

Ciguatoxin-like toxin in mackerel *Acanthocybium soladria* in Vietnam

Dao Viet Ha*, Phan Bao Vy

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*E-mail: daovietha69@gmail.com

Received: 30 July 2019; Accepted: 6 October 2019

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

Two processed mackerel products were sent to VAST keylab on “Food and Environmental Safety” in Institute of Oceanography for Ciguatoxin criteria as exported seafood requirement. The specimens were caught from offshore region of Vietnam South-Eastern sea in April 2019. By DNA sequencing of *COI* gene, both specimens were identified as *Acanthocybium solandri*, one of high commercial mackerel species which is well-known to be distributed in Central and South-Eastern sea of Vietnam. In mouse bioassay, both extracts from 2 samples exhibited acute toxicity, which killed tested mice within 6 and 15 hours after i.p. injection. In SIM LC/MS-MS analysis, the extracts showed the peak with retention time closed to that in CTX-1B standard in both cases of optimized and non-optimized solid phases. The result suggested that at least there was occurrence of CTX-like toxin in these mackerel specimens. The equivalent toxin levels were estimated as 0.51 ng/g and 0.84 ng/g; 5 and 8 times higher than regulation limit for CTXs in seafood product (0.1 ng CTX-1B/g). Further verification is in progress to confirm toxin in these mackerel samples in Vietnam. However, this data is the first alert on potential poisoning by consumption of mackerel, not only in Vietnam but also in Asia.

Keywords: Mackerel, ciguatera, food poisoning, Vietnam.

Độc tố tương tự ciguatoxin trong mẫu cá thu ngành *Acanthocybium solandria* tại Việt Nam

Đào Việt Hà*, Phan Bảo Vy

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*E-mail: daovietha69@gmail.com

Nhận bài: 30-7-2019; Chấp nhận đăng: 6-10-2019

Tóm tắt

Hai sản phẩm cá thu cắt lát dự kiến xuất khẩu được gửi kiểm định chỉ tiêu độc tố Ciguatoxin (CTX) tại phòng thí nghiệm trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về “An toàn thực phẩm và Môi trường (khu vực miền Trung)”, Viện Hải dương học. Các mẫu vật này có nguồn gốc từ vùng biển xa bờ Đông Nam Bộ, Việt Nam, được thu mua vào tháng 4/2019. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, hai mẫu vật này được xác định thuộc loài cá thu ngành *Acanthocybium solandria* - một loài cá có giá trị kinh tế phân bố tại vùng biển miền Trung và Đông Nam Bộ nước ta. Trong thử nghiệm sinh học trên chuột, các dịch chiết từ 2 mẫu này đều biểu hiện độc tính cấp, gây chết đối với 100% chuột thử nghiệm trong 6 h và 15 h sau khi tiêm phúc mạc. Phân tích sắc ký lỏng gắn đầu dò khối phổ kép (LC/MS-MS) đối với các dịch chiết này, thấy có sự xuất hiện đỉnh có thời gian lưu rất gần với thời gian lưu của CTX-1B, với hàm lượng tương đương ước tính là 0,51 ng/g và 0,84 ng/g, cao gấp 5 và 8 lần ngưỡng tiêu chuẩn an toàn thực phẩm đối với độc tố CTXs trong sản phẩm thủy sản (0,1 ng CTX-1B/g). Bước kiểm chứng đang được thực hiện để có kết luận về bản chất độc tố trong các mẫu vật của nghiên cứu này. Tuy nhiên, kết quả này đưa ra sự cảnh báo đầu tiên về nguy cơ ngộ độc thực phẩm do tiêu thụ cá thu ngành tại Việt Nam và châu Á.

Từ khóa: Cá thu ngành, ciguatera, ngộ độc thực phẩm, Việt Nam.

MỞ ĐẦU

Hơn 400 loài cá rạn thuộc danh sách các loài sinh vật biển có thể tích lũy độc tố ciguatoxin (CTX), với mức độ nguy hiểm càng cao khi chúng ở những thang bậc cao trong chuỗi thức ăn biển. Khi hàm lượng độc tố tích lũy đạt đến ngưỡng nhất định, các loài cá này có nguy cơ gây ngộ độc ciguatera (CFP) đối với người tiêu thụ với triệu chứng lâm sàng điển hình là rối loạn cảm giác về nhiệt, đau nhức các khớp và các khối cơ lớn, suy yếu toàn thân dai dẳng (vài tuần, thậm chí 2 năm) [1].

Tại Việt Nam, từ năm 2007, luôn ghi nhận rải rác các vụ ngộ độc thực phẩm do ăn cá hồng hay chinh biên xảy ra tại các địa phương ven biển và một số đảo xa bờ như Trường Sa,

Phú Quý; thậm chí cả tại thành phố Hồ Chí Minh hay Hà Nội. Nguy cơ ngộ độc CFP đã trở thành vấn đề cấp thiết, gây tác động xấu đến an toàn thực phẩm trong nước và thiệt hại kinh tế đối với ngành xuất khẩu thủy sản của Việt Nam. Tuy nhiên, hầu như chưa có công bố khoa học về độc tố CTXs trong các loài cá rạn từ vùng biển nước ta. Gần đây, Dao et al., [2] đã lần đầu tiên xác định CTX-1B là độc tố gây ra vụ ngộ độc thực phẩm do ăn cá hồng *Lutianus bohar* tại Việt Nam năm 2014 và 2016. Báo cáo này công bố kết quả thực nghiệm phân tích độc tố CTX trong sản phẩm cá thu cắt khúc thu vào tháng 4/2019 có nguồn gốc từ vùng biển xa bờ Đông Nam Bộ Việt Nam. Mặt khác, báo cáo cũng trình bày kết

quả định danh các mẫu vật cá thu bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

MẪU VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu vật

Mẫu vật là sản phẩm chế biến xuất khẩu của một công ty xuất khẩu thủy sản thu mua

vào tháng 4/2019 (bảng 1), được bảo quản bằng đá lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về “An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung)” tại Viện Hải dương học. Mẫu vật được bảo quản ở điều kiện -30°C cho đến khi phân tích.

Bảng 1. Thông tin mẫu vật trong nghiên cứu

Ký hiệu mẫu	Vùng khai thác	Mã số lô	Ngày sản xuất	Khối lượng mẫu (g)
M01	FAO 71-ĐNB2	01040999	09/4/2019	930
M02	FAO 71-ĐNB2	04041019	11/4/2019	1170

Định danh khoa học mẫu cá thu

Do các mẫu vật thu thập đã qua sơ chế (cắt khúc), nên việc định danh khoa học được thực hiện bằng kỹ thuật sinh học phân tử, cụ thể: DNA của mẫu cá thu được tách chiết sử dụng bộ KIT DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR được thực hiện trong vùng gen cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) của ty thể, với 25 μl hỗn hợp dung dịch phản ứng có chứa 1 μl (khoảng 30 ng) DNA khuôn; 1,0 pmol mỗi loại môi; 12,5 μl 2x OneTag® Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) và 9,6 μl nước cất vô trùng trên máy luân nhiệt Applied Biosystems 2720, trình tự môi và chu trình nhiệt của phản ứng PCR theo [3]. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ KIT GenElute™ PCRClean-Up kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) trước khi giải trình tự. Công đoạn giải trình tự được thực hiện tại công ty 1ST BASE (Selangor, Malaysia) ở cả hai chiều xuôi và ngược. Kiểm tra chất lượng trình tự cũng như chuẩn hóa trình tự cuối cùng được thực hiện trên phần mềm Clone Manager 9 (Sci-Ed, Cary, NC, USA). Hai trình tự *COI* của hai mẫu trong nghiên cứu này và 15 trình tự *COI* của các loài khác thuộc họ Scombrinae đã truy xuất từ ngân hàng gen (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) được sử dụng cho việc phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại. Các trình tự được gióng thẳng hàng (alignment) bằng phần mềm MEGA 7 [4] theo phương pháp CLUSTAL W tích hợp trong phần mềm. Trong nghiên cứu này, sử

dụng phương pháp Maximum Likelihood (ML) [5] bằng phần mềm RAxML version 8 với độ lặp lại là 1.000 để xây dựng cây phát sinh chủng loại.

Tách chiết độc tố

Độc tố trong các mẫu được chiết rút theo phương pháp dùng cho thử nghiệm sinh học trên chuột tại Nhật Bản theo Oshiro et al., [6]. Cụ thể, đồng nhất 120 g mẫu trong 350 ml acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), lọc hỗn hợp bằng giấy lọc Whatman No. 1 (Whatman filter paper No. 1), thu dịch trong (lặp lại 2 lần). Cô cạn toàn bộ thể tích dịch trong bằng hệ thống cô chân không, hoà tan cặn rắn trong 100 ml diethylether ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), lắc đều, sau đó để yên cho đến khi phân lớp hoàn toàn, thu lớp diethylether phía trên (bước chiết rút với diethylether được lặp lại hai lần). Bay hơi thể tích diethylether bằng hệ thống cô chân không để thu được độc tố thô ở dạng cặn rắn. Hoà tan cặn độc tố này bằng hỗn hợp 50 ml hexan (C_6H_{14}) và 25 ml methanol (CH_3OH) 90%, lắc đều, sau đó để lắng cho đến khi phân lớp hoàn toàn và thu lớp methanol. Tiếp tục bay hơi toàn bộ thể tích methanol này bằng hệ thống cô chân không để có độc tố dạng cặn rắn, bảo quản ở -20°C .

Xác định độc tính

Độc tính tổng số có mặt trong dịch chiết được xác định bằng thử nghiệm sinh học trên chuột (Mouse Bioassay-MBA) theo Oshiro et al., [6]; trong đó, một đơn vị chuột (mouse unit -MU) được tính là lượng độc tố nhỏ nhất trong

1 ml dịch tiêm gây chết chuột thử nghiệm (18–20 g/cá thể) trong vòng 24 giờ khi tiêm phúc mạc. Cặn rắn chứa độc tố thu nhận từ quy trình chiết rút được hoà tan bằng 3 ml dung dịch Tween 60 1% pha trong dung dịch natriclorua (NaCl) 0,9%. Như vậy, 1 ml dung dịch này (tương ứng với 40 g mẫu vật ban đầu) được tiêm phúc mạc chuột nhắt trắng *Swiss swiss* 20 g/cá thể ($n = 3$). Theo dõi chuột thử nghiệm và ghi nhận thời gian chết trong 24 h (nếu có). Kết quả dương tính được ghi nhận trong trường hợp 2 trong số 3 chuột thử nghiệm chết.

Độc tính được tính toán theo công thức $\log MU = 2,3 \log(1+T^{-1})$; Trong đó: MU là đơn vị chuột được tính là lượng độc tố nhỏ nhất của CTX có trong 1 ml dịch chiết tiêm chuột và T là thời gian chết của chuột (tính theo giờ). Hàm lượng độc tố có mặt trong dịch chiết được chuyển đổi với giá trị quy đổi của 1 MU là lượng độc tố ở ngưỡng LD_{50} đối với chuột nhắt trắng 20 g/cá thể tương ứng với 5 ng P-CTX-1 [7].

Loại bỏ tạp chất

Quy trình loại bỏ tạp chất trong dịch chiết trước khi phân tích bằng sắc ký lỏng khối phổ kép LC/MS-MS được thực hiện theo công bố của Yogi et al., [8]. Cụ thể, dịch chiết từ 5 g mẫu cá được bay hơi hoàn toàn, hoà tan cặn rắn (A) bằng 2 ml EtOAc-MeOH (tỉ lệ 9:1, v/v) và chảy qua cột Florisil (InertSep FL-PR, 500 mg), giải hấp phụ bằng 3 ml EtOAc-MeOH (tỉ lệ 9:1 v/v), cho bay hơi hoàn toàn thu cặn rắn (B). Tiếp tục hoà tan cặn rắn (B) bằng 3 ml MeOH, chảy qua cột Florisil (IntertSep FL-200 mg), rửa bằng 3 ml MeCN, giải hấp phụ bằng 3 ml MeOH, cho bay hơi hoàn toàn thu cặn rắn (C). Hoà tan cặn rắn (C) trong 200 μ l MeOH để sử dụng phân tích LC/MS-MS.

Phân tích sắc ký lỏng khối phổ kép (LC/MS-MS)

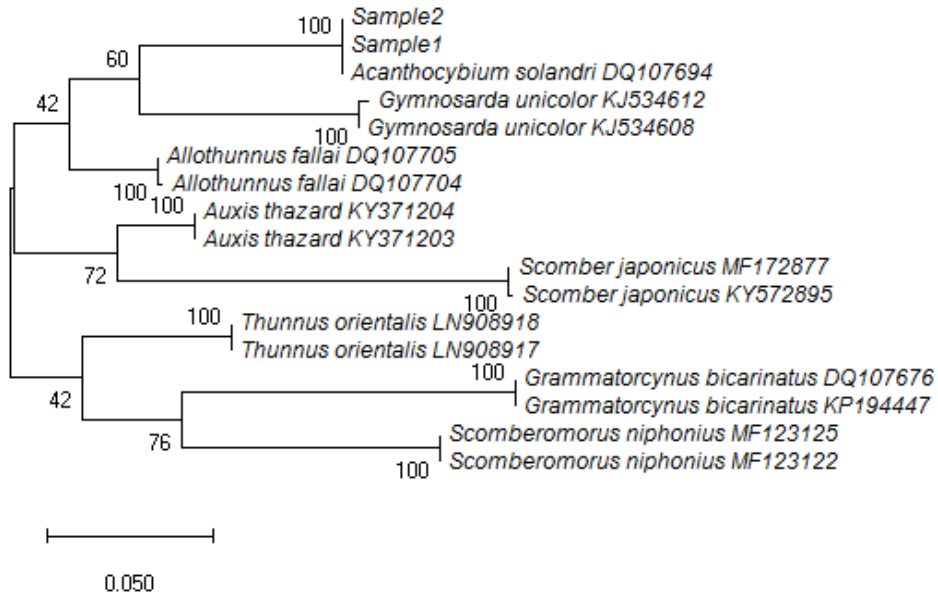
Với điều kiện nuôi cấy chuẩn CTX-1B khan hiếm và hệ thiết bị sắc ký lỏng khối phổ LCMS 8040 Shimadzu được trang bị tại phòng thí nghiệm trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về “An toàn thực phẩm và môi trường (Khu vực miền Trung)”, trong nghiên cứu này, ion $[M+Na]^+$ được lựa chọn ở chế độ SIM với 2 pha tĩnh khác nhau (cột Agilent Poroshell 120 EC-18

và cột Wakosil-II 5C18). Cụ thể, ion $[M+Na]^+$ được chọn lọc quan trắc với pha tĩnh là cột Agilent Poroshell 120 EC-18 (100 \times 2,1 mm i.d.), nhiệt độ 20°C, thể tích mẫu tiêm 5 μ l, tốc độ dòng 0,25 μ l/phút của pha động (dung dịch A: 5 mM ammonium formate có chứa 0,1% formic acid trong nước cất và B: MeOH), chế độ thay đổi nồng độ pha động (gradient) từ 80% đến 95% của dung dịch B trong 10 phút, giữ ổn định trong 10 phút tiếp theo. Pha rắn Agilent Poroshell 120 EC-18 được xác nhận là tối ưu cho phân tách độc tố CTXs cho cường độ đỉnh cao nhất [8, 9]. Tuy nhiên, nguyên tắc phân tách độc tố này trong quá trình sắc ký dựa vào liên kết kỵ nước giữa độc tố CTXs có mặt trong pha động và pha tĩnh bản chất silica đã alkyl hóa các nhóm –OH trên bề mặt silica trung tính. Do đó, các cột sắc ký pha đảo đều có thể phân tách CTXs mặc dù hiệu quả, độ nhạy rất khác nhau tùy vào đặc tính của cột (pha tĩnh) trong điều kiện pha động và các thông số khác của quá trình sắc ký được tối ưu hoá. Chính vì vậy, thay đổi pha tĩnh kém nhạy hơn là một cách kiểm tra kết quả nhận diện độc tố CTXs trong dịch chiết. Do đó, trong nghiên cứu này, ở điều kiện tối ưu về pha tĩnh, khi xuất hiện đỉnh tương đồng thời gian lưu với độc tố chuẩn CTX-1B (Viện Nghiên cứu Thủy Sản Nhật Bản cung cấp), pha tĩnh sẽ được thay thế bằng cột Wakosil-II 5C18 (4,4 \times 250 mm i.d.) với cùng hệ pha động và các điều kiện trước đó.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định tên khoa học các mẫu cá thu

Khi giống thẳng hàng 17 trình tự *COI* với khối dữ liệu có độ dài là 619 bp, không có vị trí trống (gap). Trong đó, 434 (70,1%) là vị trí bảo tồn (conserved sites); 185 (29,9%) là vị trí biến động (variable sites); 184 (29,7%) là vị trí thông tin tối thiểu (parsimony informative characters) và 1 (< 0,01%) là vị trí đơn lẻ (singleton). Kết quả phân tích cây tiến hóa bằng phương pháp ML (hình 1) cho thấy các mẫu S2 và S1 là cùng một loài, cùng nhánh với trình tự được biết trước là của loài *Acanthocybium solandri* (Cuvier, 1832) số đăng ký trên Genbank là DQ107694 (cá thu ngang) với hệ số tương đồng là 100%.



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại của một số loài thuộc họ Scombrinae bằng phương pháp ML dựa trên độ dài 619 bp của gen chỉ thị *COI*: Con số trên mỗi nhánh là giá trị; Mã số sau tên khoa học là mã số trên ngân hàng gen; Cây tiến hóa được thực hiện bằng phần mềm RAxML version 8

Độc tính của mẫu cá thu ngang

Dịch chiết từ cả 2 mẫu vật cá thu đều biểu hiện dương tính với chuột thử nghiệm với độc tính là 4,0 và 7,5 MU/40 g mẫu tươi ban đầu (bảng 2), cao hơn 4 và 7,5 lần liều khuyến cáo của FAO đối với độc tố CTX (1 MU/40 g mẫu). Độc tính của các mẫu cá thu trong nghiên cứu này hoàn toàn tương đương với độc tính của mẫu cá hồng trong vụ ngộ độc thực phẩm 2014 và 2016 tại Việt Nam [2, 10]. Tương tự, chỉ cần tiêu thụ khoảng 130–200 g thực phẩm này sẽ có nguy cơ gây hội chứng ngộ độc cho người.

Bảng 2. Độc tính của mẫu cá thu đánh bắt vào tháng 4/2019 tại vùng biển xa bờ Đông Nam Bộ, Việt Nam trong thử nghiệm sinh học trên chuột (MBA)

Ký hiệu mẫu	Độc tính (MU/40 g)	Khẩu phần ước tính có thể gây ngộ độc (g)*
M01	4,0	200
M02	7,5	133

Ghi chú: *: [10].

Kết quả xác định độc tố trong mẫu cá thu ngang

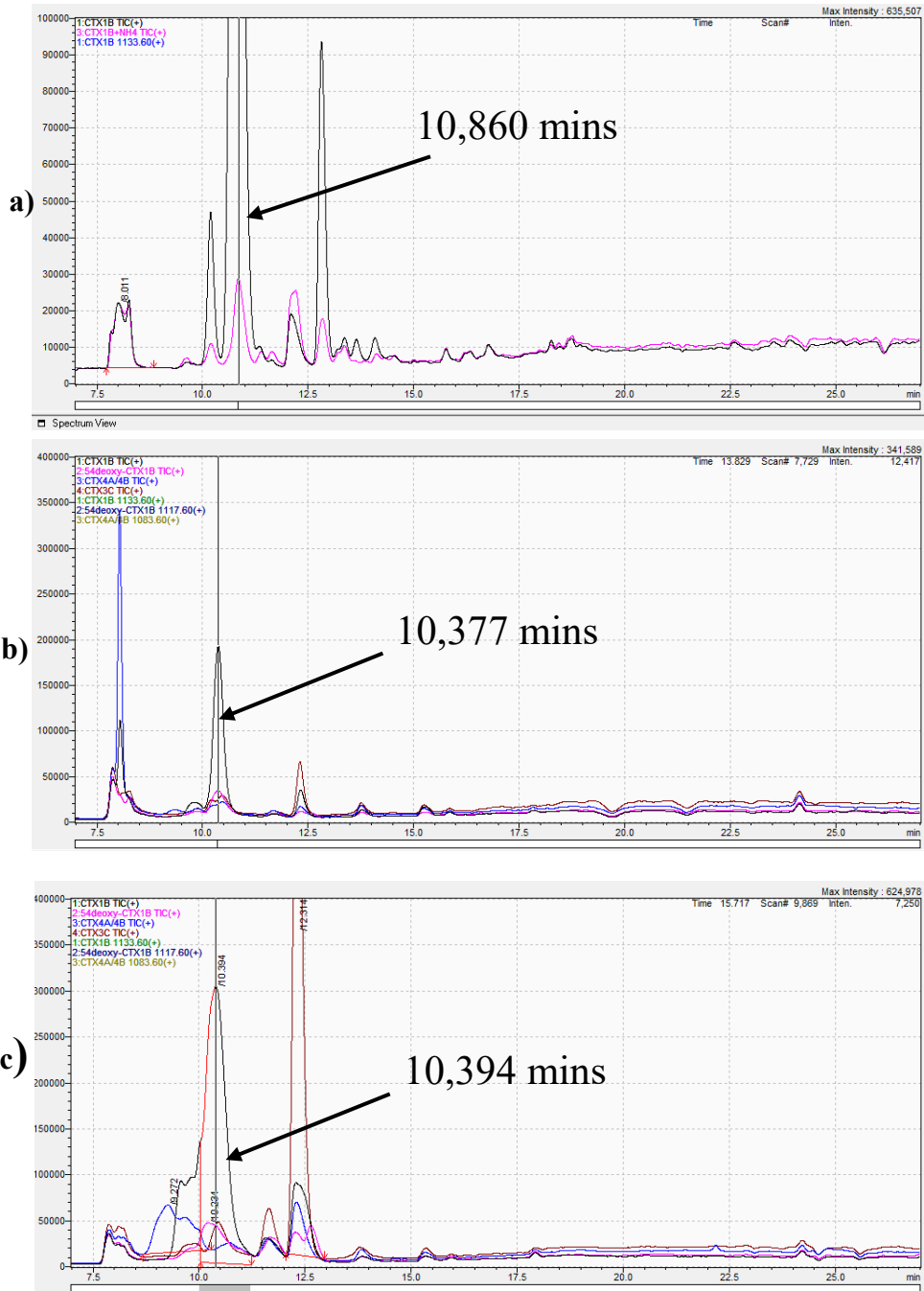
Kết quả phân tích SIM LC/MS-MS của ion $[M+Na]^+$ (m/z 1133,6) trên pha rắn Agilent

Poroshell 120 EC-18, ở dịch chiết của 2 mẫu cá thu ngang đều có sự xuất hiện của một đỉnh với thời gian lưu lần lượt là 10,366 và 10,394 phút, rất gần với thời gian lưu của CTX-1B chuẩn (10,860 phút) (hình 2). Sự sai khác về thời gian lưu của độc tố trong 2 dịch chiết cá thu là khoảng 5% so với CTX-1B chuẩn, có phần cao hơn sai số cho phép về thời gian lưu của phương pháp LC/MS-MS đối với độc tố CTXs [9].

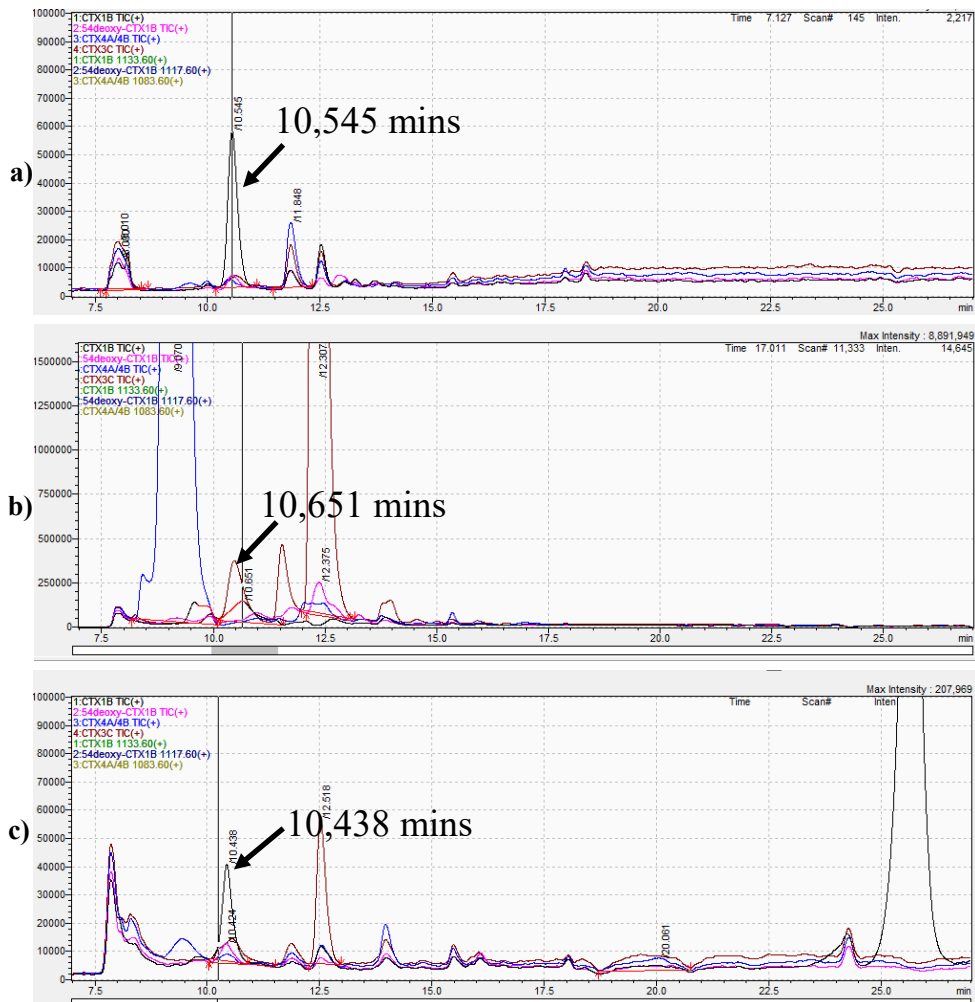
Khi thay đổi quá trình phân tách trên pha rắn Wakosil 5C18, vẫn xuất hiện các đỉnh có thời gian lưu gần với thời gian lưu của CTX-1B chuẩn mặc dù ở cường độ thấp hơn nhiều (hình 3). Sự sai khác về thời gian lưu của đỉnh chất này trong 2 dịch chiết từ mẫu cá thu ngang đều nhỏ hơn 2% so với thời gian lưu của CTX-1B chuẩn, trong khoảng cho phép sai số của phương pháp LC/MS-MS đối với độc tố CTXs [8]. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công bố của Suzuki et al., [9] cho rằng, độc tố CTX hoặc hợp chất nhóm lipophilic có cấu trúc phân tử gần giống/tương tự với CTX-1B sẽ được phân tách tốt nhất trên hệ pha tĩnh Agilent Poroshell 120 EC-18. Tuy nhiên, với pha tĩnh khác được cho là kém nhạy hơn, ví dụ Wakosil-II 5C18 nhóm chất này

vẫn được nhận diện, dù với cường độ đỉnh thấp hơn. Do nguồn chất chuẩn CTX-1B rất hiếm nên nghiên cứu này không tiến hành bước phân tích tiếp theo ở chế độ MRM để xác định sự tương đồng của các mảnh ion con

từ ion phân tử mẹ ban đầu $[M+NH_4]^+$ so sánh với $[CTX-1B + NH_4]^+$ (m/z 1128,7). Tuy nhiên, từ kết quả này cho phép nhận định, mẫu cá thu ngành tại Việt Nam có chứa một độc tố có cấu trúc phân tử rất gần với CTX-1B.



Hình 2. Phổ đồ SIM ion phân tử $[M+Na]^+$ của độc tố trong dịch chiết từ mẫu cá thu ngành M01 (b) và M02 (c) so sánh với CTX-1B chuẩn (a) trên hệ pha rắn Agilent Poroshell 120 EC-18



Hình 3. Phổ đồ SIM ion phân tử $[M+Na]^+$ của độc tố trong dịch chiết từ mẫu cá thu ngang M01 (b) và M02 (c) so sánh với CTX-1B chuẩn (a) trên hệ pha rắn Wakosil II 5C18

Ngộ độc CFP hay tương tự CFP được ghi nhận khá nhiều tại một số vùng biển khu vực châu Á [12, 13] nhưng lại rất ít được ghi nhận tại Việt Nam [2, 10], đặc biệt, chưa có ghi nhận về độc tố trong các loài cá thu tại Việt Nam. Theo các thông tin đi kèm mẫu vật (do công ty chế biến thủy sản cung cấp) (bảng 1), 2 mẫu cá thu này có nguồn gốc từ vùng biển xa bờ Đông Nam Bộ của nước ta. Các nghiên cứu cho thấy đã có sự khác biệt về bản chất hoá học của độc tố được tổng hợp ở loài vi tảo *Gambierdiscus toxicus* và trong các loài cá rạn ở các bậc khác nhau của chuỗi thức ăn biển có tích lũy độc tố từ loài vi tảo độc này cũng như rất có thể do sự chuyên hoá nội cơ thể của các loài cá nhất định [8, 11]. Điều này gợi ý cho việc có thể tồn tại

một dạng tiền chất hay chất trung gian nào đó của độc tố CTX trong mẫu vật cá thu ngang có nguồn gốc từ vùng biển Việt Nam. Thông tin này cần được kiểm chứng bằng các nghiên cứu chuyên sâu về hướng sinh lý và sinh thái học của độc tố.

KẾT LUẬN

Bước đầu đã phát hiện sự có mặt của độc tố thuộc nhóm lipophilic có cấu trúc phân tử rất gần với độc tố ciguatoxin-1B trong hai mẫu vật cá thu ngang *Acanthocybium solandri* có nguồn gốc từ vùng biển xa bờ Đông Nam Bộ, Việt Nam vào tháng 4 năm 2019. Độc tính cấp ghi nhận ở 2 mẫu này lần lượt là 4,0 và 7,5 MU/40 g mẫu tươi, cao hơn 4 và 7,5 lần liều khuyến

cáo của FAO đối với độc tố CTX. Với độc tính này, 130–200 g cá thu nếu tiêu thụ có thể gây hội chứng ngộ độc cho người. Mặc dù cần có bước kiểm chứng để xác định bản chất độc tố, nhưng kết quả nghiên cứu này là cảnh báo đầu tiên về nguy cơ ngộ độc thực phẩm do tiêu thụ cá thu ngang tại Việt Nam và châu Á.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài nghiên cứu Khoa học Công nghệ mã số KHCBBI.02/18–20. Tác giả chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Xuân Vị, phòng Thực vật biển, Viện Hải dương học đã hỗ trợ trong việc định danh mẫu vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ahmed, F. E., 1991. *Seafood safety*. National Academy Press. 768 p.
- [2] Ha, D. V., Uesugi, A., Uchida, H., Ky, P. X., Minh, D., Watanabe, R., Matsushima, R., Oikawa, H., Nagai, S., Iwataki, M., Fukuyo, Y., and Suzuki, T., 2018. Identification of causative ciguatoxins in red snappers *Lutjanus bohar* implicated in ciguatera fish poisonings in Vietnam. *Toxins*, 10(10), 420.
- [3] Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., and Hebert, P. D., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. doi: 10.1098/rstb.2005.1716.
- [4] Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874.
- [5] Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- [6] Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., Hiramata, M., Yasumoto, T., and Inafuku, Y., 2010. Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon*, 56(5), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.036>.
- [7] Lewis, R. J., and Sellin, M., 1992. Multiple ciguatoxins in the flesh of fish. *Toxicon*, 30(8), 915–919. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90390-Q](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90390-Q).
- [8] Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hiramata, M., and Yasumoto, T., 2011. Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. *Analytical Chemistry*, 83(23), 8886–8891. DOI: 10.1021/ac200799j.
- [9] Suzuki, T., Ha, D. V., Uesugi, A., and Uchida, H., 2017. Analytical challenges to ciguatoxins. *Current Opinion in Food Science*, 18, 37–42.
- [10] Đào Việt Hà. 2017. Độc tính của mẫu cá hồng gây ngộ độc thực phẩm tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển*, 17(4A), 331–337.
- [11] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2010. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish-Emerging toxins: Ciguatoxin group. *EFSA Journal*, 8(6), 1627. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1627>.
- [12] Oshiro, N., Matsuo, T., Sakugawa, S., Yogi, K., Matsuda, S., Yasumoto, T., and Inafuku, Y., 2011. Ciguatera Fish Poisoning on Kakeroma Island, Kagoshima Prefecture, Japan. *Tropical Medicine & Health*, 39(2), 53–57. DOI: 10.2149/tmh.2011-03.
- [13] Yogi, K., Oshiro, N., Matsuda, S., Sakugawa, S., Matsuo, T., and Yasumoto, T., 2013. Toxin profiles in fish implicated in ciguatera fish poisoning in Amami and Kakeroma islands, Kagoshima prefecture, Japan. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 54(6), 385–391. DOI: 10.3358/shokueishi.54.385.