školjkašima se analozi OA na položaju C7 hidroksi skupine mogu esterificirati dugolančanim zasićenim i nezasićenim masnim kiselinama, a skupina nastalih derivata nazivaju se DTX3 toksini (McNabb, 2008). Budući da su DTX3 toksini podložni kemijskoj ili enzimatskoj hidrolizi koja se odvija i tijekom probave, mehanizam djelovanja i toksičnost jednaka je matičnom toksinu od kojih potječu (Sosa i Tubaro, 2016). Drugu skupinu čine C1 esterificirani toksini nazvani DTX4 i DTX5 toksini, a za razliku od DTX3 nastaju u algama (McNabb, 2008).

Vektori toksina okadaične skupine u prehrani ljudi najvećim dijelom su školjkaši, no mogu biti i ribe, rakovi i puževi (Costa i sur., 2017; Vilarinño i sur., 2018; Murk i sur., 2019). U većini vrsta školjkaša kumuliraju se uglavnom u probavnom sustavu (Suzuki i sur., 2005; García i sur., 2015). Od početka 90-tih godina prošlog stoljeća, kada je i započelo istraživanje pojavnosti morskih biotoksina u ovom dijelu Jadrana, sve do sredine 90-tih dominirali su DTX i OA (Ciminiello i sur., 2010). U hrvatskom dijelu Jadrana, OA i DTX1 prvi put su detektirani 1994. godine u dagnjama izlovljenim u srednjem Jadranu (Orhanović i sur., 1996), dok je DTX2 detektiran 1997. godine (Pavela-Vrančić i sur., 2002). Povremena pojavnost toksina okadaične skupine zabilježena je u školjkašima podrijetlom iz južnog (Ninčević-Gladan i sur., 2010) i srednjeg dijela Jadrana (Bogdanović i sur., 2022), kao i u onima podrijetlom i iz sjevernog Jadrana (akvatorij istarskog poluotoka), u kojima je više puta utvrđena koncentracija OA iznad NDK (Ninčević-Gladan i sur., 2008; 2010; 2011; Kvirgić, 2023).

3.6. Skupina paralitičkih toksina

PSP toksini su skupina hidrofилnih morskih biotoksina koje u morima proizvode dinoflagelati (Cusick i Sayler, 2013). Utvrđeno je otprilike desetak toksičnih *Alexandrium* vrsta, od kojih su najčešće *A. tamarense*, *A. fundyense* i *A. catanella* te vrste *Gymnodinium catenatum* i *Pyrodinium baharense* (Shumway, 1990; Shumway, 1995). Posebnost ove skupine morskih biotoksina je pojavnost u slanim, ali i slatkim vodama (Cusick i Sayler, 2013) gdje ih proizvode cijanobakterije (Wiese i sur., 2010). Skupini pripada najmanje 58 strukturno sličnih spojeva, od kojih je više od 30 analoga STX (Wiese i sur., 2010; Wu i sur., 2019), koji je predstavnik skupine i jedan od najpotentnijih poznatih neproteinskih toksina (Thottumkara i sur., 2014). Po kemijskoj strukturi ovi toksini su alkaloidi s tetrahidropurinskim prstenom s R1-R4 supstituentima, a zbog dvije gvanidinske skupine izrazito su polarni (Raposo i sur., 2020). S obzirom na supstitucijsku skupinu R4 u molekuli, dijele se u više podskupina koje se razlikuju po toksičnosti (navedeni prema padajućoj vrijednosti): karbamoil, dekarbamoil i N-sulfokarbamoil toksine (EFSA, 2009e). Također su identificirani i opisani analozi s hidrogenbenzoatom, sulfatiranim benzoatom i acetatom kao R4 supstitucijskom skupinom (Raposo i sur., 2020), a među posljednje

otkrivenima su M analozi koji pripadaju karbamoil i N-sulfokarbamoil podskupinama (Leal i Cristiano, 2022). U kiselim uvjetima su stabilni, dok u alkalnim uvjetima lako oksidiraju (Wu i sur., 2019). Izuzetak su analozi N-sulfokarbamoil podskupine koji pri visokoj temperaturi i u kiselom mediju ($\text{pH} < 4$) podliježu hidrolizi i prelaze u odgovarajuće analoge iz skupine karbamata (Van Egmond i sur., 2004). Prvi identificirani PSP toksin otkriven je u školjkašu *Saxidomus giganteus* 1957. godine (Schantz i sur., 1957) prema kojem je i dobio ime saksitoksin (STX), a cijela skupina u pošlosti je nazivana skupinom saksitoksina. Podložni su različitim reakcijama biokonverzije od kojih se najveći broj odvija u školjkašima, manje u dinoflagelatima koji ih proizvode, i u ljudima (Leal i Cristiano, 2022). Reakcije se razlikuju među vrstama i mogu dovesti do nastajanja novih analoga i promjene toksičnosti (Shimizu i Yoshioka, 1981; Bricelj i sur., 1991; Gessner i sur., 1997; Bricelj i Shumway, 1998; Ding i sur., 2017; Raposo i sur., 2020; Oyaneder-Terrazas i sur., 2022). Kumulacija ove skupine morskih biotoksina zabilježena je u mnogim vrstama morskih organizama čak i u slučaju odsutnosti dinoflagelata, što ukazuje na moguće postojanje i drugih proizvođača PSP toksina, poput pojedinih vrsta bakterija koje su prisutne u morima (Sakamoto i sur., 1992). Najčešći vektori su dvoljuštorni školjkaši i puževi (Oyaneder-Terrazas i sur., 2017), a utvrđeni su i u plaštenjacima (Roje-Busato i Ujević, 2014; Ben-Gigirey i sur., 2020), bodljikašima (Silva i sur., 2018), rakovima (Llewellyn i sur., 2002) i ribama (Cembella i sur., 2002; Costa i sur., 2010). U hrvatskom dijelu Jadrana prvi put su detektirani 2009. godine u školjkašima uzgojenim u sjeveroistočnom Jadranu (Ujević i sur., 2012). U školjkašima Jadranskog mora najčešće su prisutni u niskim koncentracijama, no više puta su detektirani u koncentracijama blizu ili iznad NDK (Ciminiello i sur., 1995; Honsell i sur., 1996; Ujević i sur., 2012; Roje-Busatto i Ujević, 2014; Kvrđić, 2023).

3.7. Skupina jesotoksina

YTX su skupina strukturno sličnih policikličkih, liposolubilnih, termostabilnih morskih biotoksina (Ferrari i sur., 2004) koje proizvode dinoflagelati *Protoceratium reticulatum* (Satake i sur., 1997; Paz i sur., 2004), *Lingulodinium polyedra* (Paz i sur., 2004) i *Gonyaulax spinifera* (Rhodes i sur., 2006). Otkriveno je preko 90 analoga (Miles i sur., 2005; Miles i sur., 2006; Ciminiello i sur., 2007; EFSA, 2009a; Rubini i sur., 2021), od kojih jedan dio nastaje u dinoflagelatima, dok neki od njih nastaju metaboliziranjem u školjkašima (Paz i sur., 2008). Predstavnik skupine je YTX, disulfatirani polieter, izgrađen od 11 etera različitih veličina poredanih u karakterističnu strukturu poput ljestava i terminalnog acikličkog nezasićenog lanca s devet ugljikovih atoma (Ciminiello i Fattorusso, 2008). Zbog dvije sulfatne skupine, YTX imaju amfotermna svojstva (Paz i sur., 2008). Prvi put su izolirani 1986. godine u kopicama *Patinopecten yessoensis* (Murata i sur., 1987). Kumuliraju se u mnogim vrstama školjkaša, a najčešći vektori su kapice i dagnje (Paz i sur., 2008). U školjkašima se kumuliraju uglavnom u probavnoj žlijezdi i imunocitima, ali utvrđeni su i u mišićnom tkivu (Murata i sur., 1987; Yasumoto i Takizawa, 1997; Franchini i sur., 2003; Paz i sur., 2008). YTX i njegovi analozi prvi put su detektirani u školjkašima podrijetlom iz hrvatskog dijela Jadrana 2004. godine u dagnjama iz sjevernog Jadrana (Ninčević Gladan i sur., 2008). Od tada se javljaju u koncentracijama nižim od NDK (Čustović i sur., 2009; Ninčević Gladan i sur., 2010; Bogdanović i sur., 2022; Kvrđić, 2023).

3.8. Novi morski biotoksini

Novijim istraživanjima koje karakterizira primjena poboljšanih metoda određivanja, otkrivaju se i identificiraju novi morski biotoksini. Njih se identificira kao "toksini u nastajanju". Primjer su

ciklički imini (CI), palitoksin (PLTX) i ciguatoksin (CTX). Pojava ovih toksina u okolišu potencijalno je posljedica klimatskih promjena koje mijenjaju fizikalno-kemijske parametre mora koji utječu na pojavnost fitoplanktonskih vrsta u vodenom stupcu (Louzao i sur., 2022). Osim okolišnog, značajan je i antropogeni utjecaj na njihovo širenje poput prijenosa s jednog područja na drugo putem balastnih voda, ili uvozom/izvozom školjkaša. „Toksini u nastajanju” nakupljaju se uglavnom u školjkašima, imaju snažno neurotoksično djelovanje, zbog čega se školjkaši koji se koriste za konzumaciju ljudi preporučuju ispitivati na njihovo prisustvo

CI su organski spojevi koji spadaju u lipofilne morske biotoksine, a koje u moru proizvodi nekoliko vrsta dinoflagelata. Njihova pojava povezuje se s cvjetanjem algi, mogu kontaminirati školjkaše, a u pokusnih životinja izazivaju neurotoksične simptome. *Karenia selliformis*, *Alexandrium (A.) ostenfeldii* i *A. peruvianum* povezani su s biosintezom gimnodimina (GYM) i spirovida (SPX) (Touzet i sur., 2008; Salgado i sur., 2015), *Vulcanodinium rugosum* je proizvođač pinatoksina i portimina (McCarthy i sur., 2015; Molgó i sur., 2017), a prorocontrolidi su izolirani iz vrste *Prorocentrum lima* (Torigoe i sur., 1988). Navedeni CI su pronađeni u ekstraktima kontaminiranih školjkaša, prirodnim populacijama fitoplanktona, monokulturama toksičnih dinoflagelata i kao rezultat metabolizma školjkaša (acil esteri masnih kiselina) (Guéret i Brimble, 2010; Stivala i sur., 2015). U CI spada 40 različitih spojeva čija se struktura razlikuje na temelju broja prstenova, koji su bitne komponente za njihovu bioaktivnost (Stivala i sur., 2015; Molgó i sur., 2017). Grupirani su zajedno zbog spiro spoja eterskih dijelova molekule te zajedničke imino skupine kao dijela cikličkog prstena, koji daje farmakološku i toksikološku aktivnost, te zbog njihove slične akutne "brzodjelujuće toksičnosti" u intraperitonealnom biološkom testu na miševima (EFSA, 2010a; Reverté i sur., 2014; Ujević i sur., 2015). Nisu zabilježeni slučajevi trovanja CI, niti postoji dovoljno podataka na temelju kojih bi se utvrdio rizik za potrošače, a zakonodavstvom EU nisu propisane NDK vrijednosti (EFSA, 2010a; Cembella i Krock, 2009).

PLTX su grupa hidrofилnih morskih biotoksina koje proizvode meki koralji rodova *Palythoa*, *Zoanthus* i *Parazoanthus*, cijanobakterije roda *Trichodesmium*, te dinoflagelati roda *Ostreopsis* čija je pojava na Mediteranu sve češća. Iako je dokazana njihova toksičnost, za ovu grupu nisu propisane NDK vrijednosti (Accoroni i sur., 2017; Lounas i sur., 2021; Louzao i sur., 2022).

CTX su lipofilni morski biotoksini čija je pojava bila uglavnom ograničena na tropska i subtropska područja, međutim, posljednjih godina sve češće se pojavljuju i na Mediteranu (Chinain i sur., 2021; Tudo i sur., 2020). Na području EU nije dopušteno stavljanje u promet ribe koja sadrži toksine ove grupe (EFSA, 2010b), što je regulirano Uredbom (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o posebnim higijenskim zahtjevima za hranu životinjskog podrijetla.

4. Karakterizacija opasnosti

4.1. Skupina amnezijских toksina

Konzumacijom školjkaša kontaminiranih amnezijским toksinima u koncentraciji većoj od NDK, moguća je pojava simptoma ASP koji uključuju nespecifične simptome probavnog sustava poput grčeva, proljeva, gastrointestinalnog krvarenja, te specifične, neurološke simptome. DA izaziva oštećenja dijelova središnjeg živčanog sustava (SŽS) koji se dovode u vezu s pamćenjem, što za posljedicu ima gubitak kratkoročnog pamćenja, karakterističan simptom po kojem je trovanje dobilo ime. Dolazi do pojave glavobolje, dezorijentiranosti, zbunjenosti, promjena u ponašanju, mučnine, povraćanja, aritmije, nestabilnosti krvnog tlaka, oštećenja oka (Todd, 1993), a u težim slučajevima do konvulzija, kome i mogućeg smrtnog ishoda (Perl i sur., 1990). Osim na središnji, DA djeluje toksično i na periferni živčani sustav. Prvo zabilježeno trovanje DA dogodilo se 1987. godine u Kanadi kada je oboljelo više od stotinu, a umrlo četvero ljudi (Todd, 1993).

Apsorpcija DA iz probavnog sustava je slaba, ne postoje podaci o biotransformaciji (Doucette i Tasker, 2008), a iz seruma se izlučuje brzo bubrežnim klirensom (Costa i sur., 2014). Slabo prolazi krvno-moždanu barijeru, međutim, pojedinim dijelovima SŽS ta barijera nedostaje, te je ulazak lakši. Prolazi placentalnu barijeru i može izazvati oštećenje fetusa (Maucher-Fuquay i sur., 2012), a izlučuje se i majčinih mlijekom (Maucher i Ramsdell, 2005). Toksični učinak DA ovisi o količini unesenog toksina, dobi i osjetljivosti organizma. Teži slučajevi trovanja zabilježeni su kod osoba s kroničnim bolestima poput kronične bubrežne bolesti, hipertenzije i dijabetesa (Todd, 1993).

DA je analog glutaminske kiseline koja je važan ekscitatorni neurotransmiter u SŽS sisavaca. Zbog strukturne sličnosti, veže se na određene vrste glutamatnih receptora (Tasker, 2016), izaziva oslobađanje endogenog glutamata koji dovodi do povećanja koncentracije intracelularnog Ca^{2+} u neuronima, njihovog oštećenja i neurotoksičnosti (Pulido, 2008). Osim na neurone, utječe i na funkciju drugih vrsta stanica u SŽS (Ross i sur., 2000).

Temeljem podataka o akutnom toksičnom djelovanju DA prikupljenim tijekom trovanja ljudi u Kanadi 1987. godine, EFSA-in CONTAM odbor odredio je LOAEL od 0,9 mg DA/kg t.m. kao početnu vrijednost. Ona je korigirana sigurnosnim faktorom 3, čime je utvrđena NOAEL od 0,3 mg DA/kg t.m., te faktorom 10 zbog individualnih razlika među ljudima i primjene nedovoljno osjetljivih metoda utvrđivanja neurotoksičnog učinka DA. Ovime je utvrđena ARfD od 30 μ g DA/kg t.m. (odnosi se na sumu DA i epi-DA) (EFSA, 2009f).

4.2. Skupina azaspiracida

Konzumiranje plodova mora kontaminiranih AZA uzrokuje sindrom azaspiracidnog trovanja školjkašima, s gastrointestinalnim simptomima identičnim onima koje uzrokuje okadaična skupina (McMahon i Silke, 1996). Nekoliko sati od konzumacije javljaju se mučnina, povraćanje, grčevi i proljev, koji u potpunosti nestaju nakon 2-3 dana (McMahon i Silke, 1996). Nakon oralne aplikacije glodavcima, uočena su oštećenja organa probavnog trakta – crijevnog epitela, *lamina propria* i crijevnih resica (Ito i sur., 2002). Nakon intraperitonealne aplikacije, AZA izazivaju pojavu neuroloških simptoma, koji uključuju tromost, poteškoće s disanjem, grčeve, paralizu i smrt unutar 90 minuta (Twiner i sur., 2008). Podataka o mutagenosti i genotoksičnosti nema, a nisu potvrđene niti karcinogenost i tumorogenost AZA (Hess i sur., 2016). Prvi slučajevi azaspiracidnog trovanja zabilježeni su 1995. godine nakon konzumacije

dagjni irskog podrijetla u Nizozemskoj (Satake i sur., 1998). Kasnije, slučajevi trovanja zabilježeni su u više europskih zemalja, a velik dio slučajeva bio je povezan sa školjkašima uvezenima iz Irske (Ryan i sur., 2008).

Mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, no provedena *in vitro* istraživanja ukazuju na citotoksičnost AZA i utjecaj na različite stanične procese (EFSA, 2008b; Botana i sur., 2014) poput morfoloških promjena citoskeleta, promjene rasporeda i koncentracije F-aktina (Román i sur., 2002; Twiner i sur., 2005; Twiner i sur., 2012a), koncentracije cikličkog adenozin monofosfata i Ca^{2+} iona u citosolu, homeostaze protona (Román i sur., 2002; Alfonso i sur., 2006), hiperpolarizacije neuronske membrane (Vale i sur., 2010) i inhibicije specifičnih kalijevih naponsko ovisnih kanala važnih za provodljivost impulsa u srcu (Twiner i sur., 2012b). Zbog razlike u strukturi njihov učinak na navedene mehanizme se razlikuje (Alfonso i sur., 2006), kao i njihova toksičnost. Temeljem podataka o akutnim letalnim dozama analoga nakon intraperitonealne aplikacije miševima, utvrđene su vrijednosti TEF za AZA1 = 1; AZA2 = 1,8; AZA3 = 1,4 (EFSA, 2008b).

Za skupinu AZA, LOAEL je utvrđena temeljem podataka jedinog slučaja trovanja ljudi. EFSA-in CONTAM odbor procijenio je izloženost od 1,9 μg AZA ekv./kg t.m. (uz pretpostavku da je tjelesna masa odrasle osobe 60 kg) kao najvjerojatnija LOAEL koja je rezultirala pojavom azaspiracidnog trovanja. Za ekstrapolaciju u NOAEL primijenjen je sigurnosni faktor 3 zbog blagog i reverzibilnog toksičnog učinka, a uobičajeni faktor 10 uslijed individualnih razlika nije primijenjen zbog toga što je do trovanja došlo među osjetljivim pojedincima. Međutim, zbog malog broja osoba (nedostatni toksikološki podaci) primijenjen je dodatni faktor 3 čime je utvrđena ARfD od 0,2 μg AZA ekv./kg t.m. (EFSA, 2008b).

4.3. Okadaična skupina

OA je inhibitor serin/treonin protein fosfataza koje sudjeluju u defosforilaciji niza supstrata u organizmu sisavaca i imaju važnu ulogu u regulaciji esencijalnih procesa u stanici, poput održavanja strukture citoskeleta, rasta, diobe i smrti stanice (Sosa i Tubaro, 2016). Nakon ingestije, morski biotoksini ove skupine zadržavaju se uglavnom u probavnom traktu (Louzao i sur., 2021). Iako molekularni mehanizam njihovog djelovanja nije u potpunosti objašnjen (Campos i sur., 2020), pretpostavlja se da povećanje fosforiliranih proteina u epitelu crijeva dovodi do narušavanja njegove barijerne uloge i povećanja paracelularne propusnosti, što utječe na transport iona i nutrijenata u tankom crijevu, kao i na apsorpciju vode (Louzao i sur., 2003). Još je poznato da u slučaju kada nije PP uključen, uključeni su neuropeptid Y i serotonin u kojem slučaju isto dolazi do dijareje (Park i sur., 2023). OA iskazuje citotoksično djelovanje, inhibira rast i izaziva apoptozu različitih vrsta stanica (Valdiglesias i sur., 2011). Uočeno je i njeno genotoksično (Carvalho i sur., 2006), embriotoksično (Jiao i sur., 2017), imunotoksično (del Campo i sur., 2017) i neurotoksično (Tapia i sur., 1999) djelovanje. CONTAM odbor EFSA-e je temeljem podataka o relativnoj inhibiciji protein fosfataza 2A (PP2A) enzima i akutne intraperitonealne toksičnosti u miševa utvrdio jednaku toksičnost za OA i DTX1, te manju za DTX2 (EFSA, 2008a), te se za izračun ukupne koncentracije primjenjuje korekcija s TEF-ovima (Tablica 3).

Konzumacija školjkaša koji sadrže morske biotoksine OA i DTX može dovesti do dijaretičnog trovanja školjkašima. Ovo trovanje ima karakteristične kliničke simptome koji se očituju kao mučnina, povraćanje, proljev i bolovi u abdomenu. Prisutnost ovih toksina u školjkašima predstavlja javnozdravstveni rizik i uzrokuje značajne ekonomske probleme u područjima u

kojima se javlja (Park i sur., 2023). Prvi slučajevi DSP dogodili su se u Japanu 1976. i 1977. godine (Yasumoto i sur., 1978). Od tada su se toksini ove skupine proširili diljem svijeta, no najveću pojavnost imaju u Europi i Japanu (Sosa i Tubaro, 2016). Zbog učestale pojavnosti na nekim područjima predstavljaju značajan socio-ekonomski i zdravstveni problem (Gestal Otero, 2008). Znaci trovanja mogu nastupiti u vremenu od pola sata do pet sati nakon konzumacije (Emery i sur., 2021). Protuotrova nema, liječenje je simptomatsko i u roku od nekoliko dana bolesnici se u potpunosti oporave (Tubaro i sur., 2008). DSP toksini ostaju nepromijenjeni nakon procesa kuhanja i/ili zamrzavanja (McCarron i sur., 2008; Reboreda i sur., 2010), a Valdiglesias i sur. (2013) su utvrdili da se njihova prisutnost u školjkašima ne može detektirati promjenom organoleptičkih svojstava.

Preporučene TEF vrijednosti dobivene su na temelju akutne intraperitonealne i akutne oralne toksičnosti, te TEF za OA i DTX1 iznosi 1,0, dok je TEF za DTX2 0,6 (EFSA, 2008a; WHO, 2016).

Količina DSP toksina regulirana je zakonodavstvom u EU i iznosi 160 µg OA ekv./kg (tkiva školjkaša) (Delegirana Uredba Komisije (EU) 2021/1374).

Na temelju podataka o kroničnim učincima OA kod životinja ili ljudi, EFSA (2008a) nije mogla donijeti vrijednost za podnošljiv dnevni unos (TDI), koji se koristi prilikom određivanja kronične izloženosti kemijskim kontaminantima. S obzirom na akutnu toksičnost toksina OA skupine, EFSA-in CONTAM odbor je postavio akutnu referentnu dozu (ARfD) na temelju dostupnih podataka za ljude. Uzimajući u obzir nesigurnosti u procijenjenoj izloženosti u različitim izvješćima o ljudskim slučajevima, zaključeno je da najniža razina kod koje je uočen štetni učinak (LOAEL) za izazivanje bolesti u ljudi iznosi od 50 µg OA ekv./osobi, što je približno 0,8 µg OA ekv./kg tjelesne mase (t.m.) za odrasle (ukoliko se pretpostavi tjelesna masa odrasle osobe od 60 kg). Za pretvorbu LOAEL-a u razinu bez uočenog štetnog učinka (NOAEL) obično se koristi faktor nesigurnosti od 3 do 10. Kako su u ovom slučaju simptomi koji se javljaju smatrani relativno blagim i s mogućnošću oporavka, Odbor je odlučio primijeniti faktor 3, te je određen NOAEL, odnosno ARfD od 0,3 µg OA ekv./kg t.m. (EFSA, 2008a). Dodatni faktor nesigurnosti koji proizlazi iz razlika među pojedincima nije primijenjen zbog toga što su toksikološki podaci dobiveni temeljem brojnih slučajeva trovanja ljudi iz različitih zemalja, a pretpostavljalo se da uključuju i najosjetljivije pojedince (EFSA, 2008a).

Slučajevi DSP trovanja u ljudi se relativno rijetko prijavljuju, a simptomi obično prođu sami od sebe za 2-3 dana, i bez smrtnih slučajeva. Moguće je da se prema simptomima zamijene s bakterijskim trovanjem i liječe s antibioticima što može utjecati na lažnu kliničku sliku te neispravnu evidenciju bolesti.

4.4. Skupina pektenotoksina

PTX djeluju na aktinski citoskelet različitih vrsta stanica (Spector i sur., 1999; Leira i sur., 2002; Ares i sur., 2005), a posljedica je narušavanje staničnih funkcija koje ovise o citoskeletu, uslijed depolimerizacije F-aktina (Ares i sur., 2007; Espiña i sur., 2008). Česta je supojavnost toksina OA skupine i PTX koji su do 2021. godine bili uključeni u zakonodavnu granicu zajedno sa toksinima OA skupine. S obzirom da imaju različit mehanizam djelovanja i nisu zabilježeni slučajevi trovanja ljudi PTX, temeljem mišljenja EFSA (2009b) o pogrešnom zajedničkom grupiranju s OA skupinom u analitičkom i toksikološkom smislu, više nisu uključeni u

regulatornu granicu za skupinu OA toksina. Ovdje su navedeni iz razloga što su u vremenu za koje se prikazuju rezultati (do 2021.) bili obuhvaćeni Planom monitoringa.

4.5. Skupina paralitičkih toksina

PSP morski biotoksini su neurotoksini koji, uslijed konzumacije plodova mora koji ih sadrže, uzrokuju paralitičko trovanje riba, ptica, sisavaca i ljudi, koje je često smrtonosno (Halstead i Schantz, 1984). Toksično djelovanje PSP toksina očituje se u reverzibilnoj opstrukciji naponsko reguliranih natrijevih kanala na membrani neurona (Choudhary i sur., 2002). Opstrukcija kanala sprječava ulazak Na⁺ iona u stanicu i širenje akcijskog potencijala kroz membrane stanica živčanog sustava i mišićnih stanica, što dovodi do neuro-muskularne paralize (Durán-Riveroll i Cembella, 2017; Leal i Cristiano, 2022). Simptomi paralitičkog trovanja školjkašima se javljaju u kratkom vremenu od intoksikacije, najčešće unutar 30 minuta. U blagim slučajevima trovanja započinju parestezijom u području usne šupljine, koja se može širiti prema vratu i ekstremitetima. U slučaju težeg trovanja parestezija prelazi u obamrlost, dolazi do otežanog izvođenja voljnih pokreta, opće slabosti, osjećaja lebdenja, tahikardije, poteškoća u disanju i govoru. Javljaju se glavobolja, mučnina i povraćanje. U najtežim slučajevima dolazi do mišićne paralize i gušenja, te smrti zbog gušenja izazvanog respiratornom paralizom i kolapsa srčanožilnog sustava, najčešće unutar dvanaest sati (Prakash i sur., 1971). Količina PSP morskih biotoksina koja je toksična ili smrtonosna za ljude individualno je vrlo različita i ovisi o osjetljivosti organizma (FAO, 2004), a djeca su osjetljivija od odraslih (Rodrigue i sur., 1990). Nakon apsorpcije iz probavnog trakta, distribuiraju se krvlju (Llewellyn i sur., 2002) u ostale organe i tkiva. Detektirani su u organima probavnog sustava, bubrezima, srcu, plućima, štitnjači, nadbubrežnoj žlijezdi, mozgu i cerebrospinalnoj tekućini (García i sur., 2004). U organizmu su podložni biokonverziji u različitim tkivima (Gessner i sur., 1997; García i sur., 2009), izlučuju se iz tijela najvećim dijelom mokraćom (Llewellyn i sur., 2002), ali i stolicom (García i sur., 2004). Trenutno referentne vrijednosti TEF navedene u Tablica 3, predložene od strane EFSA-inog CONTAM odbora (EFSA, 2009e), temelje se uglavnom na podacima o akutnoj toksičnosti dobivenim biopokusom na miševima nakon intraperitonealne aplikacije.

CONTAM odbor je temeljem podatka prikupljenih tijekom brojnih slučajeva intoksikacija ljudi utvrdio LOAEL od 1,5 µg STXdiHCl ekv./kg t.m., a budući da u velikom broju slučajeva nije zabilježen toksični učinak niti pri većoj izloženosti, pretpostavljeno je da je ta razina primjenjiva i za osjetljive pojedince. Stoga je primjenom sigurnosnog faktora 3 utvrđena NOAEL od 0,5 µg STXdiHCl ekv./kg t.m. koja je prihvaćena i kao ARfD, zbog velikog broja slučajeva koji su uključivali i osjetljive pojedince (EFSA, 2009e).

4.6. Skupina jesotoksina

Slučajevi trovanja ljudi morskim biotoksinima iz ove skupine nisu zabilježeni (Munday i sur., 2008), međutim, toksičnost nakon intraperitonealne aplikacije pokusnim životinjama je velika (Ogino i sur., 1997). Nakon aplikacije pokusnim životinjama simptomi se javljaju unutar nekoliko sati, u obliku nekoordiniranosti pokreta, skakanja (Franchini i sur., 2004a), iscrpljenosti, a smrt nastupa u kratkom vremenu uslijed dispneje. Uočena su oštećenja srčanog mišića (Tubaro i sur., 2003; Suárez Korsnes i sur., 2006), jetre, gušterače (Terao i sur., 1990) i Purkinje neurona u mozgu (Franchini i sur., 2004a). Pokusom na miševima utvrđeno je da je toksičnost nakon oralnog unosa znatno manja zbog slabe resorpcije iz probavnog trakta (Munday i sur., 2008). Pri izloženosti većim dozama nisu uočena oštećenja

probavnog sustava, ali su uočene neznatne promjene stanica srčanog mišićnog tkiva (Aune i sur., 2002) i prolazne promjene u ponašanju (Ogino i sur., 1997). Također je uočen utjecaj letalnih i subletalnih doza na timus i imunostni sustav (Franchini i sur., 2004b). Dokaza o njihovoj kroničnoj toksičnosti i karcinogenosti nema (EFSA, 2009a).

Dosadašnja *in vitro* istraživanja ukazuju na citotoksičnost YTX uslijed djelovanja na unutarstaničnu homeostazu Ca^{2+} iona, cikličkog adenozin monofosfata, modifikacije citoskeleta, aktivacije kaspaza i otvaranja mitohondrijskih prijelaznih pora (Tubaro i sur., 2010). S obzirom na nedostatak podataka o toksičnom učinku na ljude i nisku toksičnost nakon oralnog unosa, temeljem podataka o toksičnosti nakon intraperitonealne aplikacije pokusnim životinjama, utvrđene su vrijednosti TEF navedene u Tablica 3.

Budući da nema podataka o toksičnim učincima YTX na ljude, ARfD je kao i u slučaju pektenotoksina, utvrđena temeljem podataka o akutnoj oralnoj toksičnosti u miševa. Uz eksperimentalno utvrđenu NOAEL od 5 mg/kg t.m., primijenjen je ukupni sigurnosni faktor 200 (EFSA, 2009a) čime je EFSA CONTAM odbor utvrdio ARfD od 25 μ g YTX ekv./kg t.m..

5. Procjena izloženosti

Procjena izloženosti napravljena je na temelju rezultata praćenih morskih biotoksina, za svaku skupinu biotoksina zasebno, te za školjkaše koji su bili obuhvaćeni ovim monitoringom. Osim toga, procjena je napravljena i za vrijednosti koje su propisane kao najveće dopuštene količine u zakonodavstvu (Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o posebnim higijenskim zahtjevima za hranu životinjskog podrijetla), koje su navedene u Tablica 3, i koje su se primjenjivale u kombinaciji s postojećim podacima o prehranbenim navikama odrasle populacije u RH (HAPIH, 2011;2012).

Nadalje, podaci o prehranbenim navikama odrasle populacije u RH (HAPIH, 2011; 2012) odnose se samo na konzumaciju dagnji, no procjena je napravljena i za ostale školjkaše obuhvaćene monitoringom. U tim su se slučajevima koristile pretpostavke da se u slučaju konzumacije nekog drugog školjkaša, može očekivati količina JTŠ u istoj količini koja je zaista prijavljena u slučaju konzumacije dagnji. Kako je EFSA prilikom izrade znanstvenih mišljenja koristila veličinu porcije od 400 g (EFSA, 2009), napravljena je procjena za tu kombinaciju, ali sa stvarno utvrđenim vrijednostima koncentracija morskih biotoksina, koje su zabilježene u ovom višegodišnjem monitoringu. Izloženost je prikazana u slučaju kada je korištena tjelesna masa od 60 kg, koju je koristila EFSA, te unos po kilogramu kada je korištena tjelesna masa stvarno prijavljena od konzumenata koji su konzumirali dagnje u RH.

Može se reći da je u šestogodišnjem razdoblju prikupljen prilično velik broj uzoraka (vidi poglavlje [Podaci o pojavnosti i koncentracijama morskih biotoksina](#)), međutim koncentracija morskih biotoksina je stvarno utvrđena u nešto manjem broju uzoraka. Kako bi se ipak iskoristili podaci svih prikupljenih uzoraka, pristupilo se izračunu prosječnih vrijednosti za tri pretpostavljena scenarija - „*upper bound*“ (UB), ili scenarij gornje granice, uključio je u izračun prosječne vrijednosti punu vrijednost LOD ili LOQ vrijednosti u slučaju da rezultat nije bio kvantificiran, a u skladu s LOD/LOQ vrijednosti kako ju je naveo laboratorij gdje je uzorak analiziran. „*Middle bound*“ (MB), ili scenarij srednje granice, u izračunu prosječne vrijednosti koristio je pola vrijednosti LOD/LOQ, a „*lower bound*“ (LB), ili scenarij niže granice, je kao vrijednost koristio nulu (0) kada rezultat nije bio kvantificiran. Izloženost je prikazana za sva tri scenarija, kao i za slučaj najveće utvrđene koncentracije, iz razloga što se ovdje radi o akutnoj izloženosti, što znači da je jedan unos u vremenu od 24 sata dovoljan da posljedica bude štetni utjecaj na zdravlje ukoliko je taj unos u količini jednakoj ili većoj od akutne referentne doze (ARfD). Odnosno ako se radi o manjoj koncentraciji, ona se neće akumulirati ukoliko se višekратно u duljem vremenskom razdoblju unosi u organizam putem hrane, što se smatra kroničnom izloženosti.

U RH je tijekom provođenja istraživanja o prehranbenim navikama odrasle populacije (HAPIH, 2011; 2012) prijavljeno 13 konzumacija od strane 12 konzumenata što predstavlja 0,6 % ukupne populacije (N=2002) obuhvaćene istraživanjem. Iz ovog podatka se može zaključiti kako je u RH prisutna navika slabe konzumacije školjkaša, još niža od Irske (Izveštaj Znanstvenog odbora Irske agencije za sigurnost hrane; 2016), u kojoj je također niska jer školjkaše konzumira 1,07 % ispitivane populacije.

U Tablica 12 nalaze se rezultati procjene izloženosti za ASP za školjkaše u skladu s prijavljenom konzumacijom dagnji u RH i izračun za izloženost uz korištenje veličine porcije u skladu s EFSA-om. U Tablicama 12-14 još je prikazana izloženost uz korigiranu konzumaciju, prema metodologiji koja je korištena u Izvještaju Znanstvenog odbora Irske agencije za sigurnost hrane (2016).

Iz rezultata za procjenu izloženosti za ASP (Tablica 12) može se vidjeti da ARfD nije prekoračena u slučaju kada je za izračun korištena najveća utvrđena koncentracija ASP, pa čak niti u slučaju korištenja veličine porcije koju je koristila EFSA, a koja je gotovo pet (5) puta veća od najveće prijavljene porcije u RH. ARfD prekoračena je jedino u slučaju kada se koristila kombinacija vrijednosti NDK i EFSA-ine veličine porcije, i u tom bi pretpostavljenom slučaju iznosila 444 % ARfD.

U slučaju konzumacije dagnji u skladu s prehrambenim navikama i s prosječnim koncentracijama OA (Tablica 13) utvrđenim u njima, nema opasnosti da se unese količina koja može imati štetni utjecaj na zdravlje. No, zabilježen je slučaj koncentracije u dagnjama od 883,33 mg/kg JTŠ i u tom bi slučaju ARfD bila premašena za 362,39 % za najveću konzumaciju, 539,17 % za korigiranu konzumaciju i čak 1962,21 % i 1455,46 % za konzumaciju EFSA-ine porcije (t.m. 60 i 81 kg). ARfD bi također bila premašena i u slučaju UB scenarija i najveće koncentracije utvrđene u kamenicama, u slučaju da se pretpostavi da je konzumirana EFSA-ina veličina porcije (t.m. 60 kg; t.m. 60 i 81 kg). Zanimljivo je da bi se ARfD premašila i u slučaju najveće utvrđene koncentracije OA za kapice u kojima nije utvrđena koncentracija OA iznad LOD/LOQ, u slučaju korigirane i oba slučaja EFSA-ine veličinu porcije. U slučaju kada bi koncentracija bila jednaka NDK, ARfD bi uz EFSA-ine veličine porcija iznosila 355,20 % i 263,47 %. Iako je veličina porcije koju koristi EFSA nekoliko puta veća od najveće prijavljene u RH, a vrijednost UB scenarija se može smatrati precijenjenom (zbog velikog broja uzoraka u kojima OA nije utvrđena), treba se biti na oprezu, jer se na tom primjeru vidi koliko vrijednost ARfD ima mali raspon tolerancije, i može biti premašena u slučaju kada je utvrđena vrijednost OA u školjkašima ispod NDK vrijednosti.

U slučaju konzumacije dagnji u skladu s prehrambenim navikama i s prosječnim koncentracijama PSP (Tablica 14) utvrđenim u njima, nema opasnosti da se unese količina koja može imati štetni utjecaj na zdravlje. No, zabilježen je slučaj koncentracije u dagnjama od 1723,20 µg/kg JTŠ i u tom bi slučaju ARfD bila premašena za 423,91 % za najveću konzumaciju, 630,69 % za korigiranu konzumaciju i čak 2295,30 % i 1702,52 % za konzumaciju EFSA-ine porcije (t.m. 60 i 81 kg). ARfD bi mogla biti prekoračena u slučaju najveće utvrđene koncentracije u dagnjama u UB scenariju kod konzumacije EFSA-ine porcije (t.m. 60 i 81 kg). Također, od 196,8 % do 1065 % ARfD-a utvrđeno je za konzumaciju dagnji u kojima bi koncentracija bila jednaka NDK. unos u slučaju EFSA-ine porcije također bi doveo do prekoračenja ARfD, ne samo za najveću koncentraciju (rumenke) već i u slučaju UB i MB scenarija (kamenice i kapice) ((Tablica 14).

U slučaju procjene izloženosti za YTX (Tablica 15), niti u jednoj kombinaciji nije izračunato da dolazi do premašivanja ARfD nakon konzumacije školjkaša.

U svim prikazima izračuna izloženosti radi se o pretpostavljenim situacijama, jer osim što se može očekivati da je u slučaju UB i MB scenarija dobivena prosječna vrijednost izloženosti

precijenjena. Napominjemo da se monitoring školjkaša provodi uzorkovanjem na mjestu proizvodnje (izlova i/ili uzgoja), a ne na tržištu.

Tablica 12. Izloženost ASP iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK

	Konc. ASP ^(a)	1 ^(b)	% ARfD ^(c)	2 ^(d)	% ARfD	3 ^(e)	% ARfD	4 ^(f)	% ARfD
DAGNJE									
UB^(g) scenarij	0,15	0,18	0,60	0,27	0,89	0,98	3,26	0,66	2,19
MB^(h) scenarij	0,08	0,09	0,31	0,14	0,46	0,50	1,67	0,34	1,13
LB⁽ⁱ⁾ scenarij	0,00	0,01	0,02	0,01	0,03	0,03	0,09	0,02	0,06
MAX^(l)	2,84	3,49	11,64	5,20	17,32	18,91	63,05	12,75	42,51
VONGOLE									
UB scenarij	0,103	0,13	0,42	0,19	0,63	0,69	2,29	0,46	1,54
MB scenarij	0,051	0,06	0,21	0,09	0,31	0,34	1,13	0,23	0,76
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KAMENICE									
UB scenarij	0,114	0,14	0,47	0,21	0,70	0,76	2,53	0,51	1,71
MB scenarij	0,064	0,08	0,26	0,12	0,39	0,43	1,42	0,29	0,96
LB scenarij	0,015	0,02	0,06	0,03	0,09	0,10	0,33	0,07	0,22
MAX	1,47	1,81	6,03	2,69	8,97	9,79	32,63	6,60	22,00
KAPICE									
UB scenarij	0,105	0,13	0,43	0,19	0,64	0,70	2,33	0,47	1,57
MB scenarij	0,056	0,07	0,23	0,10	0,34	0,37	1,24	0,25	0,84

LB scenarij	0,008	0,01	0,03	0,01	0,05	0,05	0,18	0,04	0,12
MAX	0,43	0,53	1,76	0,79	2,62	2,86	9,55	1,93	6,44
RUMENKE									
UB scenarij	0,2	0,25	0,82	0,37	1,22	1,33	4,44	0,90	2,99
MB scenarij	0,1	0,12	0,41	0,18	0,61	0,67	2,22	0,45	1,50
LB scenarij	0,001	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,00	0,01
MAX	0,21	0,26	0,86	0,38	1,28	1,40	4,66	0,94	3,14
PRNJAVICE									
UB scenarij	0,117	0,14	0,48	0,21	0,71	0,78	2,60	0,53	1,75
MB scenarij	0,067	0,08	0,27	0,12	0,41	0,45	1,49	0,30	1,00
LB scenarij	0,018	0,02	0,07	0,03	0,11	0,12	0,40	0,08	0,27
MAX	1,273	1,57	5,22	2,33	7,77	8,48	28,26	5,72	19,05
NDK^(k)	20	24,6	82	36,6	122	133,2	444	89,80	299,33

(a): koncentracija amnezijских biotoksina (mg/kg jestivog tkiva školjkaša); (b): izloženost uz najveću konzumaciju (1,23 g/kg), rezultat izražen u µg DA/kg t.m. (c): akutna referentna doza; (d): izloženost uz najveću korigiranu konzumaciju (1,83 g/kg), rezultat izražen u µg DA/kg t.m. (e): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g (6,66 g/kg), rezultat izražen u µg DA/kg t.m. (f): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g i prosječnu nacionalnu tjelesnu masu 81 kg (4,49 g/kg), rezultat izražen u µg DA/kg t.m. (g): gornja granica; (h): srednja granica; (i): donja granica; (j): najveća koncentracija (mg/kg); (k): najveća dopuštena količina (mg/kg)

Tablica 13. Izloženost OA iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK

	Konc. OA ^(a)	1 ^(b)	% ARfD ^(c)	2 ^(d)	% ARfD	3 ^(e)	% ARfD	4 ^(f)	% ARfD
DAGNJE									
UB^(g) scenarij	44,36	0,05	18,19	0,08	27,06	0,30	98,47	0,22	73,04
MB^(h) scenarij	27,40	0,03	11,23	0,05	16,71	0,18	60,82	0,14	45,11
LB⁽ⁱ⁾ scenarij	10,44	0,01	4,28	0,02	6,37	0,07	23,17	0,05	17,18
MAX⁽ⁱ⁾	883,88	1,09	362,39	1,62	539,17	5,89	1962,21	4,37	1455,46
VONGOLE									
UB scenarij	11,625	0,01	4,77	0,02	7,09	0,08	25,81	0,06	19,14
MB scenarij	5,813	0,01	2,38	0,01	3,55	0,04	12,90	0,03	9,57
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KAMENICE									
UB scenarij	48,41	0,06	19,85	0,09	29,53	0,32	107,47	0,24	79,72
MB scenarij	26,75	0,03	10,97	0,05	16,32	0,18	59,39	0,13	44,05
LB scenarij	5,09	0,01	2,09	0,01	3,10	0,03	11,30	0,03	8,38
MAX	165,23	0,20	67,74	0,30	100,79	1,10	366,81	0,82	272,08
KAPICE									
UB scenarij	51,07	0,06	20,94	0,09	31,15	0,34	113,38	0,25	84,10

MB scenarij	30,73	0,04	12,60	0,06	18,75	0,20	68,22	0,15	50,60
LB scenarij	10,39	0,01	4,26	0,02	6,34	0,07	23,07	0,05	17,11
MAX	171,48	0,21	70,31	0,31	104,60	1,14	380,69	0,85	282,37
RUMENKE									
UB scenarij	47	0,06	19,27	0,09	28,67	0,31	104,34	0,23	77,39
MB scenarij	23,5	0,03	9,64	0,04	14,34	0,16	52,17	0,12	38,70
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PRNJAVICE									
UB scenarij	11,625	0,01	4,77	0,02	7,09	0,08	25,81	0,06	19,14
MB scenarij	5,813	0,01	2,38	0,01	3,55	0,04	12,90	0,03	9,57
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NDK^(k)	160	0,20	65,60	0,29	97,60	1,07	355,20	0,79	263,47

(a): koncentracija okadaične grupe biotoksina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ jestivog tkiva školjkaša); (b): izloženost uz najveću konzumaciju (1,23 g/kg), rezultat izražen u μg OA ekv/kg t.m. (c): akutna referentna doza; (d): izloženost uz najveću korigiranu konzumaciju (1,83 g/kg), rezultat izražen u μg OA ekv/kg t.m. (e): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g (6,66 g/kg), rezultat izražen u μg OA ekv/kg t.m. (f): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g i prosječnu nacionalnu tjelesnu masu 81 kg (4,49 g/kg), rezultat izražen u μg OA ekv/kg t.m. (g): gornja granica; (h): srednja granica; (i): donja granica; (j): najveća koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$); (k): najveća dopuštena količina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Tablica 14. Izloženost PSP iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK

	Konc. PSP ^(a)	1 ^(b)	% ARfD ^(c)	2 ^(d)	% ARfD	3 ^(e)	% ARfD	4 ^(f)	% ARfD
DAGNJE									
UB^(g) scenarij	116,07	0,14	28,55	0,21	42,48	0,77	154,61	0,57	114,68
MB^(h) scenarij	58,89	0,07	14,49	0,11	21,55	0,39	78,44	0,29	58,18
LB⁽ⁱ⁾ scenarij	1,71	0,00	0,42	0,00	0,63	0,01	2,28	0,01	1,69
MAX⁽ⁱ⁾	1723,20	2,12	423,91	3,15	630,69	11,48	2295,30	8,51	1702,52
VONGOLE									
UB scenarij	15,006	0,02	3,69	0,03	5,49	0,10	19,99	0,07	14,83
MB scenarij	7,503	0,01	1,85	0,01	2,75	0,05	9,99	0,04	7,41
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KAMENICE									
UB scenarij	202	0,25	49,69	0,37	73,93	1,35	269,06	1,00	199,58
MB scenarij	101	0,12	24,85	0,18	36,97	0,67	134,53	0,50	99,79
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KAPICE									
UB scenarij	202	0,25	49,69	0,37	73,93	1,35	269,06	1,00	199,58

MB scenarij	101	0,12	24,85	0,18	36,97	0,67	134,53	0,50	99,79
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RUMENKE									
UB scenarij	126,052	0,16	31,01	0,23	46,14	0,84	167,90	0,62	124,54
MB scenarij	63,249	0,08	15,56	0,12	23,15	0,42	84,25	0,31	62,49
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	142,6	0,18	35,08	0,26	52,19	0,95	189,94	0,70	140,89
PRNJAVICE									
UB scenarij	15,006	0,02	3,69	0,03	5,49	0,10	19,99	0,07	14,83
MB scenarij	7,503	0,01	1,85	0,01	2,75	0,05	9,99	0,04	7,41
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NDK^(k)	800	0,98	196,80	1,46	292,80	5,33	1065,60	3,95	790,40

(a): koncentracija paralitičkih biotoksina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ jestivog tkiva školjkaša); (b): izloženost uz najveću konzumaciju (1,23 g/kg), rezultat izražen u μg STX ekv/kg t.m. (c): akutna referentna doza; (d): izloženost uz najveću korigiranu konzumaciju (1,83 g/kg), rezultat izražen u μg STX ekv/kg t.m. (e): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g (6,66 g/kg), rezultat izražen u μg STX ekv/kg t.m. (f): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g i prosječnu nacionalnu tjelesnu masu 81 kg (4,49 g/kg), rezultat izražen u μg STX ekv/kg t.m. (g): gornja granica; (h): srednja granica; (i): donja granica; (j): najveća koncentracija ($\mu\text{g} / \text{kg}$); (k): najveća dopuštena količina ($\mu\text{g} / \text{kg}$)

Tablica 15. Izloženost YTX iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK

	Konc. YTX ^(a)	1 ^(b)	% ARfD ^(c)	2 ^(d)	% ARfD	3 ^(e)	% ARfD	4 ^(f)	% ARfD
DAGNJE									
UB^(g) scenarij	0,06	0,08	0,31	0,12	0,46	0,42	1,68	0,31	1,24
MB^(h) scenarij	0,05	0,06	0,25	0,09	0,37	0,34	1,36	0,25	1,01
LB⁽ⁱ⁾ scenarij	0,04	0,05	0,19	0,07	0,28	0,25	1,01	0,19	0,75
MAX^(l)	3,09	3,80	15,20	5,65	22,62	20,58	82,32	15,26	61,06
VONGOLE									
UB scenarij	0,09	0,11	0,44	0,16	0,66	0,60	2,40	0,44	1,78
MB scenarij	0,086	0,11	0,42	0,16	0,63	0,57	2,29	0,42	1,70
LB scenarij	0,083	0,10	0,41	0,15	0,61	0,55	2,21	0,41	1,64
MAX	0,3115	0,38	1,53	0,57	2,28	2,07	8,30	1,54	6,16
KAMENICE									
UB scenarij	0,052	0,06	0,26	0,10	0,38	0,35	1,39	0,26	1,03
MB scenarij	0,028	0,03	0,14	0,05	0,20	0,19	0,75	0,14	0,55
LB scenarij	0,004	0,00	0,02	0,01	0,03	0,03	0,11	0,02	0,08
MAX	0,17	0,21	0,84	0,31	1,24	1,13	4,53	0,84	3,36
KAPICE									
UB scenarij	0,087	0,11	0,43	0,16	0,64	0,58	2,32	0,43	1,72
MB scenarij	0,071	0,09	0,35	0,13	0,52	0,47	1,89	0,35	1,40

LB scenarij	0,056	0,07	0,28	0,10	0,41	0,37	1,49	0,28	1,11
MAX	0,8	0,98	3,94	1,46	5,86	5,33	21,31	3,95	15,81
RUMENKE									
UB scenarij	0,033	0,04	0,16	0,06	0,24	0,22	0,88	0,16	0,65
MB scenarij	0,018	0,02	0,09	0,03	0,13	0,12	0,48	0,09	0,36
LB scenarij	0,003	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,08	0,01	0,06
MAX	0,51	0,63	2,51	0,93	3,73	3,40	13,59	2,52	10,08
PRNJAVICE									
UB scenarij	0,013	0,02	0,06	0,02	0,10	0,09	0,35	0,06	0,26
MB scenarij	0,006	0,01	0,03	0,01	0,04	0,04	0,16	0,03	0,12
LB scenarij	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MAX	0,0352	0,04	0,17	0,06	0,26	0,23	0,94	0,17	0,70
NDK^(k)	3,75	4,6125	18,45	6,8625	27,45	24,975	99,90	18,53	74,10

(a): koncentracija grupe jesotoksina (mg/kg jestivog tkiva školjkaša); (b): izloženost uz najveću konzumaciju (1,23 g/kg), rezultat izražen u µg YTX ekv/kg t.m. (c): akutna referentna doza; (d): izloženost uz najveću korigiranu konzumaciju (1,83 g/kg), rezultat izražen u µg YTX ekv/kg t.m. (e): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g (6,66 g/kg), rezultat izražen u µg YTX ekv/kg t.m. (f): izloženost uz EFSA konzumaciju 400 g i prosječnu nacionalnu tjelesnu masu 81 kg (4,49 g/kg), rezultat izražen u µg YTX ekv/kg t.m. (g): gornja granica; (h): srednja granica; (i): donja granica; (j): najveća koncentracija (mg /kg); (k): najveća dopuštena količina (mg /kg)

6. Karakterizacija rizika

Na temelju rezultata šestogodišnjeg praćenja koncentracija morskih biotoksina: azaspiracidi (AZA), okadaična skupina (okadaična kiselina i dinofizistoksini), jesotoksini (YTX), domoična i epi-domoična kiselina (DA) i paralitički toksini (PSP) u školjkašima Jadrana: dagnje (*Mytilus galloprovincialis*), vongole (*Venerupis decussata*), kamenice (*Ostrea edulis*), kapice (*Aequipecten opercularis*), rumenke (*Callista chione*) i prnjavice (*Venus verrucosa*), nakon procjene izloženosti, *ad hoc* stručno tijelo za donošenja Znanstvenog mišljenja o morskim biotoksinima u školjkašima u Republici Hrvatskoj donosi sljedeće zaključke o karakterizaciji rizika:

- Procjena izloženosti za AZA nije napravljena iz razloga što ovaj morski biotoksin nije utvrđen niti u jednom uzorku u praćenom vremenu u količini iznad limita detekcije/kvantifikacije (LOD/LOQ). Stoga se može zaključiti da je rizik za konzumente u ovom slučaju zanemariv.
- Na temelju procjene izloženosti za ASP u pretpostavljenom slučaju konzumacije predložene EFSA-ine porcije i u slučaju koncentracije koja je jednaka vrijednosti NDK, unos ASP može prijeći vrijednost ARfD-a. ASP je bio kvantificiran u nekim uzorcima, ali niti u jednom nije imao koncentraciju koja je jednaka ili veća od NDK. Stoga se rizik u ovom slučaju može smatrati zanemarivim.
- Procjena izloženosti za OA ukazuje na mogućnost unosa OA većeg od ARfD u određenim slučajevima, od kojih je najizvjesniji slučaj najveće koncentracije OA (883,88 µg/kg) i konzumacije najveće porcije u RH za dagnje, što znači da postoji rizik za konzumente. Koncentracija za OA osim što je utvrđena u vrijednosti iznad LOD/LOQ, utvrđena je i u vrijednosti iznad NDK u 2,22 % uzoraka dagnji, 0,62 % uzoraka kamenica i 0,15 % uzoraka kapica.
- Procjena izloženosti za PSP ukazuje na mogućnost unosa PSP većeg od ARfD u određenim slučajevima, od kojih je najizvjesniji slučaj najveće koncentracije (1723,20 µg/kg) i konzumacije najveće porcije u RH za dagnje, što znači da postoji rizik za konzumente. Koncentracija za PSP osim što je utvrđena iznad LOD/LOQ, utvrđena je i u vrijednosti iznad NDK u 0,51 % uzoraka dagnji i 0,31 % uzoraka rumenki.
- Procjena izloženosti za YTX nije niti u jednom slučaju dovela do unosa YTX koji prelazi vrijednost ARfD-a. YTX je kvantificiran u nekim uzorcima, ali niti u jednom nije imao koncentraciju jednaku ili veću od NDK. Stoga se rizik u ovom slučaju može smatrati zanemarivim. Osim toga, YTX su lipofilni morski biotoksini za koje nije dokazano da uzrokuju trovanja ljudi, međutim aplicirani pokusnim životinjama intraperitonealno iskazuju velik toksični učinak (EFSA, 2009.a).
- Odlika morskih biotoksina jest da su termostabilni, te priprema koja uključuje kuhanje, nema utjecaja na smanjivanje njihove pojavnosti u hrani. Štetno djelovanje morskih

biotoksina na zdravlje ljudi ispoljava se akutno, nakon konzumacije u slučaju kada su morski biotoksini prisutni u školjkašima u koncentracijama u kojima mogu imati štetni utjecaj na zdravlje. Slučajevi trovanja ljudi se često se ne prijavljuju nadležnim zdravstvenim ustanovama, jer iako neugodni, uglavnom prolaze bez potrebe za liječničkom intervencijom.

- Prilikom tumačenja rezultata ovog znanstvenog mišljenja, mora se uzeti u obzir kako su uzorci čiji su rezultati analiza na morske biotoksine obrađeni u ovom znanstvenom mišljenju uzorkovani na mjestu uzgoja/izlova školjkaša, a ne na tržištu. Svrha provođenja ovako opsežnog monitoringa školjkaša je na prvom mjestu zaštita konzumenata. Stoga je, uz određena poboljšanja, dana preporuka za njegov nastavak.

7. Nesigurnosti

Prilikom procjene rezultata izloženosti koji su prikazani u ovom znanstvenom mišljenju, trebaju se uzeti u obzir sljedeće nesigurnosti, odnosno objektivne činjenice koje mogu utjecati na drugačiji rezultate od onih koji su prikazani u ovom znanstvenom mišljenju:

- Podaci prikazani i obrađeni u ovom mišljenju predstavljaju vrijednosti morskih biotoksina koji su praćeni i utvrđeni u nekoliko različitih vrsta školjkaša prilikom provođenja godišnjeg *Plana praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša* u (tekućoj) godini, i ne predstavljaju uzorke koji su prikupljeni na tržištu. Prilikom izrade Znanstvenog mišljenja krenulo se od **pretpostavke** kako je moguće da se školjkaši koji nisu uzorkovani mogu naći na tržištu i možda sadržavati količinu biotoksina koja je u najgorem slučaju jednaka količini koja je bila utvrđena laboratorijskim analizama u uzorcima koji su uzorkovani na istom ili sličnim mjestima odakle potječe i pošiljka koja se nalazi na tržištu.
- Na tržištu RH osim školjkaša iz nacionalnog uzgoja mogu se naći i školjkaši iz uvoza koji su ovisno od zemlje i područja iz kojeg dolaze, podložni prisutnosti morskih biotoksina koji su u skladu s tamošnjim prilikama, a koje se u kontekstu izrade ovog mišljenja ne mogu predvidjeti.
- Veličina uzorka za analizu (otprilike 2 kg školjkaša) predstavlja cijelo uzgojno (izlovno) područje nije primjerena ukoliko su evidentirane značajne promjene u fizikalno-kemijskim parametrima vodenog stupca.
- *Planom praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša* utvrđena je referentna vrsta školjkaša za određeno područje. Temeljem utvrđene količine morskih biotoksina u jednoj, referentnoj vrsti školjkaša procjenjuje se njihova prisutnost u ostalim vrstama uzgojenim (izlovljenim) na istom području.
- Podaci o pojavnosti morskih biotoksina temeljem kojih se izradila procjena izloženosti potrošača prikupljeni su tijekom šest godina, što za je određene grupe poput paralitičkih toksina prekratko vremensko razdoblje, s obzirom na njihovu dekadalu pojavnost. Procjena izloženosti trebala bi obuhvatiti podatke o pojavnosti tijekom što dužeg vremenskog razdoblja.
- U nedostatku podataka o prehranbenim navikama svih vrsti školjkaša, korištene su vrijednosti prehranbenih navika koje se odnose na konzumaciju dagnji, pa se dobiveni rezultati moraju oprezno tumačiti, posebice ukoliko se preporuke žele donijeti za druge vrste školjkaša.
- Prikupljeni rezultati sadrže mali broj kvantificiranih vrijednosti, a raspolaže se s velikim brojem uzoraka. Korištenjem LB, MB i UB scenarija može se očekivati precijenjenost ili podcijenjenost u izračunu procjene izloženosti.

8. Zaključci

Uzimajući u obzir rezultate monitoringa, na temelju kojih se školjkaši ne stavljaju na tržište ukoliko se utvrdi prisutnost morskih biotoksina iznad najvećih dozvoljenih koncentracija, te sporadične slučajeve trovanja ljudi s morskim biotoksinima koji nisu službeno evidentirani, i veličinu prosječno ili najviše konzumirane porcije, te općenito slabiju konzumaciju školjkaša u populaciji u RH, može se zaključiti kako je rizik od trovanja morskim biotoksinima iz školjkaša za konzumente malen, no ne može ga se isključiti.

Utvrđene koncentracije morskih biotoksina u promatranom razdoblju su u većini uzoraka ispod NDK:

- U slučaju AZA, ASP i YTX vrijednost koncentracije nije bila iznad NDK niti u jednom uzorku školjkaša.
- OA su bili prisutni iznad vrijednosti NDK u 2,2 % uzoraka dagnji, 0,62 % uzoraka kamenica i 0,15 % uzoraka kapica.
- PSP su bili prisutni iznad vrijednosti NDK u 0,51 % uzoraka dagnji i 0,31 % uzoraka rumenki.

8.1. AZA skupina

U slučaju izloženosti konzumenata toksinima AZA skupine, s obzirom da niti u jednoj vrsti školjkaša ovi biotoksini nisu utvrđeni u koncentraciji iznad LOD/LOQ, može se zaključiti da je rizik zanemariv.

8.2. ASP skupina

U slučaju izloženosti konzumenata toksinima ASP skupine, koji su utvrđeni u koncentraciji iznad LOD/LOQ u 0,41 % slučajeva za dagnje, 0,62 % za kamenice, 1,85 % za kapice, 0,32 % za rumenke, 3,14 % za prnjavice, a nisu utvrđeni u vongola, procijenjena izloženost u svim scenarijima ne prelazi vrijednost uspostavljene ARfD, osim u pretpostavljenom slučaju kada bi utvrđena koncentracija bila jednaka NDK, a veličina EFSA-ine porcije od 400 g konzumirana kod osobe tjelesne mase od 60 kg, u kojem bi slučaju izloženost bila 444 % ARfD.

8.3. OA skupina

U slučaju izloženosti konzumenata toksinima OA skupine, koji su utvrđeni u koncentraciji iznad LOD/LOQ u 5,98 % slučajeva za dagnje, 6,83 % za kamenice i 12,83 % za kapice, a nisu utvrđeni u vongola, rumenki i prnjavica, procijenjena izloženost prelazi vrijednost ARfD u slijedećim pretpostavljenim slučajevima:

- za dagnje kod najveće koncentracije u slučaju najveće konzumacije (362 %), najveće korigirane konzumacije (539 %), te konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) i kod osoba t.m. od 60 kg (1962 %) i 81 kg (1455 %),

- za kamenice kod UB scenarija i konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) i osoba t.m. od 60 kg (107 %), te u slučaju najveće konzumacije i EFSA-ine porcije (400 g) i kod osoba t.m. od 60 kg (367 %) i 81 kg (272 %)
- za kapice kod najveće koncentracije u slučaju najveće korigirane konzumacije (105 %), te konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba t.m. od 60 kg (381 %) i 81 kg t.m. (282 %)
- u slučaju koncentracije koja je jednaka NDK za oba slučaja konzumacije EFSA-ine veličine porcije (355 %, 263 %)

U slučaju biotoksina OA skupine ne može se isključiti postojanje rizika s obzirom da izloženost iznosi 363 % ARfD u realnoj situaciji konzumacije najveće porcije s najvećom stvarno utvrđenom koncentracijom OA. No mora se naglasiti kako uzorci dagnji s ovom koncentracijom nisu uzorkovani s tržišta već iz uzgajališta.

8.4. PSP skupina

U slučaju izloženosti konzumenata toksinima PSP skupine, koji su utvrđeni u koncentraciji iznad LOD/LOQ u 0,51 % slučajeva za dagnje i 0,31 % za rumenke, a nisu utvrđeni u vongola, kamenica, kapica i prnjavica, procijenjena izloženost prelazi vrijednost ARfD u slijedećim pretpostavljenim slučajevima:

- za dagnje kod najveće koncentracije u slučaju najveće konzumacije (424 %), najveće korigirane konzumacije (631 %), te konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba s t.m. od 60 kg (2295 %) i 81 kg (1703 %), a za UB scenarij konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba t.m. od 60 kg (155 %), te osoba s t.m. od 81 kg (115 %)
- za kamenice kod UB i MB scenarija i konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba t.m. od 60 kg (269 %, 134 %), te u slučaju najveće konzumacije i EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba s t.m. 81 kg (200 %)
- za kapice kod UB i MB scenarija i konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba t.m. od 60 kg (269 %, 134 %), te u UB scenariju i EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba s t.m. 60 kg (200 %)
- za rumenke kod UB scenarija i najveće koncentracije konzumacije EFSA-ine porcije (400 g) kod osoba t.m. od 60 kg (166 %; 189 %) i 81 kg (125 %; 141 %)
- u slučaju koncentracije koja je jednaka NDK u svim pretpostavljenim slučajevima (197 %; 293 %, 1066%, 790 %)

U slučaju biotoksina PSP skupine ne može se isključiti postojanje rizika za zdravlje potrošača s obzirom da utvrđena izloženost iznosi 424 % ARfD u realnoj situaciji konzumacije najveće porcije s najvećom stvarno utvrđenom koncentracijom PSP. No mora se naglasiti kako uzorci dagnji s ovom koncentracijom nisu uzorkovani s tržišta već iz uzgajališta. Treba istaknuti kako je propisani NDK od 800 µg/g nedostatan zaštititi konzumenta već i u slučaju najveće prijavljene veličine porcije (konzumacije) u RH, jer će već i u tom slučaju izloženost iznositi 197 % ARfD, znači biti će skoro dva puta veća.

8.5. YTX skupina

U slučaju izloženosti konzumenata toksinima YTX skupine, koji su utvrđeni u koncentraciji iznad LOD/LOQ u 22,48 % slučajeva za dagnje, 50 % za vongole (uzimajući u obzir da se radilo o samo šest uzoraka), 4,35 % za kamenice, 37,17 % za kapice, 1,56 % za rumenke, 1,18 % za prnjavice, ali nisu utvrđeni koncentraciji iznad NDK, procijenjena izloženost u svim scenarijima ne prelazi vrijednost uspostavljene ARfD. Čak i u slučaju kada je pretpostavljeno da je koncentracija bila jednaka NDK nije bilo utjecaja na povećanu izloženost u odnosu na ARfD.

Na kraju podsjećamo kako aktivnosti/djelatnosti koju provode ljudi samo djelomično utječu na prisutnost morskih biotoksina u školjkašima. Prisutnost je više ovisna o okolišnim i klimatskim utjecajima, na koje je utjecaj vrlo ograničen.

9. Preporuke

Rezimirajući polučene rezultate *ad hoc* stručno tijelo za donošenja Znanstvenog mišljenja o morskim biotoksinima u školjkašima u Republici Hrvatskoj donosi sljedeće preporuke:

- uključiti toksine u nastajanju u Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša
- evidentirati toksične fitoplanktonske vrste, posebno invazivne (strane) u Jadranskom moru te pratiti pojave morskih biotoksina u vodama Jadranskom i Mediteranskom moru
- pratiti toksičnosti u prirodnim populacijama školjkaša i drugim morskim organizmima koji su uključeni u hranidbeni lanac
- razvijati napredne instrumentalne tehnike u cilju evidentiranja biotoksina i njihovih metabolita, te vremenskom skraćivanju trajanja analiza
- pratiti i implementirati znanstvene spoznaje u analitici morskih biotoksina te uskladiti LOD/LOQ vrijednosti između tri laboratorija koji rade analize
- revidirati kontrolne točke prikupljanja uzoraka školjkaša za analizu biotoksina
- kontrolirati uzorke zamrznutih i polupripremljenih proizvoda školjkaša s tržišta uvezenih iz drugih država
- pratiti druge čimbenike i znanstvene spoznaje na koji način se može smanjiti proizvodnja morskih biotoksina, ili sprječavanje kontaminacija školjkaša kako bi se ovaj sporadični trend utjecaja na zdravlje ljudi zadržao ili čak smanjio
- povezati humani i veterinarski sektor na principima „jedno zdravlje“ i na taj način omogućiti promptnije djelovanje, kako u slučajevima prevencije, tako i u slučajevima dijagnostike bolesti, osobito imajući na umu koristi koje bi od toga imali proizvođači i potrošači u sustavu
- nastaviti provođenje monitoringa koji se pokazao uspješnim u zaštiti zdravlja potrošača
- planirati monitoring školjkaša na tržištu temeljem procjene rizika
- pratiti situaciju u stvarnom vremenu (može poslužiti kao dio sustava ranog uzbunjivanja i tako spriječiti štetno djelovanje na zdravlje ljudi)
- educirati i voditi računa o antropogenom utjecaju na pojavnost toksičnog fitoplanktona, kao i uvjetima koje se mora ispoštovati npr. prilikom odabira lokacija za uzgoj ili izlov
- potrebno je djelovati na više razina, te se preporučuju poduzimati preventivne mjere koje bi smanjile antropogeno uzrokovani proces eutrofikacije pogodan za pojavu „cvjetanja mora“, odnosno pojavu značajnog povećanja brojnosti fitoplanktonskih toksičnih ili netoksičnih vrsta
- izraditi ponovnu procjenu izloženosti temeljem podataka o pojavnosti morskih biotoksina prikupljenih tijekom dužeg vremenskog razdoblja (najmanje 10 godina).

10. Literatura

Adams NG, Tillmann U, Trainer VL (2020): Temporal and spatial distribution of Azadinium species in the inland and coastal waters of the Pacific northwest in 2014–2018. *Harmful Algae*, 98; 101874.

Ajani P, Harwood DT, Murray SA (2017): Recent trends in marine phycotoxins from Australian coastal waters. *Marine Drugs*, 15:1–33. doi: 10.3390/md15020033

Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM (2006): Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(3):1091-1099.

Álvarez G, Rengel J, Araya M, Álvarez F, Pino R, Uribe E, Díaz PA, Rossignoli AE, López-Rivera A, Blanco J (2020): Rapid domoic acid depuration in the scallop *Argopecten purpuratus* and its transfer from the digestive gland to other organs. *Toxins*, 12(11):698.

Álvarez G, Uribe E, Regueiro J, Martín H, Gajardo T, Jara L, Blanco J (2015): Depuration and anatomical distribution of domoic acid in the surf clam *Mesodesma donacium*. *Toxicon*, 102:1-7.

Andres JK, Yñiguez AT, Maister JM, Turner AD, Olano DE, Mendoza J, Salvador-Reyes L, Azanza RV (2019): Paralytic shellfish toxin uptake, assimilation, depuration, and transformation in the Southeast Asian green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Toxins*, 11(8):468.

Ares I, Louzao C, Espiña B, Vieytes M, Miles C, Yasumoto T, Botana L (2007): Lactone ring of pectenotoxins: a key factor for their activity on cytoskeletal dynamics. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 19(5-6):283-292.

Ares IR, Louzao MC, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM (2005): Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *Journal of experimental biology*, 208(22):4345-4354.

Association of Official Analytical Chemists International (2005): Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish, Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. AOAC Official Method 2005.06. *Journal of AOAC International*, 88: 1714-1732.

Baugh KA, Bush JM, Bill, BD, Lefebvre, KA, Trainer, VL (2006): Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. *African Journal of Marine Science*, 28: 403–407.

Besiktepe S, Ryabushko L, Ediger D, Yilmaz D, Zengin A, Ryabushko V, Lee R (2008): Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup at Hasle (bacillariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae*, 7:438-442.

Blanco J (2018): Accumulation of Dinophysis toxins in bivalve molluscs. *Toxins*, 10(11):453.

Blanco J, Mariño C, Martín H, Álvarez G, Rossignoli AE (2021a): Characterization of the Domoic Acid Uptake Mechanism of the Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Digestive Gland. *Toxins*, 13(7):458.

Bogdanović T, Di Giacinto F, Berti M, Visciano P, Petričević S, Rogošić M, Rogić Z, Mascilongo G, Di Renzo L, Ferri N, Schirone M (2022): Surveillance Plan of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs from the Croatian Coast. *Exposure and Health*, 14(1):129-138.

Bognár A (2002): Tables on weight yield of food and retention factors of food constituents for the calculation of nutrient composition of cooked foods (dishes)." BFE, Karlsruhe, Germany.

Boni L, Mancini L, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Viviani R (1992). First cases of diarrhoeic shellfish poisoning in the northern Adriatic Sea. U Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Eds.), *Marine coastal eutrophication*, Elsevier.

Botana LM, Vilarino N, Alfonso A, Vale C, Louzao C, Elliott CT, Botana AM (2010): The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11):1316-1325.

Botana LM (2014): Guide to Phycotoxin Monitoring of Bivalve Mollusk-Harvesting Areas. U *Seafood and Freshwater Toxins, pharmacology, physiology, and detection*. CRC Press, Boca Raton.

Bricelj VM, Lee JH, Cembella AD (1991): Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Marine Ecology Progress Series*, 74(1):33-46.

Bricelj VM, Shumway SE (1998): Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science*, 6(4):315-383.

Campos A, Freitas M, de Almeida AM, Martins JC, Domínguez-Pérez D, Osório H, Vasconcelos V, Reis Costa P (2020): OMICs approaches in diarrhetic shellfish toxins research. *Toxins*, 12(8):493.

Carpenter EJ, Janson S, Boje R, Pollehne F, Chang J (1995): *Dinophysis norvegica*: biological and ecological observations in the Baltic Sea Eur. *Journal of Phycology*, 30:1-10.

Caruana AMN, Amzil Z (2018): *Microalgae and Toxins*. U *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London.

Carvalho PS, Catia R, Moukha S, Matias WG, Creppy EE (2006): Comparative study of Domoic Acid and Okadaic Acid induced-chromosomal abnormalities in the Caco-2 cell line. *International journal of environmental research and public health*, 3(1):4-10.

Cavas T, Könen S (2008): In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90:154-159.

Cembella A, Krock B: Cyclic Imine Toxins: Chemistry, Biogeography, Biosynthesis, and Pharmacology. In *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 561-594, 2008.

Choudhary G, Shang L, Li X, Dudley SC (2002): Energetic localization of saxitoxin in its channel binding site. *Biophysical Journal*, 83(2):912-919.

Ciminiello P, Dell'aversano C, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Magno SG, Poletti R, Tartaglione L (2007): Desulfoyessotoxins from Adriatic mussels: a new problem for seafood safety control. *Chemical Research in Toxicology*, 20(1):95-98.

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M (2009): Recent developments in Mediterranean harmful algal events. U *Advances in molecular toxicology*. Elsevier, Amsterdam.

Costa PR, Costa S T, Braga A C, Rodrigues S M, Vale P (2017): Relevance and challenges in monitoring marine biotoxins in non-bivalve vectors. *Food Control*, 76:24-33.

Cusack CK, Bates SS, Quilliam MA, Patching JW, Raine R (2002): Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *Journal of Phycology*, 38:1106-1112.

Cusick KD, Saylor GS (2013): An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs*, 11(4):991-1018.

Del Campo M, Zhong TY, Tampe R, García L, Lagos N (2017): Sublethal doses of dinophysistoxin-1 and okadaic acid stimulate secretion of inflammatory factors on innate immune cells: Negative health consequences. *Toxicon*, 126:23-31.

Delegirana uredba Komisije (EU) 2021/1374 od 12. travnja 2021. o izmjeni Priloga III. Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o posebnim higijenskim zahtjevima za hranu životinjskog podrijetla. *Official Journal of the European Union*, L297.

Dhanji-Rapkova M, O'Neill A, Maskrey BH, Coates L, Swan SC, Teixeira Alves M, Kelly RJ, Hatfield RG, Rowland-Pilgrim SJ, Lewis AM, Turner A (2019): Variability and profiles of lipophilic toxins in bivalves from Great Britain during five and a half years of monitoring: azaspiracids and yessotoxins. *Harmful Algae*, 87:101629.

Ding L, Qiu J, Li A (2017): Proposed Biotransformation Pathways for New Metabolites of Paralytic Shellfish Toxins Based on Field and Experimental Mussel Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(27):5494-5502.

Donovan CJ, Ku JC, Quilliam MA, Gill TA (2008): Bacterial degradation of paralytic shellfish toxins. *Toxicon*, 52(1):91-100.

Douding L, Yuzao Q, Haifeng G, Xinfeng D, Hongxia W, Yahui G, Ping-Ping S, Qingchun Z, Rencheng Y, Songhui L (2014): Causative species of harmful algal blooms in Chinese coastal waters. *Algalological Studies*, 145:145-168. doi: 10.1127/1864-1318/2014/0161

Durán-Riveroll LM, Cembella AD (2017): Guanidinium toxins and their interactions with voltage-gated sodium ion channels. *Marine Drugs*, 15(10):303.

EFSA, European Food Safety Authority (2008): Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from DG SANCO on the assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *EFSA J*. 2008, 6, 659.

EFSA, European Food Safety Authority (2008a): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues. EFSA Journal, 589:1-62.

EFSA, European Food Safety Authority (2008b): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids. EFSA Journal, 723:1-52.

EFSA, European Food Safety Authority (2009): Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine biotoxins in shellfish–domoic acid. EFSA Journal, 1181:1–61.

EFSA, European Food Safety Authority (2009a): Statement of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on the Influence of processing on the levels of lipophilic marine biotoxins in bivalve molluscs. EFSA Journal, 1016, 1-10.

EFSA, European Food Safety Authority (2009b): 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. EFSA Journal, 1019, 1-76.

EFSA, European Food Safety Authority (2009c): General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. EFSA Journal, 7(2):1435. [51 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.1435.

EFSA, European Food Safety Authority (2009d): Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. EFSA Journal, 1306:1-23.

EFSA, European Food Safety Authority (2009e): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – yessotoxin group. EFSA Journal, 907:1-62.

EFSA, European Food Safety Authority (2009f): Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – pectenotoxin group. EFSA Journal, 1109: 1–47.

EFSA, European Food Safety Authority (2010): 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. EFSA Journal, 8(8):1706. [20 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1706.

EFSA, European Food Safety Authority (2010a): European Food Safety Authority, Scientific Opinion: Marine Biotoxins in Shellfish – Cyclic imines, EFSA ;1628.

EFSA, European Food Safety Authority (2010b): European Food Safety Authority, Scientific Opinion: Marine Biotoxins in Shellfish – Emerging toxin: Brevetoxin group,

Emery H, Traves W, Rowley AF, Coates CJ (2021): The diarrhetic shellfish-poisoning toxin, okadaic acid, provokes gastropathy, dysbiosis and susceptibility to bacterial infection in a non-rodent bioassay, *Galleria mellonella*. *Archives of Toxicology*, 95:3361–3376. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03132-x>

Espiña B, Louzao MC, Ares IR, Cagide E, Vieytes MR, Vega FV, Rubiolo JA, Miles CO, Suzuki T, Yasumoto T, Botana LM (2008): Cytoskeletal toxicity of pectenotoxins in hepatic cells. *British Journal of Pharmacology*, 155(6):934-944.

EU-RL-MB, European Union Reference Laboratory. EU Working Group on Toxin-producing Phytoplankton Monitoring in Bivalve Mollusc Harvesting Areas (2019): Monitoring of Toxin-producing Phytoplankton in Bivalve Mollusc Harvesting Areas; Guide to Good Practice: Technical Application for Marine Biotoxins. Issue 1: November 2019. https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/EURLMB_Guides.htm.

Fabro E, Almandoz GO, Ferrario M, John U, Tillmann U, Toebe K, Krock B, Cembella A (2017): Morphological, molecular, and toxin analysis of field populations of *Alexandrium* genus from the Argentine Sea. *Journal of Phycology*, 53:1206–1222. doi: 10.1111/jpy.12574

Fehling J, Green DH, Davison K, Bolch CJ, Bates SS (2004): Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish waters. *Journal of Phycology*, 40: 622-630.

Ferrari S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Malaguti C, Tubaro A, Poletti R, Yasumoto T, Fattorusso E, Rossini GP (2004): Structure- activity relationships of yessotoxins in cultured cells. *Chemical research in toxicology*, 17(9):1251-1257.

Fire SE, Wanga Z, Leighfield TA, Morton SL, McFee WE, McLellan WA, Litaker RW, Tester PA, Hohn AA, Lovewell G, Harms C, Rotstein DS, Barco SG, Costidis A, Sheppard B, Bossart GD, Stolen M, Durden WN, Van Dolah FM (2009): Domoic acid exposure in pygmy and dwarf sperm whales (*Kogia* spp.) from southeastern and mid-Atlantic U.S. waters. *Harmful Algae*, 8:658-664.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations(2004): Marine biotoxins. Rim.

García C, del Carmen Bravo M, Lagos M, Lagos N (2004): Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 43(2):149-158.

Gessner BD, Bell P, Doucette GJ, Moczydlowski E, Poli MA, Van Dolah F, Hall S (1997): Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon*, 35(5):711-722.

Guéret SM, Brimble MA (2010): Spiroimine shellfish poisoning (SSP) and the spirolide family of shellfish toxins: Isolation, structure, biological activity and synthesis. *Natural Product Reports*, 27:1350–1366.

Gull S, Saifullah SM (2010): Taxonomic and ecological studies on three marine genera of Dinophysiales from Arabian Sea shelf of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42:2647-2660.

Halstead BW, Schantz EJ (1984): Paralytic shellfish poisoning. WHO, Geneva.

HAPIH, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (2011; 2012): Prehrambene navike odrasle populacije u RH (interna baza podataka)

Hasle RG (2002): Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia cosmopolites*? *Harmful Algae*, 1: 137-146.

Hess P, Nguyen L, Aasen J, Keogh M, Kilcoyne J, McCarron P, Aune T (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.

Hess P, Twiner MJ, Kilcoyne J, Sosa S (2016): Azaspiracid toxins: toxicological profile. In *Marine and Freshwater Toxin, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 170-191.

Indrasena WM, Gill TA (2000): Thermal degradation of partially purified paralytic shellfish poison toxins at different times, temperatures, and pH. *Journal of food science*. 65(6):948-53.

Izveštaj Znanstvenog odbora Irske agencije za sigurnost hrane (2016): Report of the Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland: The Occurrence of Marine Biotoxins and Risk of Exposure to Seafood Consumers in Ireland. Dublin. Ireland. <https://www.fsai.ie/publications/the-occurrence-of-marine-biotoxins-and-risk-of-exp> (pristupljeno 8.2.2024.)

Jaén D, Mamán L, Domínguez R, Martín E (2009): First report of *Dinophysis acuta* in culture. *Harmful Algae News*, 39:1-2.

Jiao YH, Dou M, Wang G, Li HY, Liu JS, Yang X, Yang WD (2017): Exposure of okadaic acid alters the angiogenesis in developing chick embryos. *Toxicon*, 133:74-81.

Johnsen TM, Lømsland ER (2010): Observations of *Dinophysis tripos* in Norwegian coastal waters Book of Abstracts and Programme, 14th International Conference on Harmful Algae, Hersonissos-Crete, Greece, p. 138

Karydis M, Kitsiou D (2012): Eutrophication and environmental policy in the Mediterranean Sea: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184:4931–4984. doi: 10.1007/s10661-011-2313-2

Kim B, Lee H, Han M, Anderson DM (2016): Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures. *Marine Pollution Bulletin*, 104(1-2): 34–43. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.057

Kodama M (2010): Paralytic shellfish poisoning toxins: biochemistry and origin. *Aquabioscience Monographs*, 3:1–38. doi: 10.5047/absm.2010.00301.0001

Kotaki Y, Lundholm N, Onodera H, Kobayashi K, Bajarias F, Furio E, Iwataki M, Fukuyo Y, Kodama M(2004): Wide distribution of *Nitzschia navis-varingica*, a new domoic acid-producing benthic diatom found in Vietnam. *Fisheries Science*, 70, 28-32.

Krock B, Tillmann U, John U, Cembella AD (2009): Characterization of azaspiracids in plankton size fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8:254-263.

Krock B, Tillmann U, Tebben J, Trefault N, Gu HF (2019): Two novel azaspiracids from *Azadinium poporum*, and a comprehensive compilation of azaspiracids produced by Amphidomataceae, (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 82:1–8.

Krock B, Tillmann U, Voß D, Koch BP, Salas R, Witt M, Potvin E, Jeong HJ (2012): New azaspiracids in Amphidomataceae (Dinophyceae). *Toxicon*, 60(5):830-839.

Kvrgić K, Lešić T, Aysal AI, Džafić N, Pleadin J (2021): Cyclic imines in shellfish and ascidians in the northern Adriatic Sea. *Food Additives and Contaminants Part B Surveillance*, 14(1):12-22.

Kvrgić K, Lešić T, Džafić N, Pleadin J (2022): Occurrence and Seasonal Monitoring of Domoic Acid in Three Shellfish Species from the Northern Adriatic Sea. *Toxins*, 14(1):33.

Kvrgić K. (2023): Profil fikotoksina u plodovima mora iz akvatorija istarskog poluotoka i procjena izloženosti hrvatskih potrošača. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer Osijek.

Leal JF, Cristiano ML (2022): Marine paralytic shellfish toxins: chemical properties, mode of action, newer analogues, and structure–toxicity relationship. *Natural Product Reports*, 39(1):33-57.

Leira F, Cabado AG, Vieytes MR, Roman Y, Alfonso A, Botana LM, Yasumoto T, Malaguti C, Rossini GP (2002): Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 63(11):1979-1988.

Leira FJ, Vieytes JM, Botana LM and Vieytes MR (1998): Domoic acid levels of naturally contaminated scallops as affected by canning. *Journal of Food Science*, 63 (6), 1081-1083.

Lembeye G, Yasumoto T, Zhao J, Fernández R (1993): DSP outbreaks in Chilean fiords. T.J. Smayda, Y. Shimizu (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Amsterdam pp. 525-529.

Lim PT, Ogata T (2005): Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon*, 45:

699–710.

Louzao MC, Costas C, Abal P, Suzuki T, Watanabe R, Vilariño N, Carrera C, Boente-Juncal A, Vale C, Vieytes MR, Botana LM (2021): Serotonin involvement in okadaic acid-induced diarrhoea in vivo. *Archives of Toxicology*, 95(8):2797-2813.

Louzao MC, Vilariño N, Vale C, Costas C, Cao A, Raposo-Garcia S, Vieytes MR, Botana LM (2022): Current trends and new challenges in marine phycotoxins. *Marine Drugs*, 20(3):198.

Louzao MC, Vieytes MR, Fontal O, Botana LM (2003): Glucose uptake in enterocytes: a test for molecular targets of okadaic acid. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 23(2-3):211-224.

MacKenzie L (1992): Does *Dinophysis* (Dinophyceae) have a sexual life cycle? *Journal of Phycology*, 28:399-406.

Magdalena AB, Lehane M, Moroney C, Furey A, James KJ (2003): Food safety implications of the distribution of azaspiracids in the tissue compartments of scallops (*Pecten maximus*). *Food Additives & Contaminants* 20(2):154–160.

Marasigan AN, Sato S, Fukuyo Y, Kodama M (2001): Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Saipan Bay, Panay Island the Philippines. *Fisheries Science*, 67:994-996.

Marasovic I, Nincevic Z, Pavela-Vrancic M, Orhanovic S (1998): A survey of shellfish toxicity in the Central Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 78, 745-754.

Matsushima R, Uchida H, Nagai S, Watanabe R, Kamio M, Nagai H, Kaneniwa M, Suzuki T (2015): Assimilation, Accumulation, and Metabolism of Dinophysistoxins (DTXs) and Pectenotoxins (PTXs) in the Several Tissues of Japanese Scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxins*, 7(12):5141-5154.

Maucher JM, Ramsdell JS (2005): Domoic acid transfer to milk: evaluation of a potential route of neonatal exposure. *Environ Health Perspect*, 113(4):461-4. doi: 10.1289/ehp.7649. PMID: 15811837; PMCID: PMC1278487.

McCarron P, Hess P (2006): Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Toxicon*, 47 (4), 473-479.

McCarron P, Kilcoyne J, Hess P (2008): Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*, 51: 1081-1089.

McCarron P, Kilcoyne J, Miles CO, Hess P (2009): Formation of azaspiracids-3,-4,-6, and-9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1):160-169.

McMahon T, Silke J (1996): Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News*, 14:2.

McCarron P, Kilcoyne J, Hess P (2008): Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*, 51(6):1081–1089.

McCarthy M, Bane V, García-Altres M, van Pelt FNAM, Furey A, O'Halloran J (2015): Assessment of emerging biotoxins (pinnatoxin G and spirolides) at Europe's first marine reserve: Lough Hyne. *Toxicon*, 108 202–209. 10.1016/j.toxicon.2015.10.007

McMahon T, Silke J (1996): West coast of Ireland winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News*, 14: 2.

McNabb P (2008): Chemistry, Metabolism, and Chemical Analysis of Okadaic Acid Group Toxins. In *Seafood and freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 209-228.

Miles CO, Samdal IA, Aasen JA, Jensen DJ, Quilliam MA, Petersen D, Briggs LM, Wilkins AL, Rise F, Cooney JM, MacKenzie AL (2005): Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4(6):1075-1091.

Miles CO, Wilkins AL, Hawkes AD, Selwood AI, Jensen DJ, Cooney JM, Beuzenberg V, MacKenzie AL (2006): Identification of 45-hydroxy-46,47-dinoryessotoxin, 44-oxo-45,46,47-trinoryessotoxin, and 9-methyl-42,43,44,45,46,47,55-heptanor-38-en-41-oxoyessotoxin, and partial characterization of some minor yessotoxins, from *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon*, 47(2):229-240.

Molgó J, Marchot P, Aráoz R, Benoit E, Iorga BI, Zakarian A, Taylor P, Bourne Y, Servent D (2017): Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of neurochemistry*, 142 (Suppl 2), 41–51. <https://doi.org/10.1111/jnc.13995> ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5550345/>

Munday R, Aune T, Rossini GP (2008): Toxicology of the Yessotoxins. In *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 329–339.

Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T (1987): Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, 28(47), 5869–5872. doi:10.1016/s0040-4039(01)81076-5

Murk AJ, Nicolas J, Smulders FJ, Bürk C, Gerssen A (2019): Marine biotoxins: Types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes. U *ECVPH Food Safety Assurance*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 207–239.

Natsuike M, Saito R, Fujiwara A, Matsuno K, Yamaguchi A, Shiga N, Hirawake T, Kikuchi T, Nishino S, Imai I (2017): Evidence of increased toxic *Alexandrium tamarense* dinoflagellate blooms in the eastern Bering ea in the summers of 2004 and 2005. *PLoS ONE* 12:e0188565. doi: 10.1371/journal.pone.0188565

Negri A, Llewellyn L, Doyle J, Webster N, Frampton D, Blackburn S (2003): Paralytic shellfish toxins are restricted to few species among Australia's taxonomic diversity of cultured microalgae. *Journal of Phycology*, 39: 663–667.

Nicolaou KC, Frederick MO, Petrovic G, Cole KP, Loizidou EZ (2006b): Total synthesis and confirmation of the revised structures of azaspiracid-2 and azaspiracid-3. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 45(16):2609-2615.

Nicolaou KC, Koftis TV, Vyskocil S, Petrovic G, Tang W, Frederick MO, Chen DY, Li Y, Ling T, Yamada YM (2006a): Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1. *Journal of the American Chemical Society*, 128(9):2859-2872.

Ninčević Gladan Ž, Skejić S, Bužančić M, Marasović I, Arapov J, Ujević I, Bojanić N, Grbec B, Kušpilić G, Vidjak O (2008): Seasonal variability in *Dinophysis* spp. abundances and diarrhetic shellfish poisoning outbreaks along the eastern Adriatic coast. *Botanica Marina*, 51:449-463.

O'Driscoll D, Skrabáková Z, O'Halloran J, van Pelt FN, James KJ (2011): Mussels increase xenobiotic (azaspiracid) toxicity using a unique bioconversion mechanism. *Environmental Science & Technology*, 45(7):3102-3108.

Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T (1997): Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins* 5(6):255-259.

Orhanović S, Ninčević Ž, Marasović I, Pavela-Vrančić M (1996): Phytoplankton toxins in the Central Adriatic Sea. *Croatica Chemica Acta*, 69; 1:291-303.

Oyaneder-Terrazas J, Contreras HR, García C (2017): Variability and Bioconcentration of Saxitoxin-Group in Different Marine Species Present in the Food Chain. *Toxins*, 9:190.

Oyaneder-Terrazas J, Figueroa D, Araneda OF, García C (2022): Saxitoxin Group Toxins Accumulation Induces Antioxidant Responses in Tissues of *Mytilus chilensis*, *Ameghinomya antiqua*, and *Concholepas concholepas* during a Bloom of *Alexandrium pacificum*. *Antioxidants*, 11(2):392.

Pan Y, Parsons ML, Busman M, Moeller PDR, Dortch Q, Powell CL, Doucette GJ (2001): Pseudo-nitzschia sp. Cf. pseudodelicatissima-a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology-Progress Series*, 220: 83-92.

Park SY, Kang J-H, Jung HJ, Hwang JH, Chun HS, Yoon YS, Oh SH (2023): Okadaic Acid Is at Least as Toxic as Dinophysistoxin-1 after Repeated Administration to Mice by Gavage. *Toxins*, 15: 587. <https://doi.org/10.3390/toxins15100587>

Parker NS, Negri AP, Frampton DMF, Rodolfi L, Tredici MR, Blackburn SI (2002): Growth of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) using high biomass culture systems. *Journal of Applied Phycology*, 14:313–324.

Pavela-Vrančić M, Ujević I, Ninčević- Gladan Ž, Furey A (2006): Accumulation of phycotoxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the central Adriatic Sea. *Croatica Chemica Acta*, 79:291-297.

Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobó P, Franco JM, Fernández JJ (2008): Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Marine Drugs*, 6(2):73-102.

Paz B, Riobó P, Fernández ML, Fraga S, Franco JM (2004): Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon*, 44(3):251-258.

Pérez-Gómez A, Novelli A, Ferrero-Gutiérrez A, Franco JM, Paz B, Fernández-Sánchez MT (2006): Potent neurotoxic action of the shellfish biotoxin yessotoxin on cultured cerebellar neurons. *Toxicol*, 90:168–177.

Perl TM, Bédard L, Kosatsky T, Hockin JC, Todd ECD, Remis RS (1990): An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England Journal of Medicine*, 322(25):1775-1780.

Prakash A, Medcof JC, Tennant AD (1971): Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Fisheries Research Board of Canada*, 177:1–87.

Pravilnik o mikrobiološkoj klasifikaciji i posebnim pravilima higijene živih školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje (2022). *Narodne novine br. 126/22*.

Quilliam MA, Wright JLC (1989): The amnesic shellfish poisoning mystery. *Analytical Chemistry*, 61: 1053-1060.

Raine R, McDermott G, Silke J, Lyons K, Nolan G, Cusack C (2010): A simple short range model for the prediction of harmful algal events in the bays of southwestern Ireland. *Journal of Marine Systems*, 83 (3–4):150-157.

Raposo MIC, Gomes MTSR, Botelho MJ, Rudnitskaya A (2020): Paralytic Shellfish Toxins (PST)-Transforming Enzymes: A Review. *Toxins*, 12(5):344.

Reboreda A, Lago J, Chapela MJ, Vieites JM, Botana LM, Alfonso A, Cabado AG (2010): Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon*, 55(2–3):235–243.

Reguera B, Pizarro G (2008): Planktonic Dinoflagellates That Contain Polyether Toxins of the Old “DSP Complex”. U *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 257-284.

Reguera B, Velo-Suárez L, Raine R, Gil Park M(2012): Harmful Dinophysis species: A review. *Harmful Algae*, 14:87-106.

Reguera B, Riobó P, Rodríguez F, Díaz PA, Pizarro G, Paz B, Franco JM, Blanco J (2014): Dinophysis toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*, 12(1):394-461.

Rehmann N, Hess P, Quilliam MA (2008): Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(4):549–558.

Reverté L, Soliño L, Carnicer O, Diogène J, Campàs M (2014): Alternative Methods for the Detection of Emerging Marine Toxins: Biosensors, Biochemical Assays and Cell-Based Assays. *Marine Drugs*, 12:5719–5763.

Rhodes L, McNabb P, De Salas M, Briggs L, Beuzenberg V, Gladstone M (2006): Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae*, 5(2):148-155.

Rodrigue DC, Etzel RA, Hall S, de Porras E, Velasquez OH, Tauxe RV, Kilbourne EM, Blake PA (1990): Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(3):267–271.

Roje-Busatto R, Ujević I (2014): PSP toxins profile in ascidian *Microcosmus vulgaris* (Heller, 1877) after human poisoning in Croatia (Adriatic Sea). *Toxicon*, 79:28-36.

Román Y, Alfonso A, Louzao MC, de la Rosa LA, Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM (2002): Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cellular Signalling*, 14(8):703-716.

Rubini S, Albonetti S, Menotta S, Cervo A, Callegari E, Cangini M, Dall’Ara S, Baldini E, Vertuani S, Manfredini S (2021): New Trends in the Occurrence of Yessotoxins in the Northwestern Adriatic Sea. *Toxin*, 13:634.

Saeed AF, Awan SA, Ling S, Wang R, Wang S (2017): Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 24:97–110.

Salgado P, Riobó P, Rodríguez F, José M, Franco IB (2015): Differences in the toxin profiles of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) strains isolated from different geographic origins: Evidence of paralytic toxin, spirolide, and gymnodimine. *Toxicon*, 103(1): 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.015>

- Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T (1997): Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins*, 5(4):164-167.
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, Jame, KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T (1998): Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society*, 120(38):9967–9968.
- Sharma A, Gautam S, Kumar S (2014): Phycotoxins. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volumen 3, Elsevier, Amsterdam, 25-29.
- Shimizu Y, Yoshioka M (1981): Transformation of paralytic shellfish toxin as demonstrated in scallop homogenates. *Science*, 212(4494):547-9.
- Shumway SE (1990): A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 21:65-104.
- Shumway SE (1995): Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Reviews In Fisheries Science*, 3:1-31.
- Sosa S, Tubaro A (2016): Okadaic Acid and Other Diarrheic Toxins: Toxicological Profile. In *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 147-168.
- Spector I, Braet F, Shochet NR, Bubb MR (1999): New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research And Technique*, 47:18–37.
- Stivala CE, Benoit E, Aráoz R, Servent D, Novikov A, Molgó J, Zakarian A (2015): Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins. *Natural Product Reports*, 32:411–435.
- Stonik VA, Stonik IV (2016): Toxins Produced by Marine Microorganisms: A Short Review. *Marine and Freshwater Toxins, Toxinology*. Springer, Dordrecht, 3-21.
- Subba Rao DV, Pan Y, Zitko V, Bugden G, Mackeigan K (1993): Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, eastern Canada. *Marine Ecology-Progress Series*, 97:117-126.
- Suzuki T, Mackenzie L, Stirling D, Adamson J (2001): Conversion of pectenotoxin2 to pectenotoxin2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. *Fisheries science*, 67(3):506-510.
- Talić S, Škobić D, Dedić A, Nazlić N, Ujević I, Ivanković A, Pavela-Vrančić M (2020): The occurrence of lipophilic toxins in shellfish from the Middle Adriatic Sea. *Toxicon*, 186:19–25.
- Tapia R, Peña F, Arias C (1999): Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochemical Research*, 24:1423–1430.
- Thottumkara AP, Parsons WH, Du Bois J (2014): Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition* 53(23):5760-5784.
- Tillmann U, Salas R, Jauffrais T, Hess P, Silke J (2014): AZA: the producing organisms – biology and trophic transfer. In *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. CRC Press, Boca Raton, 773–798.

Todd ECD (1993): Domoic acid and amnesic shellfish poisoning—a review. *Journal of Food Protection*, 56: 69–83.

Torigoe K, Murata M, Yasumoto T, Iwashita T (1988): Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. *Journal of the American Chemical Society*, 110:7876–7.

Touzet N, Franco JM, Raine R (2008): Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae*, 7:782–97.

Trainer VL (2002) *Harmful Algal Blooms in the PICES Region of the North Pacific*. Taylor, F.J., Trainer, V.L., Eds.; PICES: Sidney, Australia. Scientific Report 23, pp. 89–118.

Trainer VL, Hickey BM, Bates SS (2008): *Toxic Diatoms*. Elsevier Science Publishers, New York, 219-237.

Tubaro A, Dell'Ovo V, Sosa S, Florio C (2010): Yessotoxins: A toxicological overview. *Toxicon*, 56(2):163-172.

Twiner MJ, Doucette GJ, Rasky A, Huang XP, Roth BL, Sanguinetti MC (2012b): Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of hERG potassium channels. *Chemical Research In Toxicology*, 25(9):1975-1984.

Twiner MJ, El-Ladki R, Kilcoyne J, Doucette GJ (2012a): Comparative effects of the marine algal toxins azaspiracid-1, -2, and -3 on Jurkat T lymphocyte cells. *Chemical Research In Toxicology*, 25:747–754.

Twiner MJ, Hess P, Dechraoui MY, McMahon T, Samons MS, Satake M, Yasumoto T, Ramsdell JS, Doucette GJ (2005): Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon*, 45(7):891-900.

Ujević I, Roje R, Ninčević-Gladan Ž, Marasović I (2012): First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia). *Food control*, 25:285-291.

Ujević I, Roje-Busatto R, Ezgeta-Balić D (2019): Comparison of amnesic, paralytic and lipophilic toxins profiles in cockle (*Acanthocardia tuberculata*) and smooth clam (*Callista chione*) from the central Adriatic Sea (Croatia). *Toxicon*, 159:32-37.

Ujević I, Ninčević Gladan Ž, Roje R, Skejić S, Arapov J, Marasović I (2010): Domoic Acid - A New Toxin in the Croatian Adriatic Shellfish Toxin Profile. *Molecules*, 15:6835-6849. doi:10.3390/molecules15106835

Ujević I, Vuletić N, Lušić J, Nazlić N, Kušpilić G (2015): Bioaccumulation of Trace Metals in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Mali Ston Bay during DSP Toxicity Episodes. *Molecules*, 20, 13031-13040.

Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla

Uredba Komisije (EU) br. 786/2013 od 16. kolovoza 2013. o izmjeni Priloga III. Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu dopuštenih granica yesotoksina u živim školjkama

Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto G, Clardy J (1985): Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41:1019-1025.

Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, Fujita N (1980): Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district Bull. Japanese Society of Fisheries Science, 46:1405-1411.

Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M (1978): Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district Bull. Japanese Society of Fisheries Science, 44:1249-1255.

Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Méndez J (2011): Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal Of Environmental Monitoring*, 13:1831–1840.

Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Pásaro E, Méndez J, Laffon B (2013): Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin. *Marine Drugs*, 11(11):4328–4349.

Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Vieytes MR, Botana LM (2010): Cell volume decrease as a link between azaspiracid-induced cytotoxicity and c-Jun-N-terminal kinase activation in cultured neurons. *Toxicological sciences*, 113(1):158-68.

Van Egmond HP, Jonker KM, Poelman M, Scherpenisse P, Stern AG, Wezenbeek P, Bergwerff AA, Van den Top HJ (2004): Proficiency studies on the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Additives and Contaminants*, 21(4):331–340.

Vidal A, Jorge Correa, Juan Blanco (2009): The effect of some habitual cooking processes on the domoic acid concentration in the cockle (*Cerastoderma edule*) and Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Food Additives and Contaminants*, 26 (07):1089-1095.

Vilariño N, Louzao MC, Abal P, Cagide E, Carrera C, Vieytes MR, Botana LM (2018): Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection. *Toxins*, 10(8):324.

Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK (2010): Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8(7):2185–2211.

Wilkins A, Rehmann N, Torgersen T, Rundberget T, Keogh M, Petersen D, Hess P, Rise F, Miles CO (2006): Identification of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:5672–5678.

Wong CK, Hung P, Lee KLH, Mok T and Kam K (2008): Effect of steam cooking on distribution of paralytic shellfish toxins in different tissue compartments of scallops *Patinopecten yessoensis*. *Food Chemistry*, 114:72-80.

WHO, World Health Organization (2016): Toxicity Equivalence Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs. Geneva, Switzerland.

Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, Pathak V, Quilliam MA, Regan MA, Sim PG, Thibault P, Walter JA, Richard DJA, Dewar C (1989): Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*, 67:481–490.

Wu X, Hou L, Lin X, Xie Z (2019): Application of novel nanomaterials for chemo-and biosensing of algal toxins in shellfish and water. In Novel Nanomaterials for Biomedical, Environmental and Energy Applications. Elsevier, Amsterdam, 353-414.

Zakon o službenim kontrolama i drugim službenim aktivnostima koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja, zdravlju bilja i sredstvima za zaštitu bilja (2021). Narodne novine, br. 52/21.

Zakon o veterinarstvu (2013). Narodne novine, br. 82/13.

11. Rječnik

ARfD – akutna referentna doza (Akutna referentna doza je procijenjena količina tvari u hrani ili vodi za piće koja može biti unesena u razdoblju od 24 h ili manje, bez značajnijeg zdravstvenog rizika za zdravlje potrošača. Izražava se kao masa kemijske tvari po kilogramu tjelesne mase.)

CONTAM – engl. *The Panel on Contaminants in the Food Chain*. EFSA-in odbor koji pruža znanstvene savjete o kontaminantima u prehranbenom lancu i nepoželjnim tvarima kao što su prirodni otrovi, mikotoksini i ostaci nedozvoljenih tvari.

LB – donja granica je Granica minimalne izloženosti potencijalno štetnoj tvari (u pojedinačnom slučaju najčešće 0) ukoliko hrana sadrži zanemarive količine te tvari. U slučaju upravljanja rezultatima koji su manji od vrijednosti LOD-a ili LOQ-a, svakom takvom rezultatu se najčešće pridružuje vrijednost 0 i označava kao donja granica. Ovakva statistička obrada podataka ujedno označava najbolji mogući scenarij.

LOAEL – engl. *Lowest-observed-adverse-effect level* - Najniža razina kod koje je uočen štetni učinak. Najniža količina tvari za koju je utvrđeno da uzrokuje štetni učinak na izloženoj populaciji.

MB – srednja granica je granica srednje izloženosti potencijalno štetnoj tvar ukoliko hrana sadrži zanemarive količine te tvari. U slučaju upravljanja rezultatima koji su manji od vrijednosti LOD-a ili LOQ-a, svakom takvom rezultatu se najčešće pridružuje pola vrijednosti uspostavljenog LOD-a ili LOQ-a. Ovakva statistička obrada podataka ujedno označava scenarij koji je najrealniji.

NOAEL – engl. *No-observed-adverse-effect-level* - Razina bez uočenog štetnog učinka. Najveća koncentracija ili količina tvari, pronađena eksperimentom ili promatranjem, koja ne uzrokuje štetne promjene morfologije, funkcionalnih sposobnosti, rasta i razvoja organizma.

UB – gornja granica je granica maksimalne izloženosti potencijalno štetnoj tvari ukoliko hrana sadrži zanemarive količine te tvari. U slučaju upravljanja rezultatima koji su manji od vrijednosti LOD-a ili LOQ-a, svakom takvom rezultatu se najčešće pridružuje njihova puna vrijednost. Ovakva statistička obrada rezultata ujedno označava najgori mogući scenarij.

12. Skraćenice

ARfD	akutna referentna doza
ASP	amnezijski toksini
AZA	azaspiracidi
CONTAM	engl. <i>The Panel on Contaminants in the Food Chain</i> .
CTX	ciguatoksin
CI	ciklički imini
DA	domoična kiselina
DSP	dijaretičko trovanje školjkašima
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane
ekv.	ekvivalent
EU	Europska unija
HT	hidrofilni toksini
HVI RI	Hrvatski veterinarski institut, podružnica Rijeka
HVI ST	Hrvatski veterinarski institut, podružnica Split
IZOR	Institutu za oceanografiju i ribarstvo, Split
JTŠ	jestivo tkivo školjkaša
LB	donja granica
LC	engl. <i>liquid chromatography</i> . Tekućinska kromatografija.
LOAEL	engl. <i>Lowest-observed-adverse-effect level</i> . Najniža razina kod koje je uočen štetni učinak.
LOD	limit detekcije
LOQ	limit kvantifikacije
LT	lipofilni toksini
MB	srednja granica

NDK	najveća dopuštena količina
NOAEL	engl. <i>No-observed-adverse-effect-level</i> - Razina bez uočenog štetnog učinka
OA	okadaična kiselina
PLTX	palitoksin
PP	protein fosfataza
PSP	paralitički toksini
PTX	pektenotoksini
RH	Republika Hrvatska
STX	saksitoksin
SŽS	središnji živčani sustav
TEF	faktor ekvivalentne toksičnosti
t.m.	tjelesna masa
UB	gornja granica
YTX	jesotoksini

13. Popis tablica

Tablica 1. Podjela morskih biotoksina s engleskim i hrvatskim nazivom te skraćenim nazivom	9
Tablica 2. Zakonski postavljene najveće dopuštene vrijednosti za morske biotoksine	10
Tablica 3. Faktori ekvivalentne toksičnosti morskih biotoksina.....	11
Tablica 4. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za ASP u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)	14
Tablica 5. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za OA u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)	15
Tablica 6. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za PSP u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)	16
Tablica 7. Deskriptivna statistika za rezultate analitičkih analiza za YTX u školjkaša uzorkovanih prije stavljanja na tržište (2017. - 2022.)	17
Tablica 8. Podaci o prehrambenim navikama za ispitanike koji su prijavili da su konzumirali školjkaše	19
Tablica 9. Analitičke metode za određivanje morskih biotoksina.....	24
Tablica 10. Limiti detekcije i limiti kvantifikacije biotoksina u pojedinim laboratorijima.....	25
Tablica 11. Zakonom propisane vrijednosti NDK u EU (izražene kao ekvivalenti toksina po kg jestivog tkiva školjkaša) i akutne referentne doze (ARfD) (izražene kao ekvivalenti toksina po kilogramu tjelesne mase).....	27
Tablica 12. Izloženost ASP iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK	43
Tablica 13. Izloženost OA iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK	45
Tablica 14. Izloženost PSP iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK	47
Tablica 15. Izloženost YTX iz školjkaša za četiri pretpostavljena slučaja i u slučaju vrijednosti NDK	49

14. Popis slika

Slika 1. Izlovna područja: Zapadna obala Istre 1, 2 i 3; Istočna obala Istre 1 i 2. Uzgojna područja: Savudrijska vala, Vabriga, Limski zaljev, Medulinski zaljev, Uvala Budava i Raški zaljev (preuzeto i modificirano s https://www.caps2.eu/caps2/)	21
Slika 2. Izlovna područja: Velebitski kanal, Paška vala, Poveljana. Uzgojna područja: Uvala Dinjiška, Poveljana i Novigradsko more (preuzeto i modificirano s https://www.caps2.eu/caps2/)	22
Slika 3. Izlovna područja: Kanal sv. Ante u Šibeniku, Izlovno područje Marinski zaljev, Kaštelanski zaljev. Uzgojna područja: Pirovački zaljev, Bisage - Obinuš, Ušće rijeke Krke, Marinski zaljev. (preuzeto i modificirano sa https://www.caps2.eu/caps2/)	23
Slika 4. Uzgojno područje: Škoj. Izlovno i uzgojno područje: Malostonski zaljev. (preuzeto i modificirano sa https://www.caps2.eu/caps2/)	23