

SINTEF Fiskeri og havbruk AS
Marin ressursteknologi

Postadresse: 7465 Trondheim
Besøksadresse:
SINTEF Sealab
Brattørkaia 17B

Telefon: 4000 5350
Telefaks: 932 70 701

E-post: fish@sintef.no
Internet: www.sintef.no

Foretaksregisteret:
NO 980 478 270 MVA

TITTEL

Utprøving av hurtigtesten MIST Alert™ for påvisning av PSP (Paralytisk Skjellgift) i skjell sammenlignet med musetest.

FORFATTER(E)

Ingrid Overrein, Tone N. Asp & Tore Aune

OPPDRAGSGIVER(E)

SND / NUMARIO

RAPPORTNR. STF80 A022005	GRADERING Åpen	OPPDRAGSGIVERS REF. Magne Volden	
GRADER. DENNE SIDE Åpen	ISBN ISBN82-14-01872-2	PROSJEKTNR. 840041.00	ANTALL SIDER OG BILAG 29 (+9)
ELEKTRONISK ARKIVKODE I:\82_bio\Pro\840041 PSP		PROSJEKTLIDER (NAVN, SIGN.) Ingrid Overrein	VERIFISERT AV (NAVN, SIGN.) Gunvor Øie
ARKIVKODE	DATO 2002-02-28	GODKJENT AV (NAVN, STILLING, SIGN.) Jostein Storøy	

SAMMENDRAG

Jellett Biotek i Canada har i samarbeid med "Institute of Marine Biosciences" og den Canadiske Stats Forskningsråd utviklet en hurtigtest, kalt MIST Alert™ for påvisning av PSP. I dette arbeidet skulle hurtigtesten prøves ut under Norske forhold. Denne testen er enkel i bruk og er designet for å teste enkelt prøver som etter 20 minutter gir et kvalitativt ja eller nei svar på tilstedeværelse av PSP i skjellene ved en visuell avlesning av testen. Resultatene fra denne utprøvingen av skjellprøver ved bruk av hurtigtesten MIST Alert™ viser lovende resultater. Det ser ut som om hurtigtesten MIST Alert™ fungerer tilfredsstillende for påvisning av PSP i skjellprøver som inneholder nivå over 300 ME/100 g skjellvev. Samtlige skjellprøver som inneholdt over 300 ME / 100 g skjellvev viste positivt utslag på hurtigtesten.

Det ble funnet variasjoner i påvisningen av PSP med hurtigtesten blant skjellprøver som inneholdt PSP toksiner i området mellom 160-259 ME / 100 g skjellvev. Dette kan skyldes variasjoner innen toksinprofilene i skjell. Det er kjent at PSP profilene kan variere mellom geografiske områder, men i hvor stor grad giftprofilene varierer utfra forhold som oppblomstrings perioder og næringstilgang i vannmassene er lite kjent. Nå er deteksjonsgrensen for PSP ved musetest rundt 150-200 ME / 100g skjellvev.

Bruksområdet for slike hurtigtester vil begrense seg til eksempelvis selvkontroll mellom to innsendinger av skjellprøver til musetesting/kjemisk analyse, testen vil kunne egne seg som en ekstra sikkerhetssjekk og vil kunne være et verdifullt supplement til de etablerte testmetodene.

STIKKORD	NORSK	ENGELSK
GRUPPE 1	PSP	PSP
GRUPPE 2	Hurtigtest	Test kit
EGENVALGTE	<i>Alexandrium sp</i>	<i>Alexandrium sp</i>

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Forord	3
2	Sammendrag	4
3	Bakgrunn	5
	3.1 Overvåkning og kontroll i Norge	7
	3.2 Fordeler ved muligheten for hurtig utvelgning av skjell	8
	3.3 Kort innføring i MIST Alert TM	9
	3.4 Hva er egentlig problemet med deteksjon av PSP?	9
4	Resultater av utprøvingen	16
5	Vurdering	26

1 Forord

Dette prosjektet ble i første rekke utført i samarbeid med fag miljøet ved Norges veterinærhøgskole.

Verdifull bistand og HPLC analyser ble utført av Tone N. Asp og Lai Nguyen fra Norges veterinærhøgskole.

Skjellprøver fra både skjelloppdrettere samt fra Fiskeridirektoratets overvåkningsstasjoner i Trøndelag og Nordland har inngått i prosjektet.

Næringsmiddelkontrollen i Trondheim og næringsmiddeltilsynet for Fosen samt Havbruksveterinærtjenesta i Gulen har stått for syreekstraksjon og utprøving av hurtigtester. Dyrestallen på St Olavs Hospital og Norges veterinærhøgskole har utført musetestene. Norges veterinærhøgskole har også bidratt med utprøving av skjellekstrakt på hurtigtesten.

Stor takk ellers til alle som har bidratt av teknisk karakter og med skjellprøver i prosjektet.

Prosjektet er utført med faglig bistand fra:

Tore Aune (Norges veterinærhøgskole)
Tone N. Asp (Norges veterinærhøgskole)
Anna Hofset (Fiskeridirektoratet region Trøndelag)
Joanne Jellett (Jellett Biotek Ltd)
Ray Roberts (Jellett Biotek Ltd)

2 Sammendrag

I Europa konsumeres mer skjell enn det produseres, og det gir Norge gode muligheter for å produsere skjell for dette markedet. Langs norskekysten er det gode naturlige forutsetninger for å dyrke de viktigste skjelltypene, blåskjell, kamskjell og østers. Vi er nå godt i gang med å utvikle kompetanse på skjell dyrking i Norge, men ennå finnes mange uløste problem spesielt knyttet til innhold og kontroll av algegifter i skjell som skal omsettes på markedet.

Jellett Biotek i Canada har i samarbeid med "Institute of Marine Biosciences" og den Canadiske Stats Forskningsråd utviklet en hurtigtest, kalt MIST Alert™ for påvisning av PSP. I dette arbeidet skulle hurtigtesten prøves ut under Norske forhold. Denne testen er enkel i bruk og er designet for å teste enkelt prøver som etter 20 minutter gir en kvalitativt ja eller nei svar på tilstedeværelse av PSP i skjellene ved en visuell avlesning av testen. Utvikling av et enkelt farget bånd på testplaten indikerer positivt utslag/prøve som følgelig ikke er trygg å spise. Utvikling av to linjer på testplaten derimot indikerer negativt testresultat og skjell fra dette partiet er trygge for konsum. Til applisering på disse testplatene brukes standard AOAC ekstraksjonsmetode som for injisering av mus ved musetesten (syre ekstrahering av skjellene).

Resultatene fra denne utprøvingen av skjellprøver ved bruk av hurtigtesten MIST Alert™ viser lovende resultater. Det ser ut som om hurtigtesten MIST Alert™ fungerer tilfredsstillende for påvisning av PSP i skjellprøver som inneholder nivå over 300 ME/100 g skjellvev. Samtlige skjellprøver som inneholdt over 300 ME / 100 g skjellvev viste positivt utslag på hurtigtesten. Det er også dette området det er spesielt ønskelig at testen viser klare resultater. Feilpåvisninger i dette giftområdet kan være fatalt og en ønsker også en viss sikkerhetsmargin i påvisningene.

Det ble funnet variasjoner i påvisningen av PSP med hurtigtesten blant skjellprøver som inneholdt PSP toksiner i området mellom 160-259 ME /100 g skjellvev. Dette kan skyldes variasjoner innen toksinprofilene i skjell. Det er kjent at PSP profilene kan variere mellom geografiske områder, men i hvor stor grad giftprofilene varierer utfra forhold som oppblomstrings perioder og næringstilgang i vannmassene er lite kjent. Nå er deteksjonsgrensen for PSP ved musetest rundt 150-200 ME / 100g skjellvev. På bakgrunn av dette er det ikke kritisk med feilpåvisninger i dette giftområdet, faren er heller at prøver blir bedømt for strengt med denne hurtigtesten i forhold til musetester ved lave PSP konsentrasjoner.

Bruksområdet for slike hurtigtester vil begrense seg til eksempelvis selvkontroll mellom to innsendinger av skjellprøver til musetesting, testen vil kunne egne seg som en ekstra sikkerhetssjekk og vil kunne være et verdifullt supplement til de etablerte testmetodene. En vet at algebildet raskt kan endre seg på en lokalitet. Dette støtter en slik bruk av hurtigtesten.

3 Bakgrunn

Skjellnæringen i Norge er utpekt som et satsningsområde og øker raskt i omfang. Internasjonalt har skjell dyrking vært en stor næring og det har i de senere årene vært arbeidet aktivt for å utvikle skjell dyrking til å bli en ny næring også i Norge. Størstedelen av verdens skjellproduksjon er dyrket (ca 85 %) mens resten er fangstet av ville bestander. For nordmenn er blåskjell best kjent, men i utlandet verdsettes østers, kamskjell, hjerteskjell og mange andre skjellarter også høyt. I 1998 ble det eksportert 64 tonn levende og frosne kamskjell til en verdi av 3,4 millioner kroner, mens det innen utgangen av september 1999 var eksportert 164 tonn til en verdi av 6,2 millioner kroner. Blåskjell eksporteres i langt større volum, men til adskillig lavere pris. I år 2000 ble det totalt høstet 1850 tonn skjell i Norge. Dette besto i 660 tonn blåskjell, 616 tonn haneskjell, 35 tonn østers og 658 tonn andre skjellarter. Prognosene for produksjonen for 2010 er optimistisk og i størrelsesorden 32 000-53 000 tonn.

I Europa konsumeres mer skjell enn det produseres, og det gir Norge gode muligheter for å produsere skjell for dette markedet. Langs norskekysten er det gode naturlige forutsetninger for å dyrke de viktigste skjelltypene, blåskjell, kamskjell og østers. Vi er nå godt i gang med å utvikle kompetanse på skjell dyrking i Norge, men ennå finnes mange uløste problem spesielt knyttet til innhold og kontroll av algegifter i skjell som skal omsettes på markedet.

I det marine næringsnett er mikroalger viktigste fødegrunnlag for bl.a skjell som filtrerer mikroalgene fra de omgivende vannmassene. Kjemiske forbindelser som blir produsert av enkelte av disse encellede algeartene kan ha en giftig effekt på mennesker og andre dyr. En av de vanligste bærere av disse giftene i det marine miljø er filterfødende skjell som inntar og akkumulerer fytoplankton og deres gifter, som i neste omgang kan føre til forgiftning hvis disse blir spist. Mange ulike encellede algearter blir filtrert av skjell og det er estimert at mindre enn 2% av alle kjente fytoplanktonarter er i stand til å produsere forbindelser som er giftige (Jellett, 1993; Dahl *et al.*, 1999). Skjell er i stand til å kvitte seg med de akkumulerte algegiftene når tilgangen på disse algeartene forsvinner fra vannmassene. Mekanismene som er involvert i denne renselsesprosessen er ikke fullt ut kjent og retensjonstiden på algegiftene kan variere med fødetilgang, samt nivået av de akkumulerte giftene (Haamer *et al.*, 1990a,b; Shumway, 1990). Algegiftene kan variere i styrke og grad av giftighet, og det er i all hovedsak fire grupper av skjellgifter;

Paralytisk skjellgift (PSP) kan i alvorlige tilfeller gi lammelser. Giftbærende alger er i første rekke representanter fra dinoflagellatslektene *Alexandrium*, *Gymnodinium* og *Pyrodinium* I Norge er det hovedsaklig *Alexandrium tamarense* (tidligere *A. excavatum*) som skaper disse problemene. *A. tamarense* produserer toksiner i PSP komplekset, men man har ikke per i dag full oversikt over hvilke av disse giftene arten produserer under norske forhold (Hestdal *et al.*, 2001). Saxitoksin er det mest kjente toksinet som fører til PSP, og gruppen består av omtrent 20 ulike nært

beslektede molekyler. De paralytiske giftmolekylene blokkerer natrium kanalene og hindrer dermed impulsoverføringen mellom nerver og muskler. Innfluks av natrium er basis i den kaskadereaksjonen som tilslutt ender opp i signaloverføring og stimuli fra nerveceller til muskelcellene. Det er mange forskjellige stoffer som påvirker nerve- og muskelceller ved å blokkere eller åpne ionekanalene. De såkalte pinnsvinfisk fra tempererte havområder har forøvrig en lignende virkning som saxitoksin, disse fiskene inneholder tetrodotoksin, som er et av de giftigste stoff en kjenner. Tetrodotoksin stenger også de spenningsstyrte natrium kanalene og blokkerer derfor aksjonspotensialene som er nødvendige for signaloverføring mellom nerve- og skjelettmuskelceller.

PSP er ikke et problem med stort omfang i Norge per i dag og det er relativt få positive skjellprøver som blir påvist hvert år. Hovedsesongen for oppblomstring av *A. tamarense* langs norskekysten har vært antatt å være rundt vår og forsommeren (mars-juni) med sporadiske oppblomstringer på høsten. De senere årene har et større område av kysten blitt overvåket, noe som har ført til bedre kunnskaper. I 1997 og 1998 ble skjell fra Finnmark inkludert i "Overvåkningsprogrammet for algegifter i skjell" og man påviste betydelige mengder PSP i perioden september til november. De nye erfaringene fra dette, samt fra andre områder av norskekysten har endret noe på det opprinnelige bildet. Det ser derfor ut som om *A. tamarense* finnes til de fleste årstider og langs kysten fra Østfold til Finnmark, men med hovedblomstring på vårparten (Hestdal *et al.*, 2001). Det som kjennetegner oppblomstringene er store lokale forskjeller i algekonsentrasjonene, transport av algeforekomster med overflatestrømmer og raske vekslinger på samme lokalitet. Det er også funnet variabelt samsvar med algekonsentrasjoner i vannmassene og giftinnhold i skjellene fra samme lokalitet. Det har blitt påvist PSP i skjell ved lav eller ingen funn av *Alexandrium* sp i vann eller håvtrekk, samt motsatte tilfeller hvor høye konsentrasjoner av *Alexandrium* sp ikke har gitt PSP påvisning i skjell (Hestdal *et al.*, 2001).

Den andre gruppen av algegifter som er mer vanlig i Norge, er diarégivende gifter (DSP). Disse er størst i utbredelse og et stort problem i skjellnæringen. Algene som er bærere av DSP gifter finnes i første rekke i dinoflagelatslekten *Dinophysis* sp., men enkeltarter innen andre slekter kan også være diarégivende. Innen *Dinophysis* slekten er det i hovedsak tre arter som er representert langs norskekysten, *D. acuminata*, *D. acuta* og *D. norvegica*. Mennesker som har blitt utsatt for DSP opplever også kvalme, oppkast, hodepine og smerter i kroppen, men friskner vanligvis til uten varige men.

Det er viktig å ha kontroll med nivået av begge disse giftene, DSP fordi denne er det største problemet med hyppigst forekomst og PSP fordi denne opptrer sporadisk og kan gi fatale følger for den som har inntatt giften. Det gamle DSP komplekset er nå splittet opp i de egentlige diarétoksinene; Okadasyre (OA), DTX, samt yessotoksiner og pectenotoksiner. Disse må analyseres hver for seg da de har egne spesifikke metoder for påvisning. I tillegg finnes en type gift som gir hukommelsestap (ASP) og en nervegift (NSP), men disse er foreløpig ikke funnet i Norge. Det har de seneste år også blitt registrert en ny type gift (azaspiracid) som har blitt påvist i lave konsentrasjoner i norske skjell. Det er fare for at algarter og andre organismer som vanligvis ikke opptrer i våre farvann kan følge med havstrømmer eller ballastvann i

store skip. Per i dag er det få land som har innført tiltak for å redusere problem med spredning av organismer via skipstrafikken.

3.1 Overvåkning og kontroll i Norge

Norge har en raskt voksende skjellnæring og med dette følger sterk økning i behovet for testing av giftinnhold i skjell som sendes ut på markedet for konsum. Statens næringsmiddeltilsyn (SNT) har siden begynnelsen av 1980 årene organisert et landsomfattende overvåkningsprogram for overvåkning av marine algegifter i blåskjell (Aune *et al.*, 1993). Overvåkingen i Norge baserer seg både på algeanalyser av vannprøver og håvtrekk tatt på faste stasjoner, og i tillegg kontrollmålinger av giftinnhold i skjell ved kjemiske analyser fra de samme stasjonene (noen få skjellprøver blir også musetestet). I de siste årene har nesten alle skjellanalyser blitt utført analytisk ved Norges veterinærhøgskole.

Skjeloppdrettere sender også inn skjell til musetesting, Fiskeridirektoratets regionkontor gir høstetillatelse hvis giftnivået ikke overstiger gitte grenseverdier. I Norge overvåkes giftinnholdet i skjell til omsetning ved musetest som analyseres parallellt til kjemiske analyser. Musetesten er pålitelig ved påvisning av paralytiske skjellgifter. PSP konsentrasjonen i skjell angis i museenheter / 100 gram skjellvev. En museenhet (ME) er definert som den mengde gift som trengs for å drepe en mus på 20 gram innen 15 minutter. Grenseverdien for kommersiell omsetning av skjell i Norge er satt ved 400 ME /100g skjellmat, som tilsvarer omtrent 80µg saxitoksin ekvivalenter /100g skjellvev (da er klormolekyler (di-hydro HCL) regnet med i kvantifiseringen av saxitoksin ekvivalentene). Fra 1/1-02 oppgis forøvrig PSP toksiner analysert ved HPLC som µg saxitoksin ekvivalenter / kg skjellvev, i henhold til EU regulativer. På grunn av de alvorlige konsekvensene PSP kan ha for den som spiser skjellene, foretar Fiskeridirektoratet også en mer gjennomgående vurdering av prøver med PSP nivåer mellom 200-400 ME /100 g skjellvev. I vurderingen taes også hensyn til nivåene av *A. tamarense* i vannmassene på lokaliteten (stigende eller synkende oppblomstring).

SNT har grenseverdier i sine kostholdsråd som er satt lavere enn Fiskeridirektoratet sine grenseverdier for omsetning av skjell. SNT gir råd på grunnlag av prøveuttak fra teststasjoner som ligger langt fra hverandre og har lagt seg på en strengere linje fordi de gir råd for et større område og ikke uttaksstedet alene, dermed opereres det med en grenseverdi for kostholds råd på 150-200 ME /100 g skjellvev.

Alternative metoder som kjemiske og immunologiske, har vært under utvikling og utprøving i 10-20 år. Norge deltar aktivt gjennom CEN (European Committee for Standardization) for å få større aksept for å benytte kjemiske analyser ved påvisning av PSP. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) til disse analysene. Ett hovedproblem også i disse analysene er at det ikke finnes standarder for alle de omlag 20 PSP giftene som er identifisert. Foreløpig benyttes standardblandinger som ikke er komplette. Mustetestene fanger opp alle de ulike paralytiske giftene som måtte forekomme i en skjellprøve og eventuelle synergistiske effekter med andre giftgrupper, mens man ved de kjemiske påvisningsmetodene kun klarer å identifisere

de toksinene man har standarder til (Dahl *et al.*, 1999). Det arbeides intensivt med å utvikle fullgode alternative metoder til musetesten for påvisning av algegifter i skjell. En ønsker å redusere eller om mulig eliminere bruk av dyr til slike analyser av hensyn til dyrene selv, samt for bedre spesifisitet. I Norge er det Norges veterinærhøgskole (NVH) i Oslo og St Olavs Hospital i Trondheim som utfører musetester.

Både bruken av levende mus til testing av algegifter og begrenset kapasitet på å få utført slike tester av skjell er forhold som har vært kritisert. Med etablering av stadig nye produksjonssteder og flere anlegg, kan det by på problemer å få analysert skjellene for algegifter ved tradisjonelle musetester. Skjelldyrkere som har høstbare skjell, har til nå testet skjellene hver fjortende dag gjennom hele året. Nye retningslinjer er under utarbeiding som medfører at skjelldyrkere må teste skjellene minst hver uke. I områder med høy risiko for giftige alger vil det i tillegg kreves flere algeanalyser i uka, hvis skjell skal høstes. I Norge kan det ta fra tre til fire dager fra innsending av skjellprøver til prøveresultatene foreligger. Det prøveregimet som til nå har vært benyttet fanger ikke opp eventuelle endringer i algebildet mellom to påfølgende skjellprøver. Innføring av de nye retningslinjene vil fange opp eventuelle endringer i algebildet og gi en ekstra sikkerhet for at bare giftfrie skjell når markedet.

SINTEF Fiskeri og havbruk har vært i kontakt med et firma i Canada (Jellett Biotek Ltd) som har kommet langt i utviklingen av tester for deteksjon av biotoksiner. Jellett Biotek Ltd, jobber med marin bioteknologi og har utvikling og produksjon av brukervennlige, kostnadseffektive diagnostiske test sett for marine biotoksiner som hovedområde. Firmaet som ble grunnlagt i 1993, har 12 ansatte som er lokalisert i Dartmouth, Nova Scotia. Jellett har utviklet hurtigtester for deteksjon av ASP og PSP, mens hurtigtest for påvisning av DSP fortsatt er under utvikling. I tillegg er det utviklet celle bioassays for påvisning av DSP og PSP, disse testene er noe mer utstyrs- og kompetansekrevede enn hurtigtestene.

3.2 Fordeler ved muligheten for hurtig utvelging av skjell

Slik næringen står i dag er det både fra industrien og de regulerende myndigheter avdekket et behov for enklere og hurtigere metoder for påvisning av paralytiske skjellgifter, og i aller høyeste grad også for de diarégivende skjellgiftene. I mange land er anlegg for produksjon av skjell gjerne lokalisert i områder med svak infrastruktur. Dette fordrer at logistikk knyttet til forsendelse av skjell til myndigheter eller private laboratorier for analyse først og fremst blir tidkrevende og fordyrende. Tidsforbruket knyttet til transport og analyse av skjellene gjør det vanskelig for skjelldyrkere å planlegge høsting av skjellene, noe som gjør det vanskelig å overholde forpliktelser overfor kundene. På enkelte lokaliteter kan det forekomme at skjellprodusentene høster skjell og samtidig sender inn prøver for analyse av toksisiteten i skjellene. Hvis testresultatene er positive, er det sjelden mulig for skjellprodusenten å sette skjellene tilbake i sjøen og skjellene må destrueres. Dette resulterer i tapte fortjenester knyttet til tap av produkt og arbeidstid knyttet til opptak av skjell. Vanlig praksis i Norge er likevel at skjell testes for innhold av skjellgift i forkant av høsting slik at skjellprodusentene unngår å høste et kontaminert produkt.

Kjemiske målemetoder av skjell vil redusere eller på sikt om mulig eliminere nødvendigheten av å teste ut toksiner på levende dyr i laboratoriesammenheng, noe som vil være en mer etisk forsvarlig praksis. Både i Norge og i Europeisk sammenheng arbeides det intensivt for å finne metoder som helt eller delvis kan erstatte eller redusere bruken av levende dyr både brukt i forsøk og/eller ved uttesting av ulike toksiner.

3.3 Kort innføring i MIST Alert™

Jellett Biotek har i samarbeid med "Institute of Marine Biosciences" og den Canadiske Stats Forskningsråd utviklet en hurtigtest, kalt MIST Alert™ for PSP. Denne testen er enkel i bruk og er designet for å teste enkelt prøver som etter 20 minutter gir en kvalitativt ja eller nei svar på tilstedeværelse av PSP i skjellene ved en visuell avlesning av testen. Utvikling av et enkelt farget bånd på testplaten indikerer positivt utslag/prøve som følgelig ikke er trygg å spise. Utvikling av to linjer på testplaten derimot indikerer negativt testresultat og skjell fra dette partiet er trygge for konsum. Til applisering på disse testplatene brukes standard AOAC ekstraksjonsmetode som for injisering av mus ved musetesten (syre ekstrahering av skjellene). For beskrivelse av hvordan hurtigtesten benyttes henvises til Vedlegg 1. Testplatene fungerer også ved bruk av en forenklet ekstraksjonsmetode som Jellett Biotek har utviklet til bruk ute i felt. Denne forenklete ekstraksjonsmetoden er for tiden inne til godkjenning av den Canadiske Stats Forskningsråd og er ikke brukt i prosjektet.

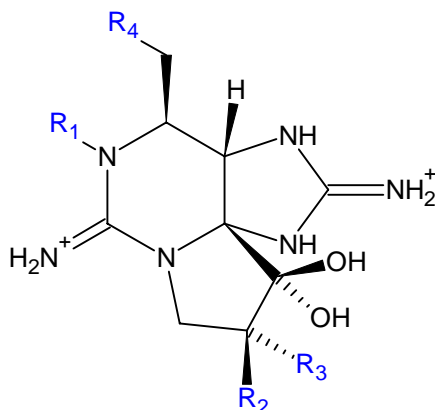
Testene har blitt påvist å være effektive ved deteksjon av alle viktige analoger av saxitoksin, som er årsak til PSP. Sensitiviteten i testene er omtrent 4ug /100 g skjellvev eller ti ganger mer sensitiv enn musetestene og 20 ganger under grenseverdier satt av Norske myndigheter. Nivåene som gir utslag på testplaten er justerbare. Testplatene kan tåle ulike og varierende lagringstemperaturer og kan lagres i minst ett år før effektiviteten i platene tapes.

Men for å kunne bruke disse testene riktig er det viktig å sette seg noe inn i prinsippene bak disse testene, hvordan de fungerer under ulike forhold samt være klar over også begrensninger som må settes i bruken av de.

3.4 Hva er egentlig problemet med deteksjon av PSP?

Langs stillehavskysten av USA har PSP vært kjent i over 200 år, mens i Norge ble det første tilfellet observert først i 1901 (Tangen, 1997). Et stort antall toksinforbindelser er involvert i PSP komplekset og de kjemiske strukturene til disse toksinforbindelsene har blitt klarlagt først de seneste 20 årene. En regner med at et 20 talls ulike forbindelser hører til under PSP komplekset. På grunn av kompleksiteten i de kjemiske strukturene av disse forbindelsene, samt store variasjoner innen strukturene

har det også blitt stadfestet varierende grad av toksisitet av forbindelsene som hører inn under PSP komplekset.



Figur 3.1 Molekylstruktur av PSP (Tone N. Asp (NVH))

Figur 3.1 viser grunnstruktur av PSP toksinet med sidegrupper ($R_{1,2,3,4}$) som varierer og gir grunnlag for endringer av den kjemiske strukturen og dermed også forbindelser og toksisitet. For eksempel kan R gruppen i PSP toksinet ha ett hydrogenatom (H), en aminogruppe (NH_2) eller en karbamat gruppe ($OCONH_2$). Tabell 3.1, 3.2 og 3.3 viser oversikt over ulike derivater av grunn molekylet for PSP som en per i dag har oversikt over (pers medd. Tone N. Asp (NVH); Hestdal *et al*, 2001 (for enkelte derivater)). Ulike forbindelser er involvert i PSP komplekset, og disse forbindelsene har også ulik toksisitet.

Tabell 3.1. Oversikt over hvordan sidegrupper kan variere og danne grunnlag for karbamat toksiner.

Karbamat toksiner	R_1	R_2	R_3	R_4
STX	-H	-H	-H	-OCONH ₂
GTX 2	-H	-H	-OSO ₃ ⁻	-OCONH ₂
GTX 3	-H	-OSO ₃ ⁻	-H	-OCONH ₂
NEO	-OH	-H	-H	-OCONH ₂
GTX 1	-OH	-H	-OSO ₃ ⁻	-OCONH ₂
GTX 4	-OH	-OSO ₃ ⁻	-H	-OCONH ₂

Hvor:

STX=Saxitoksin

NEO=Neosaxitoksin

GTX=Gonyautoksin

Saxitoksin, Neosaxitoksin og Gonyautoksin er de forbindelsene som har størst toksisitet av forbindelsene som hører til under PSP og er ansvarlig for det meste av den toksiske aktiviteten funnet i skjell med PSP.

Tabell 3.2. Oversikt over hvordan sidegrupper kan variere og danne grunnlag for dekarbamoyl toksiner.

Dekarbamoyl toksiner	R₁	R₂	R₃	R₄
dc-STX	-H	-H	-H	-OH
dc-GTX 2	-H	-H	-OSO ₃ ⁻	-OH
dc-GTX 3	-H	-OSO ₃ ⁻	-H	-OH
dc-NEO	-OH	-H	-H	-OH
dc-GTX1	-OH	-H	-OSO ₃ ⁻	-OH
dc-GTX4	-OH	-OSO ₃ ⁻	-H	-OH

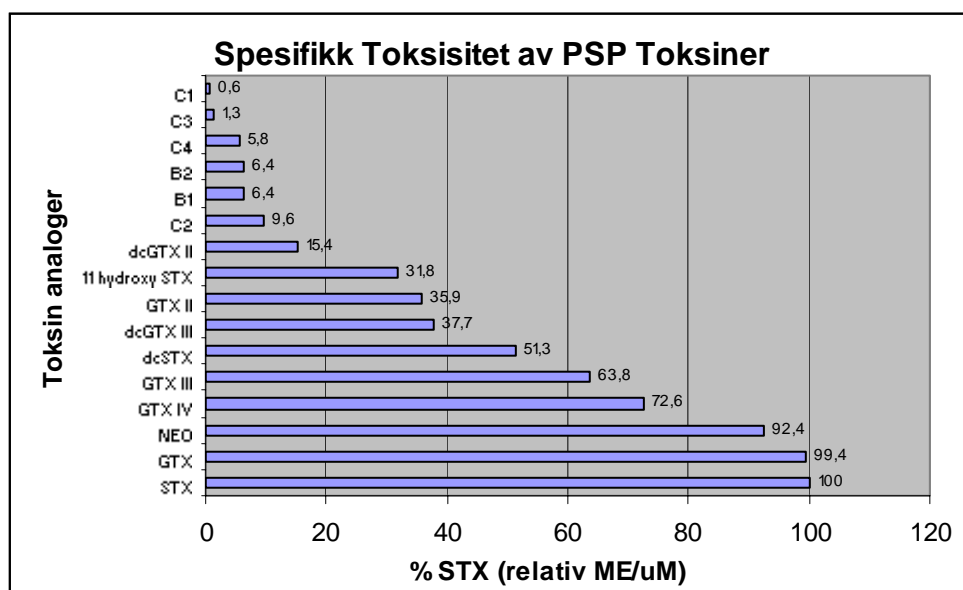
De fleste forbindelsene i Tabell 3.2, dekarbamoyl toksiner har nå nylig blitt klarlagt. Strukturenes navngiving (dekarbamoyl) er basert på erstatning av karbamat gruppen (OCONH₂) med en hydroxyl gruppe (OH). Toksisiteten av dekarbamoyl toksinene er omtrent halvparten av toksisiteten av saxitoksin.

Tabell 3.3. Oversikt over hvordan sidegrupper kan variere og danne grunnlag for sulfokarbamoyl toksiner i PSP komplekset.

Sulfokarbamoyl toksiner	R₁	R₂	R₃	R₄
B1	-H	-H	-H	-OCONHOSO ₃ ⁻
C1	-H	-H	-OSO ₃ ⁻	-OCONHOSO ₃ ⁻
C2	-H	-OSO ₃ ⁻	-H	-OCONHOSO ₃ ⁻
B2	-OH	-H	-H	-OCONHOSO ₃ ⁻
C3	-OH	-H	-OSO ₃ ⁻	-OCONHOSO ₃ ⁻
C4	-OH	-OSO ₃ ⁻	-H	OCONHOSO ₃ ⁻

Selv om sulfamat toksinene er toksiske er de likevel de med lavest toksisitet av PSP forbindelsene, som et eksempel kan forbindelser i denne gruppen inneholde omtrent 1/10 av toksisiteten av saxitoksin.

Oversikt over toksisiteten av de ulike forbindelsene i PSP komplekset er en nødvendig bakgrunnskunnskap for å forstå hvordan MIST AlertTM for PSP i praksis kan fungere, gitt i Figur 3.2. Giftmekanismen for PSP er som tidligere nevnt en blokkering av impulsoverføringen mellom nerver og muskler, PSP toksinene binder seg til natriumkanalene og blokkerer signaloverføringen mellom celler. Natriumkanaler finnes i membranene til alle celler, men finnes i størst antall i membranene hos nervecellene, en blokkering av disse fører til paralys (lammelse) ved at det blir stans i overføring av nerveimpulser til muskulaturen. Det er dette som ved høye doser kan gi respirasjonssvikt. Toksisiteten av de ulike PSP forbindelsene blir målt i % binding til natriumkanalene og varierer mellom 0,6% binding for C1 til 100% binding for STX (Figur 3.2).

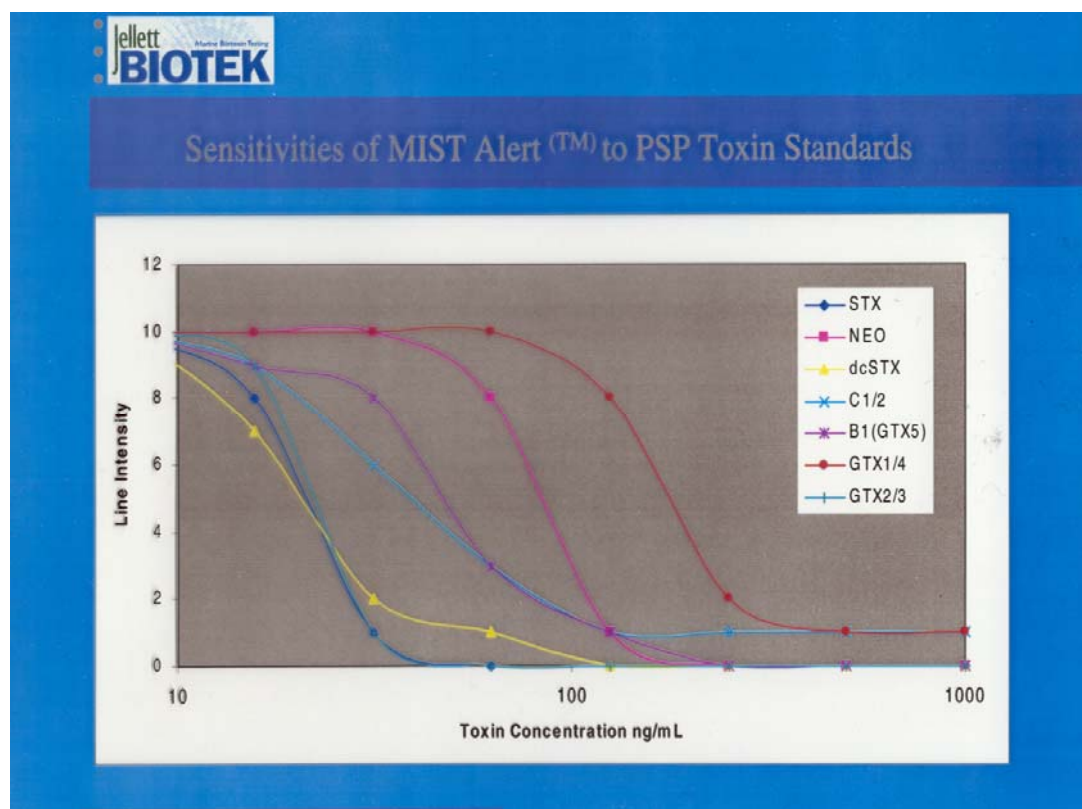


Figur 3.2 Spesifikk toksisitet av PSP toksiner relativt til Saxitoksin (Figur Jellett Ltd.).

Problemer ved bruk av kjemiske analysemetoder og hurtigtester har basis i at det ikke finnes standarder for samtlige av giftforbindelsene, samtidig finnes antistoff for enda færre av disse forbindelsene. Per i dag er det laget antistoff som dekker 11 av toksinforbindelsene i PSP komplekset og disse er inkludert i MIST Alert™ for PSP. Testkitet er basert på en antistoff-antigen bindingsreaksjon og fungerer som en ”omvendt graviditetstest”. I korte trekk vil det være slik at når en blanding av både buffer og skjellekstrakt blir applisert på testplaten, vil antistoff og fargede partikler føres over membranen på testplaten. Hvis det ikke er fritt toksin tilstede i prøven vil antistoffer og fargestoff bindes til tilhørende toksinreseptor på teststreken og gi fargeutslag. Hvis det derimot skulle være toksin tilstede i prøven vil disse konkurrere om bindingssetet og blokkere bindingssetet for fargestoffet slik at det ikke klarer å binde seg til den tilhørende reseptoren på testlinjen. Dermed vil fargestoffet bli ført over testplaten og ut sammen med bufferen. Hvis toksinkonsentrasjonen er høy nok vil derfor ikke testlinjen være synlig på testplaten. Kontroll-linjen skal alltid være tilstede, det vil ikke være noen konkurranse med fritt toksin på kontroll-linjen forutsatt at antistoff og fargestoff har gått i binding og blitt ført fremover på testplaten. Hvis kontroll-linjen ikke skulle tre frem i en test, indikerer dette feil ved testen som kan skyldes interferens med salt eller uriktig pH i syreekstraktet.

Reduksjon i fargeintensitet av teststreken indikerer tilstedeværelse av PSP toksiner i prøven. Konsentrasjonen hvor dette skjer er forskjellig for hver av forbindelsene i PSP komplekset (Figur 3.3). Dette på grunn av at bindingsaffiniteten av de ulike forbindelsene i PSP komplekset til de tilhørende antistoffene er forskjellig slik at f.eks STX, dc-STX, GTX_{2/3} blir detektert ved lavere konsentrasjoner enn NEO og GTX_{1/4}. Figur 3.3 viser ved hvilke konsentrasjonene fargeintensiteten på teststreken blir redusert for hver av toksinforbindelsene som testen detekterer. I denne testen

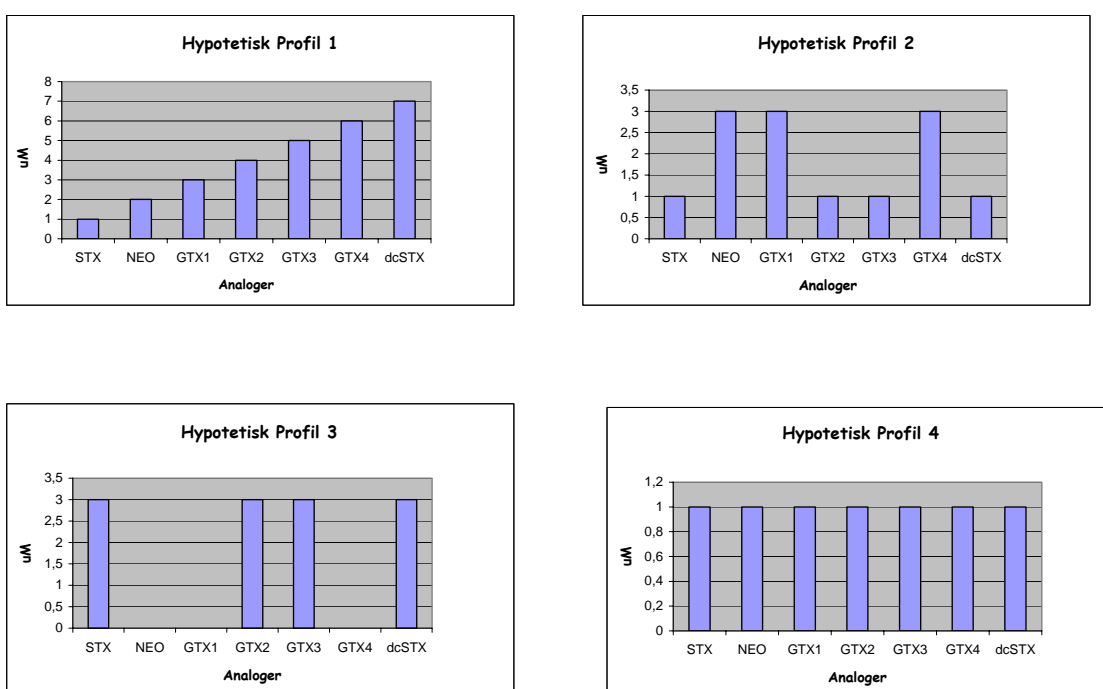
detekteres derfor selve toksinene og ikke toksisiteten av forbindelsene. Testen vil, etter opplysninger fra Jellett, av denne grunn detektere C-toksinene med samme effektivitet som GTX-toksinene (men ved ulike konsentrasjoner) selv om C-toksinene er de med lavest toksisitet i PSP familien.



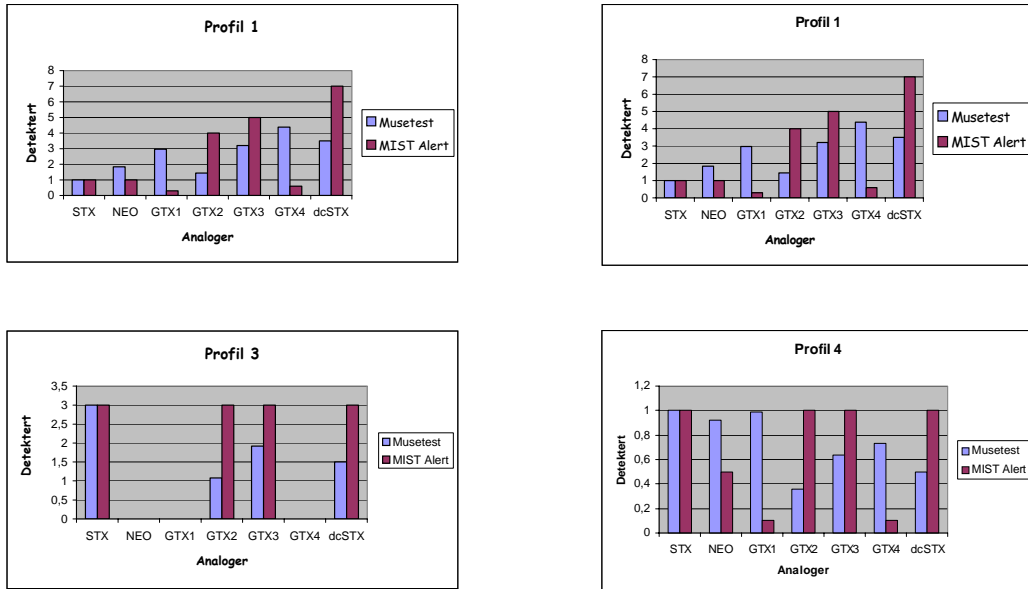
Figur 3.3 Sensitivitet i Mist AlertTM for PSP toksin standarder ved ulike konsentrasjoner (ng/ml). Reduksjon i fargeintensitet av testlinjen ved ulike toksin konsentrasjoner for PSP standarder kjørt enkeltvis på MIST AlertTM. (Fra Laycock et al.).

Kompleksiteten i denne testen og giftforbindelsene som hører til PSP familien skaper vansker i både tillaging og bruk av slike tester. På grunn av ulikheter i bindingsaffinitet i antistoffblandingen til de individuelle analogene vil det ikke være mulig å lage en helt definert og eksakt deteksjonsgrense for den blanding av toksin som finnes i skjellvev. Hvis en hadde hatt en prøve med rene STX analoger ville deteksjonsgrensen være 30ug 100g skjellvev og hvis en hadde hatt bare NEO toksin i prøven ville denne bli detektert ved 60ug STX ekv /100 g skjellvev. I denne testen opereres det derfor med deteksjonsområder på mellom 30-60ug STX ekv /100 g skjellvev avhengig av sammensetningen av de ulike PSP forbindelsene i prøven. Deteksjonsområdet for testen er satt lavere enn de fleste lands grenseverdier for PSP i skjell som omsettes på markedet.

For å komplisere bildet ytterligere vil antagelig mange av forbindelsene i sur løsning omdannes til de mer giftige analogene, dette skjer naturlig i magesekken samt også ved syreekstraksjon (Jellett, 1993). Det er også vist at toksinprofiler kan variere mellom ulike geografiske områder, men hvor store variasjoner en kan ha er lite er kartlagt (Hestdal *et al.*, 2001). I tillegg er lite kjent hvor mye toksinprofiler kan variere gjennom en oppblomstring, samt eventuelle årstidsvariasjoner av PSP profilene. Figur 3.4 illustrerer eksempelvis hvordan PSP profilene kan tenkes å variere (dette er ikke reelle PSP profiler). Mens figur 3.5 viser hvordan de samme teoretiske profilene kunne detekteres av en musetest og av hurtigtesten MIST AlertTM.



Figur 3.4. Teoretiske PSP skjellgift profiler, eksempler på hvordan sammensetningen av analogene kan tenkes å variere.



Figur 3.5. Oversikt over hvordan teoretiske PSP gift profiler fra Figur 3.4 kan detekteres ved musetesten og MIST AlertTM. Det er tatt høyde for den spesifikke toksisiteten av analogene.

4 Resultater av utprøvingen

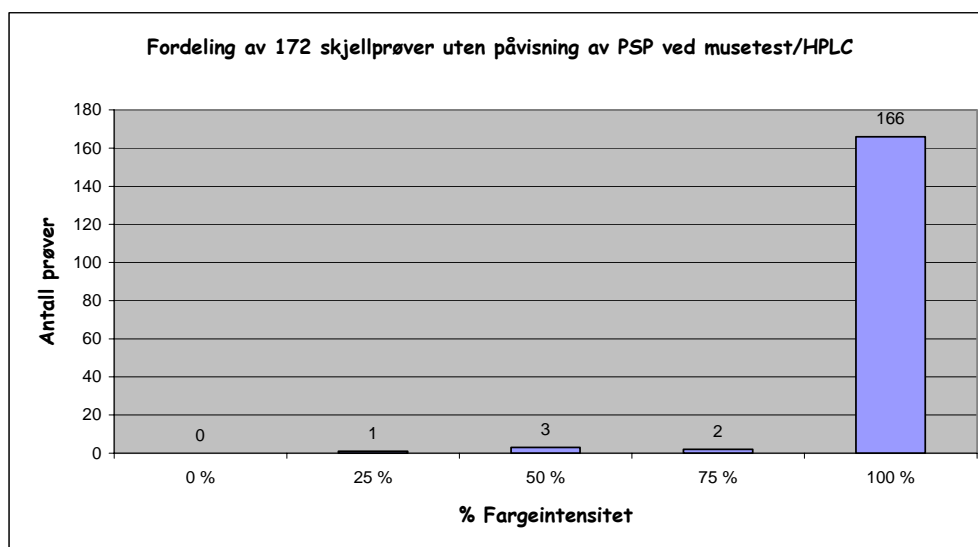
Skjellprøver ble innsendt etter ordinære rutiner fra skjelloppdrettere eller kontrollstasjoner til lokale næringsmiddellaboratorier eller veterinærtjenester hvor prøvene gjennomgikk syreekstraksjon for PSP testing etter AOAC standard ekstraksjons metode. Ekstrakt ble så sendt til Norges veterinærhøyskole eller RIT (nå St Olavs Hospital) for musetesting eller HPLC analyse. Norges veterinærhøyskole har i tillegg tatt vare på positive PSP skjellprøver fra de seneste årene som ble testet i dette prosjektet. Dette ble utført fordi det gjennom året erfaringsvis blir funnet få positive skjellprøver for PSP i løpet av testsesongen.

Totalt ble 241 skjellprøver analysert for PSP innhold ved hjelp av musetest eller HPLC og sammenlignet med MIST Alert™ i dette prosjektet. Dette inkluderte prøver fra regulær innsending av skjellprøver i perioden fra september 2000 til desember 2001, samt lagrede positive skjellekstrakt. Det poengteres at alle skjellprøvene i dette prosjektet er behandlet sammen og gir derfor ikke et reelt bilde på årlige forekomster av PSP i skjellprøver i Norge. For et helhetlig giftbilde for norske farvann henvises det til overvåkningsprogrammet for algetoksiner 1998 (ISSN 0802-1627).

I resultatbearbeidingen ble prøvematerialet inndelt i fire grupper:

- skjellprøver uten påviselig innhold av PSP
- skjellprøver inneholdende spor av PSP
- skjellprøver inneholdende PSP toksiner i området 160-259 ME /100 g skjellvev
- skjellprøver inneholdende PSP toksiner over 300 ME /100 g skjellvev

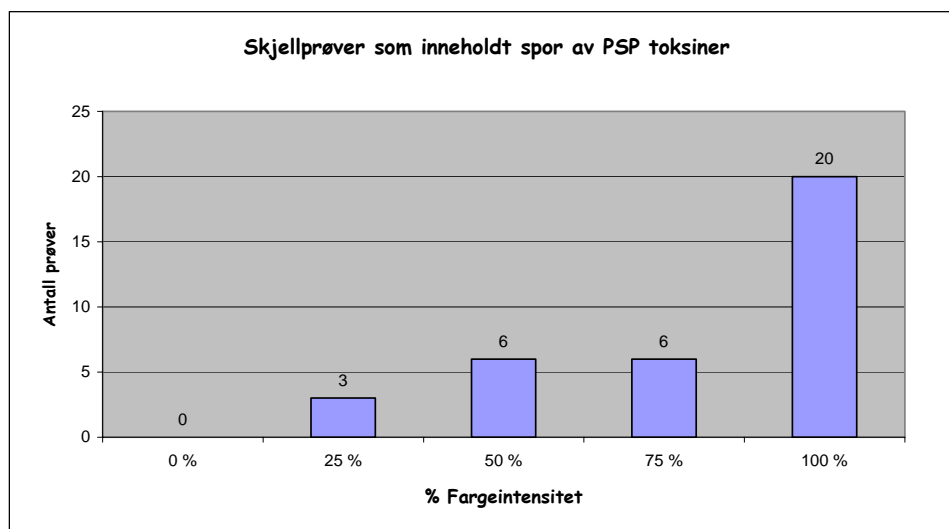
I alt hadde 172 av de testede skjellekstraktene ikke påviselig innhold av PSP toksiner, vist ved musetest eller HPLC analyser. Blant denne gruppen skjellekstrakter viste hurtigtesten MIST Alert™ for påvisning av PSP brukbart samsvar med musetest- og HPLC resultater. Ved bruk av hurtigtesten på de samme skjellekstraktene, viste 168 av prøvene (97,7%) samsvarende resultat som ved musetest eller HPLC, og ble bedømt til å være negative PSP prøver (vist i Figur 4.1). Det var 4 av skjellekstraktene i denne gruppen (2,3%) som ble vurdert til å være positive for PSP toksiner ved bruk av hurtigtesten. En av disse prøvene som testet positivt for PSP var forøvrig ekstrahert fra kamskjell.



Figur 4.1. Resultatene av utprøving av hurtigtesten MIST AlertTM på skjellprøver uten påviselig innhold av PSP toksiner. En fargeintensitet i testen på 0-25 og 50% indikerer positive PSP prøver, bedømt med hurtigtesten. 75 og 100% fargeintensitet gir negative prøver (prøver uten påvist PSP).

Den andre gruppen skjellprøver hadde et innhold av PSP toksiner som var under deteksjonsnivået for musetest. Under dette nivået gir musetesten usikre resultater og det er vanskelig å angi nøyaktig verdi av PSP toksiner ved musetest, slike prøver er angitt å ha spor av PSP toksiner. Av skjellprøver som ble testet i prosjektet inneholdt 35 av prøvene spor av PSP toksiner påvist ved testing på mus. De nedre deteksjonsgrensene ved musetest ligger i området 150-200 ME /100 g skjellvev. Skjellprøver som inneholdt spor av PSP toksiner ble i første omgang testet med buffer nr 1 (Buffer nr:2001-062600).

Figur 4.2 viser resultater for testing av prøver som inneholdt spor av PSP toksiner på hurtigtesten. Hele 26 prøver inneholdende spor av PSP gav negativt utslag ved bruk av hurtigtesten (74,3%), disse gav 75 og 100% fargeintensitet på teststreken. Blant prøver med spor av PSP toksiner var det også 9 prøver (25,7% prøver) som ble bedømt til å være positive ved bruk av hurtigtesten. Tre av disse ble bedømt som klare positive prøver og viste ned til 25% fargeintensitet på testlinjen.

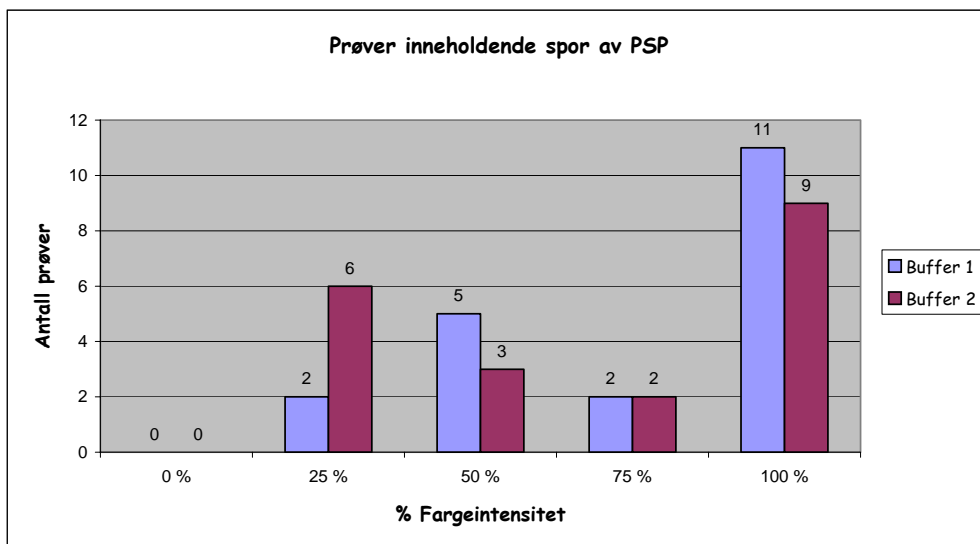


Figur 4.2 Resultater fra testing av skjellprøver som inneholdt spor av PSP toksiner ved bruk av hurtigtesten Mist Alert TM. Figuren viser bedømming i % fargeintensitet av testlinjen; 0, 25 og 50 % fargeintensitet gir positivt testresultat for PSP toksiner, mens 75 og 100% fargeintensitet gir negativt testresultat for PSP toksiner.

Av dette prøvematerialet ble 20 prøver testet på nytt med buffer nr 2 (buffer nr: 40004-041101). Resultater fra denne utprøvingen er vist i Figur 4.3.

Bruk av buffer nr 2 gav ikke bedre samsvar i resultatene for skjellprøver som inneholdt spor av PSP toksiner. Flere prøver ble bedømt som til å være positive ved bruk av buffer nr 2 enn ved bruk av buffer nr 1 (Figur 4.3). To av disse prøvene som med buffer 1 (buffer nr:2001-062600) ble bedømt som negative PSP prøver skiftet til positiv for PSP ved bruk av buffer 2, samtidig resulterte buffer 2 i at 7 av de andre prøvene ble bedømt til en til to nivå strengere.

Samsvarende resultater mellom musetest og MIST Alert™ for prøver som inneholdt spor av PSP var bedre ved bruk av buffer nr 1 hvor 74,3 % av prøvene ble bedømt riktig som negative prøver mot 68,6 % ved bruk av buffer nr 2.



Figur 4.3. Prøver som inneholdt spor av PSP testet med to ulike buffere under utføring av hurtigtesten. Figuren viser bedømming i % fargeintensitet av testlinjen; 0, 25 og 50 % fargeintensitet gir positivt testresultat for PSP toksiner, mens 75 og 100% fargeintensitet gir negativt testresultat for PSP toksiner.

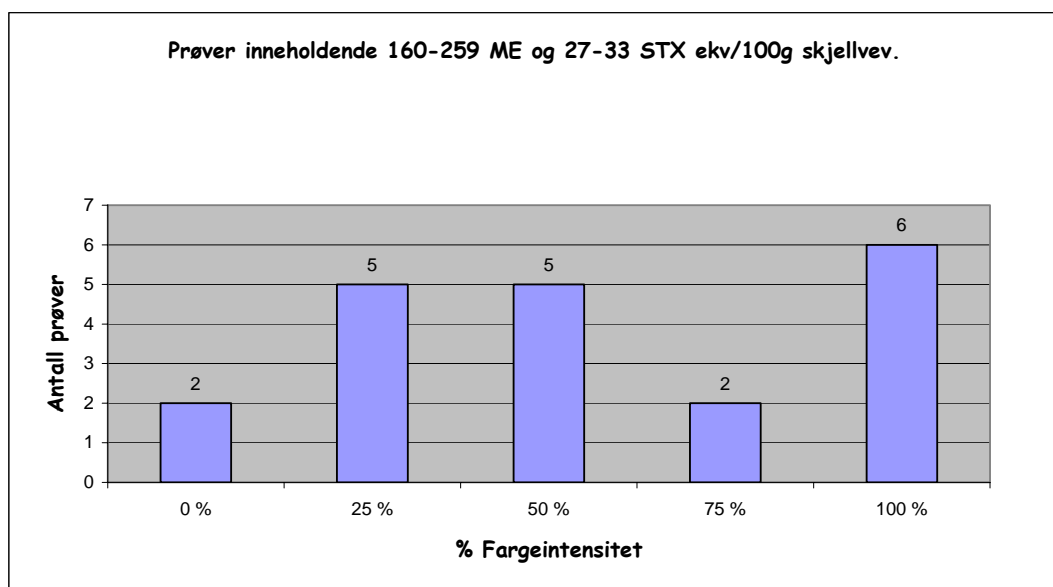
De prøvene som inneholder lave nivåer av PSP toksiner under grenseverdien er vanskelige å få nøyaktig bedømming av ved bruk av denne typen test. Det kan likevel være akseptabelt at hurtigtesten ved enkelte tilfeller gir positiv bedømming av skjellprøver som ved musetest viser spor av PSP toksiner. Da vil testresultatet likevel ligge på den sikre siden ved at bedømmelsen er strengere enn det en får ved musetest.

I og med at det er lagt på antistoffer på testen som matcher både de mindre giftige og de mer giftige analogene, vil skjellenes eventuelle variasjoner i giftprofil kunne spille inn og gi positivt utslag på testen der hvor det ikke gir tilsvarende utslag ved musetest. Det er per i dag ikke mulig å lage en hurtigtest basert på dette prinsippet som viser et klart enten-eller resultat (positivt eller negativt) etter en bestemt grenseverdi. Problemene bunner i at det er så mange ulike toksinforbindelser som er involvert i PSP komplekset. Samtidig kan det forekomme variasjoner i sammensetningen og toksisiteten av disse forbindelsene, dette tatt i betraktning gir det seg selv at hurtigtesten ikke fungerer som en ren kvantitativ test.

I den tredje gruppen skjellprøver ble det funnet størst variasjon i resultatene av denne utprøvingen. Skjellprøver som inneholdt et nivå av PSP på mellom 160-259 ME /100 g skjellvev og 27-33 STX ekv /100 g skjellvev inngikk i denne gruppen. Det ble valgt å inkludere skjellprøver som inneholdt 27-33 STX ekv /100 g skjellvev analysert ved HPLC i denne gruppen skjellprøver, selv om musetestresultater kunne gi noe lavere resultater ved musetest enn 160 ME /100 g skjellvev. Usikkerhet i musetestresultater i dette lave nivået av PSP toksiner var den bakenforliggende årsak til dette valget. Disse prøvene ligger under grenseverdien for omsetting av skjell i Norge som er 400 ME /100 g skjellvev og tilsvarer 80µg STX ekv /100g skjellvev.

Av prøvematerialet som inngikk i prosjektet var det 20 prøver som falt innenfor denne tredje gruppen, og som da hadde et innhold av PSP toksiner i området 160-259 ME /100 g skjellvev og 27-33µg STX ekv /100g skjellvev.

Blant disse 20 prøvene var det så vidt overvekt av prøver som testet positivt for PSP ved bruk av hurtigtesten. I alt 12 prøver gav positivt utslag ved bruk av hurtigtesten mens 8 viste negativt resultat, vist i Figur 4.4.

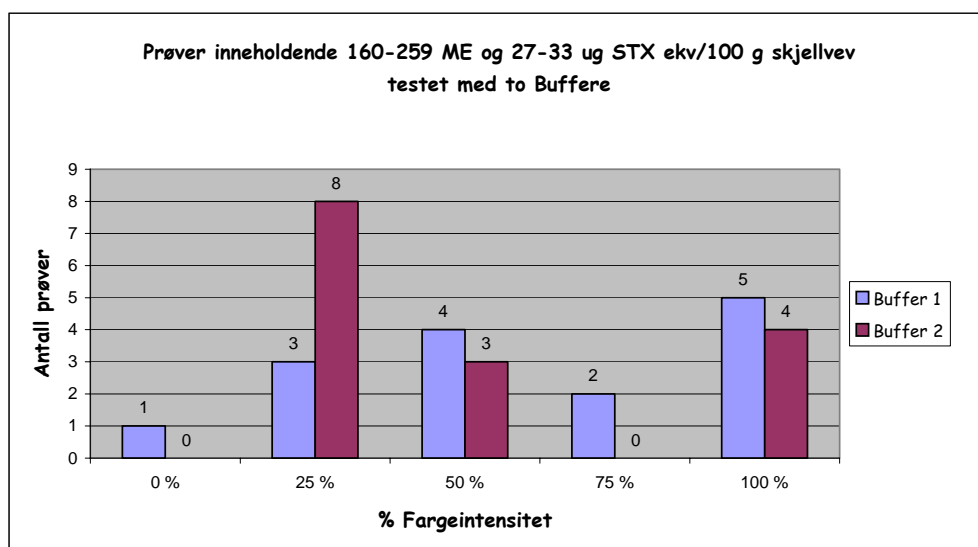


Figur 4.4. Syreekstrakt fra skjellprøver ble testet med hurtigtesten MIST Alert™ for PSP toksiner. Innholdet av PSP toksiner i skjellprøvene var mellom 160-259 ME /100 g skjellvev og 27-33 µg Saxitoksin ekvivalenter /100g skjellvev. Figuren viser bedømming i % fargeintensitet av testlinjen; 0, 25 og 50 % fargeintensitet gir positivt testresultat for PSP toksiner, mens 75 og 100% fargeintensitet gir negativt testresultat for PSP toksiner.

Genseverdien som Statens næringsmiddeltilsyn bruker for PSP toksiner i skjell ligger innen dette området. Det hadde av denne grunn vært ønskelig om prøver her hadde gitt en noe mer entydig bedømmelse (enten positivt eller negativt), det ble derfor også her testet med to typer buffere på 15 prøver fra denne gruppen av skjellekstrakt.

Resultatene fra testingen er vist i Figur 4.5 og viser en liten forbedring ved bruk av buffer 2 (buffer nr: 40004-041101) i forhold til buffer 1 (buffer nr:2001-062600). Det var tre prøver som med buffer 1 viste negativt resultat for PSP, mens de samme prøvene ved bruk av buffer 2 fikk en klart svakere fargeintensitet på teststreken. Intensiteten av teststreken var for disse prøvene to nivå svakere. Dette betyr at en prøve som med buffer 1 viste 100% fargeintensitet ble med buffer 2 bedømt til å ha 50% fargeintensitet, mens de to prøvene som hadde 75% (v/buffer 1) ble bedømt til å ha en fargeintensitet på 25% med buffer 2 og dermed klart positiv for PSP toksiner.

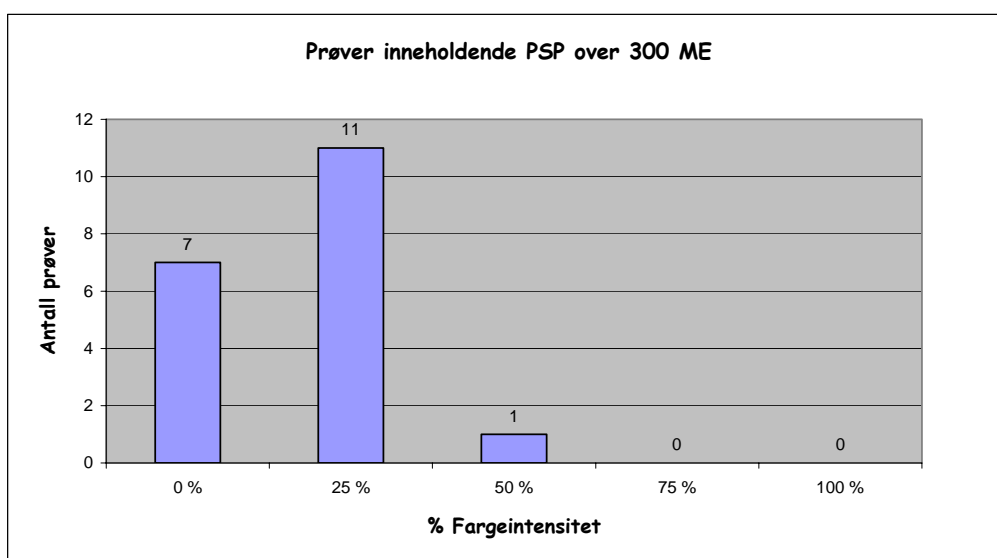
Men fortsatt ble 4 av disse 15 prøvene bedømt til å være negative ved bruk av buffer 2, og hadde fortsatt 100% fargeintensitet i teststreken. Av disse fire prøvene var tre av prøvene analysert med musetest og en på kjemisk analyse, og hadde et innhold av PSP på 160, 185, 200 ME /100 g skjellvev samt 31 µg STX ekvivalenter /100 g skjellvev. Av disse fire skjellprøvene ble så de tre prøvene hvor en bare har resultater fra musetesten også analysert på HPLC ved Norges veterinærhøgskole. Resultatene av disse HPLC resultatene viste et innhold på hhv 10, 26.2 og 14.8 µg STX ekv /100g skjellvev. Resultater funnet med hurtigtesten var forøvrig mer i samsvar med HPLC resultatene for to av disse prøvene (10 og 14,8 µg STX /100g skjellvev), enn med resultater fra musetest for de samme prøvene.



Figur 4.5. Sammenligning av resultater ved bruk av to ulike buffere i uttesting av skjellekstrakt inneholdende 160-259 ME og 27-33 saxitoksin ekvivalenter /100 g skjellvev. Figuren viser bedømming i % fargeintensitet av testlinjen; 0, 25 og 50 % fargeintensitet gir positivt testresultat for PSP toksiner, mens 75 og 100% fargeintensitet gir negativt testresultat for PSP toksiner.

I den siste gruppen skjellekstrakt var nivået av PSP toksiner over 300 ME /100 g skjellvev. I alt var det 19 slike prøver som inngikk i prosjektet, og samtlige av disse prøvene ble bedømt som positive PSP prøver ved bruk av hurtigtesten MIST Alert™. Dette var stort sett prøver som Norges veterinærhøgskole hadde lagret og gjenspeiler ikke forekomster av PSP i en normalsesong i Norge.

Det var totalt 7 prøver som ikke fikk utviklet testlinje (0% fargeintensitet) mens 11 så vidt hadde synlig farge (25% fargeintensitet). Bare en av prøvene hadde 50% fargeintensitet i testlinjen. Denne prøven hadde et innhold av PSP toksiner på 303 ME /100 g skjellvev. Samtlige prøver i denne gruppen (303 ME-4970 ME) testet altså positivt for PSP ved bruk av hurtigtesten.

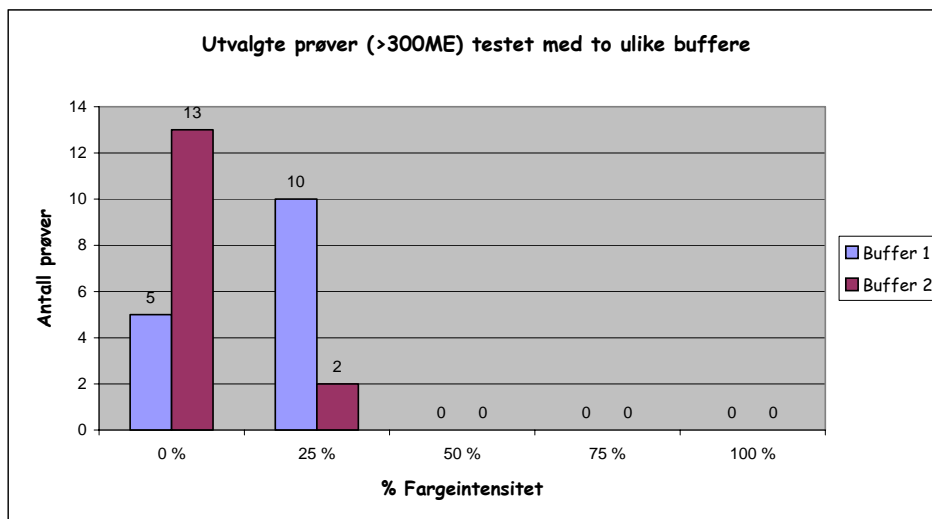


Figur 6. Uttesting med hurtigtest MIST Alert™ på skjellekstrakt som inneholdt over 300 ME /100 g skjellvev. Figuren viser bedømming i % fargeintensitet av testlinjen; 0, 25 og 50 % fargeintensitet gir positivt testresultat for PSP toksiner, mens 75 og 100% fargeintensitet gir negativt testresultat for PSP toksiner.

Totalt 15 av disse syreekstraktene som inneholdt over 300 ME ble også testet buffer 2, resultatene fra disse forsøkene er vist i Figur 4.7. Resultatene fra utprøving av hurtigtest samt oversikt over musetest- resultater for samme prøver er også vist i Tabell 4.1.

Figur 4.7 viser at bruk av buffer 1 resulterte i at 5 prøver ikke fikk utviklet testlinje på hurtigtestplaten mens 10 så vidt hadde synlig linje (25% fargeintensitet). Bruk av buffer 2 på de samme skjellprøvene resulterte i at flere av prøvene ikke fikk utviklet testlinje og bare to prøver hadde fortsatt svakt synlig testlinje (25% fargeintensitet).

Disse to prøvene hadde et innhold av PSP toksiner på 310 og 311 ME /100 g skjellvev. Samtlige av disse prøvene ble bedømt til å være positive for PSP og det ble vist et klarere positivt testresultat for innhold av PSP ved bruk av buffer 2 i forhold til bruk av buffer 1.



Figur 4.7. Sammenligning av resultater ved bruk av to ulike buffere i uttesting av skjellekstrakt som inneholdt PSP i nivåer over 300 ME. Figuren viser bedømming i % fargeintensitet av testlinjen; 0, 25 og 50 % fargeintensitet gir positivt testresultat for PSP toksiner, mens 75 og 100% fargeintensitet gir negativt testresultat for PSP toksiner.

I denne gruppen skjellprøver hadde 7 av prøvene et PSP nivå under 400 ME / 100g skjellvev mens 12 var over denne grenseverdien (Tabell 4.1).

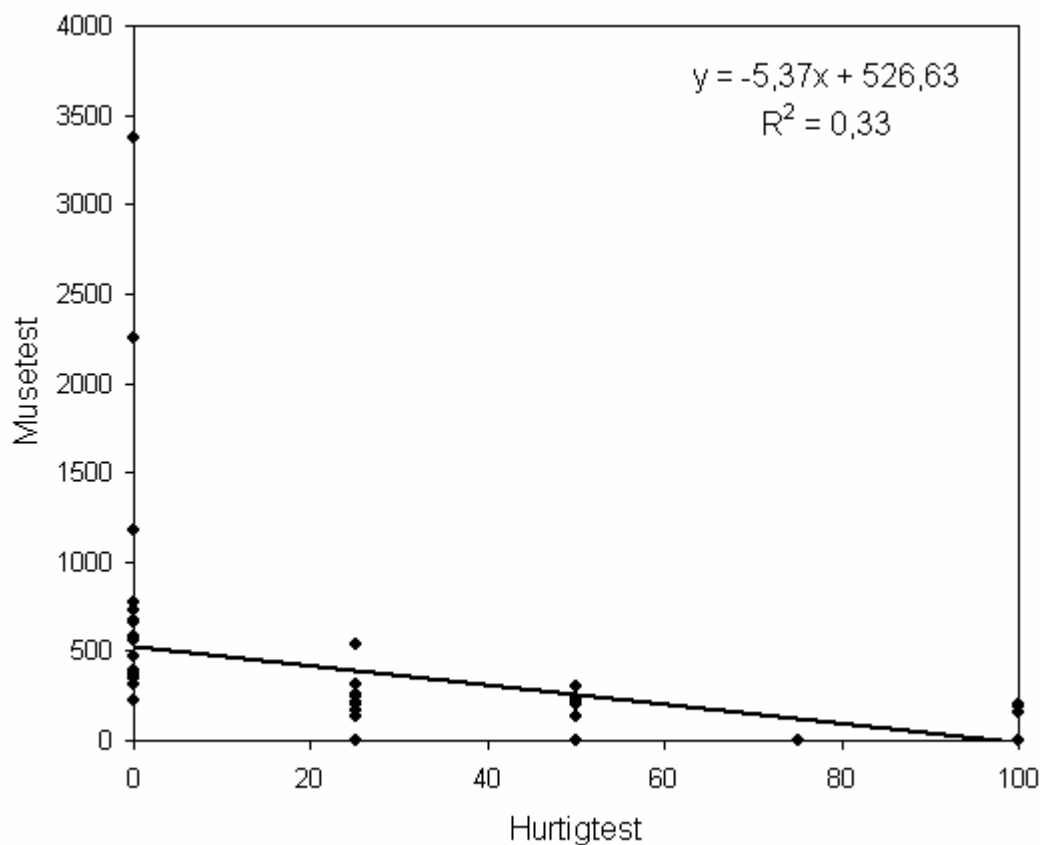
Tabell 4.1. Fargeintensitet i testlinjen ved bruk av to ulike buffere i testing av skjellekstrakt som inneholdt PSP i nivåer over 300 ME /100 g skjellvev. Tabellen viser museresultater for de individuelle prøvene. Prøvematerialet stammer fra lagrede prøver fra Norges veterinærhøgskole og fra år 2000 og gjenspeiler ikke forekomster av PSP i en normalsesong i Norge.

Prøve nr	1	2	3	4	5	6	7
Buffer 1	0	25	25	25	25	50	0
Buffer 2	0	0	25	25	0		0
ME/100g	316	394	310	311	343	303	373

Prøve nr	8	9	10	11	12	13	14
Buffer 1	25	0	25	25	0	25	0
Buffer 2	0	0		0	0		0
ME/100g	723	586	533	3373	2256	4970	1172

Prøve nr	15	16	17	18	19
Buffer 1	25	25	25	0	0
Buffer 2	0	0	0	0	0
ME/100g	662	773	675	476	560

Resultatene i uttestingen av hurtigtesten ble testet statistisk mot musetestresultater fra samme prøvemateriale. Det ble utført en one way anova Kruskal-Wallis rank sum test, med lineær kurve tilpasning. ($Y = -5,37X + 526,63$; $r^2 = 0,33$). Dette betyr at 33 % av alle data kan beskrives med denne lineære ligningen (Figur 4.8). Forholdsvist mange skjellprøver med 0 verdi for PSP ved musetest ligger i punkter ved 75 og 100% fargeintensitet som fører til dreining av kurven og stor vektlegging av disse verdier i kurvetilpasningen.



Figur 4.8. Resultater fra one way anova Kruskal-Wallis rank sum test, med lineær kurve tilpasning.

5 Vurdering

I Norge er det relativt få skjellprøver i løpet av året som har et innhold av PSP som overskrider grenseverdiene satt av Fiskeridirektoratet for omsetting av skjell. En relativt liten del av kysten vår blir regelmessig undersøkt gjennom overvåkningsprogrammet eller gjennom rutinemessige innsending av skjellprøver fra skjelloppdrettere, men dette bidrar til at verdifull erfaringsdata samles inn for hvert år. Etter hvert som stadig større del av kyststripen tas i bruk til skjell dyrking får en også større mulighet til å skaffe seg en mer fullstendig oversikt over forekomstene av giftalger langs kysten vår. Selv om forekomstene av PSP i analyserte skjell på årsbasis er lav, er det nødvendig å rutinemessig kontrollere skjell før de slippes på markedet fordi PSP er en av de farligste algegiftene, og kan ha alvorlige konsekvenser hvis de konsumeres.

Musetesting av skjellekstrakt er en sikker analysemetode for PSP som fanger opp samtlige av de toksiske analogene samt eventuelle synergiske effekter. Det har nå også blitt større aksept for kjemiske analyser for påvisning av PSP. I den forbindelse har det blitt etablert en HPLC metode for detektering av PSP ved Norges Veterinærhøgskole. Et fellestrekk ved både musetest og HPLC er at skjellprøver som sendes inn krever noen dager med både transport, ekstraksjon og analyse før resultatet foreligger. En er i Norge i ferd med å oppjustere regelverket for skjelltesting. Fremover vil skjelloppdrettere i områder med hyppig forekomst av problemalger teste de høstbare skjellene hyppigere enn det som har vært vanlig praksis frem til nå. I tillegg vil det pålegges hyppigere algeprøvetellinger. Dette blir innført for å ivareta sikkerheten, da store endringer i algebildet kan forkomme med fare for plutselige oppblomstringer mellom to innsendinger av skjellprøver.

En hurtigtest som skjelloppdretteren selv kan utføre i perioden mellom to prøveinnsendinger som et tillegg til de biologiske/kjemiske analysene vil kunne gi en ekstra sikkerhet mot eventuelle endringer i algebildet, som kan skape giftige skjell i perioden mellom to prøveinnsendinger. Et slikt bruksområde fordrer at testen er enkel å utføre og at den er tilfredsstillende sikker i påvisning av algegifter. I utprøvingen ble det funnet at det kunne være vanskelig for den som utfører testen å avgjøre fargenivåene på hurtigtesten i områder 50-75% fargeintensitet av kontroll linjen, som også er satt som grense mellom hhv positive og negative skjellprøver. Hvis en står med bare en prøve vil dette problemet være større enn om en har flere prøver som kan sammenlignes. I prosjektet ble det laget standard testsett med ulike fargegradienter som kunne brukes for sammenligning, men fargeintensiteten av disse ble tapt over tid. Tillaging av fargestabile prøvekit for sammenligning vil kunne være en stor fordel for de som skal utføre testene og vil kunne redusere dette problemet.

Resultatene fra denne utprøvingen av skjellprøver ved bruk av hurtigtesten MIST AlertTM viser lovende resultater. Det ser ut som om hurtigtesten MIST AlertTM fungerer tilfredsstillende for påvisning av PSP i skjellprøver som inneholder nivå over 300 ME /100 g skjellvev. Det er også dette området det er spesielt ønskelig at testen viser klare resultater. Feilpåvisninger i dette giftområdet kan være fatalt og en ønsker

også en viss sikkerhetsmargin i påvisningene. Samtlige skjellprøver som inneholdt over 300 ME /100 g skjellvev viste positivt utslag på hurtigtesten.

Nå er det forholdsvis få skjellprøver med nivå av PSP over grenseverdien som i løpet av året kommer inn til laboratoriene for skjelltesting i Norge. Dette resulterte i at testgrunnlaget er noe begrenset. Få skjellprøver med nivåer over 300 ME /100 g skjellvev (19 prøver) gjør at testgrunnlaget kan være noe lite for å gi en anbefaling i bruken av hurtigtester for sikker deteksjon. Ved PSP nivåer i området mellom 200-400 ME /100 g skjellvev er Fiskeridirektoratet også restriktive med å gi høstetillatelse selv om grenseverdien for omsetting av skjell ligger noe høyere (400 ME /100 g skjellvev). En høstetillatelse kan da gis på bakgrunn av vurdering av algeprøver fra de omgivende vannmassene.

Bruk av buffer 2 (serie 40004-041101) på skjellprøver fra denne gruppen gav et klarere positivt utslag på hurtigtesten, noe som gir en større sikkerhetsmargin. Det vil være nyttig og ønskelig at Norges Veterinærhøgskole samt St Olavs Hospital fortsetter å ta vare på fremtidige positive skjellprøver for en mulig verifisering av denne typen tester.

De prøvene som skapte størst problemer i forhold til et samsvarende resultat mellom musetest/HPLC og hurtigtesten var skjellprøver som inneholdt små mengder PSP. Det ble funnet store variasjoner i deteksjon av PSP i skjellprøver som inneholdt spor av PSP samt lave nivåer av PSP (160-259 ME). Skjell med PSP på dette nivået vil kunne være godkjent for omsetting på markedet, gitt lave *A. tamarense* forekomster i vannmassene rundt lokaliteten. SNT sin grenseverdi for kostholds råd for PSP toksiner i skjell (150-200 ME /100 g skjellvev) ligger innen dette området. De varierende resultatene nettopp i dette området hvor SNT har sine grenseverdier tyder på at hurtigtesten ikke vil kunne erstatte etablerte metoder som per i dag benyttes i deres overvåkningsprogram.

Bruk av buffer nr 2 på denne gruppen av skjellprøver gav et noe høyere innslag av positive prøver på skjellprøver som lå under grenseverdien satt av Fiskeridirektoratet.

På grunn av ulikheter i bindingsaffinitet i antistoffblandingen til de individuelle analogene vil det ikke være mulig å lage en helt definert og eksakt deteksjonsgrense i hurtigtesten for den blanding av toksin som finnes i skjellvev. Hvis en hadde hatt en prøve med ren saxitoksin ville deteksjonsgrensen være 30ug /100g skjellvev og hvis en hadde hatt bare neosaxitoksin i prøven ville denne bli detektert ved 60ug STX ekv /100 g skjellvev. I hurtigtesten opereres det derfor med et deteksjonsområde mellom 30-60ug STX ekv /100 g skjellvev avhengig av sammenstningen av de ulike PSP forbindelsene i prøven. Disse forholdene er sannsynligvis den overordnede grunnen til de varierende resultatene nettopp i dette konsentrasjonsområdet.

Den variasjonen som ble funnet i prøvematerialet som inneholdt PSP toksiner mellom 160-259 ME /100 g skjellvev, kan skyldes variasjoner innen toksinprofilene i skjell. Det er kjent at PSP profilene kan variere mellom geografiske områder, men i hvor stor grad giftprofilene varierer utfra forhold som oppblomstrings perioder og næringstilgang i vannmassene er lite kjent. Nå er deteksjonsgrensen for PSP ved

musetest rundt 150-200 ME /100g skjellvev. På bakgrunn av dette er det ikke kritisk med feilpåvisninger i dette området, faren er heller at prøver blir bedømt for strengt med denne hurtigtesten i forhold til musetesten.

Foreløpig ser det ikke ut som om slike hurtigtester er gode nok til bruk i den offentlige kontrollen av skjell alene da det er muligheter for at giftprofilene for PSP kan variere. Fravær av de toksinene man kan påvise utelukker heller ikke at det ikke er andre toksiner tilstede i skjellprøven. Disse ville en musetest kunne fange opp. Denne hurtigtesten fanger kun opp PSP toksinene. Hvis en skulle basert en stor del av kontrollen på slike tester ville en måtte ha et betydelig antall slike tester for å dekke alle toksinene som opptrer. Dette ville i sum bli kostbart selv om en hver test kan ha en lav pris. Alternativt kan en velge å bruke hurtigtester for de toksinene med de største konsekvensene.

Bruksområdet for slike hurtigtester vil begrense seg til eksempelvis selvkontroll mellom to innsendinger av skjellprøver til musetesting, testen vil kunne egne seg som en ekstra sikkerhetssjekk og vil kunne være et verdifullt supplement til de etablerte testmetodene. En vet at algebildet raskt kan endre seg på en lokalitet. Dette støtter en slik bruk av hurtigtesten.

Det er viktig å følge med utviklingen av alternative testmetoder videre. I dette arbeidet er det viktig å kunne fange opp, ha tilgang til, og å prøve ut nye metoder utviklet av andre som har kommet langt i utviklingen av alternative deteksjonsmetoder, enten de er av kjemisk eller av mer bioteknologiske karakter. Bare ved at vi selv har erfaringer fra utprøvinger kan vi si noe om hvordan disse fungerer under våre forhold og i våre farvann. Å drive utviklingsarbeid på dette feltet er kompetansekrevene og kostbart.

Hvis slike hurtigtester skulle brukes i Norge vil det anbefales at de som allerede i dag er premissleverandører når det gjelder overvåkning av skjell, som Norges veterinærhøgskole samt Statens næringsmiddeltilsyn og St Olavs Hospital, har stor innflytelse for hvordan de skal implementeres. En eventuell videre bruk bør skje under kontrollerte former. Det er viktig at brukere gjøres oppmerksomme også på farene som er forbundet ved bruken, slik at de avstår fra å ta unødig risiko. Slike tester vil ikke vil erstatte de etablerte metodene, men vil kunne komme som et supplement til andre testmetoder. Skjellnæringen er helt avhengig av å ha et godt organisert testapparat tilgjengelig slik at gifttestingen foregår hurtigst mulig i tillegg til å sikre at bare giftfrie skjell (under grenseverdien) når markedet.

Algetoksin gruppa ved Norges veterinærhøgskole har de siste årene fått betydelige ressurser fra Fiskeridirektoratet. Dette har resultat i etablering av alternative metoder (HPLC, LC-MS, PP2A) til de tradisjonelle musetestene. Bruken av forsøksdyr er allerede betydelig redusert, og utviklingen ventes å fortsette

Litteratur

Aune, T., Tangen, K., Eriksen, G.S. & Varran, G.T. (1993) Overvåkning av marine algegifter i blåskjell. Årsrapport 1992. SNT rapport (14). Statens næringsmiddeltilsyn. 17s.

Dahl, E., Aune, T., Tangen, K. (1999) Giftalger og algegifter i norske farvann, Kunnskapsgrunlaget mot år 2000. Manus til Miljø 1999- Havforskningsinstituttet.

Hestdal, M., Aune, T., Tangen, K. & Dahl, E. (2001) Overvåkningsprogrammet for algetoksiner 1998. SNT rapport (6) ISSN 0802-1627. 21s

Haamer, J., Andersson, P.O., Lange, S., Li, X.P. & Edebo, L. (1990a) Effects of transplantation and reimmersion of mussels *Mytilus edulis* Linneus, 1728, on their contents of okadaic acid. Journal of shellfishResearch. 9, **1**; 109-112.

Haamer, J., Andersson, P.O., Lindahl, O., Lange, S., Li, X.P. & Edebo, L. (1990b) Geographic and seasonal variation of okadaic acid content in farmed mussels *Mytilus edulis* Linneus, 1758, along the Swedish west coast. Journal of shellfish research 9, **1**; 103-108.

Jellett, J. F. (1993) Phytotoxins and shellfish aquaculture. *World Aquaculture*, 24 (4), s. 33-43.

Jellett, J.F., Marks, L.J., Stewart, J.E., Dorey, M.L., Watson-Wright, W., Lawrence, J.F. (1992) Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon*, 30 (10), 1143-1156.

Laycock, M.V., Jellett, J.F., Belland, E.R., Bishop, P.C., Theriault, B.L., Russell-Tattrie, A.L., Quilliam, M.A., Cembella, A.D. & Richards, R.C. MIST Alert TM: A rapid Assay for Paralytic Shellfish Poisoning toxins.

Shumway, S.E. (1990) A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society 21, **2**; 65-104.

Tangen, K (1997) Planktonalger som kan være skadelige for skjell dyrkning og fiskeoppdrett. 17pp.

VEDLEGG 1