

“Biotossine marine. Origine, diffusione e controllo”

A CURA DI ROBERTO POLETTI



Biotossine marine

Origine, diffusione e controllo

A cura di Roberto Poletti

Fondazione Centro ricerche marine

Laboratorio nazionale di riferimento per le biotossine marine

V.le A. Vespucci, 2

47042 Cesenatico (FC)

www.centroricerchemarine.it

infocrm@centroricerchemarine.it

“Biotossine marine. Origine, diffusione e controllo”

A cura di Roberto Poletti



INDICE

Presentazione	9
Introduzione	11
Capitolo 1. Harmful Algal Blooms	13
1.1 Le microalghe tossiche	15
1.2 Il monitoraggio	18
1.3 Le biotossine marine	19
1.4 Bibliografia	23
Capitolo 2. Analisi del rischio	25
2.1 Analisi del rischio biotossine algali: approccio metodologico	27
2.1.1 Valutazione del rischio	27
2.1.2 Identificazione del pericolo: definizione	27
2.1.3 Caratterizzazione del pericolo: definizione di dose-risposta	28
2.1.4 Valutazione dell'esposizione: definizione	28
2.1.5 Caratterizzazione del rischio: definizione	28
2.1.6 Gestione del rischio	28
2.1.7 Comunicazione del rischio	28
2.2 Valutazione del Rischio molluschi bivalvi o altri prodotti ittici	29
2.3 Bibliografia	31
Capitolo 3. PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)	33
3.1 Chimica delle saxitossine (STXs)	36
3.2 Meccanismo d'azione	37
3.3 Tossicità	39
3.3.1 Tossicità negli animali	40
3.3.2 Tossicità nell'uomo	42
3.4 Eziologia	45
3.5 Prodotti della pesca interessati dalla PSP	46
3.5.1 Molluschi Bivalvi	46
3.5.2 Gasteropodi	51
3.5.3 Crostacei	52
3.5.4 Pesci	52
3.6 Incidenti e distribuzione di PSP	53
3.6.1 Distribuzione in Europa	54
3.7 Diagnosi	55
3.8 Trattamento	56
3.9 Prevenzione	56
3.10 Valutazione del Rischio per prodotti ittici con tossine PSP (STXs)	57
3.11 Bibliografia	58
Capitolo 4. Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	65
4.1 Introduzione	67
4.2 Chimica dei costituenti responsabili della sindrome ASP	67

4.3	Meccanismo d'azione	68
4.4	Tossicità	70
4.4.1	Tossicità negli animali	71
4.4.2	Tossicità nell'uomo	71
4.5	Eziologia	73
4.6	Prodotti ittici soggetti alla contaminazione da tossine ASP	74
4.6.1	Molluschi bivalvi	74
4.6.2	Altri organismi marini	75
4.7	Distribuzione ASP in Europa	77
4.8	Diagnosi	77
4.9	Trattamento	78
4.10	Prevenzione	78
4.11	Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine ASP	79
4.12	Bibliografia	80
Capitolo 5. Sindrome neurotossica da Pesce Palla		85
5.1	Chimica della Tetrodotossina (TTX)	87
5.2	Meccanismo d'azione	89
5.3	Eziologia	91
5.4	Tossicità	92
5.4.1	Tossicità negli animali	92
5.4.2	Tossicità nell'uomo	96
5.4.3	Valutazione del rischio per prodotti ittici contaminati da Tetrodotossina (TTX)	99
5.5	Bibliografia	101
Capitolo 6. Intossicazione da Palitossine (PITXs)		105
6.1	Introduzione	108
6.2	Struttura chimica	108
6.3	Eziologia	109
6.4	Meccanismo d'azione	109
6.5	Tossicità	111
6.5.1	Tossicità negli animali	111
6.5.2	Tossicità nell'uomo	112
6.6	Contaminazione dei prodotti ittici	113
6.7	Diffusione in Europa delle PITXs	113
6.8	Valutazione del Rischio dei prodotti ittici contaminati da PITXs	117
6.9	Bibliografia	119
Capitolo 7. Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)		125
7.1	Bibliografia	128
Capitolo 8. Acido Okadaico e derivati (AOs)		129
8.1	Meccanismo d'azione	132
8.2	Tossicità	133
8.2.1	Tossicità negli animali	133
8.2.2	Tossicità nell'uomo	137

8.3	Eziologia	141
8.4	Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da Aos	145
8.5	Bibliografia	146
Capitolo 9. Pectenotossine (PTXs)		151
9.1	Struttura chimica	153
9.2	Meccanismo d'azione	154
9.3	Tossicità	155
9.3.1	Tossicità negli animali	155
9.3.1.1	Tossicità negli animali per via intraperitoneale (i.p.)	155
9.3.1.2	Tossicità negli animali per via orale (per os)	157
9.3.2	Tossicità nell'uomo	158
9.4	Eziologia	158
9.5	Prodotti della pesca e contaminazione da PTXs	158
9.6	Valutazione del Rischio associato a prodotti ittici contaminati da PTXs	160
9.7	Bibliografia	162
Capitolo 10. Yessotossine (YTXs)		167
10.1	Struttura chimica	169
10.2	Meccanismo d'azione	171
10.3	Tossicità	173
10.3.1	Tossicità negli animali	173
10.3.1.1	Tossicità acuta per via intraperitoneale (i.p.)	173
10.3.1.2	Tossicità acuta per via orale (per os)	175
10.3.2	Tossicità nell'uomo	177
10.4	Le YTXs nei prodotti della pesca	177
10.5	Eziologia	182
10.6	Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da YTXs	183
10.7	Bibliografia	184
Capitolo 11. Azaspiracid Poisoning (AZP)		189
11.1	Struttura chimica	191
11.2	Tossicità	193
11.2.1	Tossicità acuta in topo per via intraperitoneale (i.p.)	193
11.2.2	Tossicità acuta in topo per via orale (<i>per os</i>)	193
11.2.3	Citotossicità	195
11.2.4	Tossicità nell'uomo	196
11.3	Molluschi associati ad AZP	197
11.4	Distribuzione geografica	197
11.5	Eziologia	198
11.6	Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da AZAs	199
11.7	Bibliografia	200
Capitolo 12. Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)		203
12.1	Struttura chimica	205
12.2	Meccanismo d'azione	207
12.3	Tossicità	208

12.3.1 Tossicità negli animali	208
12.3.2 Tossicità nell'uomo	212
12.4 Intossicazione da consumo di molluschi bivalvi (NSP)	212
12.5 BTXs associate a disturbi respiratori	213
12.6 Eziologia	215
12.7 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminate da BTXs	216
12.8 Bibliografia	217
Capitolo 13. Ciguatera Fish Poisoning (CFP)	221
13.1 Introduzione	223
13.2 Struttura chimica	224
13.3 Meccanismo d'azione	226
13.4 Tossicità	227
13.4.1 Tossicità negli animali	227
13.4.2 Tossicità nell'uomo	228
13.5 Eziologia	230
13.6 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine CFP	234
13.7 Bibliografia	237
Nota dell'autore	243

La sicurezza alimentare riguarda gli aspetti igienico sanitari della produzione degli alimenti in tutte le sue fasi, dal campo alla tavola, e rappresenta una parte fondamentale nella prevenzione e nella tutela della salute umana.

Nonostante regole comunitarie severe, i rischi sanitari che possono interessare gli alimenti destinati direttamente al produttore o alle lavorazioni di alimenti sono sempre presenti e vanno valutati e gestiti con competenza e professionalità. Per questo motivo i titolari delle imprese alimentari e il personale addetto al controllo ufficiale deve essere costantemente aggiornato ed informato affinché il sistema generale diventi sempre più efficace nel garantire la tutela dei consumatori.

I prodotti della pesca, per le loro caratteristiche peculiari e per la capacità di accumulare inquinanti chimici di diversa natura, rappresentano un rischio particolare per il consumatore. I molluschi bivalvi nello specifico, essendo organismi filtratori di grandi quantità di acqua, devono essere considerati con ancor più attenzione in quanto capaci di accumulare quantitativi di biotossine in dose tossica per l'uomo.

Per questo motivo le normative comunitarie assegnano ai Servizi pubblici addetti al controllo ufficiale il compito di monitorare le zone di produzione dei molluschi e la qualità sanitaria di quelli già in commercio. Per svolgere questa funzione l'autorità competente si avvale di laboratori pubblici in grado di fornire le garanzie richieste per la qualità delle analisi svolte e la consulenza tecnico scientifica necessaria per affrontare con competenza l'attività prevista.

Nella nostra regione l'apporto fornito dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico risulta in tal senso di fondamentale importanza.

Il Centro Ricerche Marine di Cesenatico, che dal 1993 è il laboratorio nazionale di riferimento per le biotossine marine, è sorto nel 1965 come Centro universitario, legato alla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna ed è diventato nel corso degli anni, grazie al lavoro di ricerca svolto nel settore, un importante punto di riferimento non solo regionale, ma anche nazionale e internazionale. Il Centro coordina le attività dei laboratori nazionali incaricati dell'analisi delle biotossine marine, assiste l'autorità competente e collabora con i laboratorio Comunitario di riferimento.

Un ruolo di primo piano nella crescita e affermazione del Centro Ricerche Marine di Cesenatico va attribuito a Roberto Poletti, che ne è stato a lungo il direttore, ed è considerato tra i maggiori esperti nazionali e comunitari dell'argomento.

Questo volume colma un vuoto e contribuisce in maniera rilevante a diffondere le più importanti conoscenze scientifiche nel settore delle biotossine marine, rappresentando uno strumento di supporto per il controllo ufficiale, ma anche per tutto il mondo della produzione.

A Roberto vanno i miei più sentiti ringraziamenti per avere concesso a tutti gli interessati di poter usufruire del frutto di anni di appassionato lavoro.

Gabriele Squintani

*responsabile Servizio veterinario e igiene degli alimenti
Regione Emilia-Romagna*

Introduzione

Gli oceani e i mari hanno attirato, in questi ultimi 50 anni, l'attenzione di molti studiosi in quanto fonte di potenziali farmaci e di prodotti alimentari d'alta qualità. Fino ad oggi sono stati isolati da organismi marini circa 16.000 composti [1]. Molti di questi mostrano un'alta attività biologica e il loro studio sta aprendo nuovi orizzonti di conoscenza per quanto riguarda le scienze biomediche e veterinarie. Il mare molto spesso è, nell'immaginario comune, un luogo di ricreazione e tuttavia rappresenta anche un'importante fonte d'approvvigionamento alimentare che per alcune popolazioni dell'area tropicale o subtropicale è quasi esclusiva.

L'aumento demografico, l'immigrazione che ha portato il diffondersi d'usi alimentari non strettamente legati all'area d'appartenenza, il turismo e nuovi Paesi entrati nel circuito commerciale internazionale hanno determinato una crescente domanda di prodotti ittici per uso alimentare. A tutto ciò va aggiunto una continua rivalutazione del valore nutritivo di questi prodotti, suffragata da importanti studi scientifici che hanno indotto una popolazione sempre più vasta ad inserire con maggior frequenza nella loro dieta i prodotti ittici, in quanto portatori di elementi importanti per un'equilibrata ed armoniosa crescita. La rapidità dei trasporti, le moderne tecniche di conservazione e di lavorazione hanno favorito il commercio dei prodotti ittici, freschi, congelati o lavorati, in aree sempre più vaste. Numerose specie ittiche sconosciute nei Paesi ad elevato tenore economico, non commercializzate in passato per mancanza di adeguate strutture di conservazione e trasporto, si stanno diffondendo in tutti i mercati del mondo, sostituendo, talvolta, le specie ittiche più conosciute e di maggior pregio commerciale. Il consumo di prodotti della pesca nella Comunità europea è tale che il 50% deve essere importato da Paesi extra Comunitari. La deperibilità dei prodotti ittici e le tossinfezioni alimentari sono i principali motivi che hanno indotto la Unità Europea a fornire all'Autorità competente, attraverso normative di carattere igienico-sanitario (Direttive, Regolamenti, raccomandazioni, ecc..), strumenti di lavoro più incisivi e puntuali per tutelare la salute dei consumatori.

Alcuni Regolamenti CE attualmente in applicazione:

- Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare;
- Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio sull'igiene dei prodotti alimentari;
- Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia d'igiene per gli alimenti d'origine animale;
- Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano;
- Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali;
- Regolamento (CE) n. 2074/2005 recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al Regolamento (CE) n. 853/2004 e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei Reg. (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al Reg. (CE) n. 852/2004 e modifica dei Reg. (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004;
- Regolamento (CE) n. 2076/2005 che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei

Regolamenti (CE) n. 853/2004, (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 che modifica i Regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004.

- Regolamento (CE) n. 1664/2006 che modifica il Regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda le misure di attuazione per taluni prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che abroga talune misure di attuazione;
- Regolamento (UE) n. 15/2011 relativo ai metodi di analisi riconosciuti per la rilevazione delle biotossine marine nei molluschi bivalvi vivi.
- COMMISSION REGULATION (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs.

I prodotti ittici, pur essendo un ottimo alimento ad alto valore nutritivo, rappresentano, in determinate circostanze, un idoneo substrato per la proliferazione di microrganismi patogeni. Inoltre, attraverso la catena alimentare, essi possono accumulare e metabolizzare molecole di varia natura, più o meno complesse, conosciute col nome di biotossine marine. L'accumulo da parte dell'uomo di biotossine presenti nei prodotti della pesca determina l'insorgenza di particolari disturbi, indicati come biointossicazioni, distinguibili dai quadri patologici dovuti ad intossicazione da batteri o da altri contaminanti quali idrocarburi clorurati persistenti, metalli tossici, contaminanti radioattivi, ecc. Le conoscenze acquisite in questi ultimi anni inducono a ritenere che la sintesi delle biotossine marine, chimicamente definite, avvenga tramite il fitoplancton e il fitobentos; gli stessi batteri, attualmente, sono considerati come uno degli aspetti più importanti e discussi in merito all'origine di queste molecole. Le biotossine manifestano il loro effetto come tali o attraverso trasformazioni metaboliche che si possono verificare nei vari passaggi della catena alimentare. Le biotossine prodotte dalle alghe, le "ficotossine", sono quelle numericamente più importanti. Molti ricercatori hanno indirizzato le loro ricerche sulle biotossine marine non soltanto perché esse rappresentano un serio pericolo per la salute dei consumatori, ma anche perché la loro straordinaria bioattività attrae:

- il chimico per le strutture originali e uniche delle molecole;
- i farmacologi per la loro attività citotossica, antitumorale, antifungicida, antibiotica, ecc;
- il biochimico perché capaci di modificare ed attivare importanti vie metaboliche.

Queste biomolecole, quindi, hanno rappresentato e rappresentano ancora oggi delle importanti chiavi metaboliche utilizzate dai ricercatori per studiare e comprendere le complesse funzioni cellulari, con importanti ricadute sulla qualità della vita umana.

Capitolo 1

Harmful Algal Blooms

Capitolo 1

HARMFUL ALGAL BLOOMS

1.1 Le microalghe tossiche

Il termine *red tide* (marea rossa o marea colorata) è utilizzato per indicare una proliferazione di microalghe capace di raggiungere in breve tempo una densità altissima, con una concentrazione che può superare le decine di milioni di cellule per litro, in grado di modificare la colorazione dell'acqua che può divenire rossa, rosa, verde, bruna, ecc. a seconda del pigmento dominante nella microalga che ha generato il fenomeno. Queste maree colorate si manifestano talvolta improvvisamente e prevalentemente nelle zone costiere o aree eutrofizzate (dal greco *eutrophia* eu = buono, *trophòs* = nutrimento), dove è maggiore l'apporto di nutrienti (sali del fosforo, sali azotati, silicati, vitamine ed altri biostimolanti), elementi indispensabili per la crescita microalgale. L'aumento numerico e l'aggregazione di queste microalghe sono, inoltre, condizionati dalle caratteristiche chimico-fisiche e idrodinamiche della colonna d'acqua, così come dalla intensità luminosa. Le abnormi fioriture algali determinano gravi alterazioni ambientali e, quando si protraggono nel tempo, possono provocare danni ecologici, talvolta irreversibili.

Fioriture e maree colorate sono state osservate lungo le zone costiere del mare Adriatico, a cadenza sempre più frequente, fin dalla fine degli anni '60; dal 1975 sono poi divenute ricorrenti al punto da indurre le autorità nazionali ad emanare leggi, per cercare di contenere e in seguito eliminare i più importanti fattori scatenanti questo fenomeno. Fioriture microalgali possono avere effetti sulla concentrazione dell'ossigeno disciolto, sulla colorazione delle acque, sulla concentrazione dei nutrienti e sugli organismi marini.

Nel periodo 1976-1987 furono osservate ripetute e intense maree colorate, senza l'insorgere di episodi di tossicità, causate da: *Skeletonema* spp., *Noctiluca scintillans*, *Diplopsalis lenticula*, *Prorocentrum micans*, *Lingulodinium polyedrum*, *Lepidodinium chlorophorum* (Tab.1).

Tab. 1. Specie responsabili delle principali fioriture dal 1976 al 1987.

Specie	colorazione	valore max. (cell/L)	Periodo di comparsa
<i>Skeletonema</i> spp.	verde-marrone	200 x 10 ⁶	inverno-primavera
<i>Noctiluca scintillans</i> *	rosso-arancio	9 x 10 ⁶	primavera
<i>Diplopsalis lenticula</i>	rosa	30 x 10 ⁶	primavera
<i>Prorocentrum micans</i>	rossa	20 x 10 ⁶	primavera
<i>Lingulodinium polyedrum</i> **	rossa	15 x 10 ⁶	estate
<i>Lepidodinium chlorophorum</i> ***	verde	200 x 10 ⁶	estate-autunno



Dal 1988, per effetto della politica di contenimento o abbattimento del fosforo nei detersivi, nella costa emiliano-romagnola si è assistito ad un’evoluzione dei fenomeni eutrofici, con una graduale diminuzione dell’incidenza dei *bloom* algali tradizionali, un decremento del numero di cellule microalgali e la comparsa di nuovi *bloom* sostenuti da altre specie scarsamente presenti in precedenza (Tab.2).

Tab. 2. Specie responsabili delle principali fioriture dal 1988 ad oggi.

Specie	Colorazione	Periodo di comparsa
<i>Skeletonema</i> sp.	verde-marrone	inverno-primavera
<i>Thalassiosira</i> sp.	verde-marrone	inverno-primavera
<i>Chaetoceros</i> sp.	giallo-verde	primavera
<i>Noctiluca scintillans</i>	rosso-arancio	primavera
<i>Prorocentrum minimum</i>	rossa	primavera
<i>Gonyaulax fragilis</i> *	biancastra (mucillagine)	estate
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	rossa	estate
<i>Gonyaulax spinifera</i>	rossa	estate
<i>Fibrocapsa japonica</i> **	rossa	estate
<i>Chattonella</i> sp.	rossa	estate

La mancanza d’ossigeno, lo sviluppo d’idrogeno solforato e di ammoniaca, sono elementi che accompagnano molto spesso la fine di queste fioriture con conseguenze drammatiche che si manifestano con estese morie della fauna marina, oltre allo sviluppo di odori sgradevoli. In queste condizioni l’utilizzo ricreativo dell’acqua è alquanto compromesso, costringendo il turista ad allontanarsi dalla spiaggia e le Autorità competenti ad emanare divieti di balneazione. Alcune specie microalgali, inoltre, possono produrre tossine: ciò impone all’Autorità sanitaria una più attenta valutazione del rischio, sia in riferimento alla balneazione, perché si possono manifestare dermatiti, disturbi alla respirazione, ecc., sia perché i prodotti ittici, pescati o raccolti in quelle aree, possono essere contaminati da biotossine. A tale proposito non è superfluo ricordare che le biotossine marine, oltre ad interessare principalmente i molluschi bivalvi, in quanto formidabili filtratori d’acqua, si ritrovano lungo tutta la catena alimentare, subendo talvolta processi di metabolizzazione, fino ad arrivare all’uomo in concentrazioni tali da determinare gravi rischi per la salute. Queste tossine si possono accumulare nei mammiferi marini determinandone la morte, che può subentrare o in maniera diretta o a causa della alterazione della capacità d’orientamento portandoli a massicci spiaggiamenti. Alcune microalghe sono anche in grado di produrre ittiotossine che, agendo attraverso le branchie, possono essere causa di estese morie di pesci.



Le biotossine microalgali, o perlomeno alcune di queste, sono considerate da molti studiosi prodotti allelopatici utilizzati dall'organismo produttore per imporsi su altre specie microalgali o per difendersi dai predatori, oltre che un importante strumento capace d'innescare una fioritura monospecifica o perlomeno di prolungarne la sua durata. L'allelopatia delle microalghe è ancora un aspetto molto dibattuto che necessita di nuovi studi per poter essere scientificamente provato. Tuttavia, il fatto che la sintesi di queste molecole sia un processo energeticamente dispendioso per la cellula, lascia intendere che debba esservi un significato metabolico, perché i processi di selezione naturale favoriscono il mantenimento delle condizioni vantaggiose per la sopravvivenza della specie. A tale proposito è giusto ricordare che l'azione di alcune biotossine può alterare profondamente alcuni processi biochimici cellulari al punto da determinare la morte della microalga produttrice stessa, se non adottati opportuni accorgimenti per rendere inoffensiva la tossina.

Recentemente, la comunità scientifica ha introdotto, per definire lo sviluppo della proliferazione di alghe tossiche o dannose, il termine di HAB (*Harmful Algal Bloom*) [3,4], anche nel caso in cui le densità microalgali non superino le 100.000 cellule/litro e quindi non siano in grado di colorare l'acqua. Ciò si è reso indispensabile per il fatto che livelli preoccupanti di biotossine marine possono accumularsi nei prodotti della pesca anche in presenza di basse concentrazioni di fitoplancton tossico. Questo è uno degli aspetti più insidiosi in quanto l'Autorità competente preposta al controllo delle zone di mare produttive non ha nessun elemento visivo che possa innescare una procedura di allerta e la verifica dell'idoneità del prodotto raccolto destinato al consumo umano.

Le fioriture di microalghe tossiche marine, note fin dall'antichità, negli ultimi decenni sembrano notevolmente aumentate, sia nell'arco temporale che spaziale [5,6,7]. Il loro incremento è probabilmente legato ad una maggiore pressione antropica, ai cambiamenti climatici, ma anche alla maggiore frequenza e attenzione dei controlli che i Paesi hanno messo in atto per tutelare la salute umana. Delle circa 5.000 specie algali identificate (appartenenti principalmente ai taxa delle Dinofitofite e delle Diatomee) circa 75 sono quelle implicate nella produzione di tossine. Altri taxa sono molto meno rappresentati.

Le fioriture di microalghe dannose (HABs), secondo gli effetti prodotti, possono essere classificate in [7]:

- fioriture di specie che provocano colorazioni anomale dell'acqua con diminuzione della trasparenza, eventuali morie di pesci e invertebrati a causa delle conseguenti condizioni d'ipossia o anossia che possono verificarsi dopo un *bloom* algale. Queste specie appartengono soprattutto al gruppo delle Dinofitofite e delle Diatomee;
- fioriture di specie che producono potenti tossine che si accumulano nella catena alimentare e causano effetti vari nei consumatori secondari (animali superiori e uomo). Si tratta per lo più di Dinofitofite appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum* e di Diatomee del genere *Pseudo-nitzschia*;
- fioriture di specie che, nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo, ma risultano dannose, in vario modo, a pesci ed invertebrati. Esempi di queste specie sono: *Gyrodinium aureolum* (Dinofitofite), *Chaetoceros convolutus* (Diatomee), *Nodularia spumigena* (Cianofitofite), *Chattonella antiqua* (Rafidofitofite);
- fioriture di specie produttrici di tossine che tramite l'aerosol vengono trasportate (ad esempio la Dinofitofite *Karenia brevis*).

Le Diatomee, contrariamente alle Dinofitofite, ritenute da tempo responsabili delle biointossicazioni nei vari mari del mondo, non erano mai state considerate capaci di produrre tossicità fino al novembre del 1987, quando in Canada si manifestò la prima intossicazione per consumo di mitili raccolti durante una fioritura di *Pseudo-nitzschia*.

Le HABs hanno un forte impatto sulla economia dei Paesi, sia in modo diretto, con la mancata commercializzazione del prodotto, la perdita dei posti di lavoro, l'aumento dei costi per il controllo igienico sanitario, sia in modo indiretto, con la mancanza d'investimenti sul sistema produttivo e con un impatto negativo sull'economia del turismo.

1.2 Il monitoraggio

L'utilizzo del sistema acqua (mare, zone lagunari, lago, ecc.) è condizionato, nei Paesi più evoluti, da una serie di controlli (monitoraggi) che ne determinano preliminarmente le condizioni chimiche, biologiche, idrodinamiche ed igienico-sanitarie per poi arrivare alla destinazione d'uso. Per questo abbiamo acque destinate all'uso potabile, alla balneazione, alla produzione (banchi naturali di molluschi bivalvi, molluschicoltura, itticultura, ecc.).

Nelle acque di mare destinate alla raccolta di molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi, il monitoraggio dell'acqua e del prodotto raccolto è, come previsto dai Regolamenti comunitari, lo strumento principe per individuare la presenza di microalghe tossiche e l'eventuale presenza di tossine negli organismi destinati al consumo umano. Questi piani di monitoraggio sono, di fatto, l'unico potente strumento di prevenzione igienico-sanitaria in mano all'Autorità competente, in quanto la commercializzazione dei molluschi bivalvi avviene in maniera troppo rapida, in confronto ai tempi di risposta delle analisi che dovrebbero evidenziare l'eventuale presenza/assenza di biotossine. La comparsa delle microalghe tossiche e l'accumulo delle tossine lungo la catena alimentare marina sono meccanismi molto complessi, che dipendono dall'interazione di fattori biologici, chimico-fisici ed idrodinamici delle acque. Pertanto, caratterizzare l'acqua di mare tramite analisi dei nutrienti, ossigeno disciolto, pH, conducibilità, salinità, temperatura, ecc., significa acquisire elementi utili per meglio interpretare i fenomeni di comparsa e crescita di microalghe tossiche o potenzialmente tossiche. Per attenuare l'impatto negativo, igienico-sanitario e socio-economico, che le biotossine marine producono, è importante:

- pianificare monitoraggi per individuare la presenza del fitoplancton tossico o potenzialmente tossico e per verificare la presenza di biotossine nei molluschi bivalvi e altri prodotti della pesca;
- ricercare metodi sempre più rapidi di screening per individuare la presenza delle tossine;
- organizzare una rete di sistemi informativi (bollettini, siti internet, riunioni con tutti i soggetti interessati, ecc.);
- ricercare sistemi di depurazione naturale.

Il monitoraggio per la ricerca del fitoplancton deve avere i seguenti obiettivi:

- individuare e quantificare le specie tossiche o potenzialmente tossiche e la loro distribuzione in termini spaziali e temporali;
- determinare i principali fattori chimico-fisici e idrodinamici che possono determinarne crescita e distribuzione;
- individuare la presenza ed il profilo delle tossine prodotte e valutarne l'impatto sulla catena trofica.

Il monitoraggio per la ricerca delle biotossine nei molluschi bivalvi e in altri prodotti della pesca deve perseguire i seguenti obiettivi:

- determinare quali-quantitativamente le tossine presenti nelle parti edibili;
- determinare la capacità d'accumulo delle biotossine tra le varie specie;
- individuare i mesi potenzialmente a rischio nei quali i prodotti della pesca possono accumulare le varie tossine;
- individuare le aree di raccolta dei bivalvi che più frequentemente sono contaminate da biotossine (aree sensibili).

La pianificazione del sistema di monitoraggio, i risultati ottenuti e gli obiettivi raggiunti, dovrebbero essere verificati annualmente per cercare, attraverso le conoscenze acquisite nel tempo, di ottenere il massimo risultato sulla sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti della pesca, con il minimo sforzo operativo ed economico.

1.3 Le biotossine marine

Una tossina, per essere considerata tale, deve possedere determinati requisiti [8]:

- essere presente in un organismo vivente (animali, piante, batteri);
- non essere prodotta dall'organismo bersaglio stesso;
- avere un effetto tossico riconoscibile sull'organismo bersaglio.

Per biotossina s'intende una sostanza prodotta da un organismo vivente capace di indurre, anche a bassa concentrazione, manifestazioni fisiologiche dannose su alcune specie viventi. In questi anni molto si è dibattuto se queste molecole siano da considerarsi dei prodotti metabolici primari o secondari, e pur non arrivando ad una conclusione certa, è opinione diffusa considerarle dei metaboliti secondari, tipici delle diverse specie. In questa ultima categoria sono inseriti anche i composti che non hanno ancora un ruolo ben conosciuto e che non sono considerati indispensabili per la sopravvivenza dell'organismo che li produce.

Le biotossine marine più conosciute, che hanno avuto in questi ultimi 70 anni una valenza igienico-sanitaria per l'uomo, sono un gruppo eterogeneo di composti che presentano, talvolta, strutture assai complesse; possono avere pesi molecolari da molto bassi a molto elevati per essere molecole non proteiche; possedere, in base alla polarità della molecola, un comportamento strettamente idrofilico o altamente lipofilico. La struttura organica di queste molecole comprende:

- amminoacidi (acido domoico ed analoghi);
- derivati purinici (saxitossina ed analoghi);
- imine cicliche (spiroolidi, gimnodimine e pinnatossina A);
- polieterei lineari e macrociclici, alcuni contenenti azoto (acido okadaico ed analoghi, pectenotossine, azaspiracidi, primnesine);
- polieterei transfusi (brevetossine, yessotossine, ciguatossine);
- poliidrossilati (palitossina).

Questi principi attivi sono stati identificati, per consuetudine, in base ai sintomi macroscopici di avvelenamento che procurano all'uomo, o accompagnati alcune volte dal nome della tossina o dall'animale che la contiene. Un'altra suddivisione, molto grossolana, è quella basata sulla polarità della molecola e la conseguente solubilità nei solventi: biotossine marine idrosolubili e biotossine marine liposolubili.

Le tossine idrosolubili comprendono:

- composti responsabili della paralisi respiratoria nell'uomo per consumo di molluschi bivalvi, conosciuta più comunemente come Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) composti responsabili di forme di amnesia temporanea, conosciute come Amnesic Shellfish Poisoning (ASP);
- le tetrodotossine (TTX), composti che per struttura e sintomatologia sono simili alle tossine PSP ma che arrivano all'uomo attraverso il consumo di vari prodotti ittici, principalmente pesci;

- le palitossine (PITX), considerate fra le più potenti e letali biotossine marine di natura non proteica. Originariamente ritrovate nei coralli molli delle aree tropicali dell'Oceano Pacifico, e successivamente in numerosi organismi marini.

Le tossine PSP o PST producono sintomi neurologici; l'avvelenamento dell'uomo deriva prevalentemente dal consumo di molluschi bivalvi contaminati, ma anche da cefalopodi, crostacei e pesci. La struttura di base della tossina è la *saxitossina* che, parimenti ai suoi analoghi, può essere mortale per l'uomo in quanto determina, nei casi più gravi di avvelenamento, la paralisi respiratoria. L'origine della molecola è principalmente microalgale, ma non si esclude che alcuni batteri, altri produttori di saxitossine, possano agire sulle microalghe come simbionti o endosimbionti, anche se questi ultimi aspetti devono essere, dal punto di vista scientifico, ancora pienamente chiariti.

La sindrome ASP è causata dall'acido domoico e dai suoi isomeri, molecole di origine microalgale (Diatomee) che agiscono sui siti della memoria, nell'area dell'ippocampo. Questa sindrome è stata registrata per la prima volta in Canada nel 1987, in seguito al consumo di molluschi bivalvi (mitili) contaminati. Chimicamente, l'acido domoico è un amminoacido raro, con funzione neuroeccitatoria; i suoi effetti sono amplificati nelle persone anziane, in cui può subentrare anche la morte.

L'intossicazione da tetrodotossina (TTX) provoca sintomi neurotossici. La tossina si accumula in vari organismi marini ed in particolare nei pesci della famiglia dei Tetrodonti (pesce palla, pesce soffiatore, *puffer fish*); pochi grammi di questi pesci contaminati, mangiati sia cotti che crudi, determinano gravi disturbi neurologici e l'insorgenza della morte per paralisi respiratoria. L'origine di questa tossina è di natura batterica e, attualmente, non si conoscono microalghe in grado di sintetizzare questa molecola. Nei Paesi dell'Unione Europea è vietata l'importazione dei suddetti pesci vettori.

L'avvelenamento da palitossina (PITX) per consumo di prodotti ittici si manifesta rapidamente nell'uomo; sono interessati il sistema gastrointestinale, cardiovascolare, renale e quello respiratorio. Palitossina ed analoghi (PITXs) sono stati scoperti in microalghe del genere *Ostreopsis* (Dinoficee). In Italia importanti fioriture di *Ostreopsis ovata* sono state associate a disturbi respiratori e parainfluenzali accusati da alcune centinaia di persone che soggiornavano in riva al mare.

Le tossine liposolubili comprendono invece molecole responsabili di:

- Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP);
- Neurotoxin Shellfish Poisoning (NSP);
- Venerupin Shellfish Poisoning (VSP);
- Ciguatera o Ciguatera Fish Poisoning (CFP).

Fra le biointossicazioni causate da molecole liposolubili, la sindrome definita DSP è quella maggiormente conosciuta per i gravi e prolungati disturbi gastrointestinali che procura nei consumatori di bivalvi contaminati. Alla sindrome di tipo DSP sono state in passato associate altre tossine liposolubili, trovate molto spesso insieme all'acido okadaico e suoi derivati, quali le yessotossine e le pectenotossine e, dalla metà degli anni '90, gli azaspiracidi. Tuttavia questo gruppo di tossine sono composti chimicamente distinti per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e lesioni biochimiche.

Il test attualmente utilizzato dai Paesi della UE per rilevare la presenza di tossine di tipo DSP mette in evidenza anche la presenza di altre tossine liposolubili come le brevetossine.

Le brevetossine, responsabili della sindrome NSP, una delle prime intossicazioni identificate fra quelle dovute a tossine liposolubili, sono endemiche in talune aree

costiere della Florida e del Golfo del Messico. Queste tossine, oltre a provocare un'azione neurotossica negli animali e negli esseri umani, hanno anche un effetto ittiotossico. Queste molecole sono prodotte da Dinofitce della specie *Karenia brevis* (ex *Gymnodinium breve*). Dopo una fioritura, i prodotti di degradazione di queste microalghe possono passare nell'aerosol marino, creando disturbi alle persone, che ne vengono in contatto per inalazione.

L'origine delle tossine lipofile qui menzionate, è di natura microalgale (Dinofitce) e i molluschi bivalvi ne sono il vettore principale.

Il composto tossico, responsabile della sindrome VSP, è la venerupina, molecola con una forte attività epatotossica, isolata per la prima volta nel 1965 in *Venerupis semidecussata* e in seguito in *Crassostrea gigas*. La natura di questa tossina non è stata ancora ben definita. La specie microalgale responsabile della sua produzione appartiene alle Dinofitce (*Prorocentrum cordatum*, ex *P. minimum* var. *mariae-lebouriae* ed ex *P. minimum* var. *triangulatum*). I disturbi che questa tossina provoca sull'uomo sono di tipo gastrointestinale e neurologico e, nei casi più gravi di intossicazione, si arriva alla morte.

Il termine Ciguatera, o CFP, indica l'intossicazione causata dal consumo di varie specie di pesci che trovano il loro nutrimento nelle barriere coralline delle zone tropicali e sub-tropicali. Il principio tossico è sintetizzato da Dinofitce epifite, in primo luogo da *Gambierdiscus toxicus*. I sintomi dell'avvelenamento da Ciguatera possono essere di natura molto diversa: neurotossici, gastrointestinali e cardiovascolari. Molti pesci ciguatossici contengono nelle loro carni anche altre biotossine algali, quali la palitossina e l'acido okadaico.

Tutte le biotossine responsabili delle varie forme di avvelenamento sono considerate termostabili alle normali condizioni di cottura.

La classificazione sopra esposta, basata su categorie di composti che di fatto non sono classificabili per sintomatologia, è stata oggetto di discussione, nel 2004, per il gruppo di lavoro “Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs” che ha indicato una nuova classificazione, basata sulle caratteristiche chimiche delle biotossine (Tab. 3) [9].

Tab. 3. Classificazione delle biotossine marine in base alla loro struttura chimica [9]

Gruppi di tossine
gruppo degli Azaspiracidi (AZA)
gruppo delle Brevetossine
gruppo delle Imine Cicliche
gruppo dell'Acido Domoico (AD)
gruppo dell'Acido Okadaico (AO)
gruppo delle Pectenotossine (PTX)
gruppo delle Saxitossine (STX)
gruppo delle Yessotossine (YTX)

Recentemente, nei mari europei, sono stati identificati altri gruppi di tossine, chimicamente distinti (Tab.4)

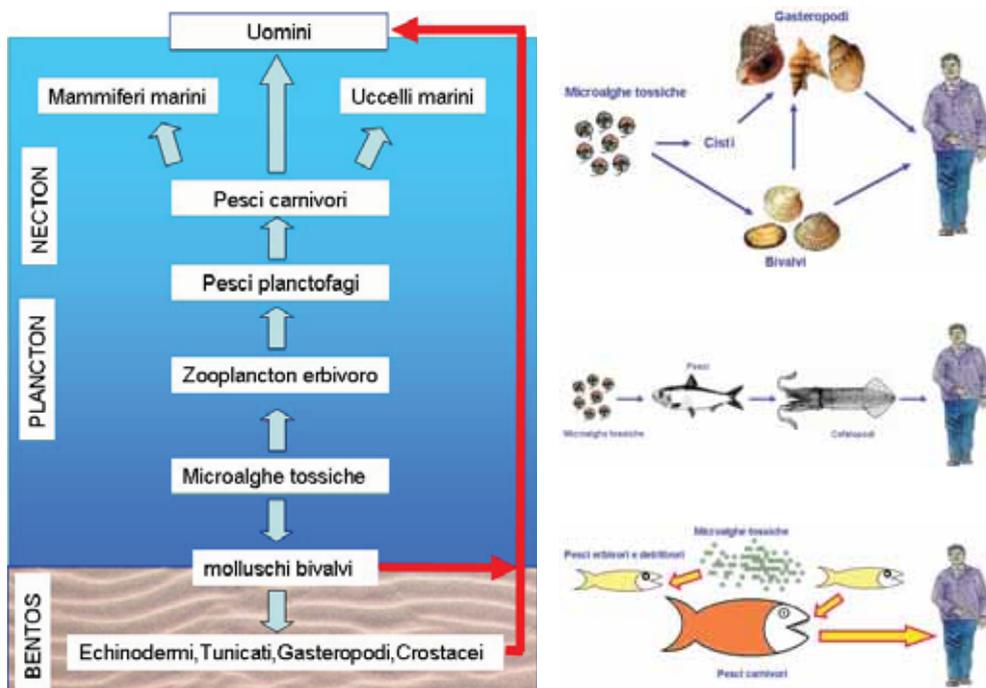
Tab. 4. Gruppi di tossine recentemente comparsi nei mari europei.

Gruppi di tossine
gruppo delle Ciguatossine (CFP)
gruppo delle Tetrodotossine (TTX)
gruppo delle Palitossine (PITX)

Queste tossine si accumulano nei molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati, gasteropodi e più in generale ai prodotti della pesca, attraverso la catena alimentare. In particolare si accumulano soprattutto negli organismi filtratori; è per questo che sovente i ricercatori hanno trovato per la prima volta questi principi attivi nelle spugne, gli animali filtratori più antichi e primitivi.

In Fig.1 sono rappresentate alcune catene alimentari marine, più o meno complesse, attraverso le quali le biotossine possono arrivare all'uomo.

Fig. 1. Le biotossine marine nella catena alimentare.



L'avvelenamento dell'uomo, per il consumo di prodotti ittici contaminati dalle biotossine marine, è argomento vasto e complesso, pertanto verranno trattate quelle sindromi storicamente più conosciute nel mondo, con specifica attenzione a quelle diffuse e regolamentate nei Paesi dell'Unione Europea ed in particolare a quelle diffuse in Italia. Alcune saranno trattate in modo più dettagliato, in quanto emblematiche, per comprenderne i complessi meccanismi d'azione, elementi indispensabili per elaborare una corretta valutazione del rischio igienico-sanitario a tutela del consumatore.

1.4 Bibliografia

1. Bhakuni D.S. and Rawat D.S. 2005. *Bioactive Marine Natural Products* - Co-published by Springer 233 Spring Street, New York 10013, USA with Anamaya Publishers, New Delhi, India.
2. Poletti Roberto 1998. *Monitoring activities on marine toxic algae in the Adriatic Sea – Algal bloom detection, monitoring and prediction*. 3rd Workshop: "Public health" Istituto Superiore di Sanità, Roma, 21-22, Rapporti ISTISAN 99/8
3. Anderson, D.M. 1994. *Red tides* - Scientific American 271: 62-68.
4. Hallegraeff, G.M. 1995. 1. *Harmful algal blooms: a global overview*. In Hallegraeff, G.M. et al.eds. Manual on Harmful Marine Microalgae, pp. 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
5. Anderson D.M. 1989. *Toxic algal blooms and red tides: a global perspective*. In: Okaichi T, Anderson D.M. Nemoto T (Ed.). Red tides: biology, environmental science and technology. New York: Elsevier Science Publishing Co.; p. 11-16.
6. Smayda T.J. 1989. *Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkage?* In: Coper EM, Carpenter EJ, Bricelj VM (Ed.). Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms. Berlin: Springer Verlag; p. 449-483.
7. Hallegraeff, G.M. 1993. *A review of harmful algae blooms and their apparent global increase*. Phycologia 32: 79-99.
8. Vogt, W. 1970. What is a toxin? *Toxicon*, 8, p. 251.
9. Report of the Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, September 26-30, 2004.

Capitolo 2

Analisi del rischio

Capitolo 2

ANALISI DEL RISCHIO

2.1 Analisi del rischio biotossine algali: approccio metodologico

L'analisi del rischio può essere definita come "la probabilità che si verifichi un evento avverso, pericoloso o dannoso, tenendo conto del suo potenziale impatto nel momento in cui accade". E' quindi un metodo sistematico per valutare i rischi in modo più completo, per chiarire fenomeni complessi e per affrontare incertezze e lacune sulla loro origine. Questo approccio metodologico rende più facile, inoltre, le decisioni da avviare per la gestione del rischio e la sua comunicazione.

L'Analisi del Rischio, come schematizzato in Fig.1, si articola in tre processi: valutazione, gestione e comunicazione [1].

Fig.1 - Schema dei processi che portano alla valutazione del rischio.



2.1.1 Valutazione del rischio

La valutazione del rischio è una procedura complessa che ci permette, grazie ad un approccio strutturato, di stimare la rilevanza dei dati sperimentali ed epidemiologici e di prendere coscienza dei fattori che la influenzano in modo positivo o negativo. Un rischio può essere valutato in termini assoluti, prendendo in esame il numero delle persone che si ammalano ogni anno a causa del pericolo individuato, o in termini relativi, considerando le persone che si ammalano relativamente al numero totale di quelle presenti in quel contesto.

2.1.2 Identificazione del pericolo: definizione

Per identificazione del pericolo si intende "stabilire se un particolare prodotto chimico od organico sia o non sia collegato ad effetti sulla salute umana" [2].

2.1.3 Caratterizzazione del pericolo: definizione di dose-risposta

La dose-risposta è definita come "la determinazione del rapporto fra la grandezza d'esposizione e la probabilità che questa determini degli effetti sulla salute". La valutazione di dose-risposta spesso è chiamata caratterizzazione del pericolo (Commissione 1996 di *Codex Alimentarius*) [3].

Nella discussione dei concetti generali della caratterizzazione del pericolo (valutazione di dose-risposta), viene suggerito che tale caratterizzazione includa valutazioni sulla variabilità umana, sulla virulenza dell'agente biologico e le caratteristiche della composizione del vettore che influenzano le interazioni dell'ospite-agente patogeno. La caratterizzazione del pericolo dovrà inoltre includere le valutazioni sulla gravità della malattia causata dal pericolo. Le misure sulla grandezza degli effetti in relazione alla salute umana devono comprendere l'eventuale ospedalizzazione, la durata della malattia e tutti quegli elementi che possono portare a conseguenze fatali [4]. I dati richiesti per la caratterizzazione del pericolo, qualitativi e quantitativi, sono essenzialmente complementari agli elementi descrittivi dell'identificazione del pericolo. Tuttavia quando la natura epidemiologica è molto variabile o più pericoli contemporaneamente concorrono a determinare effetti nocivi sulla salute, la valutazione della dose-risposta è molto difficile da determinare.

2.1.4 Valutazione dell'esposizione: definizione

La valutazione dell'esposizione è definita come "la probabilità di consumare o essere esposti ad un agente pericoloso". La concentrazione dell'agente pericoloso e la sua distribuzione, la durata e la frequenza dell'esposizione ed altre caratteristiche legate all'esposizione, sono elementi indispensabili che concorrono ad una corretta valutazione.

La valutazione all'esposizione dell'agente pericoloso, nel caso delle biotossine marine prodotte da microalghe, dovrà tenere conto della natura e genetica degli agenti eziologici, delle condizioni naturali e degli interventi umani che possono influenzarne la crescita e la distribuzione.

2.1.5 Caratterizzazione del rischio: definizione

La caratterizzazione del rischio è definita come "la descrizione della natura e la grandezza del rischio umano, comprese le relative incertezze" [2]. Questa si deve integrare con la valutazione dell'esposizione o della dose-risposta, includendo la valutazione della probabilità che l'evento accada, in varie circostanze di esposizione, compresa la valutazione delle incertezze [4]. La descrizione del rischio è pertanto una valutazione quantitativa e qualitativa del potenziale tossico di un agente biologicamente attivo sulla salute umana.

2.1.6 Gestione del rischio

Quando il pericolo non può essere evitato, la gestione del rischio associata al pericolo assume un ruolo importante per prevenire impatti negativi sulla salute umana.

Le Autorità competenti che gestiscono il rischio hanno il compito di guidare l'analisi degli esperti e decidere, sui dati acquisiti, le azioni da intraprendere. Quando il pericolo non può essere evitato è necessario ridurre il rischio, scegliendo le azioni più appropriate per farlo.

2.1.7 Comunicazione del rischio

L'Autorità competente che affronta la gestione di un rischio, e avvia azioni concrete per attenuarne il pericolo, deve comunicare le azioni intraprese ai settori pubblici e privati interessati e ai cittadini che possono esserne coinvolti. Non è sempre facile

stabilire quali strategie di comunicazione debbano essere adottate, in quanto potrebbero avere implicazioni sul piano economico, sociale e talvolta etico. Tuttavia, alla base di una buona gestione del rischio, che significa prendere delle decisioni idonee e possibilmente condivise, ci deve essere la garanzia di un'adeguata comunicazione. Questa non può basarsi soltanto sulle relazioni pubbliche, ma deve tenere conto del rischio percepito dalle persone. A tale proposito sembra ormai acquisito che le persone si preoccupano più dei rischi che non possono controllare che di quelli, specialmente a carattere naturale, ai quali vanno incontro volontariamente. Per questo il modo di presentare il rischio è di fondamentale importanza e soprattutto bisogna cercare di evitare che la comunicazione del rischio vada dall'alto verso il basso, ovvero dal legislatore alla collettività. L'esperienza ha dimostrato che la forma più efficace di comunicazione del rischio è quella di corresponsabilizzare direttamente il pubblico, facendolo diventare un soggetto attivo della comunicazione.

2.2 Valutazione del Rischio molluschi bivalvi o altri prodotti ittici

Commissioni di esperti che fanno capo alla FAO (*Food and Agriculture Organization*), IOC (*Intergovernmental Oceanographic Commission*), WHO (*World Health Organization*) e EFSA (*European Food Safety Authority*) hanno più volte ribadito in questi ultimi anni che il consumo di molluschi bivalvi deve ritenersi occasionale. Conseguentemente, gli effetti dannosi di eventuali biotossine presenti nell'alimento, sulla salute umana, sono da considerarsi come tossicità acuta. Questa affermazione si basa, per la maggior parte delle biotossine marine, sulla conoscenza del loro meccanismo d'azione e sulle loro proprietà farmacologiche. Tuttavia, in alcuni casi c'è carenza di dati di una vera sperimentazione *in vivo* protratta nel tempo, specialmente per le tossine liposolubili, per verificare gli eventuali effetti cronici. In questa situazione, il parametro tossicologico che meglio si adatta ad una valutazione del rischio è la Dose Acuta di Riferimento (ARfD).

L'ARfD è definita come "la valutazione della quantità di una sostanza in un alimento, espressa normalmente in mg per kg di peso corporeo (generalmente si usa rapportarla ad una persona di 60 kg di peso corporeo), che è ingerita durante un pasto o al massimo nell'arco delle 24 ore, senza che questa crei un rischio apprezzabile per la salute del consumatore, sulla base di tutti i fatti conosciuti al tempo della valutazione".

Un elemento importante per la valutazione del rischio, che ha come conseguenza la quantificazione dell'agente pericoloso in termini di limiti da non superare, è stabilire la quantità massima dell'alimento, contenente l'agente pericoloso, ingeribile nelle 24 ore.

In passato il calcolo dei limiti per le biotossine marine ha fatto riferimento ad un consumo giornaliero di 100 g di parte edibile (p.e.) di molluschi bivalvi. Questa dose può essere considerata ragionevole se riferita a bivalvi di piccole dimensioni (vongole, telline, ecc.) o ad altri bivalvi aggiunti alle preparazioni alimentari (minestre, zuppe, insalate di mare, ecc.). Indagini ai consumatori hanno evidenziato che in un pasto i molluschi bivalvi ingeriti possono raggiungere anche i 380 g di p.e., anche se il 97,5% degli intervistati non ne consuma, nelle 24 ore, più di 250 g di p.e [5].

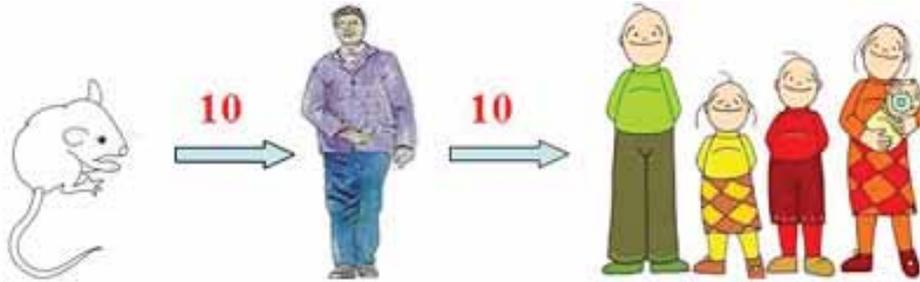
L'EFSA, incaricata dalla Commissione Europea (CE) di esprimere un parere sulla validità dei limiti per le biotossine marine, nel novembre 2008 ha proposto di considerare per i molluschi bivalvi un'assunzione giornaliera di 400 g di p.e. Questa quantità, considerata per molti eccessiva, ha naturalmente influenzato l'indicazione dei nuovi limiti proposti dall'EFSA. Per maggiore chiarezza, la valutazione del rischio riportata alla fine di ogni capitolo sarà calcolata prendendo in considerazione diverse dosi giornaliere di assunzione di parte edibile (100, 250 e 400 g) [6].

Un altro elemento importante per la valutazione del rischio per una tossina è indicare

un fattore d'incertezza (FI) o di sicurezza per il consumatore che deve essere applicato nel calcolo dell'ARfD. Generalmente il FI usato nella quantificazione del pericolo, ottenuto attraverso la sperimentazione animale, è di 100, valore ottenuto moltiplicando (Fig.2) :

- per un fattore 10, che estrapola i dati dall'animale all'uomo, basandosi sul fatto che l'uomo può essere più sensibile dell'animale da esperimento;
- per un altro fattore 10, che tiene conto della sensibilità umana dovuto all'età, al sesso, ecc.

Fig. 2. Schema per la valutazione del fattore d'incertezza (FI)



Spetta al tossicologo stabilire il FI che deve essere applicato per la quantificazione del pericolo. Il FI è calcolato sulla base dei dati disponibili ottenuti dalla sperimentazione e dovrebbe portare ad una quantificazione del pericolo tenendo conto del NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), cioè della concentrazione massima a cui la tossina non crea alcun effetto tossico sull'organismo. Tuttavia, quando non c'è un valore disponibile di NOAEL si può indicare un FI partendo dal LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*), la quantità più bassa della tossina che può creare effetti tossici nell'organismo trattato. In questo caso il NOAEL può essere ottenuto calcolando 1/10 della dose del LOAEL.

In Tab. 1 sono riportati i Fattori di Incertezza (FI) utilizzati dalla WHO [7].

Tab.1. Fattori di Incertezza (FI) utilizzati dalla WHO

Sorgente d' incertezza	FI
Variazione interspecie (da animali all'uomo)	1-10
Variazione intraspecie (variazione di sensibilità fra membri della stessa specie)	1-10
Validità dei dati sperimentali	1-10
Natura e severità degli effetti tossici	1-10

FI è il prodotto dei singoli fattori e può avere valori da 1 a 10.000*

* In alcuni casi, per sostanze ad alto rischio, è inserito un ulteriore FI (es. agenti teratogenici)

2.3 Bibliografia

1. Lammerding, A.M. 1998. *An overview of microbial food safety risk assessment*. Journal of Food Protection 60(11): 1420–1425.
2. Kindred, T.P. 1996. *Risk analysis and its application in FSIS*. Journal of Food Protection Supplement, 24–30.
3. Codex Alimentarius Commission, 1996. *HACCP system and guidelines for its application*. Report of the 29th session of the Codex Committee on food hygiene, Food and Agriculture Organization.
4. Buchanan, R. 1998. *Principles of risk assessment for illness caused by foodborne biological agents*. Journal of Food Protection 61(8):1071-1074.
5. Report of the Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, September 26-30, 2004.
6. EFSA. 2008. Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues- Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065A) The EFSA Journal, 589: 1-62.
7. WHO. 2005. *Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability*. Guidance document for use of data in dose/concentration–response assessment. Harmonization project document No.2: pp.100.

Capitolo 3

PSP *(Paralytic Shellfish Poisoning)*

Capitolo 3

PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

La PSP è una delle sindromi più studiate e conosciute per le gravi conseguenze che produce nei consumatori di prodotti ittici, in modo particolare di molluschi bivalvi che accumulano le tossine prodotte dalle microalghe assunte con l'alimentazione. Le microalghe responsabili della produzione di tossine di tipo PSP appartengono quasi esclusivamente al taxon delle Dinofitce. I sintomi dell'avvelenamento sono di natura neurologica; nei casi più gravi insorge paralisi respiratoria con conseguente morte [1,2].

Il primo episodio documentato, ma all'epoca non conosciuto come PSP, risale al 1798, quando alcuni marinai di un battello che esplorava le coste della British Columbia in Canada, si avvelenarono consumando molluschi bivalvi. Il capitano George Vancouver ha lasciato, sul giornale di bordo, una dettagliata descrizione dei tragici avvenimenti [2].

Il primo tentativo di caratterizzare la tossina, da molluschi contaminati, avvenne nel 1885 a seguito di un'intossicazione di massa a Wilhelmshaven (Germania). La tossina fu classificata come una delle sostanze chimiche più potenti [3] e sin da allora fu rilevata la sua stabilità al calore, l'instabilità agli alcali e la solubilità in acqua ed in alcool.

In seguito, nel 1927, ricercatori dell'Università della California attribuirono l'avvelenamento di numerose persone, con paralisi respiratoria e morte, al consumo di mitili raccolti in aree in cui si era sviluppata la dinofitea *Alexandrium catenella* (ex *Gonyaulax catenella*). Gli estratti acidi delle microalghe raccolte durante la fioritura e dei mitili prelevati nella stessa area, iniettati per via intraperitoneale al topo, ne procurarono la morte con la stessa sintomatologia osservata negli individui intossicati. La dimostrazione sperimentale dell'origine di questa intossicazione alimentare fu data nel 1937, quando alcuni ricercatori della California riuscirono a rendere tossici molluschi sani, dopo che, in laboratorio, questi si erano alimentati con *A. catenella*. Nella metà degli anni '50 fu isolata in Alaska, dal mollusco bivalve *Saxidomus giganteus*, la tossina sufficientemente pura per l'esecuzione di saggi biologici e per procedere alla sua caratterizzazione chimica [4]. La tossina, responsabile della sindrome da PSP, fu chiamata saxitossina (STX), nome derivato dalla specie da cui era stata estratta [5].

Attualmente si conoscono più di 30 analoghi della saxitossina: neosaxitossina (neoSTX), gonyautossine 1, 2, 3, 4 (GTX1- 4), B1 (GTX5), B2 (GTX6) e C1- 4 [6,7]. L'intossicazione PSP può essere causata dalla combinazione di queste tossine, che dipendono dalle specie di Dinofitce produttrici, dall'area geografica in cui queste si sviluppano e dalle trasformazioni metaboliche che queste molecole possono subire nei molluschi bivalvi [8].

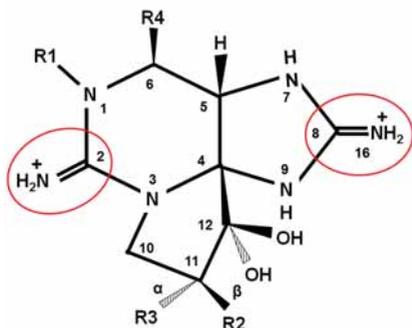
Col tempo è emerso che oltre alle microalghe anche alcuni batteri possono produrre saxitossine. Mentre è accertato il ruolo esclusivo dei batteri nella sintesi della tetrodotossina (TTX) [9], il ruolo giocato dalle alghe e da eventuali batteri endosimbionti nella sintesi di saxitossina rimane ancora materia di discussione. La produzione di saxitossine in batteri simbiotici (*Moraxella* sp.) è stata dimostrata in *A. tamarensis*. Altre specie di batteri marini come *Vibrio*, *Alteromonas*, *Plesiomonas* e *Pseudomonas* possono produrre sia TTX che STX [10]. Il connubio batteri-alghe sembra così giocare, in maniera sempre più evidente, un ruolo importante nell'ecologia delle HAB.

3.1 Chimica delle saxitossine (STXs)

La saxitossina (formula grezza $C_{10}H_{17}N_7O_4$) ha un PM di 299,29; ha l'aspetto di una polvere bianca igroscopica, solubile in acqua e parzialmente solubile in metanolo ed etanolo, ma insolubile in molti solventi non polari, quali cloroformio, dietilere, etere di petrolio. La STX non assorbe radiazioni nelle lunghezze d'onda dell'UV, ha due gruppi protonabili (con pKa di 8,22 e di 11,28) e possiede un potere di rotazione di circa +130 [6].

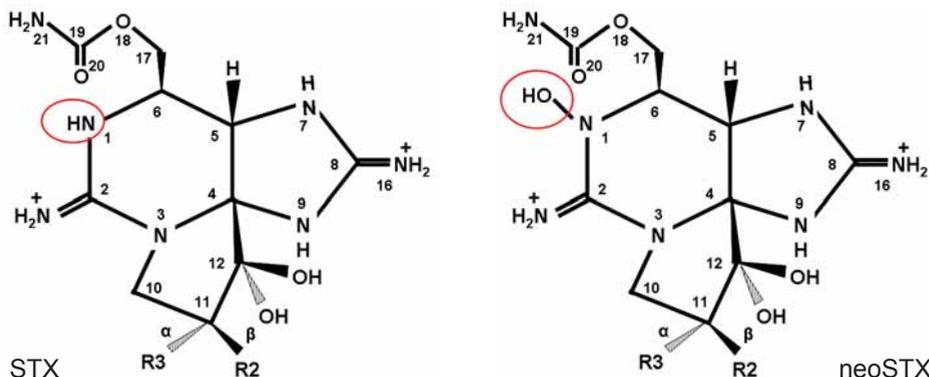
La struttura di base delle STXs è quella di una tetraidropurina con due gruppi guanidinici (Fig.1) nella forma protonata; uno di questi, evidenziato in C8, è quello interessato al blocco dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti della membrana cellulare. Le saxitossine si dividono in tre gruppi: carbammati, composti N-solfocarbammati e decarbammati [11].

Fig.1. Struttura base delle STXs; in evidenza dei gruppi guanidinici.



Gli attuali costituenti naturali delle saxitossine sono circa 30 e derivano da due principali strutture di base: la STX e la neoSTX (con un idrossile in N1) (Fig.2). Queste hanno proprietà chimiche simili e sono considerate stabili al calore, almeno alla temperatura di cottura dei molluschi bivalvi. Lo stato di stabilità alle alte temperature, invece, dipende molto dal pH del mezzo. La STX, infatti, è estremamente stabile alle alte temperature quando il pH è basso, ed in acido cloridrico non perde la sua potenzialità tossica per decenni; in ambiente basico (già a pH 8), invece, si degrada facilmente anche a temperatura ambiente. Questo ha fatto supporre che in acqua di mare, dove il pH è generalmente compreso tra 7,5 e 8,5, la STX non possa persistere a lungo se non in forma complessata [12].

Fig.2. Struttura di base delle STXs



Lo stato di carica netta delle STXs è elemento importante per l'affinità di legame ai canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti; dipende dal complesso delle due cariche dei gruppi guanidinici (carica positiva +) e da quelle di ogni gruppo solfato (carica negativa -) che si possono trovare in posizione C11, C21 o in entrambi. Le interazioni delle saxitossine col canale Na⁺ voltaggio-dipendente sono condizionate anche dalla posizione del gruppo solfato, che si trova nella posizione R2 (β) o R3 (α). Gli epimeri α e β , la cui concentrazione dipende dal pH, possono interagire con uno dei gruppi OH in C12. Questi stati molecolari influenzano il comportamento farmacologico delle saxitossine e, conseguentemente, la loro tossicità. In Tab.1 sono riportate le principali saxitossine con i loro gruppi funzionali e lo stato di carica.

Tab.1. Gruppi funzionali e stato di carica a pH 7 delle principali STXs.

Tossina	R4	R1	R2	R3	PM	Carica
STX	H ₂ N-CO Carbammato	H	H	H	299,3	++
neoSTX		OH	H	H	315,3	++
GTX1		OH	H	OSO ₃ ⁻	411,4	+
GTX2		H	H	OSO ₃ ⁻	395,4	+
GTX3		H	OSO ₃ ⁻	H	395,4	+
GTX4		OH	OSO ₃ ⁻	H	411,4	+
B1 (GTX5)	-O ₃ S-NH-COO N-Solfocarbammato	H	H	H	379,4	+
B2 (GTX6)		OH	H	H	395,4	+
C3		OH	H	OSO ₃ ⁻	491,4	0
C1		H	H	OSO ₃ ⁻	475,4	0
C2		H	OSO ₃ ⁻	H	475,4	0
C4		OH	OSO ₃ ⁻	H	491,4	0
dc-STX	H Decarbammato	H	H	H	256,3	++
dc-neo		OH	H	H	272,3	++
dc-GTX1		OH	H	OSO ₃ ⁻	368,3	+
dc-GTX2		H	H	OSO ₃ ⁻	352,3	+
dc-GTX3		H	OSO ₃ ⁻	H	352,3	+
dc-GTX4		OH	OSO ₃ ⁻	H	368,3	+

Mentre le tossine carbammate sono quelle principalmente rinvenute nei molluschi bivalvi, le N-solfocarbammate sono il gruppo più rappresentato nelle cellule fitoplanctoniche [11,13].

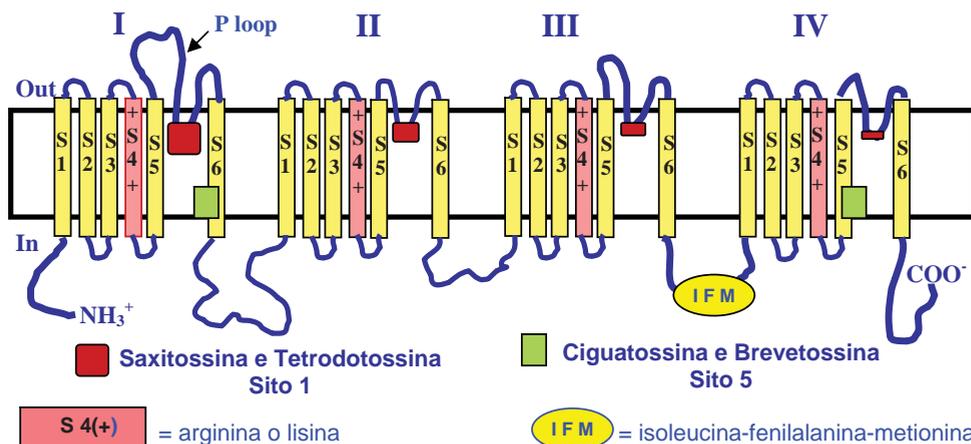
In tutti i casi, come abbiamo già detto per la STX, si tratta di composti idrosolubili, resistenti al calore, stabili in ambiente acido ma non in quello alcalino [14].

3.2 Meccanismo d'azione

La tossicità delle STXs è di tipo esclusivamente acuto. Le STXs, come altre biotossine, agiscono sui canali dello ione Na⁺, localizzati nella membrana delle cellule di tessuti eccitabili elettricamente, come le fibre nervose ed i muscoli scheletrici dei Vertebrati, che permettono la trasmissione di informazioni fra le stesse. I canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti sono glicoproteine trans-membrana formate da una sub-unità α , che comprende il poro di entrata, e da una o più sub-unità β (β 1, β 2 e β 3), che concorrono alla specificità dell'azione del canale. La sub-unità α ha una massa di 250-280 kD (circa 2.000 amminoacidi). La complessa struttura del canale è caratterizzata da 4 domini simili, ognuno dei quali comprende 6 segmenti ad α -elica che attraversano la membrana (Fig.3) e sono tra loro collegati attraverso dei *loops* intra ed extracellulari [15]. Questi canali, che permettono il passaggio dello ione dall'esterno (dove la concentrazione dello ione Na⁺ è circa 150 mM) all'interno della cellula (concentrazione dello ione Na⁺ circa 10 mM), sono responsabili della fase ascendente del potenziale d'azione. In un solo canale aperto possono passare 10 milioni di ioni in un secondo [16]. Il potenziale di riposo di una cellula nervosa è di circa -70/-90 mV; quando la membrana

si depolarizza fino a circa -55 mV (il cosiddetto "valore soglia"), si ha l'apertura del canale e l'entrata di ioni positivi nella cellula che depolarizzano ulteriormente la membrana fino a $+35$ mV. Questo provoca un'ulteriore depolarizzazione nelle zone limitrofe della membrana cellulare e, conseguentemente, l'apertura di altri canali e la possibilità che l'impulso elettrico (l'informazione) possa essere trasmesso ad altre cellule. Le STXs, di fatto, alla stessa stregua di altre tossine marine come le tetrodotossine, agiscono ostacolando il passaggio allo ione Na^+ impedendo la depolarizzazione della membrana cellulare con l'effetto di bloccare la trasmissione dell'informazione ad altre cellule.

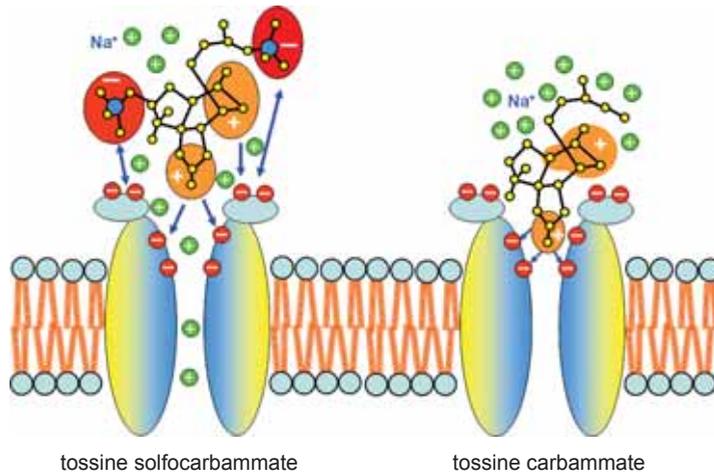
Fig.3. Subunità α del canale del Na^+ ; siti di legame con alcune biotossine [15].



Questa proprietà della STX è stata utilizzata come strumento per purificare le proteine del canale, oltre che a rilevare la sequenza degli amminoacidi del *P loop* che lega in ogni dominio i segmenti 5 e 6. Due importanti amminoacidi di questa sequenza, in posizione analoga nei quattro domini, sono chiamati in causa nella formazione delle cariche negative che servono come recettore per il sito che blocca il passaggio dello ione Na^+ e la selettività del canale (Fig. 2). La carica positiva del gruppo guanidinico delle saxitossine, quella evidenziata in C8, interagisce con la superficie anionica (gruppo carbossilico) dei due amminoacidi del *P loop* (sito 1), provocando un cambiamento della struttura del canale e il blocco del passaggio dello ione Na^+ . La mutazione di uno solo di questi amminoacidi, come ad esempio la trasformazione dell'acido glutammico a glutammina, può non determinare la chiusura del canale [17]. Questo può spiegare perché esiste una classe di canali Na^+ voltaggio-dipendenti che hanno una ridotta sensibilità alle saxitossine.

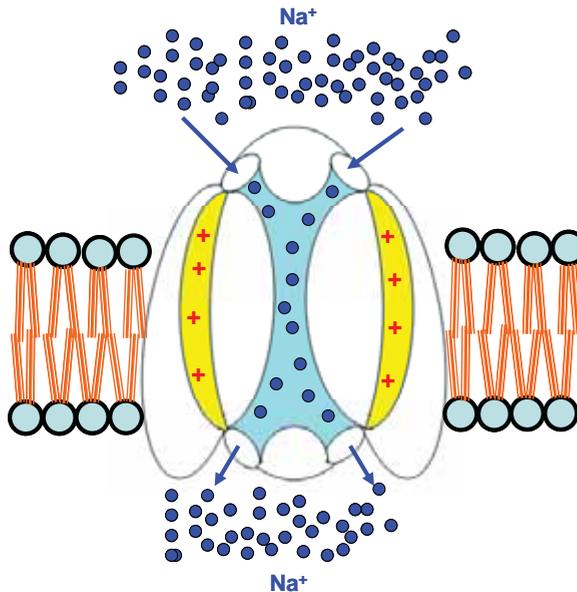
Le STXs esercitano questa azione in maniera diversificata in relazione alla loro struttura molecolare, e ciò è causa dei diversi gradi di tossicità manifestata, che varia in relazione alla carica complessiva della molecola. Per questo le saxitossine solfocarbammate non occludono completamente il canale Na^+ voltaggio-dipendente e quindi risultano essere meno tossiche (Fig.4) [13,18,19]. Per la loro azione sui canali del sodio, le STXs sono classificate come tossine occludenti (o bloccanti), al contrario di altre che agiscono come attivatori o di altre ancora come stabilizzatori.

Fig.4. Meccanismo d'azione delle PST [20].



Recentemente è stato proposto un nuovo modello di canale Na^+ , che prevede quattro entrate per questo ione convergenti in una cavità centrale che si collega al citoplasma con quattro uscite (Fig. 5) [21].

Fig.5 - Modello del canale del sodio (Na^+) subunità- α (~ 2000 aa / 240-280 kDa).



Questo cambia la raffigurazione tradizionale che vede la subunità- α raffigurata come un imbuto e induce a pensare che la saxitossina, per esplicare la sua azione, deve agire a livello della cavità centrale del poro [7].

3.3 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

3.3.1 Tossicità negli animali

La misura della tossicità delle PSP è espressa come saxitossina o saxitossina equivalente ed è generalmente quantificata in unità topo (UT). Questa rappresenta, in condizioni standardizzate [22], la concentrazione minima di tossina in grado di uccidere un topo (Swiss albino) di 20 g in 15 minuti, dopo iniezione intraperitoneale di 1 mL di estratto di molluschi bivalvi tossici. Il test sul topo, *mouse test* o *Mouse Bioassay* (MBA), rappresenta a livello mondiale, fin dagli anni '50, una delle metodiche più diffuse per il controllo delle tossine PSP. Una UT equivale a circa 0,180 µg di saxitossina e la tossicità delle STXs viene espressa in UT/µM. Le molecole che compongono nel loro insieme il gruppo delle STXs hanno diversi gradi di tossicità, anche molto diversi (Tab.2): le tossine carbammate sono le più tossiche, mentre le N-solfocarbammate sono le meno tossiche (da 5 a 100 volte inferiori); il gruppo dei composti decarbammati ha valori di tossicità intermedia [23,24].

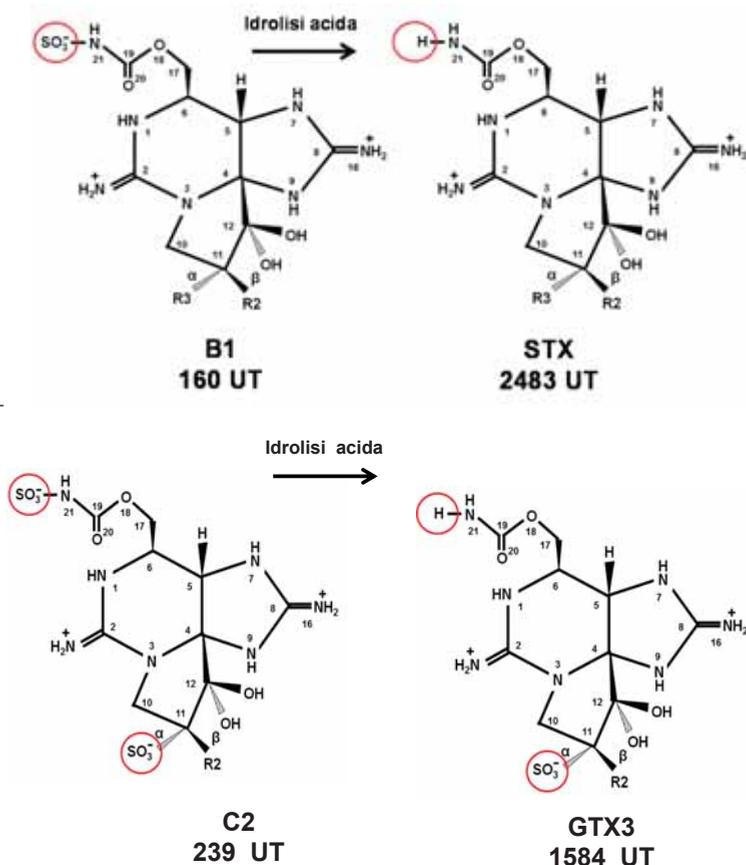
Tab.2. Saxitossine: tossicità in unità topo (UT), tossicità relativa, fattore di tossicità equivalente

Tossina	R4	Tossicità UT/µmol	Tossicità relativa	TEF EFSA
STX	Carbammato	2.483	1,000	1,0
neoSTX		2.295	0,924	1,0
11-idrossi-STX		791	0,312	0,3
GTX1		2.468	0,994	1,0
GTX2		892	0,359	0,4
GTX3		1.584	0,640	0,3
GTX4		1.803	0,726	0,7
B1 (GTX5)	N-Solfocarbammato	160	0,064	0,1
B2 (GTX6)		160	0,064	0,1
C1		15	0,060	
C2		239	0,096	0,1
C3		33	0,013	
C4		143	0,058	0,1
dc-STX	Decarbammato	1.274	0,513	1,0
dc-neo STX				0,4
dc-GTX2		382	0,154	0,2
dc-GTX3		935	0,377	0,4

UT = 0,180 µg di saxitossina TEF = Fattore di tossicità equivalente
Tossicità relativa = tossicità dei composti rispetto alla saxitossina

Alimenti contaminati da concentrazioni significative di tossine N-solfocarbammate che potrebbero superare il test sul topo, in quanto la loro tossicità equivalente alla saxitossina è molto bassa, devono essere attentamente valutati perché i vari sistemi di cottura, di conservazione o i processi di digestione potrebbero per idrolisi acida trasformare le tossine presenti nei corrispettivi carbammati (da B1 a STX; da B2 a neoSTX; da C1 a GTX2, ecc.) molto più tossici [6]. Queste tossine, proprio per la facilità di perdere il gruppo solfato, sono anche chiamate tossine criptiche (Fig.6).

Fig.6. Idrolisi delle tossine N-solfocarbammate



Alcuni ricercatori ritengono che il *mouse test* potrebbe sottostimare la potenzialità tossica di questi composti nei prodotti ittici, in quanto l'HCl 0,1M, utilizzato per l'estrazione a caldo delle saxitossine, non ha la forza sufficiente per determinare l'idrolisi delle tossine che contengono i gruppi solfato. Infatti, il metodo prevede un rapporto tra omogenato di mitili e HCl di 1:1, che porta questa miscela a pH=3, corrispondente ad una concentrazione 0,05 M di HCl, insufficiente a determinare l'idrolisi dei gruppi solfato, che avviene invece ad una concentrazione superiore a 0,2 M [6].

Le STXs presenti nei prodotti ittici a determinate concentrazioni, se ingerite, provocano seri disturbi neurologici all'uomo, con effetti sul sistema respiratorio, cardiovascolare, neuromuscolare e sul nervoso centrale (SNC).

Negli animali è stato visto che le tossine PSP provocano una progressiva paralisi dei muscoli respiratori, fino a giungere all'asfissia. La somministrazione intravenosa di STX, alla concentrazione di 1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di p.c. (peso corporeo), in gatti e conigli, oltre a provocare una rapida debolezza della contrazione muscolare a carico dei muscoli del sistema scheletrico, determina una diminuzione dell'attività respiratoria, sia in termini di ampiezza che di velocità. Alla dose di 4-5 μg di STX/kg p.c. si ha una forte e rapida depressione della respirazione fino a provocare la morte, se non si ricorre alla respirazione artificiale. Inoltre, è stato evidenziato che il controllo respiratorio da

parte del SNC non viene inibito, ma i muscoli coinvolti direttamente nella respirazione subiscono una progressiva paralisi [18]. La possibilità che le STXs abbiano effetti anche sui neuroni coinvolti nel controllo respiratorio non può essere al momento esclusa [25]. Effetti cardiovascolari insorgono in animali trattati con dosi di 1µg STX/kg p.c. Questi effetti sono più rari nei casi di intossicazione umana [26].

In Tab.3 sono riportati i valori di tossicità acuta (LD_{50}) della STX somministrata ai topi per diverse vie, espressi come µg di tossina per kg di peso corporeo [27].

Tab. 3. Valori di LD_{50} della STX somministrata attraverso diverse vie.

Via di somministrazione della tossina	LD_{50} (µg/kg di p.c.)
orale	250 - 263
intraperitoneale	9,0 - 11,6
intravenosa	2,4 - 3,4

In Tab.4 è riportato il confronto della tossicità acuta (LD_{50}) per somministrazione orale della STX in alcune specie di animali.

Tab. 4. Valori di LD_{50} della STX somministrata per via orale in diversi animali.

Somministrazione orale	LD_{50} (µg/kg di p.c.)
Ratto	192 - 212
Scimmia	277 - 800
Gatto	254 - 280
Coniglio	181 - 200
Cane	180 - 200
Porcellino d'india	128 - 135
Piccione	91 - 100

3.3.2 Tossicità nell'uomo

I casi di avvelenamento da STXs nell'uomo, per consumo di molluschi bivalvi, evidenziano una sintomatologia che può essere classificata in tre categorie: lieve, moderatamente grave ed estremamente grave [28].

I sintomi tipici di ciascuna categoria sono:

1. sintomatologia lieve: sensazione di formicolio o intorpidimento attorno alle labbra (parestesia) che si diffonde a poco a poco su viso e collo. Sensazione di “punture di spilli o aghi” alle dita delle mani e dei piedi. Cefalea, vertigini e nausea;
2. sintomatologia moderatamente grave: discorsi sconnessi; progressione della sensazione di spilli nelle braccia e gambe; perdita del controllo posturale e rigidità delle gambe e braccia. Debolezza generale e sensazione di leggerezza. Lieve difficoltà respiratoria. Polso accelerato;
3. sintomatologia molto grave: paralisi muscolare. Pronunciata difficoltà respiratoria; Sensazione di soffocamento.

La concentrazione di STXs che determina nell'uomo i sintomi dell'avvelenamento, ricavata da numerose osservazioni epidemiologiche, varia considerevolmente. La comparsa della sindrome dipende da diversi fattori quali: il profilo tossicologico e la concentrazione delle tossine presenti, la quantità di alimento tossico ingerito, il procedimento di preparazione del pasto, talvolta il tipo di altri cibi assunti contemporaneamente ed infine la quantità di tossine assorbite o eventualmente trasformate durante la digestione. Un quesito ricorrente circa la pericolosità delle STXs a

bassa tossicità (N-solfocarbammate) è quello di sapere se durante la fase digestiva, che avviene in ambiente fortemente acido (pH=2-3), c'è la possibilità che queste subiscano processi d'idrolisi (Fig. 6) diventando così molto più tossiche. In un esperimento con tossina B1 (GTX5), saxitossina a bassissimo potenziale tossico, incubata per 5 ore a 37°C in succo gastrico artificiale (pH=1,1), soltanto il 9% della tossina era convertita nell'analogo più tossico. In un altro studio, con succo gastrico di ratto (pH=2,2) non è stata osservata nessuna conversione della tossina [29]. Esperimenti condotti con C1 e C2, saxitossine a basso potenziale tossico, la conversione delle tossine dopo 4 ore d'incubazione a pH=2,2 era del 5,5%. Le saxitossine idrolizzabili durante la digestione, come queste ricerche hanno dimostrato, non hanno effetti significativi sulla salute del consumatore [24].

La tossicità delle STXs è considerata di tipo acuto e non ci sono elementi scientifici per ipotizzarne una tossicità cronica. Questo è coerente con la natura idrosolubile di queste molecole e con il loro meccanismo d'azione.

I casi d'avvelenamento registrati in Europa si sono verificati con concentrazioni variabili da 144 a 1.660 µg di STX eq.(equivalente)/persona, con casi mortali già a dosi di 300 µg di STX eq./persona [30]. In Canada, durante un episodio di avvelenamento PSP, tra le persone intossicate alcune accusarono sintomi con concentrazioni di circa 360 µg STX eq./persona, mentre altre, pur avendo ingerito 2.340 µg di STX eq. non mostrarono alcun sintomo.

La quantità minima di STX o di STX equivalente che crea disturbi osservabili (LOAEL), è stimata, per un adulto, in circa 120 µg [31]. Questo significa che una persona ingerendo 200 grammi di parte edibile di molluschi bivalvi, contenenti STXs ad una concentrazione leggermente inferiore al limite di legge (800 µg di STX eq./kg di p.e.), può introdurre una quantità di tossina pericolosa per la salute umana.

Il metabolismo umano delle STXs ancora non è stato molto studiato; tuttavia, alcune ricerche sono indirizzate sulla farmacologia di queste biotossine e sulla possibilità che l'organismo umano possa determinare una biotrasformazione di alcune di queste. Nel 1994, in Kodiak Island (Alaska), alcuni ricercatori, analizzando il sangue (siero) e le urine di persone morte per consumo di mitili contaminati da PSP, trovarono una concentrazione più alta di C1 e C2 rispetto a GTX2, riferita all'analisi sui mitili responsabili dell'avvelenamento [32]. In un altro caso d'avvelenamento mortale per consumo di crostacei (granchi della specie *Zosimus aeneus*), il contenuto stomacale e le urine della vittima contenevano una concentrazione percentualmente più alta di STX, dcSTX e neoSTX rispetto a quella rilevata nella parte edibile del granchio, che presentava invece alte concentrazioni di GTX2 e GTX3 ed assenza di neoSTX e dcSTX [33]. In un caso di avvelenamento fatale per due pescatori cileni che avevano consumato mitili (*Mytilus chilensis*), si evidenziava, nel contenuto gastrico delle vittime, la presenza di STX e GTXs (GTX1-5). Tale profilo tossico era molto simile a quello dei mitili, mentre nelle urine e nella bile delle vittime le tossine presenti erano, principalmente, neoSTX e GTX4/GTX1 epimeri [34]. Questi casi evidenziano la possibilità di una trasformazione metabolica delle saxitossine. Il caso cileno, sopra riportato, indica che le STXs o i suoi metaboliti sono trasportati in vari tessuti del corpo umano, cervello compreso, superando in tal modo la barriera emato-encefalica, nonostante le cariche presenti nella molecola. Questi dati, tuttavia, devono essere valutati con molta attenzione perché il profilo tossicologico naturale può essere falsato dal metodo analitico utilizzato per l'estrazione delle saxitossine. Infatti, le STXs generalmente vengono estratte facendo bollire un omogenato di parte edibile di molluschi con una soluzione acquosa di HCl.

La molarità dell'HCl, che determina il pH di estrazione, è molto importante in quanto può riuscire ad idrolizzare le saxitossine N-solfocarbammate in carbammate ad alta tossicità (Fig.6)

Ciò che maggiormente sorprende sono l'efficienza e la rapidità con cui le STXs, considerato il loro stato di carica, vengono assorbite dall'apparato digerente e inviate in circolo senza essere eliminate almeno in parte dalle feci [35,32,36].

Dalla casistica sulle intossicazioni da PSP nell'uomo si evince che, rispetto alla sperimentazione animale, l'uomo, a parità di concentrazione, risulta essere più vulnerabile alle STXs ed accusa sintomi più gravi. Ciò dipenderebbe dalla velocità d'assorbimento della tossina nel tratto gastrointestinale, dal metabolismo e dalla velocità con cui queste tossine sono eliminate con le urine; ovviamente riveste molta importanza anche lo stato fisico di partenza dell'individuo.

La sperimentazione animale ha evidenziato che l'eliminazione della saxitossina attraverso le urine è del 19%, durante le prime 4 ore, e raggiunge il 58% nelle 24 ore [37].

I bambini sono molto più sensibili all'intossicazione rispetto agli adulti. In Guatemala nel 1987, durante un grave episodio di avvelenamento da PSP, con 24 decessi su 154 persone intossicate, la mortalità dei bambini con età inferiore ai 6 anni era del 50%, mentre quella degli adulti del 7% [38,39].

I sintomi da PSP, rilevati in Alaska dal 1973 al 1994, su 143 casi episodi di intossicazione, sono molteplici (Tab.5)

Tab. 5. Sintomatologia rilevata durante numerosi casi di intossicazione da PSP

Sintomatologia	Numero di persone accusanti il sintomo
Parestesia	113
Torpore alle labbra	64
Formicolio alle labbra	61
Nausea	45
Torpore alle estremità degli arti	43
Formicolio delle estremità degli arti	39
Vomito	34
Debolezza	33
Atassia	32
Respiro breve	29
Vertigini	28
Sensazione di volare	24
Secchezza della bocca	23
Diplopia	19
Disartria	16
Diarrea	10
Disfagia	6
Paralisi degli arti	4

La sintomatologia è prevalentemente di tipo neurologico, mentre quella gastrointestinale, come nausea, vomito, diarrea e dolori addominali, è meno comune e in molti casi assente. La rapidità con cui questi sintomi si manifestano è strettamente legata sia alla quantità che alla qualità del profilo tossicologico delle tossine ingerite. Generalmente i primi sintomi si manifestano da 30 minuti a 2 ore dopo l'introduzione del cibo. I casi che si concludono con la morte, si verificano generalmente da 3 a 12 ore dopo l'ingestione del cibo.

Trascorse 12 ore dall'assunzione di cibo contaminato, indipendentemente dalla quantità di tossina ingerita, le vittime cominciano a gradualmente a ristabilirsi e, dopo alcuni giorni, i sintomi dell'avvelenamento scompaiono [26,40].

La saxitossina esplica la sua attività tossica anche per aerosol, con una LCt₅₀ (concentrazione letale nel tempo) calcolata in circa 5 mg/min/m³, mentre attraverso le ferite aperte, sono stati stimati disturbi gravi con 0,05 mg di STX/persona [41].

3.4 Eziologia

Di alcuni generi di dinofitocofite marine, fanno parte specie in grado di produrre tossine PSP; STXs sono prodotte anche da alcuni cianobatteri di acqua dolce, da una macroalga rossa e da alcune specie di batteri (Tab. 6).

Tab. 6. Organismi produttori di tossine PSP.

Gruppo	genere-specie
Dinofitocofite	Alexandrium: <i>A. catenella</i> , <i>A. andersonii</i> , <i>A. catenella</i> , <i>A. fundyense</i> , <i>A. minutum</i> , <i>A. ostenfeldii</i> , <i>A. tamarense</i> , <i>A. tamiyavanichii</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i>
Cianofitocofite	<i>Anabaena perturbata</i> var. <i>tumida</i> Aphanizomenon: <i>A. flos-aquae</i> , <i>A. isatschenkoii</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> Dolichospermum: <i>D. circinale</i> , <i>D. lemmermannii</i> , <i>D. spiroides</i> <i>Lyngbya wollei</i> <i>Planktothrix</i> sp. <i>FP1</i>
Batteri	<i>Moraxella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>
Rodofite (alghe rosse)	<i>Jania</i> sp.

Si tratta di organismi ubiquitari, ritrovabili sia in acque marine temperate che in condizioni estreme (Alaska, Terra del Fuoco). La loro continua colonizzazione potrebbe essere imputabile al traffico marittimo: infatti possono essere trasportate sia per adesione alle carene degli scafi, che con le acque di zavorra delle navi. Anche la reimmersione di molluschi bivalvi vivi, in acque diverse da quelle di origine, può determinare il trasporto di questi organismi da un'area marina ad un'altra.

Ne consegue che le aree incontaminate da biotossine marine sono sempre meno numerose. Il numero di cellule/L di microalghe tossiche che possono determinare un accumulo di tossine PSP nei bivalvi, non deve essere necessariamente alto. In Giappone sono stati documentati casi in cui molluschi bivalvi sono risultati contaminati in ambienti in cui la concentrazione di fitoplancton tossico era di poche decine di cellule per litro [27]. Occorre inoltre tenere presente che molti di questi organismi possono, durante il loro ciclo vitale, produrre delle cisti che, a loro volta, possono risultare più tossiche della loro forma vegetativa [8].

In Europa nel 1976, nelle rias meridionali della Galizia, è stata dimostrata la presenza di *Gymnodinium catenatum* [42]. Questa specie ha creato numerosi e gravi episodi di avvelenamento da PSP in molti Paesi dell'Europa, Italia compresa, per il consumo di mitili spagnoli provenienti da queste aree. *Alexandrium tamarense* è presente nelle coste atlantiche della Danimarca, Germania, Olanda, Francia, Irlanda e Italia. La prima segnalazione di *Alexandrium ostenfeldii* è avvenuta in Danimarca [43]. Nel 1998 nelle coste francesi del Mediterraneo (laguna di Thau), sono state riscontrate, in molluschi bivalvi, concentrazioni di PSP superiori a 8.000 µg STX eq./kg p.e. Tale episodio è stato recentemente attribuito ad una fioritura di *Alexandrium catenella*, specie introdotta probabilmente da una zona del Pacifico [44].

In Italia il primo caso di PSP è stato registrato nel maggio 1994, lungo la costa emiliano romagnola, in concomitanza alla presenza di *A. minutum* in concentrazioni

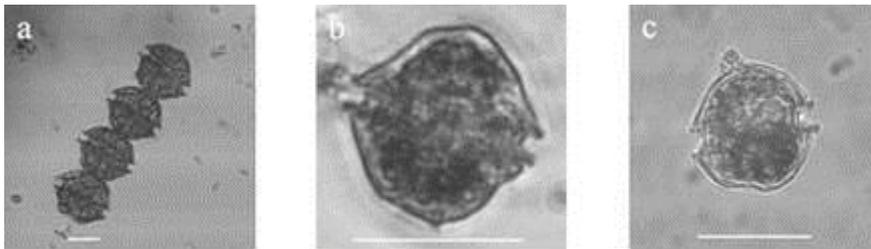
di circa 80.000 cell/L. Questa specie ha determinato il primo divieto di raccolta e commercializzazione di mitili per tossine PSP oltre il limite di legge (800 µg STX eq./kg di parte edibile) [45].

Il divieto di raccolta dei mitili si è reso necessario anche in in Sardegna per una fioritura di *A. catenella*: nel maggio 2002 nel Golfo di Olbia e alla fine del 2006 nel Golfo di Oristano. Il profilo tossico dei mitili prelevati in queste aree concordava con il profilo tossico dell'alga presente [46] ed era caratterizzato dalla predominanza di tossine C1, C2, GTX 1,4 e GTX5 (B1) [47]. Contaminazioni di questo tipo si sono verificate anche negli anni successivi, a dimostrazione che queste aree sono da considerarsi potenzialmente a rischio per la presenza di tossine PSP.

Nei mitili raccolti in Sicilia nel mese di febbraio 2007, la maggiore concentrazione di GTX 1,4 rispetto a GTX 2,3 era in accordo con la presenza nell'acqua di *A. minutum*. Questo profilo era già stato evidenziato durante i *bloom* della stessa microalga accaduti sempre in Sicilia dal 2001 al 2005, in particolare in un campione naturale raccolto nell'aprile 2003 nel Porto di Siracusa in cui *A. minutum* era presente a concentrazioni di $1,2 \times 10^6$ cell/L di [48].

Anche nei mitili dell'Emilia Romagna prelevati nell'agosto 2007, da Goro (FE) a Misano Adriatico (RN), il profilo tossico riscontrato era in accordo con la presenza, nella colonna d'acqua, di *A. minutum* (Fig.7). In particolare nei campioni del tratto di costa settentrionale della regione erano prevalenti le tossine GTX 2,3 mentre in quello meridionale le GTX 1,4 [49].

Fig.7. *Alexandrium* spp. identificati nelle tre aree di studio:
(a) *A. catenella* del Golfo di Oristano; (b) *A. minutum* del Porto Grande di Siracusa;
(c) *A. minutum* della costa emiliano romagnola. Barra = 20 µm.



3.5 Prodotti della pesca interessati dalla PSP

Diversi organismi marini sono in grado di accumulare tossine idrosolubili del tipo PSP. Di seguito vengono presi in considerazione contaminazioni di alcune categorie di prodotti della pesca maggiormente interessati dal fenomeno (bivalvi, gasteropodi, crostacei e pesci).

3.5.1 Molluschi bivalvi

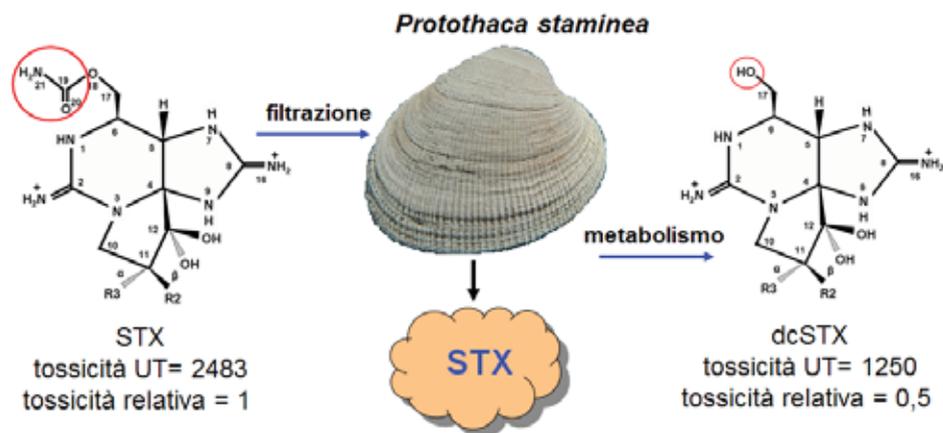
I molluschi bivalvi sono i prodotti della pesca principalmente esposti alle tossine PSP, in quanto organismi filtratori; il filtrato viene accumulato nella ghiandola digestiva, l'epatopancreas. La loro capacità di filtrazione può variare considerevolmente sia da specie a specie, che nell'ambito della stessa specie. I fattori che regolano questi meccanismi sono molteplici, ma principalmente sono riconducibili allo stato fisiologico dell'animale e alle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua. La capacità dei molluschi bivalvi di accumulare tossine dipende: dalla concentrazione di fitoplancton tossico

presente nell'acqua, dal rapporto introduzione ed escrezione, dalla trasformazione delle molecole più tossiche di STX in altre meno tossiche, dalle dimensioni dei molluschi (in quanto cambia il rapporto epatopancreas/parte edibile) e dalla concentrazione dell'altra componente fitoplanctonica.

Le concentrazioni molto elevate di tossine PSP ritrovate nei molluschi bivalvi ci inducono a pensare che questi non siano particolarmente sensibili alle saxitossine. Questo è stato ricondotto al fatto che nei molluschi i nervi e i muscoli operano principalmente attraverso i canali del Ca^{++} e non del Na^+ come negli altri animali [2]. Tuttavia, ricerche condotte *in vitro*, su nervi di molluschi bivalvi trattati con STX, hanno evidenziato che differenze significative di accumulo di queste tossine, fra le varie specie, dipendono dalla diversa sensibilità delle cellule alle tossine. Alcuni bivalvi, infatti, in presenza di microalghe produttrici di STX attivano una diminuzione della filtrazione o una sua completa inibizione, con la chiusura delle valve [50].

Le ostriche, in alcuni casi, hanno dimostrato una sensibilità superiore alle tossine PSP rispetto ai mitili [6], mentre altri molluschi, come *Mercenaria mercenaria* (quahog), hanno evidenziato la capacità di sottrarsi alle microalghe tossiche chiudendo le valve e riaprendole soltanto quando queste non sono più presenti nell'acqua [30]. La vongola *Protothaca staminea*, invece, fa fronte alle tossine carbammate (GTX 1,4, neoSTX e STX) ingerite con *Alexandrium* spp., metabolizzandole nei corrispondenti decarbammate meno tossici [51]. Questa specie, inoltre, è in grado di ridurre l'esposizione alle STXs anche attraverso una loro rapida eliminazione (Fig.8). [52].

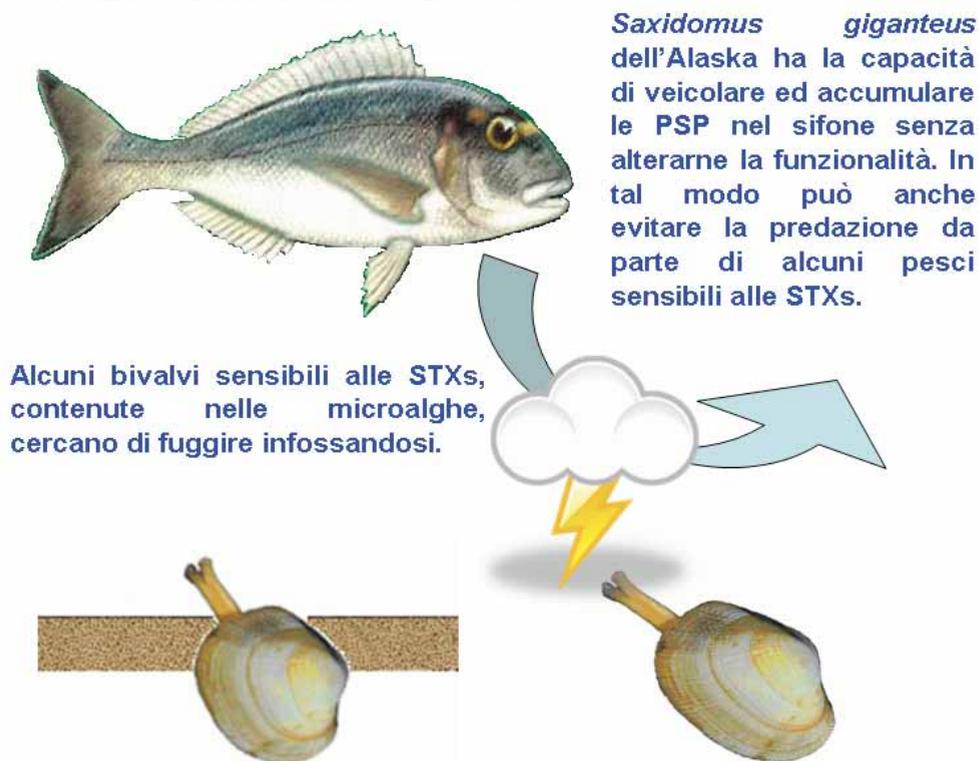
Fig. 8. Reazione del mollusco bivalve *Protothaca staminea* alla presenza di STX
Il bivalve *Mya arenaria*, raccolta nel Nord America (coste dell'Oceano Atlantico), in



determinato una modificazione del piede: esperimenti in laboratorio hanno messo in evidenza che *Mya arenaria*, raccolta in acque soggette a fioriture di *A. tamarensis* (strain tossico), dimostra la sua sensibilità a queste microalghe cercando di sfuggire alla presenza delle tossine infossandosi. Questo comportamento non avviene per *M. arenaria* presa in acque non soggette a fioriture di microalghe tossiche, perché il piede del bivalve, organo utilizzato per scavare nella sabbia, rimane invece paralizzato dalle STXs [53]. Per il mollusco *Saxidomus giganteus* la resistenza alle STXs sembra essere innata e quindi, anche gli esemplari raccolti in aree dove non si sono mai verificate fioriture di microalghe produttrici di STXs, mostrano la medesima resistenza alle tossine [54].

In generale è la ghiandola digestiva dei molluschi bivalvi l'organo che accumula la maggior parte delle saxitossine, anche se esemplari di *Saxidomus giganteus* dell'Alaska, raccolti in occasione di fioriture di alghe tossiche, hanno evidenziato un accumulo di saxitossine (fino al 60-80%) nel sifone, senza alterarne la funzione [27,55,56]. Questo potrebbe essere interpretato come un meccanismo utilizzato dai bivalvi per proteggersi dai predatori (otarie, gabbiani, pesci, ecc.) (Fig.9) [54].

Fig. 9. Reazione di alcuni bivalvi alla presenza di STXs



I mitili sono in grado, durante una fioritura di microalghe tossiche, di concentrare oltre 800 µg STX eq./kg p.e. in un'ora [57]. I mitili sono anche i bivalvi in cui sono state documentate le concentrazioni più alte di STXs [58]; alcuni esempi: *Mytilus edulis* 20.000 µg/kg; *Chlamys rubida* 11.945 µg/kg; *Saxidomus giganteus* 7.750 µg/kg; *Siliqua alta* 3.294 µg/kg; *Clinocardium nuttalli* 2.252 µg/kg; *Crassostrea gigas* 910 µg/kg.

Di seguito si riporta un elenco di alcune specie di molluschi in cui è stata documentata la presenza di STXs (Tab.7) [59].

Tab. 7. Molluschi bivalvi in cui è stata rilevata la presenza di tossine del tipo PSP [59].

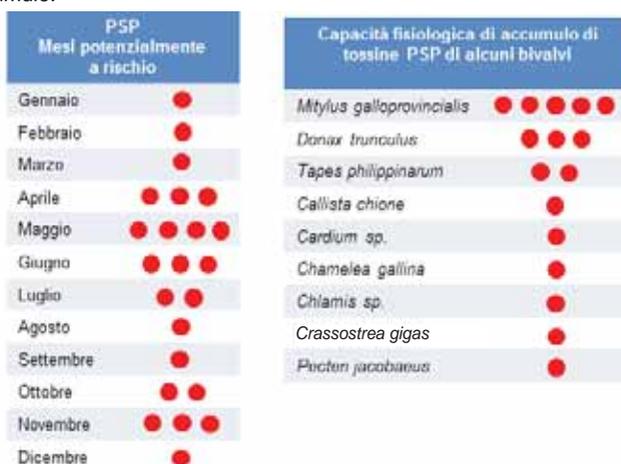
Specie	
<i>Acanthocardia tuberculatum</i>	<i>Ostrea edulis</i>
<i>Amphichaena kindermanni</i>	<i>Soletellina diphos</i>
<i>Argopecten irradians</i>	<i>Saxidomus giganteus</i>
<i>Callista chione</i>	<i>Patinopecten yessoensis</i>
<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Placopecten megallanicus</i>
<i>Chamelea striatula</i>	<i>Protothaca staminea</i>
<i>Clinocardium nutalli</i>	<i>Scrobicularia plana</i>
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Siliqua patula</i>
<i>Donax trunculus</i>	<i>Spisula solidai</i>
<i>Ensis siliqua</i>	<i>Spisula solidissima</i>
<i>Mya arenaria</i>	<i>Tapes (Amygdala) japonica</i>
<i>Mytilus californianus</i>	<i>Venerupis rhomboides</i>
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Venus verrucosa</i>

In Italia, il primo episodio di contaminazione da PSP con livelli superiori al limite di legge (800 µg STX eq./kg p.e.) si è verificato nella primavera del 1994 in mitili raccolti nel Mare Adriatico, nelle barriere frangiflutti della costa emiliano-romagnola. La concentrazione massima registrata è stata di 1.920 µg di STX /kg p.e. [60, 61].

Successivamente, altri episodi di contaminazione da tossine PSP hanno interessato le coste italiane determinando il divieto di raccolta dei mitili. Le concentrazioni massime rilevate sono state: 2.840 µg STX eq./kg p.e. nel Golfo di Olbia (maggio 2002), 1.720 µg STX eq./kg p.e. nel Golfo di Oristano e 921 µg STX eq./kg p.e. a Siracusa. L’analisi chimica effettuata in HPLC su campioni di mitili prelevati nel Golfo di Oristano ha messo in evidenza il seguente profilo tossicologico: GTX 1/4 (3,35 µmol/kg p.e.), C1, C2 (2,94 µmol/kg p.e.), GTX5 (B1) (2,07 µmol/kg p.e.), GTX 2/4 (0,34 µmol/kg p.e.), dcSTX (0,06 µmol/kg p.e.), GTX6 (B2) (1,77 µmol/kg p.e. soltanto semiquantitativa). La somma di queste STXs, moltiplicate ognuna per il loro fattore di tossicità equivalente (secondo Oshima), indica una concentrazione complessiva di 1.529 µg STX eq./kg p.e.

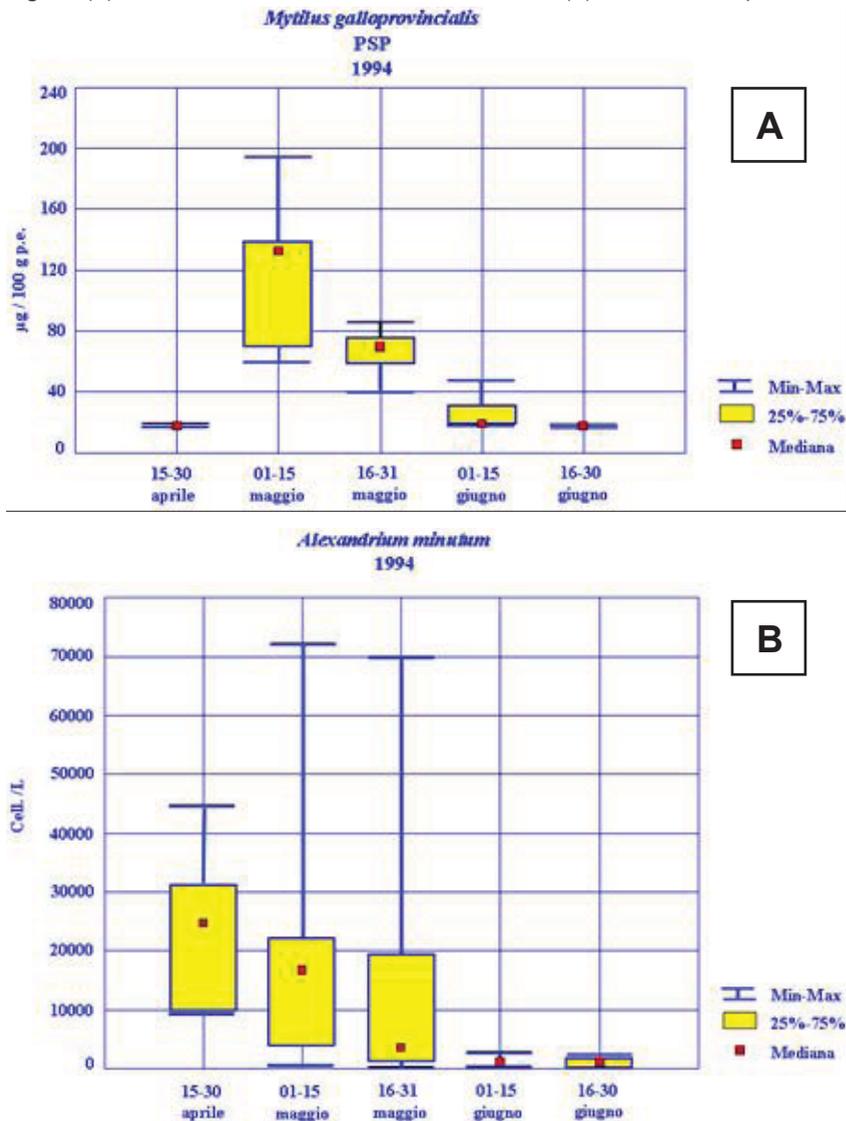
Le numerose analisi per la ricerca di tossine PSP, che il Centro Ricerche Marine ha effettuato sin dal 1976 in diverse specie di molluschi bivalvi raccolti in Italia, hanno permesso di elaborare alcune indicazioni sui potenziali rischi di accumulo di PSP in alcune specie di molluschi bivalvi, relativamente al loro potere di filtrazione e al periodo stagionale (Fig.10).

Fig.10. Accumulo di tossine PSP in alcuni molluschi bivalvi raccolti nei mari italiani: mesi potenzialmente a rischio e capacità fisiologica di accumulo.



Un aspetto molto importante legato alla sicurezza alimentare dei molluschi bivalvi, così come alla redditività degli allevamenti o della raccolta in banchi naturali, è il periodo di decontaminazione da queste tossine. La decontaminazione da STXs in alcuni molluschi bivalvi, dopo una fioritura di alghe tossiche, è talvolta molto rapida, così come lo era stata la contaminazione, mentre in altre occasioni i tempi sono estremamente lunghi. Ad esempio in organismi del genere *Ostrea*, che al contrario dei mitili accumula le tossine più lentamente, la decontaminazione è molto più lenta. In *Saxidomus giganteus* la contaminazione da STX può durare anche anni [5]. Nei mitili della costa emiliano-romagnola, che nella primavera del 1994 accumularono circa 1.920 μg STX eq./kg di p.e., la decontaminazione (a concentrazioni inferiori a 600 μg STX eq./kg di p.e.), e quindi inferiori al limite di legge, si verificò in circa 15 giorni (Fig.11) [61].

Fig. 11. (A) Accumulo e decontaminazione di PSP in Mitili. (B) Presenza di fitoplancton tossico.



3.5.2 Gasteropodi

I gasteropodi accumulano tossine PSP o attraverso la predazione di animali contaminati o direttamente attraverso le cisti di alghe tossiche che si depositano sul fondo, essendo alcuni di essi organismi detritivori.

Tra i gasteropodi implicati in intossicazione da PSP [27] ricordiamo: *Thais lapillus*, *Lunatia heros*, *Turbo* spp., *Tectus* spp., *Lambis lambii*, *Neptunea decemcostata*, *Colus stimpsoni*. Nel mare del Giappone sono state trovate PSP in quattro specie di gasteropodi [62]: *Turbo marmorata*, *T. argyrostoma*, *T. pyramis*, *T. nilotica maxima*.

Il mollusco bivalve *Hiatula diphos* è stato alimentato con una coltura di *Alexandrium minutum*, per caratterizzare e quantificare le tossine accumulate. Gli organismi, una volta contaminati, sono stati dati in pasto a gasteropodi carnivori della specie *Babylonia aerolata*. La composizione delle saxitossine (STXs), sia nei bivalvi che nei gasteropodi utilizzati nell'esperimento, era simile sulla di *A. minutum*. In particolare le GTX1,4 trasmesse da *A. minutum* sono state trovate soltanto nei visceri dei gasteropodi, con una significativa trasformazione di GTX1 (UT 2.468) in GTX2 (UT 869) e GTX4 (UT 1.803). Questa biotrasformazione portava ad una riduzione della tossicità, malgrado un aumento della concentrazione delle STXs totali [63].

Nel 1990, durante un monitoraggio per il controllo delle biotossine marine nel litorale ovest del Sud Africa, è stata rilevata la presenza di STXs in gasteropodi marini della specie *Haliotis midae* [64]. Successive analisi hanno dimostrato la contaminazione di STXs anche in altri gasteropodi marini. Infatti, l'area di raccolta dei gasteropodi era stata interessata da una fioritura di *Alexandrium catenella*. La tossicità degli animali era variabile e la saxitossina era il composto maggiormente rappresentato, diversamente da quanto emergeva dal profilo tossico di *A. catenella*. Questa osservazione poteva indicare che *Haliotis midae* aveva la capacità di trasformare le saxitossine, oppure che la fioritura di *A. catenella* non era la fonte primaria delle STXs. Lo studio metteva in evidenza inoltre la distribuzione delle STXs nei vari tessuti: il muscolo del piede, che contribuisce sostanzialmente al peso totale dei tessuti molli ed è la parte edibile, aveva un basso livello di contaminazione. *Haliotis midae* dimostrava di avere una scarsa capacità di eliminare le STXs e questo poteva rappresentare una seria minaccia per la salute dei consumatori e portare a gravi danni economici all'industria della pesca. Nel periodo 1994-95 è stato condotto uno studio dettagliato della presenza di tossine PSP in gasteropodi della specie *Haliotis tuberculata* raccolti lungo alcune coste spagnole. L'analisi chimica in HPLC mostrò la presenza di decarbamoil-saxitossina (dcSTX, 79-100%) e STX. La tossicità in *Haliotis*, in alcuni campioni, era rilevata nel muscolo e non nei visceri, diversamente da quanto segnalato in altri studi che evidenziavano nei visceri le concentrazioni più alte di STXs [64,65].

Questo faceva supporre che le tossine accumulate nel muscolo non erano dovute all'alimentazione del momento, ma trasportate nel muscolo in tempi precedenti. Gli stessi gasteropodi mantenuti in laboratorio per 3 mesi ed alimentati con macroalghe non tossiche non mostravano riduzione della tossicità. Presenza di PSP era segnalata nei visceri di *Haliotis* raccolti nella baia di Lorne (Victoria zona occidentale dell'Australia) dove erano state rinvenute nei sedimenti e lungo la colonna d'acqua numerosissime cisti di *Gymnodinium catenatum* dopo una fioritura della stessa alga [66].

3.5.3 Crostacei

L'insorgenza di episodi di PSP dovuta a crostacei contaminati è poco conosciuta; ciò probabilmente dipende dal fatto che l'accumulo di saxitossine avviene generalmente nell'epatopancreas, che solitamente non viene consumato.

I crostacei sono capaci di accumulare concentrazioni importanti di STXs e mantenerle per molto tempo [31]. Il profilo di queste tossine vede predominare la neosaxitossina (neoSTX) e la saxitossina (STX); seguono, in piccole percentuali, la decarbossisaxitossina (dc-STX) e le gonyautossine 1 e 3 (GTX 1,3) [62,67]. STXs sono state trovate in granchi delle barriere coralline del Giappone (*Platypodia granulosa*, *Atergatis floridus*, *Zosimus aeneus*) e in un granchio di sabbia della California (*Emerita analoga*). Intossicazioni e casi mortali per il consumo di granchi sono stati registrati nelle Filippine con *Demania* sp., nelle New Hebrides con *Zosimus aeneus* e in Thailandia con *Tachypleus gigas* [27].

STXs sono state caratterizzate in dieci specie di granchi appartenenti a quattro famiglie diverse, pescati nelle acque del Giappone [63]: *Z. aeneus*, *P. granulosa*, *A. floridus*, *Neoxanthias impressus*, *Actaeodes tomentosus*, *Eriphia scabricula*, *Pilumnus vesperilio*, *Actaea polyacantha*, *Schizophrys aspera*, *Thalamita* sp. e *Percnon planissimum*.

Alla lista dei granchi potenzialmente tossici sono stati aggiunti altre specie quali [68]: *Euzanthus exsculptus*, *Lophozozymus octodentatus*, *Platypodia pseudogranulosa*. La famiglia degli *Xantidi* rappresenta quella con più specie tossiche conosciute. Altre famiglie di crostacei accumulano STXs, ma i livelli di tali tossine non hanno mai raggiunto, per ora, quelli ritrovati nelle specie appartenenti agli *Xantidi*. I ricercatori ritengono che in alcuni *Xantidi* ci sia un meccanismo di resistenza alla STXs, che si esplica attraverso una proteina, farmacologicamente attiva, molto simile alla saxifilina contenuta nell'emolinfia. Altre famiglie di crostacei tendono ad accumulare STXs in concentrazioni subletali, ma anche a concentrazioni che provocano la loro morte. I granchi che accumulano questo tipo di tossina hanno la caratteristica comune di vivere sulle barriere coralline e di alimentarsi con quello che trovano sulla loro superficie [2]. STXs sono state trovate nei visceri di gamberi pescati nel litorale di Victoria, in Australia, probabilmente accumulate attraverso la catena alimentare [66].

3.5.4 Pesci

I pesci possono essere esposti alle STXs, durante le fioriture di microalghe tossiche, attraverso l'acqua o l'alimentazione. In quest'ultimo caso le STXs arrivano ai pesci attraverso la catena alimentare più o meno complessa, che comprende il consumo diretto di fitoplancton tossico, di zooplancton erbivoro, di molluschi bivalvi o di altri pesci che si alimentano con materiale contaminato. I pesci contaminati con STXs perdono, di solito, il loro assetto normale di nuoto e boccheggiano vistosamente in superficie; tuttavia, possono superare questa situazione se l'avvelenamento non è molto grave. I pesci sembrano essere estremamente sensibili alle STXs, che se assorbite da parte dell'intestino, possono provocarne la morte. Fioriture di dinoflaccie tossiche, del genere *Alexandrium*, sono la causa di estese morie di aringhe nel Canada orientale, di perciformi (Sand lance) e di clupeidi in Inghilterra e negli Stati Uniti nord-orientali. Esperimenti hanno indicato che sia gli adulti che le fasi larvali di pesci sono sensibili alle STXs [69]. La maggior parte delle STXs, nei pesci, viene accumulata nei visceri, mentre il filetto rimane praticamente incontaminato.

Larve e post-larve di *Mallotus villosus* e *Clupea harengus*, esposte a concentrazioni variabili di *A. tamarense* (ceppi tossici), hanno dimostrato di essere molto vulnerabili

alle tossine. La mortalità delle larve sottoposte al trattamento di *A. tamarensis* era proporzionale alla quantità delle microalghe ingerite. Alla concentrazione di 1.500 cellule/mL, la mortalità delle larve di *Mallotus villosus* e *Clupea harengus* era rispettivamente del 92% e 77%. La mortalità di post-larve di aringhe (*Clupea harengus*), nutrite con zooplancton tossico da PSTs, variava giornalmente dal 17% al 36% ed era in relazione all'età, alla dose consumata e all'efficienza della digestione di questi pesci [70].

Casi mortali da PSP, per consumo di pesci, sono stati registrati nel Brunei, Sabah, New Britain ed in Papuaia (Nuova Guinea) [27,71]. In Indonesia è stata documentata un'intossicazione da PSP dopo il consumo di clupeiformi (genere *Sardinella*) e perciformi (genere *Selaroides*) che ha coinvolto 191 persone, con quattro decessi. In questo caso non è stato possibile individuare le microalghe tossiche responsabili, in quanto questi pesci si alimentano di zooplancton, percorrendo vaste aree. Tuttavia è stato ipotizzato che proprio lo zooplancton possa aver trasferito le tossine microalgali ai pesci [2].

STXs, principalmente STX, sono state trovate nel fegato e negli intestini di sgombri (*Scomber scombrus*) pescati nell'Atlantico, a seguito di una piccola fioritura di *Alexandrium fundyense*, nella baia di Fundy (New Brunswick, Canada). I muscoli degli sgombri non sono stati analizzati, ma i tratti gastrointestinali contenevano molto meno tossina rispetto al fegato. Questi sgombri sono stati anche considerati la fonte di una moria di aringhe [72]. Alcuni autori hanno segnalato che sgombri, alimentati con anguille contaminate da STXs, accumulavano le tossine nel filetto [73].

Analisi condotte su *Scomber japonicus*, in occasione di un'estesa moria avvenuta nelle coste argentine a seguito di una fioritura di *A. tamarensis*, mostravano rilevanti concentrazioni di STXs nel contenuto stomacale (2.800 µg STX eq./100g), ma anche nel fegato (361 µg STX eq./100g) e nelle branchie (72 µg STX eq./100g). Nel muco stomacale dei pesci morti erano presenti

numerose cellule di *A. tamarensis*. Le STXs estratte dalle branchie indicavano che l'assimilazione di tossine attraverso questi organi poteva essere un'altra importante via d'intossicazione [74].

Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che le PST accumulate dallo sgombrino potrebbero essere state la causa di morte delle balene di Cape Cod Bay, così come per la morte di mammiferi marini attribuita a STXs trasportate lungo la catena alimentare [75]. Sgombri campionati nel Golfo di St. Lawrence (Canada), da maggio a ottobre del 1993, hanno mostrato la presenza di STXs relativamente alla loro età, ipotizzando come possibile fonte lo zooplancton contaminato [76]. Questo può diventare un grosso rischio potenziale di mortalità per i grandi predatori marini (tonno, pesce spada, palombo, ecc.), ma anche per mammiferi e uccelli marini.

In Florida (USA), dal gennaio all'aprile del 2002, sono stati segnalati 13 casi d'intossicazione per consumo di pesci (Tetrodonti), tuttavia questi pesci non contenevano tetrodotossina, ma soltanto STXs [77].

3.6 Incidenti e distribuzione di PSP

La PSP è una delle più comuni forme mortali di avvelenamento da consumo di prodotti ittici. Statistiche elaborate negli U.S.A., che hanno preso in considerazione tutti i casi di avvelenamento da prodotti alimentari, attribuiscono alla PSP un'incidenza di circa l'1% [78,79]. Statisticamente questa percentuale non risulta importante in termini di numero di persone avvelenate, ma è l'incidenza della mortalità delle persone avvelenate ad essere preoccupante.

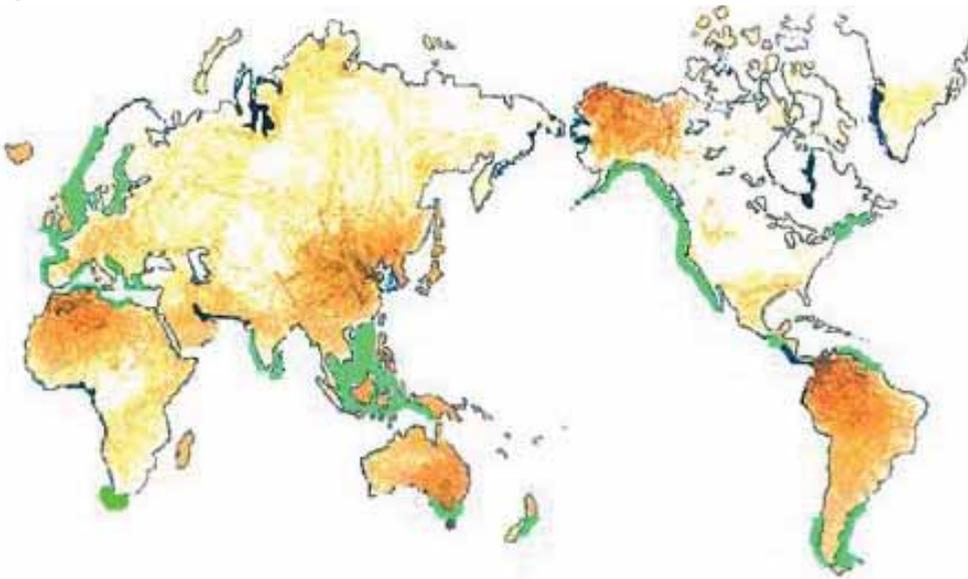
L'aumento di episodi HAB, in termini di frequenza, intensità e distribuzione

geografica, ha potenzialmente aumentato la possibilità di casi di avvelenamento da tossine PSP. Il monitoraggio delle condizioni igienico-sanitarie dei prodotti della pesca, che molti Paesi hanno organizzato con particolare riferimento ai molluschi bivalvi, ha permesso di attenuare considerevolmente i casi di avvelenamento da PSP. Nel 1974 il numero di incidenti da PSP era stimato in circa 1600 casi in tutto il mondo, di cui 300 mortali [80]. Mentre la mortalità da PSP nel mondo è stimata essere dell'8,5% dei casi di avvelenamento [27], diventa inferiore all'1% nei Paesi dove sono stati impostati adeguati piani di monitoraggio delle aree produttive. Numerosi sono i casi registrati in Asia: dal 1991 sono documentati tre episodi di PSP con 240 casi di avvelenamento, di cui 2 mortali [81,82]. In Giappone i casi di PSP sono noti sin dal 1948 [83]. Nel 1997 a Nagasaki su 26 persone intossicate, 16 sono state ospedalizzate [84]. In Venezuela, nel 1977, le persone intossicate sono state 256 con 10 casi mortali; in Guatemala, nel 1987, le persone intossicate sono state 187 con 26 casi mortali. Un caso recente (2002) è stato registrato in Patagonia, dove due pescatori sono morti dopo 4 ore, per aver ingerito solamente 7-8 mitili [85].

Si sospetta, comunque, che queste cifre siano largamente sottostimate, in quanto in molti Paesi non vi sono controlli e non sempre le intossicazioni vengono rilevate o denunciate.

Nella figura seguente (Fig.12), sono evidenziate le aree che sono state interessate da incidenti di PSP.

Fig. 12. In verde, casi di PSP documentati nel mondo.



3.6.1 Distribuzione in Europa

Gli episodi di PSP in Europa non sono molto numerosi e questo è il risultato di attenti monitoraggi che ogni Paese ha organizzato ancora prima che la Comunità europea emanasse direttive precise sul controllo igienico-sanitario dei prodotti della pesca. Tuttavia, casi di avvelenamento sono stati segnalati in Norvegia sin dal 1901, per un totale di 32 persone colpite, con due casi mortali [30]. In Inghilterra, il primo episodio di PSP è stato documentato nel 1968, con 78 persone ospedalizzate mentre un secondo caso viene segnalato in Scozia nel 1990, per consumo di mitili e pettini che

presentavano concentrazioni di circa 8.000 µg STX eq./kg di parte edibile. In Francia, casi di PSP sono stati segnalati nel nord della Bretagna, causati da *A. minutum*. In Germania, casi d'intossicazione con sintomi da PSP sono stati segnalati nel 1976, attribuibili a mitili provenienti da Vigo in Spagna. Così pure potrebbe essere accaduto in tre casi del 1987, nella Bassa Sassonia, per mitili in scatola sempre di origine spagnola. Un solo caso è stato documentato in Irlanda nel 1992 in Cork Harbour [43]. Casi di PSP sono stati registrati in Spagna nell'anno 1976 per consumo di mitili. Gli stessi mitili esportati sono stati causa di avvelenamento in alcuni Paesi dell'Unione europea: Francia, Germania, Svizzera e Italia [30]. Per questo episodio in Italia sono stati registrati 38 casi di avvelenamento con ricorso alle cure dei presidi sanitari [86]. Altri episodi sono stati documentati in Spagna nel 1993, per consumo di mitili contenenti sia PSP che DSP [86]. Nella figura seguente (Fig.13) viene riportata la distribuzione di PSP in Europa.

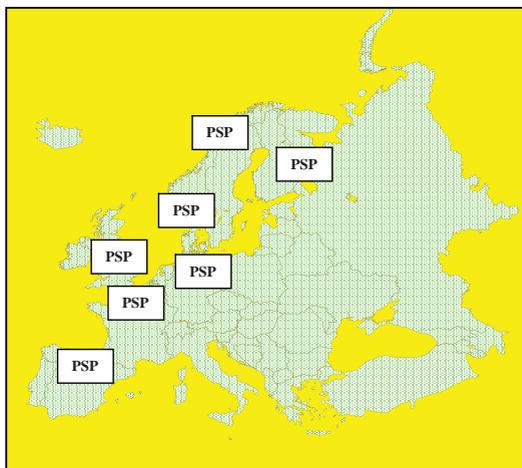


Fig.13. Distribuzione di PSP in Europa.

In Italia le aree di raccolta di mitili considerate potenzialmente a rischio, per accumulo di tossine PSP, sono localizzate nel nord Adriatico, in Sardegna e in Sicilia (Fig.14).



Fig. 14. Aree italiane in cui sono stati rilevati campioni di mitili contaminati da PST.

3.7 Diagnosi

La diagnosi dell'avvelenamento da PSP è basata interamente sulla sintomatologia e al tipo di di alimento ingerito. Una sitomatologia di tipo neurologico associata all'ingestione di molluschi bivalvi e/o di crostacei (questi ultimi però meno pericolosi), rappresentano un quadro classico della sindrome PSP. I sintomi gastrointestinali acuti, che alcune volte accompagnano l'avvelenamento da PSP, possono confondere il quadro clinico, facendo propendere la diagnosi verso un'intossicazione di natura batterica o virale. La PSP può essere differenziata dall'avvelenamento da pesticidi anticolinesterasi, pur manifestando talvolta sintomi molto simili (debolezza muscolare, vomito e diarrea), in quanto nel caso di pesticidi tali sintomi possono essere alleviati con atropine, che non

sono invece efficaci nel trattamento della PSP. Inoltre, l'avvelenamento da pesticidi si manifesta anche con eccessiva salivazione, lacrimazione e secrezione bronchiale [13], che non sono presenti tra i sintomi della PSP.

Un tipo di avvelenamento, che per sintomatologia è del tutto simile a quello della PSP, è quello provocato dalla tetrodotossina. Questa, pur essendo una molecola molto diversa dalle saxitossine, presenta lo stesso meccanismo d'azione e cioè il blocco dei canali dello ione Na^+ . Anche in questo caso la diagnosi deve essere fatta a partire da ciò che il paziente ha ingerito. Aver mangiato pesce, piuttosto che molluschi bivalvi, può far propendere la diagnosi verso l'avvelenamento da tetrodotossina.

Analogo ragionamento può essere fatto per l'avvelenamento da ciguatossine (Ciguatera Food Poisoning o CFP), derivante dal consumo di pesci pescati nelle acque dei mari della fascia tropicale o sub-tropicale. Anche le ciguatossine infatti alterano i canali del Na^+ , favorendo, però, il flusso di ioni Na^+ , meccanismo opposto a quello delle saxitossine.

Attualmente non ci sono test rapidi di laboratorio per diagnosticare in un paziente l'avvelenamento da tossine PSP. Importante è ottenere campioni del cibo da analizzare, al fine di evidenziare l'eventuale presenza di PSP.

3.8 Trattamento

Il trattamento da PSP è sintomatico e non ci sono per ora antidoti per combattere questo avvelenamento. Quando l'ingestione dell'alimento contaminato è recente, il cibo può essere rimosso dallo stomaco con una lavanda gastrica. Altri sistemi sono quelli di far ingerire al paziente tavolette di carbone attivo, che assorbe efficacemente le tossine ancora presenti, o una soluzione di bicarbonato. Nelle Filippine, ai pazienti affetti da PSP è somministrata una bevanda ricavata dalla noce di cocco addizionata con zucchero di canna. Esperimenti sui topi hanno dimostrato che questi ingredienti possono contenere sostanze attive ad effetto disintossicante [13]. L'acidosi lattica, dall'origine sconosciuta, che compare in animali da laboratorio trattati con saxitossina e probabilmente negli esseri umani, può essere trattata con ventilazione assistita e con una somministrazione di liquidi che induce un aumento della escrezione renale della tossina [2]. Il supporto respiratorio e la respirazione artificiale, nei casi più gravi di avvelenamento, sono i sistemi più efficaci per superare la paralisi respiratoria. Senza questo tipo di trattamento, il 75% delle persone seriamente avvelenate da PSP, può morire entro 12 ore. Farmaci possono anche essere somministrati al paziente per aiutare la respirazione artificiale e facilitare il recupero.

3.9 Prevenzione

Il sistema che garantisce un'azione preventiva efficace nel controllo ed ostacola il diffondersi di avvelenamenti da PSP comprende il monitoraggio delle aree di mare dove sono pescati o allevati i prodotti suscettibili di contaminazione. Una particolare attenzione deve essere dedicata ai molluschi bivalvi, coltivati o pescati in banchi naturali, in quanto rappresentano il vettore principale dell'avvelenamento umano. Il monitoraggio in generale deve riguardare il controllo quali-quantitativo del fitoplancton tossico o potenzialmente tossico, oltre alla quantificazione delle tossine sul prodotto pescato. L'efficienza e l'efficacia di questi monitoraggi sono strettamente legate alla frequenza temporale e spaziale dei campioni raccolti, che deve essere rappresentativa dell'area sottoposta al controllo. La conoscenza delle condizioni chimico-fisiche, biologiche e idrodinamiche dell'area di mare, nonché la storia epidemiologica legata alla tradizione del consumo locale di questi prodotti, sono elementi altrettanto importanti per elaborare un piano di controllo efficace nella prevenzione di episodi di PSP.

3.10 Valutazione del Rischio per prodotti ittici con tossine PSP (STXs)

Nella tabella seguente è rappresentata una sintesi della valutazione del rischio per le tossine PSP.

Tab.8. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine PSP.

Distribuzione	Le STXs sono state rilevate in microalghe, molluschi bivalvi e in altri prodotti ittici di: Africa, Asia, Europa, Nord e Sud America, Oceania.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Nei gatti, la STX iniettata i.v. si distribuisce in tutto il corpo. Scompare rapidamente nel sangue (nel plasma il tempo di dimezzamento è di circa 22 minuti). Nel corpo di cani e gatti la STX ha un tempo di dimezzamento di 12-18 ore. L'eliminazione principale della STX avviene attraverso le urine. I dati sul metabolismo umano della STX non sono molto numerosi.
Tossicità in animali (topo)	La tossicità acuta (LD ₅₀) in topo, per via venosa, è di 2,4 - 3,4 µg/kg p.c.; per via intraperitoneale 9,0 - 11,6 µg/kg p.c.; per os 260 - 263 µg/kg p.c..
Meccanismo d'azione	Le STXs agiscono sui canali dello ione Na ⁺ voltaggio-dipendenti (glicoproteine trans-membrana) bloccando il passaggio Na ⁺ . Questi canali sono localizzati nella membrana delle cellule di tessuti eccitabili elettricamente, come le fibre nervose ed i muscoli scheletrici e il loro blocco determina la mancanza di informazioni fra le stesse cellule.
Tossicità nell'uomo	Gli effetti tossici si manifestano dopo 5-30 minuti dall'ingestione di cibo contaminato, con formicolio alle labbra, paralisi facciale e nei casi più gravi con paralisi degli arti, blocco del diaframma, paralisi respiratoria e in seguito con la morte (dopo 2-12 ore dall'ingestione delle STXs). L'esposizione umana alla STX è stata stimata valutando una serie di casi che hanno coinvolto decine di persone, con età variabili dai 3 ai 72 anni. La valutazione di questi ha consentito di classificare i sintomi della PSP in: leggeri, moderati e gravi. Nella sintomatologia leggera è stata valutata un'ingestione di 2-30 µg STX eq./kg p.c.. Per le persone coinvolte nei casi più gravi d'intossicazione le tossine ingerite sono state calcolate da 10-300 µg STX eq./kg p.c.. Gli esperti FAO/IOC/WHO, sulla base di diverse centinaia di intossicazioni umane, hanno calcolato un LOAEL di 2,0 µg STX eq./kg p.c. (120 µg STX eq./persona). Gli esperti EFSA (CONTAM) hanno valutato invece il LOAEL in 1,5 µg STX eq./kg p.c. (90 µg STX eq./persona).
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Sulla base dei LOAEL di 2,0 (FAO/IOC/WHO) e 1,5 µg STX eq./kg p.c. (EFSA), con un fattore d'incertezza di 3, gli ARfDs sono stati calcolati in 0,7 µg STX eq./kg p.c. (42 µg STX eq./persona) (FAO/IOC/WHO) e in 0,5 µg STX eq./kg p.c. (30 µg STX eq./persona) (EFSA/CONTAM).

In Tab.9 sono riportati i valori dei Limiti Guida:

Tab. 9. Limiti Guida in relazione alla Parte Edibile Assunta.

Parte edibile ingerita in grammi	Limite Guida * µg STX eq./kg p.e.		Limite µg STX eq./kg p.e. Reg. (CE) 853/2004
	FAO/IOC/WHO	EFSA -CONTAM	
100	420	300	800
250	170	120	
400	105	75	

* Calcolo dei limiti elaborati da R.Poletti sul indicazione FAO/IOC/WHO [87] e EFSA/CONTAM [24]

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo delle saxitossine è stato indicato un limite di 0,8 mg di saxitossina 2HCl equivalente/kg di parte edibile [88].

3.11 Bibliografia

1. Taylor F.J.R., 1989. *Red Tide, brown tides and other harmful algal blooms: the view into the 1990's*. Toxic Marine Phytoplankton Edit. Graneli E., Sundstrom B., Edler L., Anderson M.D. Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 527.
2. Kao CY., 1993. *Chapter 4. Paralytic shellfish Poisoning*, pp. 75-86. In: Algal toxins in seafood and drinking water, IR Falconer (ed.). Academic Press, London and New York.
3. Salkowski E., 1885. *Zur Kenntniss de Giftes der Miesmuschel (Mitylus edulis)*. Arch. Pathol. Anat. Physiol. 202:578-592.
4. Schantz, E.J., McFarren, E.F., Schafer M.L. & Lewis, K.H., 1958. *Purified shellfish poison for bioassay standardization*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 41: 160-168.
5. Schantz E.J., 1984. *Historical perspective on paralytic shellfish poison*. In Seafood toxins, EP Ragelis 8ed.) ACS Symposium Series 262, American Chemical Society, Washington, DC. 99-111.
6. Hall, S, Reichardt, PB, 1984. *Cryptic paralytic shellfish toxins*. In: *Seafood Toxins*, EP Ragelis (ed.). ACS Symposium Series 262, American Chemical Society, Washington, DC.
7. Lyndon E. L., 2006. *Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors*. Nat. Prod. Rep. 23, 200–222.
8. Shimizu, Y., 1987. *Dinoflagellate toxins*. In: *Biology of dinoflagellates*, JFR Taylor (ed.). Blackwell Scientific. 282–315.
9. Yasumoto T., Yasamura D., Yotsu M., Michishita T., Endo A. e Kotaki., 1986. *Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin*. Agric. Biol. Chem. 50: 793-795.
10. Tamplin M.L., 1990. *A bacterial source of tetrodotoxins and saxitoxins*. Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology (S.Hall, G. Strichardz, eds) ACS Symposium Series. Am. Chem. Soc. Washington, Vol. 418. 78-84.
11. WHO, 1984. *Aquatic (marine and freshwater) biotoxin*. World Health Organization, p.1 (Environmental Health Criteria 37).
12. Shimizu, Y., 2000. *Chemistry and Mechanism of Action*. Seafood and Freshwater Toxins edited by Luis M. Botana: 151-172
13. Viviani R., 1992. *Eutrophication, marine biotoxins, human health*. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). Marine coastal eutrophication. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. Sci. Total Environ; (suppl.): 631-62
14. Schantz E.J., Mold J.D., Howard W.L., Bowden J.P., Stanger D.W., Lynch J.M., Wintersteiner O.P., Dutcher J.D., Walters D.R., Riegel B., 1961. *Paralytic shellfish poisoning. Some chemical and physical properties of purified clam and mussel poisons*. Can. J. Chem;39: 2117-2123.
15. Nobukuni Ogata and Yoshiaki Ohishi., 2002. *Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na⁺ Channels*. Jpn. J. Pharmacol. 88, 365 – 377
16. Ackerman M. J., Clapham D. E., 1997. *Ion channels – Basic science and clinical disease*. N. Engl. J. Med., 336, 1575-1586.
17. Noda MH., Suzuki H., Numa S., Stuhmer W., 1989. *A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel-II*. FEBS Lett. 259: 213-216.
18. Evans MH., 1965. Cause of death in experimental paralytic shellfish poisoning (PSP). *British Journal of Experimental Pathology* 46: 245–253.
19. Kao CY, Suziki CY, Kleinahus T, Siegman MJ., 1967. *Vasomotor and Respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin*. Arch Int Pharmacodyn 165: 438-

- 450.
20. Martha L. Hernández-Orozco, Ismael Gárate-Lizárraga, 2006. *Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos*. Rev Biomed; 17: 45-60.
 21. Sato C., Ueno Y., Asai K., Takahashi K., Sato M., Engel A., Fujiyoshi Y., 2001. *The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities*. Nature Feb 22; 409(6823):1047-1051.
 22. AOAC., 1990. *Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action*. In Hellrich, K. ed. Official Method of Analysis. 15th Edition, Sec 959.08. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Virginia, USA. pp. 881-882
 23. Oshima Y., 1995. *Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. [note: some errors in the original data values have been corrected]*. J. AOAC Int. 78, 528-532.
 24. Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2006-065E) EFSA Journal (2009) 1019: 1-76
 25. Acres J., Gray J., 1978. *Paralytic shellfish poisoning*. Canadian Medical Association Journal 119(10):1195–1197.
 26. Bower D. J., Hart R. J., Matthews P. A. and Howden M. E. H., 1981. *Non-Protein Neurotoxins*. Clinical Toxicology, 18: 813-863.
 27. Halstead, B.W., Schantz, EJ (1984) Paralytic shellfish poisoning. *WHO Offset Publication* No. 79:1–60. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 28. Prakash A., Medcof J.C., Tennent A.D., 1971. *Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada*. Fisheries Research board of Canada 177.
 29. Harada T., Oshima Y. and Yasumoto T., 1984. *Assessment of potential activation of gonyautoxin V in the stomach of mice and rats*. Toxicol 22 (3): 476-478.
 30. Van Egmond H.P., Aune T., Lassus P., Speijers, G.J.A. and Waldock M., 1993. *Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation*. J.Nat.Toxins 2: 41-83.
 31. Shumway S.E., 1995. *Phycotoxin-related shellfish poisoning; bivalve molluscs are not the only vector*. In Proceeding of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton in Nantes, France, ed. Lassus P., Amsterdam, Elsevier. 18-22.
 32. Gessner B.D., Bell P., Doucette G.J., Moczydlowski E., Poli M.A., Van Dolah F. and Hall S., 1997. *Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks*. Toxicol 35 (5), 711-722.
 33. Llewellyn L.E., Dodd M.J., Robertson A., Ericson G., de Koning C. and Negri A.P., 2002. *Postmortem analysis of samples from a human victim of a fatal poisoning caused by the xanthid crab, Zosimus aeneus*. Toxicol 40 (10), 1463-1469.
 34. Garcia C., del Carmen Bravo M., Lagos M. and Lagos N., 2004. *Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords*. Toxicol 43 (2), 149-158.
 35. Hines HB, Naseem SM and Wannemacher RW Jr., 1993. [3H]-saxitoxinol metabolism and elimination in the rat. *Toxicol* 31 (7), 905-908.
 36. Andrinolo D., Michea L.F, Lagos N., 1999. *Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats*. Toxicol. Mar; 37(3):447-464.
 37. Stafford R.G., Hines, H.B., 1995. *Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection*. Toxicol 33(11):1501–1510.
 38. Rosales-Loessener F., De Porras E. and Dix M.W., 1989. *Toxic shellfish poisoning*

- in Guatemala*. In T. Okaichi, D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.). Red tides: Biology, environmental science and toxicology. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 113-116.
39. Rodriguez D.C., Etzel R.A., Hall S., De Porras E., Velasquez O.H., Tauxe R.V. et al. 1990. *Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala*. Am. Soc. Trop Med. Hyg. 42:267-271.
40. Halstead B.W. 1988. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. Darwin Press. Princeton.
41. Patockaa Jiri and Ladislav Stredab., 2002. *Brief Review of Natural Non-protein Neurotoxins*. The Applied Science and Analysis Newsletter.
42. Estrada M., Sanchez F.J. and Fraga S., 1984. *Gymnodinium catenatum* (Graham) *en las rias gallegas (NO de Espana)*. Inv. Pesq. 48: 31-40.
43. CRL., 1995. State of the art NRLs on marine biotoxins. CRL Rep 01/95, European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins (CRL). Vigo, Spain.
44. Lilly E.L., Kulis D.M., Gentien P. and Anderson D.M., 2002. *Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of Alexandrium catenella from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis*. J. Plankton Res. 24: 443-452.
45. Poletti R., Milandri A., Pompei M., Draisci R., Giannettini L., Lucentini L., 1996. *First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in shellfish from Adriatic Sea*. IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins Edit. Miraglia M., Brera C., Onori R.. Roma 27-31 May 1996.
46. Krock B., Seguel C.G., Cembella A.D., 2007. *Toxin profile of Alexandrium catenella from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Harmful Algae, 6: 734-744.
47. Luglie' A., Giacobbe M.G., Penna A., Milandri A., Poletti R., Sannio F., Fiocca R., Ruiu R., Sechi N., 2003. *Conoscenza e gestione della fascia marina costiera. Presenza e significato di specie di Alexandrium in aree portuali della Sardegna*. 98° Congresso della Società Botanica Italiana. Catania, 24-26 settembre.
48. Giacobbe M.G., Maso' M., Milandri A., Penna A., Poletti R., 2006. *Plankton toxicity and shellfish contamination by phycotoxins in a new Mediterranean locality*. In: Henshilwood K., Deegan B., McMahon T., Cusack C., Keaveney S., Silke J., O'Conneide M., Lyons D., Hess P. (eds.), Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Galway, 14-18 June 2004: 206-214.
49. Milandri A., Cangini M., Costa A., Giacobbe M.G., Poletti R., Pompei M., Riccardi E., Rubini S., Virgilio S., Pigozzi S. 2008. *Caratterizzazione delle tossine PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) in mitili raccolti in differenti aree marine italiane*. Biol. Mar. Medit., 15(1): 38-41.
50. Bricelj V.M., Lee J.H., Cembella A.D., Anderson D.M., 1990. *Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate Alexandrium fundyense in the mussel Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series Vol.63 : 177-188, 29 May 1990.
51. Sullivan J.J., Iwaoka W.T., Liston J., 1983. *Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (Protothaca staminea)*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 465-472
52. Sullivan J., 1982. *Paralytic shellfish poisoning analysis and biochemical investigations*. Ph. D, dissertation, University of Washington, School of Fisheries, Seattle
53. Bricelj V.M., Connell L., Konoki K., MacQuarrie S.P., Scheuer T., Catterall W.A. & Trainer V.L., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. Nature April 7. 434 (7034): 763-767.

54. Kvitek Rikk G., Beitler Mark K., 1991. *Relative insensitivity of butter clam neurons to saxitoxin: a pre-adaptatio for sequestering paralytic shellfish poisoning toxins as a chemical defense*. Mar. Ecol. Prog. Ser. - Vol. 69:47-54.
55. Beitler M. K., Liston J., 1990. *Uptake and tissue distribution of PSP toxins in butter clams*. In: Graneli E. B., Sundstrom L., Edler, Anderson D. M. (eds.) *Toxic marine phytoplankton*. Elsevier, New York, p. 257-262
56. Price R. J., Lee J. S., 1972. *Paralytic shellfish poison and melanin distribution in fractions of toxic butter clam (Saxidomus giganteus) siphon*. J. Fish. Res. Bd Can. 29: 1657-1658
57. Bricelj V.M., Lee J.H. and Cembella A.D., 1991. *Influence of Dinoflagellate cell toxicity on uptake and less of paralytic shellfish toxins in the northern quahog, Mercenaria mercenaria (L)*. Marine Ecology. Progress Series Vol.74 : 33-46.
58. Foster N.R., 1991. *Shellfish drawings from "Intertidal Bivalves: A Guide to Common Marine Bivalves of Alaska"*. University of Alaska Press.
59. Mons M.M., van Egmond H.P. & Speijers G.J.A., 1998. *Paralytic shellfish poisoning: A review*. RIVM Report 388802005.
60. Honsell G., Poletti R., Pompei M., Sidari L., Milandri A., Casadei C., Viviani R., 1996. *In Alexandrium minutum Halim and PSP contamination in the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea)*. In T. Yasumoto, Y. Oshima, & Y. Fukuyo (Eds.), *Harmful and toxic algal blooms*. Proceedings 7th international conference of toxic phytoplankton IOC-UNESCO, Sendai. pp. 77–80.
61. Poletti R., Milandri A., Pompei M., Draisci R., Giannettini L., Lucentini L., 1996. *First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in shellfish from Adriatic Sea*. IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins Edit. Miraglia M., Brera C., Onori R.. Roma 27-31 May 1996.
62. Oshima Y., Kotaki Y., Harada T., Yasumoto T., 1984. *Paralytic shellfish toxins in tropical waters*. In: *Seafood toxins*, EP Ragelis (ed.). ACS Symposium Series 262, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 161–170
63. Chen C.Y. and Chou H.N., 1998. *Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins from dinoflagellate to gastropod*. *Toxicon* 36(3): 515-522.
64. Pitcher G.C., Franco J.M., Doucette G.J., Powell C.L., Mouton A., 2001. *Paralytic shellfish poisoning in the abalone Haliotis midae on the West Coast of South Africa*. *J. Shellfish Res.* 20(2): 895-904
65. Bravo I., Reyero M.I., Cacho E., et al., 1999. *Paralytic shellfish poisoning in Haliotis tuberculata from the Galician coast: geographical distribution, toxicity by lengths and parts of the mollusc*. *Aquatic Toxicology* 46(2): 79-85.
66. Arnott G.H., 1998. *Toxic marine microalgae: a worldwide problem with major implications for seafood safety*. *Advancing Food Safety* 1: 24–34.
67. Yasumoto T., Oshima Y. and Kotaki Y., 1983. *Analyses of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and gastropods with the identification of the primary source of toxins*. *Toxicon*, vol. 21, supplement 3, 513–516.
68. Negri A., Llewellyn L., 1998. *Comparative analyses by HPLC and the sodium channel and saxiphillin 3H- Saxitoxin receptor assays for paralytic shellfish toxins in crustaceans and molluscs from tropical north west Australia*. *Toxicon* 36, 283-298.
69. White A.W., 1984. *Paralytic shellfish toxins and finfish*. In *Seafood Toxins*; Ragelis, E. P., Ed.; ACS Symposium Series 262; pp. 171-180.
70. Gosselin S., Fortier L., Gagné J.A., 1989. *Vulnerability of marine fish larvae to the toxic dinoflagellate Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57, 1–10.
71. MacLean J.L., 1979. *Indo-Pacific red tides* (pp. 173–8). In: *Toxic dinoflagellate*

- blooms*, DL Taylor, HH Seliger, HH (eds). Proceedings of the 2nd International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms, Key Biscayne, Florida, 31 October – 5 November 1978. Elsevier North Holland, New York.
72. Haya K., Martin J.L., Waiwood B.A., Biurridge L.E., Hungerford J.M., Zitko V., 1990. *Identification of paralytic shellfish toxins in mackerel from southwest Bay of Fundy, Canada*. In: Toxic marine phytoplankton, Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, June 1989, E Granéli, B Sandström, L Elder, DM Anderson (eds). Elsevier Applied Science, London. pp. 350–355.
73. Clifford M.N., Walker R., Ijomah P., Wright J., Murray C. K., Hardy R., Martlbauer E. P., Usleber E. and Terplan G., 1993. *Do saxitoxin-like substances have a role in scombrototoxicosis?* Food Add. Contam. 9, 657-667.
74. Montoya N.G., Akselman R., Franco J. and Carreto J.I., 1996. *Paralytic shellfish toxins and mackerel (Scomber japonicus) mortality in the Argentine sea*. In Harmful and toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp. 417-420.
75. Gerace J.R., Anderson D.M., Timperi R.J., StAubin D.J., Early G.A., Prescott J.H., Mayo C.A., 1989. *Humpback whales (Megaptera novaeangliae) fatally poisoned by dinoflagellate toxin*. Can. J. fish Aquat. Sci. 46. 1895-1898.
76. Castonguay M., Levasseur M., Beaulieu J., Gregoire F. Michaud S., Bonneau E., and Bates S., 1997. *Accumulation of PSP toxins in Atlantic mackerel: seasonal and ontogenetic variations*. Journal of Fish Biology. 50: 1203-1213.
77. Quilliam M., Wechsler D., Marcus S., Ruck B., Wekell M., Hawryluk T., 2002. *Detection and identification of paralytic shellfish poisoning toxins in Florida pufferfish responsible for incidents of neurologic illness*. In Harmful Algae. Proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae; Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Tomas, C. R., Vargo, G. A., Eds; Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental
78. Hughes J.M., 1979. *Epidemiology of shellfish poisoning in the United States, 1971 – 1977 (pp. 23–8)*. In: Toxic dinoflagellate blooms, DL Taylor, HH Seliger (eds). Elsevier North Holland, New York.
79. Sanders W.E., 1987. *Intoxications from the seas: ciguatera, scombroid, and paralytic shellfish poisoning. New Challenges from Infectious Diseases*. Infectious Disease Clinics of North America 1(3):665–76.
80. Prakash A., 1975. *An overview*. In: Proceedings of the 1st International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms, VR LoCicero (ed.). Massachusetts Science and Technology Foundation, Wakefield, MA., pp. 1–6
81. Cheng H.S., Chua S.O., Hung J.S., Yip K.K., 1991. *Creatine kinase MB elevation in paralytic shellfish poisoning*. Chest 99(4):1032–1033.
82. Hwang D.F., Tsai Y.H., Cheng C.A., Liao. I.C., Jeng S.S., Noguchi T., Hashimoto K., 1995. *Two food poisoning incidents due to ingesting the purple clam occurred in Taiwan*. Journal of Natural Toxins 4(2):173–179.
83. Anraku M., 1984. *Shellfish poisoning in Japanese waters (pp. 105–9)*. Toxic red tides and shellfish toxicity in Southeast Asia. Proceedings of a consultative meeting held in Singapore, 11–14 September 1984. Southeast Asian Fisheries development Center and International Development Research Centre.
84. Akaeda H., Takatani T., Anami. A., Noguchi T., 1998. *Mass outbreak of paralytic shellfish poisoning due to ingestion of oysters at Tamano-ura, Goto Islands, Nagasaki, Japan*. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 39(4):272-274.

85. García C., 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: 149-15
86. Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs (Oslo, September 26-30 2004)
87. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs

Capitolo 4

Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

Capitolo 4

Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

4.1 Introduzione

Nel 1987, a Prince Edward Island (Canada), si manifestarono 250 casi d'intossicazione dovuti al consumo di mitili (appartenenti alla specie *Mytilus edulis*) cresciuti in un'area interessata da una fioritura di Diatomee. Mentre le Dinofitceee erano, già da tempo, ritenute responsabili di fenomeni di biointossicazioni occorsi in varie aree del mondo, le Diatomee non erano mai state considerate un pericolo per la salute umana. Le persone intossicate mostravano sintomi che includevano vomito e diarrea, seguiti, in alcuni casi, da confusione mentale, perdita di memoria, disorientamento, fino a casi estremi di stato di coma. Per questa nuova sindrome fu proposto il termine di **Amnesic Shellfish Poisoning** (ASP) [1]. Un gruppo di esperti di vari istituti di ricerca canadesi furono incaricati dal *Canadian Department of Fisheries and Oceans* (DFO) e dall'*Health and Welfare Canada* (HWC) di stabilire l'entità della contaminazione nei bivalvi, la natura chimica della tossina e la sua origine. I ricercatori, dopo aver escluso l'implicazione di biotossine marine note e di inquinanti chimici inorganici e organici, tra quelli di maggior importanza, stabilirono che la tossina presente nei bivalvi era riconducibile ad acido domoico, un amminoacido, relativamente raro, non presente nelle proteine. In seguito identificarono nella Diatomea pennata *Nitzschia pungens* f. *multiseries* la fonte della tossina. Il nome acido domoico deriva da *Chondria armata*, una macroalga (appartenente alle Rodofitceee) tipica delle coste dell'Oceano Indiano, conosciuta comunemente come "domoi" [2,3], da cui questa molecola fu isolata per la prima volta negli anni '50.

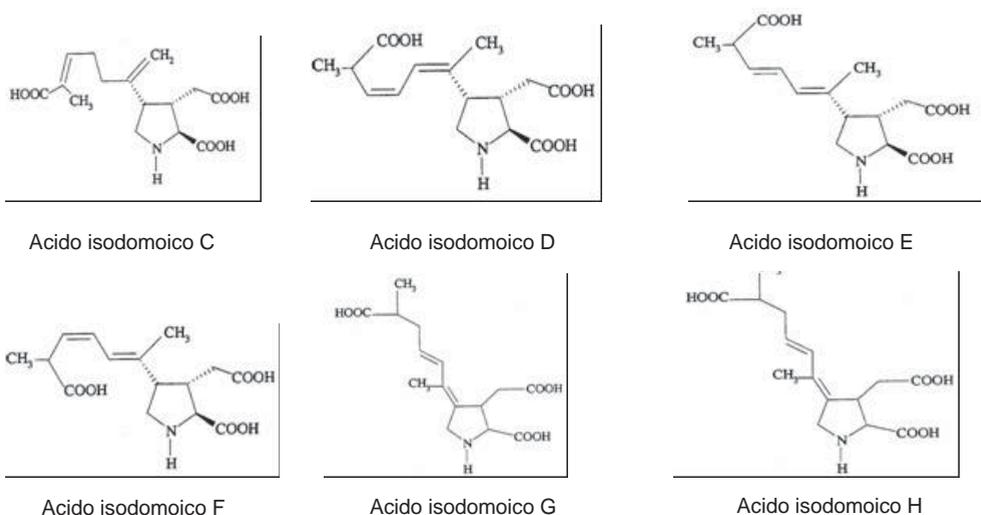
4.2 Chimica dei costituenti responsabili della sindrome ASP

La molecola principalmente responsabile della sindrome ASP è l'**acido domoico** ($C_{15}H_{21}NO_6$): un amminoacido tricarbossilico con peso molecolare di 311,14 Da, solubile in acqua, in acidi e in alcali diluiti; scarsamente solubile in metanolo ed etanolo, insolubile in etere di petrolio e benzene. I tre gruppi carbossilici presenti hanno costanti di dissociazione (pKa) di: 2,10, - 4,97 e 9,82 [4]. L'acido domoico esiste in diverse stati di carica, in relazione al pH, e contiene un forte cromoforo che ne facilita la rilevazione spettroscopica UV a 242 nm di lunghezza d'onda [5].

La struttura dell'acido domoico (AD) e dei suoi isomeri, fino ad ora isolati dalle alghe e dai tessuti di molluschi bivalvi, è riportata in Fig.1:

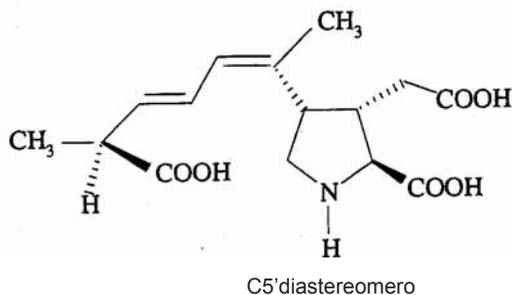
Fig.1 Struttura chimica dell'acido domoico e dei suoi isomeri.





Nelle Diatomee produttrici sono stati isolati, oltre all'acido domoico, gli isomeri acido isodomoico D, acido isodomoico E e acido isodomoico F. Gli acidi isodomoico A, B, C, sono stati isolati in *Chondria armata* e mai in *Pseudo-nitzschia* spp. o in estratti di molluschi bivalvi. Gli isomeri acido isodomoico G e H sono stati isolati in *Chondria armata* [6]. Un altro isomero, il C5' diastereomero, è stato isolato sia dal plancton che dai molluschi bivalvi [7,8].

Fig. 2 Isomero C5'diastereomero

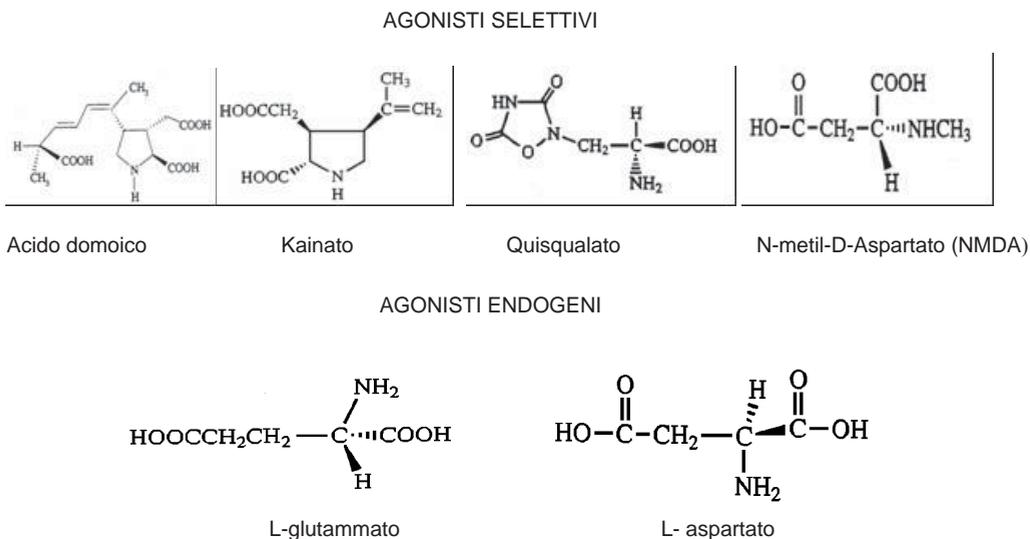


Gli isomeri dell'acido domoico possono essere ottenuti esponendo una soluzione di acido domoico, per un breve periodo, ai raggi UV, mentre la formazione di C5'diastereomero è accelerata dal calore.

4.3 Meccanismo d'azione

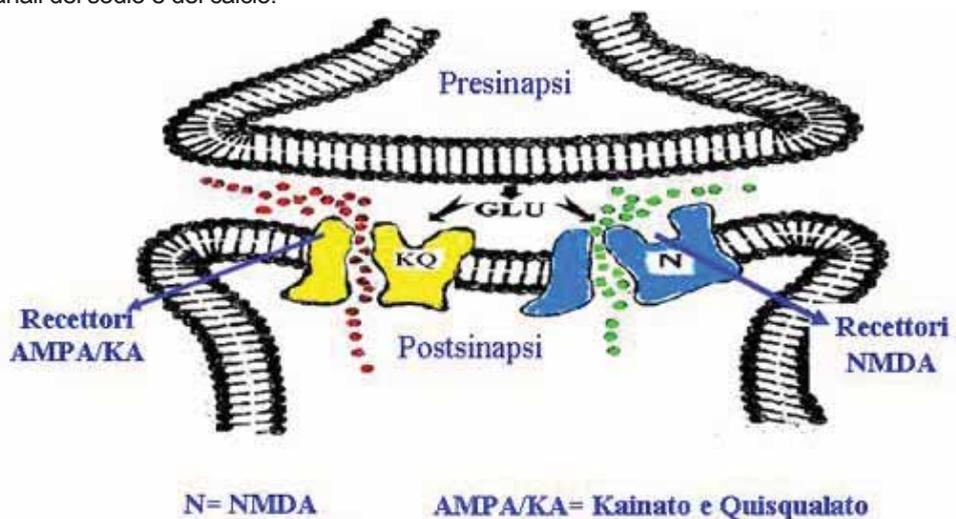
Ricerche sul meccanismo d'azione dell'AD hanno dimostrato che questo amminoacido si comporta come agonista sui recettori dell'acido glutammico [9], sui quali esercita una potente azione anche l'acido kainico [10,11]. L'AD e i suoi isomeri possiedono, infatti, nella molecola, una parte della struttura identica a quella dell'acido kainico, amminoacido raro già noto per il suo effetto neurotossico, in quanto potente agonista sui recettori dell'acido glutammico.

Fig. 3. Formula di struttura dell'acido domoico, degli altri agonisti selettivi e degli aminoacidi neurotrasmettitori (agonisti endogeni)



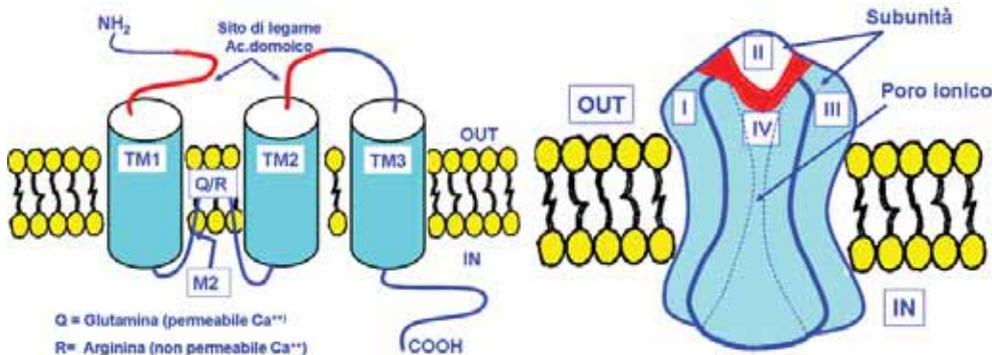
L'azione dell'acido domoico si esplica, quindi, sui recettori degli aminoacidi eccitatori e sulla trasmissione sinaptica (Fig.4), anche se la sintomatologia da ASP non si limita al sistema nervoso, ma colpisce anche l'apparato digerente. Gli aminoacidi eccitatori, in particolare l'acido glutammico e l'acido aspartico, sono stati considerati i neurotrasmettitori naturali più importanti. Il glutammato e l'aspartato sono aminoacidi eccitatori del cervello e l'acido glutammico è ritenuto responsabile del 75% della neurotrasmissione eccitatoria. E' noto che questi aminoacidi agiscono su alcuni recettori indicati con sigle che derivano da principi attivi esogeni denominati con il termine di eccitotossine. Si tratta dell'N-Metil D-Aspartato (NMDA), dell'acido kainico e del quisqualato.

Fig. 4. Recettori postsinaptici (NMDA, AMPA, Kainato) degli aminoacidi neurotrasmettitori e canali del sodio e del calcio.



Si tratta di recettori ionotropici (funzionano come canali) che lasciano fluire ioni Na^+ e Ca^{2+} all'interno del neurone e defluire ioni K^+ al suo esterno; sono suddivisi in due sottoclassi: NMDA e non-NMDA, a seconda dell'agonista che li attiva. I recettori ionotropici NMDA vengono attivati sia dal glutammato che dall'NMDA; i recettori non-NMDA (AMPA e KA) vengono attivati dal glutammato, quisqualato (il recettore è oggi considerato come un sottotipo dell'AMPA), kainato (KA) e AMPA (alfa-Amino-3-I-drossi-5-Metil-4-isoxazolone propinato).

Fig. 5. Recettore del kainato (KA = acido kainico).



L'acido domoico è quindi considerato un amminoacido eccitatorio, un neurotrasmettitore e una neurotossina per il sistema nervoso centrale (SNC) e funziona in maniera analoga a composti strutturalmente simili all'acido kainico [12,13]. Recenti ricerche hanno evidenziato che l'AD si lega a due sottotipi di recettori del KA (Fig.5) [14], la cui azione si esercita a livello pre e post-sinapsi. Quando, per qualche ragione, i recettori vengono attivati in modo eccessivo e prolungato, questa ipereccitazione può provocare lesioni irreversibili alle cellule neuronali. Tali lesioni sono una conseguenza di un aumento dei flussi, all'interno della cellula, di ioni Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} oltre che di acqua, che porta ad un rigonfiamento cellulare (*swelling*) con conseguente rottura cellulare [15]. Questi avvenimenti sono osservati in numerosi processi neurodegenerativi localizzati in particolare, come dimostrato nella sperimentazione animale con acido domoico e acido kainico, nell'ippocampo nelle zone CA3 e CA1, corrispondenti alla zona H3 e H1 nell'uomo, ricche di recettori del kainato [16,17]. Questo spiegherebbe il deficit di memoria registrato sia nella sperimentazione animale che nei casi umani d'intossicazione. L'acido domoico è una neurotossina considerata da 2 a 3 volte più potente dell'acido kainico e fino a 100 volte più potente dell'acido glutammico [10,11,18,19]. Il meccanismo d'azione che si esplica sui recettori pre e post-sinapsi spiega solo in parte gli effetti neurotossici dell'acido domoico. Infatti, oltre all'attività neurotossica, l'acido domoico dimostra un'azione gastrotossica o enterotossica, mentre non pare avere un'azione mutagena sui fibroblasti polmonari V79 dell'*hamster* [20] e neppure ci sono indicazioni che abbia attività teratogena o cancerogena.

4.4 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

4.4.1 Tossicità negli animali

Gli effetti tossici dell'acido domoico sono stati studiati, dopo i primi casi canadesi di intossicazione, usando roditori (topi, ratti) e primati (scimmie). I topi trattati con AD tramite iniezione intraperitoneo manifestano sintomi caratteristici, talvolta unici, rispetto ad altri tipi di tossine marine. Quello più evidente è il grattarsi con le zampe posteriori, seguito dalle convulsioni e dalla morte. Altri sintomi meno evidenti sono: ipoattività, sedazione-acinesia, rigidità, perdita del controllo del treno posteriore e tremore [6].

L'AD, assunto tramite gli organismi marini con la catena alimentare, è assorbito molto lentamente dalla mucosa gastrointestinale; con velocità assai bassa; nel circolo sanguineo si ritrova come molecola a carica idrofila. L'acido domoico somministrato oralmente a ratti e topi è eliminato, quasi totalmente, nelle feci dopo 36 ore dalla somministrazione. L'acido domoico presente nell'urina è principalmente nella forma non modificata e ciò suggerisce che il suo metabolismo *in vivo* sia assai limitato [21]. I test di tossicità acuta in topi trattati per via intraperitoneale (i.p.) con acido domoico estratto dai mitili, hanno mostrato un LD₅₀ di 3,6 mg/kg p.c. (peso corporeo), con una concentrazione mortale di circa 5 mg/kg di p.c. [22]. La più bassa concentrazione di AD somministrata per via intraperitoneale, in grado di creare cambiamenti comportamentali nel topo, è valutata in 23 µg. I ratti trattati per via intraperitoneale con 1-2 mg di acido domoico/kg p.c. non mostrano evidenti sintomi di tossicità, sintomi invece evidenti alla concentrazione di 2,5-7,5 mg/kg p.c.. La somministrazione di alte concentrazioni di AD comporta lesioni: all'ippocampo, all'amigdala, all'ipotalamo, alla corteccia, nel sistema olfattivo e nella retina [22]. Generalmente l'acido domoico, somministrato oralmente in ratti e topi, ha un effetto 10 volte meno tossico di quello che si manifesta quando somministrato per via intraperitoneale. In questi animali la somministrazione per via orale di acido domoico di 30-50 mg/kg p.c. non provoca nessun effetto visibile. La concentrazione mortale per ratti, trattati oralmente con acido domoico, è di ≤ 80 mg/kg p.c. [22]. Tuttavia, neonati di ratto risultano circa 80 volte più sensibili all'acido domoico rispetto agli adulti, con una LD₅₀, per quelli che hanno due giorni di vita, di 0,25 mg/kg p.c. e per quelli di 10 giorni di 0,70 mg/kg p.c. [23].

Le scimmie, trattate per via intraperitoneale con AD alla concentrazione di 12,5 mg/kg p.c., manifestano vomito; la più bassa dose che produce segnali di tossicità è di 1 mg/kg p.c. [24]. Scimmie del peso di 3,4-5,1 kg, trattate per via orale con omogeneizzato di epatopancreas di mitili contenente 20-29 µg di acido domoico, manifestano gastroenteriti caratterizzate da anoressia, vomito, diarrea e alcuni effetti neurologici (tremori, disorientamento, prostrazione, ecc.). L'assorbimento di AD ritrovato a livello gastrointestinale è circa il 4-7% la quantità ingerita, valore che è almeno due volte maggiore rispetto a quello riscontrato nel ratto [25]. I sintomi gastrointestinali iniziano dopo 3-6 ore dalla somministrazione dell'omogenato tossico, mentre quelli neurologici insorgono tra i 25 minuti e le 6 ore e si protraggono fino a 120 ore [26]. L'acido domoico provoca, in preparati istologici di tessuti nervosi di scimmie, segni evidenti di neurotossicità alla concentrazione di 10 mg/kg p.c., mentre ad una concentrazione di 5,0 mg/kg p.c. non ci sono segni evidenti di tossicità. Nelle scimmie l'acido domoico contenuto nel plasma ha un tempo di dimezzamento di circa il doppio di quello registrato nei ratti [27].

4.4.2 Tossicità nell'uomo

In Giappone l'acido domoico è stato somministrato oralmente ad esseri umani alla dose di 0,5 mg/kg di p.c. senza che venisse riscontrato alcun effetto negativo. L'estratto della macroalga marina *Chondria armata*, contenente acido domoico, era tradizionalmente utilizzato come farmaco e somministrato alle persone come antielmintico [2] o anche utilizzato come potente insetticida [28].

I dati sulla tossicità umana sono quelli ricavati dall'unico episodio umano registrato, che fa riferimento all'intossicazione canadese del 1987. Questo episodio ha permesso di raccogliere le principali informazioni sulla sintomatologia da avvelenamento umano da acido domoico e suoi derivati. La sindrome fu chiamata *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) in quanto uno dei sintomi dell'avvelenamento era la perdita della memoria. Le persone allora visitate dalle strutture ospedaliere di Montreal furono circa 250 (si stimò che dovevano essere circa 50.000 coloro che avevano consumato mitili contaminati), e di queste soltanto su 107 fu possibile calcolare l'incidenza in percentuale dei sintomi più comuni. I primi sintomi si manifestavano tra 15 minuti e 48 ore dal consumo dei mitili tossici: la nausea (77%) era il sintomo più comune, seguito da vomito (76%), crampi addominali (51%), mal di testa (43%), diarrea (42%) e perdita di memoria (25%).

I casi più gravi (19 pazienti) furono ricoverati nel reparto di cure intensive per un periodo variabile da 4 a 101 giorni: presentavano vertigini, confusione, disorientamento, perdita della memoria breve e coma. Tre pazienti morirono dopo 12-18 giorni dal ricovero, un quarto dopo tre mesi. La perdita della memoria si manifestava principalmente in pazienti con oltre 50 anni di età e i casi più gravi, pazienti di oltre 65 anni, erano portatori di malattie preesistenti come diabete, disfunzioni renali e ipertensione. In alcuni pazienti era anche notata ritenzione urinaria, profusa secrezione bronchiale (tale da richiedere in alcuni casi intubazione endotracheale), instabilità della pressione sanguigna, tachicardia, oltre a disturbi visivi (diplopia, oftalmoplegia).

I sintomi gastrointestinali si manifestarono entro le 24 ore, mentre quelli neurologici entro le 48 ore dall'ingestione del cibo contaminato [22,29].

I dati clinici registrati evidenziarono chiaramente che nell'uomo la sindrome ASP interessava diversi sistemi: nervoso centrale e periferico, gastrointestinale, respiratorio e cardiovascolare. La sintomatologia neurologica e la perdita di alcune funzioni si manifestarono come una conseguenza da ipereccitazione delle cellule neuronali a livello delle sinapsi, con degenerazione e perdita delle stesse, specialmente in alcune zone dell'ippocampo e dell'amigdala. L'analisi autopsica dei quattro pazienti deceduti rivelava marcate lesioni nel cervello con necrosi e perdita di neuroni principalmente nell'area dell'ippocampo e dell'amigdala [30], nonostante l'acido domoico abbia una struttura idrofila scarsamente capace di attraversare la barriera ematoencefalica se questa non è già compromessa.

La concentrazione di acido domoico che non creava sintomi ASP alla persona fu calcolata in 15-20 mg (circa 0,2-0,3 mg/kg per una persona), mentre quella che aveva effetti neurologici gravi era di circa 295 mg/individuo. Alcune di queste persone mostrarono leggeri sintomi dopo aver consumato dai 60 ai 110 mg di AD, equivalente a 0,9-2,0 mg/kg p.c., mentre per i sintomi più gravi la dose per persona fu calcolata in 1,9-4,2 mg/kg [22]. La quantità di acido domoico accumulata nei mitili in Canada durante l'intossicazione del 1987 era compresa tra 310-1.280 mg/kg di p.e. di mitili [31]. Calcolando che circa 50.000 persone avevano consumato mitili contaminati, il tasso d'avvelenamento era quantificato nello 0,4%, mentre quello di mortalità nello 0,0006%. Per questo l'episodio fu ritenuto di bassa tossicità rispetto ad altri episodi con altre biotossine marine.

Il livello di tolleranza dell'acido domoico per la sicurezza sanitaria del consumatore, adottato da molti Paesi, compresi quelli della Unione Europea, è di 20 mg/kg di parte edibile (p.e.) di mollusco. Questo livello era stato calcolato inizialmente dalle Autorità sanitarie canadesi e prendeva come riferimento un pasto di 250 g di parte edibile di molluschi. Alcuni ricercatori ritengono che tale livello vada preso con molta precauzione, specialmente quando sono interessate persone anziane affette da seri disturbi neurologici o con funzione renale compromessa. Ricerche in animali nefrectomizzati hanno dimostrato che questi sono assai più sensibili all'azione tossica dell'acido domoico [32].

4.5 Eziologia

La tossina responsabile della sindrome ASP fu individuata nell'acido domoico ed isomeri [33]. Oltre che in *Chondria armata*, da cui fu isolato per la prima volta l'acido domoico negli anni '50, in un'altra macroalga rossa del Golfo di Napoli, *Alsidium corallinum*, è stata messa in evidenza la presenza di tale molecola [34]. La produzione di AD da parte di microalghe appartenenti alle Diatomee è riportato per la prima volta in occasione dell'avvelenamento canadese del 1987. La Diatomea responsabile fu individuata in *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* [33]. Nel Golfo di Napoli è stato isolato un ceppo di *Pseudo-nitzschia multistriata* che, in coltura, è stato in grado di produrre acido domoico.

All'elenco delle micro e macroalghe inizialmente identificate come produttrici di AD e suoi derivati [7], sono state aggiunte diverse specie di Diatomee (Tab.1).

Tab. 1. Microalghe e macroalghe marine in cui è stata rilevata la presenza di acido domoico.

MICROALGHE (Diverse specie)	Rif.
<i>Amphora coffeaeformis</i> (C. Agardh) Kützing, 1844 (in coltura)	[65,66]
<i>Nitzschia actydophila</i> Hasle, 1965	[63]
<i>Nitzschia navis-varingica</i> Lundholm & Moestrup, 2000	[67]
<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i> (Hasle, 1974) Hasle, 1995 (ex <i>Nitzschia pungens</i> f. <i>multiseries</i> Hasle, 1974, ex <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> f. <i>multiseries</i> (Hasle) Hasle, 1993)	[33,59,60,72]
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle, 1993	[61,74]
<i>Pseudo-nitzschia australis</i> Frenguelli, 1939	[35,62]
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (P.T. Cleve, 1883) H.Peragallo in H.& M. Peragallo, 1900	[64]
<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> Lundholm, Moestrup & Hasle, 2003	[69]
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (P.T. Cleve, 1897) Heiden, 1928	[70]
<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i> (P.T. Cleve, 1897) Hasle, 1993	[71]
<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> (Takano, 1993) Takano, 1995	[73]
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (P.T. Cleve, 1883) H. Peragallo in H. & M. Peragallo, 1900	[75]
MACROALGHE (Rodofita)	
<i>Chondria armata</i> (Kützing) Okamura, 1907	[57,3]
<i>Chondria baileyana</i> (Montagne) Harvey, 1853	[57,26]
<i>Alsidium corallinum</i> C.Agardh, 1827	[34]

Per le Diatomee in particolare, la possibilità che esse producano tossine ASP è molto legata alle condizioni ambientali in cui queste microalghe crescono; un ruolo importante è giocato dal rapporto tra le concentrazioni dei nutrienti. Ricerche condotte su colture di *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* hanno dimostrato che sono tre le condizioni richieste per la produzione di AD: disponibilità di nitrato ed altre forme di azoto anche durante la fase stazionaria, cessazione della divisione cellulare (si ottiene in carenza di fosforo), presenza di luce. La crescita ottimale avviene in mezzi colturali del tipo f/2, con quantità limitate di silicati e un eccesso di nitrato [35].

4.6 Prodotti ittici soggetti alla contaminazione da tossine ASP

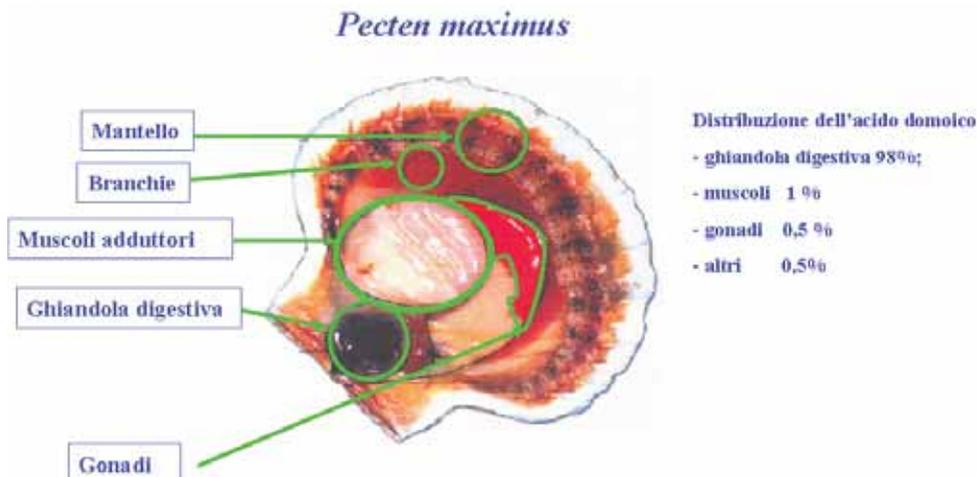
4.6.1 Molluschi bivalvi

I molluschi bivalvi sono, fra i prodotti ittici, quelli in cui si ritrovano tossine di tipo ASP alle più alte concentrazioni. Il tasso di accumulo e di eliminazione delle tossine è altamente variabile, è specie-specifico, è quasi sempre correlato al numero di cellule microalgali presenti nell'acqua ed alle condizioni chimico fisiche e idrodinamiche dell'acqua. Il tasso di smaltimento dell'acido domoico dipende anche in quale tessuto del bivalve è stato accumulato. *Mytilus edulis* canadesi hanno raggiunto, durante l'episodio d'intossicazione del 1987, i 1.280 mg di acido domoico/kg di p.e. (parte edibile), mentre nella ghiandola digestiva (epatopancreas) questa concentrazione superava i 1.500 mg/kg di p.e. [33,36]. L'AD è stato rilevato anche in altri bivalvi quali: *Siliqua patula* con 147 mg/kg p.e. negli USA (Oregon e Washington, 1991); *Argopecten irradians* (canestrello americano) in grado di accumulare 60 µg di AD per grammo di epatopancreas in 84 ore di esposizione a *Pseudo-nitzschia multiseris*; *Placopecten magellanicus* (cappasanta americana) trovati morti nella baia di Fundy, in Canada, nel 1993, contenevano 93,4 mg di AD/kg di epatopancreas; *Pecten maximus* (cappasanta) della costa atlantica galiziana, con oltre 100 mg di AD/kg p.e. [37]; *Callista chione* (fasolaro) delle coste portoghesi, con AD < 20 mg/kg di p.e.. Analisi su 909 campioni di 9 specie di molluschi bivalvi campionati nel 2001 nel Mediterraneo nella costa Catalana (Spagna) hanno evidenziato la presenza di AD ed isomeri [38].

I molluschi bivalvi, pur avendo la capacità di accumulare concentrazioni molto elevate di acido domoico, non ne sono del tutto insensibili. Infatti, esemplari di *Chlamys hastata* morivano dopo una esposizione di 12 ore ad una fioritura di *Pseudo-nitzschia multiseris* [39]; la stessa specie, in un altro esperimento sempre in presenza di *P. multiseris*, mostrava scarsa sensibilità al nuoto e agli stimoli diventando in tal modo una facile preda [40]. Esemplari di *Crassostrea gigas* del Pacifico (ostrica concava, ostrica del Pacifico) dopo quattro ore di esposizione a *P. punges* f. *multiseris* chiudevano le valve, e la tossina contenuta nella parte edibile cominciava a diminuire [41]. In mitili *Perna canaliculus* (cozze verdi) della Nuova Zelanda, l'acido domoico era rapidamente accumulato ma veniva anche rapidamente eliminato [42].

La distribuzione dell'AD nei tessuti dei bivalvi non è uniforme. La ghiandola digestiva è, per alcuni bivalvi (*Pecten*, *Chlamys*, *Mytilus*, ecc.), l'organo in cui si ha il massimo tenore di accumulo, seguito da gonadi e muscoli adduttori. Esemplari di *Placopecten magellanicus* alimentati con *P. multiseris* per 21 giorni, accumulavano l'AD in: epatopancreas >> tessuti molli >> muscoli adduttori. Nell'epatopancreas si registrava un massimo di 3.108 µg di AD/g di tessuto mentre solo tracce (0,7-1,5 µg/g) erano trovate nei muscoli adduttori. I livelli di AD nella ghiandola digestiva dopo 14 giorni dalla fine dell'esperimento rimanevano ancora elevati (732 µg/g) e i bivalvi non mostravano nessun segno di sofferenza [39]. Quella di mantenere elevati livelli di AD per lunghi periodi sembra essere una caratteristica delle diverse specie di *Pecten*, anche se l'esperienza ha dimostrato che la ritenzione di AD è risultata molto lunga anche in *Modiolus modiolus* (cozza rossa, cozza cavallo) [43] e *Siliqua patula* con un tempo di ritenzione di oltre due anni [44].

Alcuni studi per verificare la localizzazione di AD in *Pecten maximus* (cappasanta atlantica) hanno evidenziato che la ghiandola digestiva poteva accumulare dal 79,3% al 98,8% della tossina rispetto alle gonadi e muscolo (Fig.6) [37]. Per contro, in *Siliqua alta* l'AD (230 mg/kg p.e.) si ritrovava in massima parte nel piede, seguito dal corpo, visceri e sifoni [45].

Fig. 6. Zone di accumulo di acido domoico in *Pecten maximus*.

Il tenore massimo complessivo di molecole del tipo ASP consentito per il consumo di molluschi bivalvi, è stabilito dalla UE in: 20 mg di acido domoico/kg di parte edibile. Il fatto che nella ghiandola digestiva si accumuli la maggior parte dell'AD è servito a regolamentare, nei Paesi della Unione europea, la pesca di questi prodotti anche in presenza di limiti superiori a quelli di legge (ma comunque inferiori a 250 mg/kg p.e.). Infatti, questi prodotti contaminati possono essere pescati o raccolti e spediti, sotto vincolo sanitario, ad uno stabilimento autorizzato all'asportazione della ghiandola digestiva e, se dopo questo trattamento il tenore di AD è rientrato nei limiti di legge, possono essere inviati alla commercializzazione.

4.6.2 Altri organismi marini

Oltre ai molluschi bivalvi altri prodotti ittici, quali gasteropodi, crostacei e pesci, possono accumulare acido domoico; possono farlo sia in maniera diretta che attraverso la catena alimentare, nonostante la via di trasferimento della tossina in organismi bentonici non sia ancora ben definita. Microalghe appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* pur essendo pelagiche possono interessare, specialmente quando sono in fioritura, tutta la colonna d'acqua della zona neritica oppure aggregarsi e flocculare sul fondo diventando parte della catena alimentare delle specie animali bentoniche. In organismi marini bentonici della California, prelevati in presenza di una fioritura di *Pseudo-nitzschia australis*, per la ricerca di AD (sul corpo intero) sono state riscontrate le seguenti concentrazioni di tossina: in crostacei quali *Emerita analoga* e *Neotrypaea californiensis* 277,9 µg AD/g e 145,0 µg AD/g rispettivamente; in gasteropodi (*Nassarius fossatus*) 573,9 µg AD/g; in un pesce piatto predatore (*Citharichthys sordidus*) 515,0 µg AD/g [46].

Esemplari di *Cancer magister* (granciporro) pescati in USA hanno presentato concentrazioni di 90 mg di AD/kg p.e.; la tossina era localizzata nei visceri e in particolare nell'epatopancreas [47].

Acido domoico è stato ritrovato anche in pesci planctofagi, sia nel contenuto stomacale che, in minor concentrazione, nei filetti. Infatti, la morte di pellicani (*Pelicanus occidentalis*) e cormorani (*Phalacrocorax penicillatus*) nella Baia di Monterey in California nel settembre del 1991 fu attribuita al consumo di acciughe contaminate da AD. Il contenuto stomacale delle acciughe (*Engraulis mordax*) analizzate mostrava una concentrazione di acido domoico di 485 mg/kg, concentrazione circa sette volte più alta rispetto a quella determinata nel filetto [47].

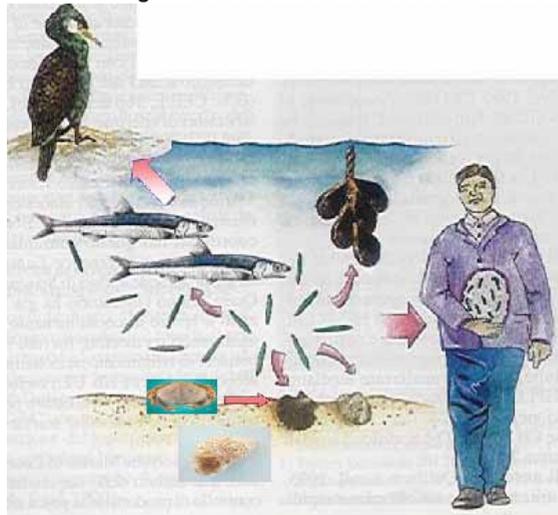
In seguito, in altre acciughe è stato trovato AD localizzato nel contenuto stomacale, e nei visceri sono state ritrovate Diatomee appartenenti a nove diverse specie del genere *Pseudo-nitzschia*; quattro di queste, messe in coltura, producevano acido domoico. Questo significa che nonostante le acciughe siano considerate carnivore possono anche concentrare, filtrando, Diatomee e quindi contaminarsi [48]. Un'altra moria di pellicani (circa 150) avvenuta in Messico nel 1996 fu attribuita al consumo di *Scomber japonicus* contaminato da AD [49].

Alle acciughe (*Engraulis mordax*) contaminate con acido domoico, è stata inoltre attribuita la morte di 400 leoni marini (*Zalophus californianus*) nelle coste della California nei mesi di maggio-giugno 1998. Nei visceri di questi mammiferi è stata ritrovata una concentrazione di 223 $\mu\text{g AD/g}$, circa sette volte superiore a quella determinata nel corpo [50].

Cefalopodi della specie *Eledone cirrhosa* (moscardino bianco) ed *E. moschata* (moscardino rosso) pescati in Portogallo, contenevano acido domoico nella ghiandola digestiva; in *E. moschata* la neurotossina poteva, occasionalmente, raggiungere concentrazioni superiori a 100 $\mu\text{g di AD/g}$ [51]. Anche *Octopus vulgaris* (polpo comune), sempre pescato lungo le coste portoghesi, conteneva 166,2 $\mu\text{g AD/g}$ nella ghiandola digestiva (stomaco e intestino) [52]. Nella stessa area notevoli concentrazioni di AD sono state ritrovate in esemplari di seppia comune (*Sepia officinalis*) pescate nel corso del 2003-2004. La concentrazione di AD era massima nella ghiandola digestiva (241,7 $\mu\text{g AD/g}$) specialmente durante i mesi primaverili ed estivi, dopo *bloom* di *Pseudo-nitzschia*. L'acido domoico e i suoi isomeri erano rilevati anche nel mantello, la parte principalmente consumata della seppia, anche se a concentrazione molto bassa (0,7 $\mu\text{g AD/g}$) [52]. Questo aspetto concorre a diminuire il rischio sanitario per il consumo di questi organismi, in quanto la loro eviscerazione rientra tra le pratiche comuni nelle preparazioni alimentari. Tuttavia, cefalopodi molto piccoli possono essere consumati senza l'asportazione dei visceri, e ciò naturalmente aumenta il fattore di rischio per la salute umana.

Questi dati dimostrano ancora una volta che il rischio sanitario per i consumatori di prodotti ittici non deriva soltanto dai molluschi bivalvi, che rappresentano comunque il pericolo maggiore, ma anche da altri prodotti della pesca (gasteropodi, cefalopodi, crostacei, pesci, ecc...) che presentano le più disparate alimentazioni. Inoltre, l'acido domoico può rappresentare un pericolo fatale anche per altri organismi che vivono e si nutrono nell'ambiente marino, quali per esempio uccelli e mammiferi.

Fig. 7. Catena alimentare delle biotossine ASP.

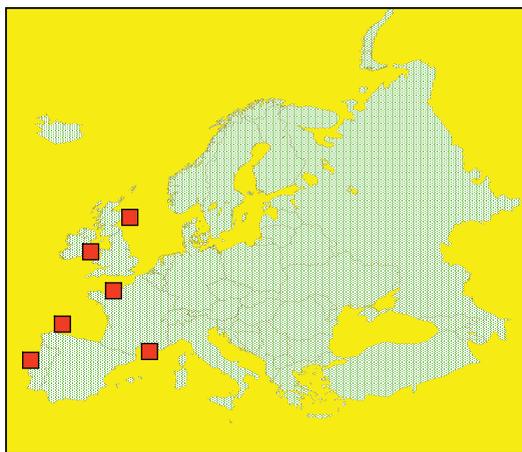


4.7 Distribuzione ASP in Europa

Nei Paesi europei non sono stati registrati casi di intossicazione tipo ASP, nonostante la tossina sia presente, in alcuni bivalvi, in misura anche di molto superiore al limite di legge (20 mg/kg p.e.); si tratta per lo più di Paesi che si affacciano sulla costa Atlantica, anche se, nel Mediterraneo, la Francia nel 2002 e nel 2006 ha denunciato la presenza in bivalvi di tossine ASP in quantità superiore al limite di legge.

Fig. 8. In rosso le aree di ritrovamento in Europa di molluschi bivalvi con contenuto di tossine ASP superiore al limite di legge.

In Italia, nel mare Adriatico, la presenza di cellule appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* non è mai stata fino ad ora messa in correlazione con una loro produzione di acido domoico. Nei bivalvi, tuttavia, in alcuni mesi dell'anno si possono riscontrare concentrazioni di AD, ma sempre inferiori a 3 mg/kg p.e. [76]. Nel Nord-Adriatico orientale (costa croata) dopo una fioritura di *Pseudo-nitzschia calliantha* (che tuttavia non è stato possibile mettere in coltura), mitili raccolti in quella stessa area hanno mostrato contaminazione da AD [77].



In Tab.2 è riassunta la situazione sul ritrovamento di mitili tossici per AD nel periodo 1999/2008 in Europa.

Tab. 2. Dati statistici sul ritrovamento di campioni di mitili positivi per AD, nel periodo 1999-2008, forniti dai vari Paesi europei ed elaborati da EFSA (European Food Safety Authority) [58].

Paese	N° di campioni analizzati	% di campioni con: >20 mg AD/Kg
Danimarca	635	0,3%
Francia	2.662	8,6%
Germania	25	-
Irlanda	1.005	11,3%
Italia	10.017	-
Norvegia	1.318	-
Portogallo	2.567	1,2%
Spagna	1.503	3,6%
Regno Unito	13.366	17,1%

4.8 Diagnosi

La diagnosi dell'avvelenamento di tipo ASP è basata interamente sulla natura dei sintomi e sul cibo ingerito dal paziente. Il consumo di bivalvi (o, in misura minore, di crostacei), associato a disordini gastro-intestinali (crampi addominali, nausea, vomito e diarrea) insorti entro 24 ore dall'ingestione, può indicare un generico quadro d'avvelenamento da biotossine marine. Disturbi neurologici (mal di testa, confusione mentale, disorientamento, mutismo, perdita di memoria, ecc.), che si possono manifestare dopo le 24 ore dal consumo dei prodotti ittici, possono far pensare ad un avvelenamento acuto di tipo ASP. Questa sintomatologia si distingue da quella di altre

biotossine marine quali la PSP e la TTX in cui, nelle prime 12 ore dall'ingestione del cibo, insorgono sintomi quali torpore e formicolio delle labbra e degli arti inferiori, parestesia, ecc. Analogo ragionamento può essere fatto per escludere un avvelenamento da ciguatossine (Ciguatera Fish Poisoning o CFP), derivante dal consumo di pesci tossici pescati nelle acque dei mari della fascia tropicale o sub tropicale. Tuttavia, per una corretta diagnosi è importante ottenere campioni del cibo che il paziente ha consumato ed inviarli tempestivamente a laboratori specializzati, al fine di evidenziare l'eventuale presenza di tossine tipo ASP ed evitare altri casi di avvelenamento, bloccando pesca o raccolta dei prodotti incriminati. Le tossine tipo ASP possono essere evidenziate analizzando campioni di contenuto gastrico, urine, feci o sangue del paziente.

4.9 Trattamento

Il trattamento di pazienti che manifestano avvelenamento ASP è di tipo sintomatico, attualmente non esistono antidoti. Tuttavia, se l'ingestione dell'alimento contaminato è recente, il cibo può essere rimosso dallo stomaco con una lavanda gastrica.

Essendo l'AD un neuroeccitatore (si comporta quindi come una eccitotossina del sistema nervoso centrale), sono stati individuati alcuni elementi per limitarne o bloccarne gli effetti, al fine di mantenere il delicato equilibrio dinamico tra le influenze eccitatorie ed inibitorie nel sistema nervoso centrale. L'azione neurotossica dell'acido domoico è stata implicata nell'inibizione del GABA (acido γ -amminobutirrico) [53]. Il GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio nel cervello, esercitando i suoi effetti su recettori specifici, funziona come neuroprotettivo. Durante l'intossicazione canadese ASP del 1987, alcuni pazienti in preda a convulsioni, relativamente resistenti al farmaco Dilantin[®], furono trattati con alte dosi di benzodiazepine e fenobarbital per via endovenosa [16]. Le benzodiazepine sembrano sopprimere selettivamente l'attivazione neuronale indotta da KA, suggerendo che un trattamento rapido con alte dosi di benzodiazepine potrebbe evitare danni irreversibili dell'ippocampo [54]. Anche la melatonina, che gioca un importante ruolo come antiossidante e neuroprotettore, sembra contrastare e attenuare gli effetti eccitotossici dell'acido domoico e del kainato [55].

Ricerche su ratti da laboratorio intossicati con AD, indicano che il diazepam (5 mg/kg) riduce le convulsioni ma non diminuisce l'apprendimento o il danno all'ippocampo [56].

4.10 Prevenzione

L'azione principale per garantire una prevenzione efficace nel controllo delle intossicazioni ASP, e ostacolare il diffondersi di avvelenamenti, è il monitoraggio delle aree di mare dove sono pescati o allevati i prodotti della pesca soggetti a contaminazione. Particolare attenzione deve essere dedicata ai molluschi bivalvi, coltivati o pescati in banchi naturali, in quanto rappresentano il vettore principale per l'avvelenamento umano. Il monitoraggio deve riguardare il controllo quali-quantitativo del fitoplancton tossico o potenzialmente tossico e la quantificazione delle tossine nel prodotto pescato. L'efficacia di un monitoraggio è strettamente legata alla frequenza spaziale e temporale della raccolta dei campioni, che devono anche essere rappresentativi dell'area produttiva sottoposta al controllo. Inoltre, la conoscenza delle condizioni chimico-fisiche, biologiche e idrodinamiche dell'area interessata, la fisiologia delle microalghe tossiche o potenzialmente tossiche presenti, la fisiologia dei molluschi bivalvi raccolti, nonché la storia epidemiologica legata alla tradizione del consumo locale di questi prodotti, sono elementi altrettanto importanti per elaborare un piano di controllo preventivo che eviti episodi di ASP nei consumatori. Pur in assenza di dati ufficiali, la depurazione di bivalvi contaminati da tossine ASP, non è praticabile: sia per i tempi molto lunghi necessari, sia

perché economicamente onerosa (a causa degli spazi che devono essere impegnati appositamente), ma anche per il dimagrimento degli stessi bivalvi se questi non vengono opportunamente alimentati durante il periodo della stabulazione.

4.11 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine ASP

In Tab.3 è schematizzata la valutazione del rischio quando si hanno prodotti ittici contaminati da tossine del tipo ASP.

Tab. 3. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine ASP.

(LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* ; NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level*)

Distribuzione	L'AD è stato rilevato in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud America, Oceania.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	L'AD è un amminoacido eccitatorio, simile al glutammato, aspartato e kainato; interviene su alcuni recettori delle sinapsi (kainato), aumentando l'ingresso di ioni Ca ²⁺ nella cellula sino a condurla alla morte. La dose di AD assorbita è pari al 5-10% di quella ingerita. Il massimo assorbimento avviene attraverso il sangue. In condizioni normali la barriera emato-encefalica impedisce la penetrazione di AD nel cervello. L'AD non sembra essere metabolizzato e la sua secrezione avviene prevalentemente attraverso le urine. Il tempo di dimezzamento della tossina (in scimmie) è di 20-140 minuti.
Meccanismo d'azione	L'AD si comporta come agonista sui recettori dell'acido glutammico influenzando la trasmissione sinaptica; è considerato un amminoacido eccitatorio, un neurotrasmettitore e una neurotossina per il sistema nervoso centrale (SNC); recenti ricerche hanno evidenziato che l'acido domoico si lega a due sottotipi di recettori dell'acido kainico, la cui azione si esercita a livello pre e post-sinapsi.
Tossicità negli animali (topo)	Dipende dalla specie e dall'età. Non sono osservati effetti di tossicità con dosi di AD < 0,5 mg/kg p.c..
Tossicità nell'uomo (per via orale)	Effetto acuto con disturbi gastrointestinali, diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, perdita della memoria breve (60-110 mg di AD) e sintomi neurologici più gravi con dosi di 270-290 mg di AD. Sulla base dei dati epidemiologici è stato indicato un LOAEL di 1 mg/kg p.c. (FAO/IOC/WHO) e di 0.9 mg/kg p.c. (EFSA-CONTAM).
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Al LOAEL di 1 mg AD/kg p.c. (FAO/IOC/WHO) è stato applicato un fattore d'incertezza 10 (interspecie umana) per arrivare a un ARfD di 0,1 mg AD/kg p.c. (6 mg AD/persona). Al LOAEL di 0,9 mg/kg p.c. (EFSA-CONTAM) è stato applicato un fattore di incertezza di 3 per passare al NOAEL (0,3 mg AD/kg p.c.). A questo NOAEL è stato applicato un altro fattore d'incertezza intraspecie di 10 che ha portato a un ARfD di 30 µg/kg p.c. (1,8 mg/persona di 60 kg).

Di seguito (Tab. 4) sono riportati i valori dei Limiti Guida:

Tab. 4. Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Parte edibile ingerita (grammi)	Limite Guida* (mg AD/kg p.e.)		Limite (mg AD/kg p.e.) Reg. (CE) 853/2004
	FAO/IOC/WHO	EFSA/CONTAM	
100	60	18	20
250	24	7,2	
400	15	4,5	

*Calcolo dei Limiti Guida elaborati da R. Poletti, in base alle indicazioni FAO/IOC/WHO [58] e EFSA/CONTAM [59].

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo dell'acido domoico è stato indicato un limite di 20 mg di AD/kg di parte edibile [78].

4.12 Bibliografia

1. Wright J.L.C., 1989. *Domoic acid, a new shellfish toxin: the Canadian experience*. J. Shellfish Res. 8: 444.
2. Takemoto T., Daigo K., 1960. *Über die Inhaltsstoffe von Chondria armata und ihre pharmakologische Wirkung*. Archiv. der Pharmazie, 293: 627-633.
3. Daigo K., 1959. *Studies on the constituents of Chondria armata. II: Detection of the anthelmintical constituents & II: Isolation of an anthelmintical constituent*. Yakugaku Zasshi, (J. Pharm. Soc. Japan) 79: 350-356.
4. Piñeiro N., Vaquero E., Leao J.M., Gago-Martinez A. and Rodriguez Vasquez J.A., 2001. *Optimization of conditions for the liquid chromatographic-electrospray ionization-mass spectrometric analysis of amnesic shellfish poisoning toxins*. Chromatographia Supplement 53 (Suppl.), S-231-S-235.
5. Jeffery B., Barlow T., Moizer K., Paul S. and Boyle C., 2004. *Amnesic shellfish poison*. Food and Chemical Toxicology 42 (4): 545-557.
6. Zaman L., Aracawa O., Shimosu A., Onoue Y., Nishio S., Shida Y., Noguchi T., 1997. *Two new isomers from a red alga, Chondria armata*. Toxicon 35(2): 205-212.
7. Wright J.L.C. and Quilliam M.A., 1995. *Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons*. In: Hallegraef, G.M., Anderson, D.M. and Cembella, A.D. (eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO: 113-133.
8. Ravn H., 1995. *Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)*. HAB Publication series Volume 1. IOC Manuals and Guides No. 31, Vol. 1, 15 pp.
9. Takemoto T., 1978. *Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids*. In: Kainic acid as a tool in neurobiology. McGeer, E.G., Olney, J.W., McGeer P.L. (eds.). Raven Press., New York : 1-15.
10. Biscoe T.J., Evans R.H., Headley P.M., Martin M., Watkins J.C., 1975. *Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurones*. Nature, 8, 255(5504):166-167.
11. Coyle J.T., 1983. *Neurotoxic action of kainic acid*. J. Neurochem. 41(1): 1-11.
12. Hampson D.R., Wenthold R.J., 1988. *A kainic acid receptor from frog brain purified using domoic acid affinity chromatography*. J. Biol. Chem., 263(5): 2500-2505.
13. Laycock M.V., de Freitas A.S.W. and Wright J.L.C., 1989. *Glutamate agonists from marine algae*. J. Appl. Phycol. 1(2): 113-122.
14. Ramsdell J., 2007. *The molecular and integrative bases to domoic acid toxicity*. In: Phycotoxins Chemistry and biochemistry. Botana, L.M. Ed., Blackwell Publishing: 223-250.
15. Choi D.W., 1992. *Excitotoxic cell death*. J. Neurobiol. 23(9): 1261-1276.
16. Teitelbaum J.S., Zatorre R.J., Carpenter S., Gendron D., Evans A.C., Gjedde A., Cashma N.R., 1990. *Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels*. N. Engl. J. Med., 322(25): 1781-1787.
17. Doble A., 2000. *Pharmacology of Domoic acid*. In Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. Botana, L.M. Ed.: 359-372.
18. Debonnel G., Beauchesne L., de Montigny C., 1989. *Domoic acid, the alleged "mussel toxin", might produce its neurotoxic effect through kainate receptor activation: an electrophysiological study in the dorsal hippocampus*. Can J Physiol Pharmacol 67(1): 29-33
19. Olney J.W., 1990. *Excitotoxicity: an overview*. Proceedings of a symposium on domoic acid toxicity held at the Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, April 11-12, 1989. In: Can. Dis. Wkly Rep. 16, Suppl.1E: 47-57.
20. Rogers C.G., Boyers B.G., 1989. *Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in*

- hepatocytemediated assay with V79 Chinese hamster cells.* Mutat. Res., 226: 191-195.
21. Suzuki, C.A.M. and Hierlihy, S.L. 1993. Renal clearance of domoic acid in the rat. Food and Chemical Toxicology 31(10): 701-706.
22. Todd E.C.D., 1993. *Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning. A Review.* J. Food Protection, 56(1): 69-83.
23. Xi D., Peng Y.G. and Ramsdell J.S., 1997. *Domoic acid is a potent neurotoxin to neonatal rats.* Natural Toxins, 5(2): 74-79.
24. Iverson F., Truelove J., Tryphonas L., Nera E.A., 1990. *The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates.* Can. Dis. Wkly Rep. 16, Suppl. 1E: 15-19.
25. Truelove J., Mueller R., Pulido O., Martin L., Fernie S. and Iverson F., 1997. *30-day oral toxicity study of domoic acid in Cinomolgus monkeys: lack of overt toxicity at doses approaching the acute toxic dose.* Natural Toxins 5(3): 111-114.
26. Todd E.C.D., 1990. *Amnesic shellfish poisoning. A new seafood toxin syndrome.* In: Toxic Marine Phytoplankton. Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, Sweden, (Eds. Granéli, E.; Sundström, B.; Edler, L., and Anderson, D. M., Elsevier, New York; Amsterdam; London): 504-508.
27. Iverson F. and Truelove J., 1994. *Toxicology and Seafood Toxins: Domoic Acid.* Nat. Toxins, 2(5): 334-339
28. Maeda M., Kodama T., Tanaka T., Yoshizumi H., Takemoto T., Nomoto K. and Fujita T., 1986. *Structures of isodomoic acids A, B and C novel insecticidal amino acids from the red alga Chondria armata.* Chem. Pharm. Bull., 34: 4892-4895.
29. Perl T.M., Bédard L., Kosatsky T., Hockin J.C., Todd E., Remis R.S., 1990. *An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid.* New England Journal of Medicine, 322: 1775-1780.
30. Teitelbaum J.S., 1990. *Acute manifestations of domoic acid poisoning: case presentations.* Can. Dis. Wkly Rep. 16, Suppl 1E: 5-6.
31. Quilliam M.A., Sim P.G., McCulloch A.W. and McInnes A.G., 1989. *High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton.* Intern. J. Environ. Anal. Chem., 36: 139-154.
32. Preston E. and Hynie I., 1991. *Transfer constants for blood-brain barrier permeation of the neuroexcitatory shellfish toxin, domoic acid.* Can. J. Neurol. Sci., 18(1): 39-44.
33. Bates S.S., Bird C.J., de Freitas A.S.W., Foxall R., Gilman M., Hanic L.A., Johnson G.R., McCulloch A.W., Odense P., Pocklington R., Quilliam M.A., Sim P.G., Smith J.C., Subba Rao D.V., Todd E.C.D., Walker J.A. and Wright J.L.C., 1989. *Pennate diatom Nitzschia pungens as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada.* Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46: 1203-1215.
34. Impellizzeri G., Mangiafico S., Oriente G., Piattelli M., Sciuto S., Fattorusso E., Mano S., Santacroce C. and Sica D., 1975. *Constituents of red algae. I. Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae.* Phytochemistry, 14: 1549-1557.
35. Garrison L.D., Conrad S.M., Eilers P.P. and Waldron E.M., 1992. *Confirmation of domoic acid production by Pseud-nitzschia australis (Bacillariophyceae) cultures.* J. Phycol., 28: 604-607.
36. Todd E.C.D., 1997. *Seafood-associated diseases and control in Canada.* Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (2): 661-672.
37. Aréval F.F., Bermúdez M., Salgado C., 1998. *ASP toxicity in scallops: individual variability and tissue distribution.* In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt,

- T (Eds.), Harmful microalgae. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Santiago de Compostela: 499–502.
38. Giménez G., de la Iglesias P., Fernandez M., Diogène J., 2009. *First evidence of Domoic Acid in Shellfish from the Catalan Coast (NW Mediterranean Sea)*. Poster - 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety Nantes (France) pag. 140.
 39. Douglas D.J., Kenchington E.R., Bird C.J., Pocklington R., Bradford B. and Silvert W., 1997. *Accumulation of domoic acid by the sea scallop (Placopecten magellanicus) fed cultured cells of toxic Pseudo-nitzschia multiseries*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54: 907-913.
 40. Whyte J.N.C., Davis J.C. and Forbes J.R., 1997. *Harmful algae in Canadian waters and management strategies*. Ocean Res, 19(2): 161-171.
 41. Jones T.O., Whyte J.N.C., Townsend L.D., Ginther N.G., Iwama G.K., 1995. *Effect of domoic acid on haemolymph pH, PCO₂ and PO₂ in the Pacific oyster, Crassostrea gigas and the Californian mussel, Mytilus californianus*. Aquat. Toxicol., 31(1): 43-55.
 42. Van Apeldoorn M.E., Van Egmond H.P. and Speijers G.J.A., 1999. *Amnesic shellfish poisoning: A review*. RIVM report 388802 019. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven 53 pp.
 43. Stewart J.E., Marks L.J., Gilgan M.W., Pfeiffer E. and Zwickler B.M., 1998. *Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (Mytilus edulis) and soft shell clams (Mya arenaria) as sources of the microorganisms*. Can. J. Microbiol., 44(5): 456-464.
 44. Shumway S.E., Van Egmond H.P., Hurst J.W. and Bean L.L., 1995. *Management of shellfish resources*. In Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Enevoldsen, H.O. eds. Manual on harmful marine microalgae, pp. 433-461. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO
 45. Wekell J.C., Gauglitz E.J., Barnett, H.J. Hatfield C.L., Simons D. and Ayres D., 1994. *Occurrence of domoic acid in Washington State razor clams (Siliqua patula) during 1991-1993*. Nat. Toxins, 2(4): 197-205
 46. Kvittek R.G., Goldberg J.D., Smith G.J., Doucette G.J., Silver M.W., 2008. *Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 367: 35–47.
 47. Wekell J.C., Gauglitz, E.J., Barnett H.J., Hatfield C.L., Eklund M., 1994. *The occurrence of domoic acid in razor clams (Siliqua patula), dungeness crab (Cancer magister), and anchovies (Engraulis mordax)*. J. Shellfish Res., 13(2): 587-593.
 48. McGinness K.L., Fryxell G.A. and McEachran J.D. 1995. *Pseudonitzschia species found in digestive tracts of northern anchovies (Engraulis mordax)*. Can. J. Zool., 73: 642-647.
 49. Sierra Beltrán A., Palafox-Urbe M., Grajales-Montiel J., Cruz-Villacorta A. and Ochoa J.L., 1997. *Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading*. Toxicon 35(3): 447-453.
 50. Lefebvre K.A., Powell C.L., Busman M., Doucette G.J., Moeller P.D., Silver J.B., Miller P.E., Hughes M.P., Singaram S., Silver M.W. and Tjeerdema R.S., 1999. *Detection of Domoic Acid in northern anchovies and California Sea Lions associated with an unusual mortality event*. Nat. Toxins, 7(3): 85-92.
 51. Costa P.R., Rosa R., Pereira J. and Sampayo M.A.M., 2005. *Detection of domoic acid, the amnesic shellfish toxin, in the digestive gland of Eledone cirrhosa and E. moschata (Cephalopoda, Octopoda) from the Portuguese coast*. Aquat. Living Resour., 18(4): 395-400.
 52. Costa P.R., Rosa R., Sampayo M.A.M., 2004. *Tissue distribution of the amnesic*

- shellfish toxin, domoic acid, in Octopus vulgaris from the Portuguese coast.* Marine Biology, 144(5): 971–976.
53. Cunha R.A., Constantino M.D., Ribeiro J.A., 1997. *Inhibition of [³H]-aminobutyric acid release by kainate receptor activation in rat hippocampal synaptosomes.* Eur. J. Pharmacol., 323: 167-172.
54. Debonnel G., Weiss M., de Montigny C., 1990. *Neurotoxic effect of domoic acid: mediation by kainate receptor electrophysiological studies in the rat.* Can. Dis. Wkly. Rep., 16 Suppl 1E: 59-68.
55. Ananth C., Gopalakrishnakone P., Kaur C., 2003. *Protective role of melatonin in domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus of adult rats.* Hippocampus, 13(3): 375-387.
56. Nakajima S. and Potvin J.L., 1992. *Neural and behavioral effects of domoic acid, an amnesic shellfish toxin, in rat.* Can. J. Psychol., 46:569-581.
57. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, September 26-30, 2004.
58. EFSA. 2009. Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal, 1181: 1-61.
59. Subba Rao D.V., Quilliam M.A. and Pocklington R., 1988. *Domoic acid - A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom Nitzschia pungens in culture.* Can. J. Fish. Aquat. Sci, 45: 2076-2077.
60. Dickey R.W., Fryxell G.A., Grande H.R., Roelke D., 1992. *Detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid in shellfish and phytoplankton in the Gulf of Mexico.* Toxicon, 30: 355-359
61. Martin J.L., Haya K., Burrige L.E., Wildish D.J. 1990. *Nitzschia pseudodelicatissima - a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada.* Mar. Ecol. Prog. Ser., 67: 177-182
62. Buck K.R., Uttal-Cooke L., Pielskain C.H., Roelke D.L., Villac M.C., Fryxell G.A., Clfuentes L., Chavez F.P., 1992. *Autecology of the diatom Pseudonitzschia australis, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California.* Mar. Ecol. Prog. Ser., 84: 193-302.
63. Worms J., Bates S., Smith J.C., Cormier P., Léger C. and Pauley K., 1991. *Domoic acid, a neurotoxin produced by the pennate diatom Nitzschia pungens forma multiseriata: An overview of some recent ecology and physiological observations.* In: Proceedings of symposium on marine biotoxins (Ed. Freymy, J.M., CNEVA, B.P. 19, 94701 Maison-Alfort): 35-41.
64. Lundholm N., Skov J., Moestrup O. and Pocklington R., 1994. *Pseudonitzschia seriata - A new toxic diatom.* Harmful Algae News, IOC, 8,6.
65. Shimizu Y., Gupta S., Masuda K., Maranda L., Walker C.K. and Wang R., 1989. *Dinoflagellate and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry.* Pure Appl. Chem., 61: 513–516.
66. Maranda L., Wang R., Masuda K. and Shimizu Y., 1990. *Investigation of the source of domoic acid in mussels.* In: Toxic Marine Phytoplankton. Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund, Sweden. (Eds. Granéli, E.; Sundström, B.; Edler, L., and Anderson, D.M., Elsevier, New York;Amsterdam; London): 300-304.
67. Kotaki Y., Furio E.F., Bajarias Fe F.A., Satake M., Lundholm N., Koike K., Sato S., Fukuyo Y. and Kodama M., 2006. *New stage of the study on domoic acid-producing diatoms - a finding of Nitzschia navis-varingica that produces domoic acid derivatives as major toxin components - 2006.* Coastal Marine Science 30: 116-120.
68. Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y.,

- Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2009 onwards). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Available online at <http://www.marinespecies.org/HAB>.
69. Moestrup Ø., (2010). *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, 2003. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2010) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/HAB/aphia.php?p=taxdetails&id=246605>
70. Moestrup Ø., (2011). *Pseudo-nitzschia delicatissima* (P.T. Cleve, 1897) Heiden, 1928. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2011) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=149153>
71. Moestrup Ø. (2011). *Pseudo-nitzschia fraudulenta* (P.T. Cleve, 1897) Hasle, 1993. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2011) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=246606>
72. Moestrup Ø. (2011). *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Hasle, 1974) Hasle, 1995. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2011) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=175738>
73. Moestrup Ø. (2010). *Pseudo-nitzschia multistriata* (Takano, 1993) Takano, 1995. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2010) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=246608>
74. Guiry M.D. (2011). *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle, 1993. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2011) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=156548>
75. Moestrup Ø. (2011). *Pseudo-nitzschia seriata* (P.T. Cleve, 1883) H. Peragallo in H. & M. Peragallo, 1900. In: Guiry, M.D. & Guiry G.M. (2011). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Accessed through: Moestrup Ø., Akselman R., Cronberg G., Elbraechter M., Fraga S., Halim Y., Hansen G., Hoppenrath M., Larsen J., Lundholm N., Nguyen L. N., Zingone A. (Eds) (2011) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=149152>
76. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G.S., Tartaglione L., Quilliam M.A., Tubaro, A. and Poletti, R., 2005. *Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 19: 2030-2038.
77. Maric D., Ljubecic Z., Godrijan J., Vilicic D., Ujevic I., Precali R., 2011. *Blooms of the potentially toxic diatom Pseudo-nitzschia calliantha Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia)*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 92: 323-331.
78. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs.

Capitolo 5

Sindrome neurotossica da pesce palla

Capitolo 5

Sindrome Neurotossica da Pesce Palla

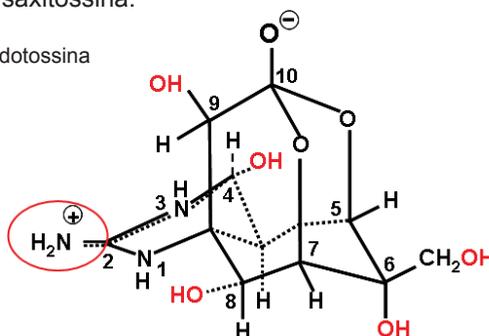
La tetrodotossina (TTX) è una delle più potenti tossine non proteiche; ampiamente distribuita nel mondo animale acquatico marino così come tra alcuni anfibi (rane e salamandre). Un estratto grezzo di TTX è stato isolato, per la prima volta, nel 1909 dal pesce palla *Sphaeroides rubripes*, (ora *Takifugu rubripes*) appartenente alla famiglia dei *Tetraodontidae* [1]. Già nel 2500 a.C., nei geroglifici degli antichi egizi c'è evidenza della conoscenza della tossicità del pesce palla, per aver causato la morte di persone e persino di un faraone [2]. Nella Legge Mosaica (1451 a.C.) c'è uno specifico riferimento al divieto di consumare pesci senza squame o senza pinne perché tossici (Esodo 19-20.1). Alcuni antichi scritti cinesi (618 d.C.) riportano la morte di imperatori della dinastia Han (200 a.C.) per aver consumato pesce palla; e nell'antica tradizione giapponese le gonadi femminili di pesce palla venivano mangiate dalle persone per procurarsi una rapida morte. Nella religione Voodoo (Vudù), praticata nell'America latina e Africa occidentale, le persone assumevano lo stato di "Zombie" mangiando una porzione di pesce palla [3].

In epoca più recente, il capitano James Cook nel diario di bordo, l'8 settembre del 1774, descrive i sintomi di una intossicazione patita da lui e da altri membri dell'equipaggio, attribuita al consumo di pesci palla pescati nella Nuova Caledonia, isola della Polinesia Francese [4].

5.1 Chimica della Tetrodotossina (TTX)

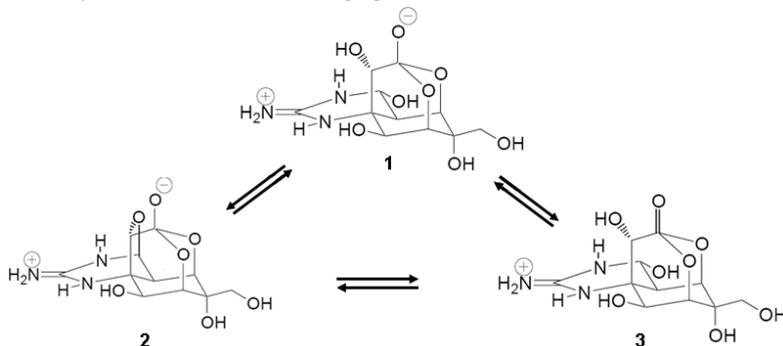
La TTX è stata isolata allo stato puro nel 1950 dalle ovaie di pesce palla [1] e pur essendo una piccola molecola (Fig. 1) non è stato facile individuarne la struttura chimica, a causa della sua originalità e delle proprietà non comuni. Tre diversi gruppi di ricercatori giunsero nel 1964, in modo indipendente, dopo numerosi sforzi, a chiarire la struttura della molecola [5,6,7]. Un altro gruppo di studiosi, sempre nello stesso anno, pubblicò un lavoro sulla tossina ritrovata in *Taricha torosa*, una salamandra californiana, a cui venne attribuito il nome di taricatossina, in seguito identificata come tetrodotossina [8]. La stereochimica della TTX fu determinata in modo assoluto attraverso la cristallografia ai raggi X solo nel 1970 [9]. La molecola è costituita da un gruppo guanidinico carico positivamente e da cinque anelli fusi contenenti gruppi ossidrilici che complessivamente interagiscono con la struttura α del canale Na^+ voltaggio-dipendente, similmente a quanto avviene per la saxitossina.

Fig. 1. Struttura della tetrodotossina



La TTX si presenta come un solido cristallino bianco con formula bruta $C_{11}H_{17}N_3O_8$, peso molecolare di 219,27, non fonde a $220^{\circ}C$, non ha un assorbimento specifico nello spettro UV; apparentemente è una base debole (pKa 8,76) ed esiste come una miscela in equilibrio tra le forme: orto-estere (1), anidride (2) e lattone (3) (Fig.2).

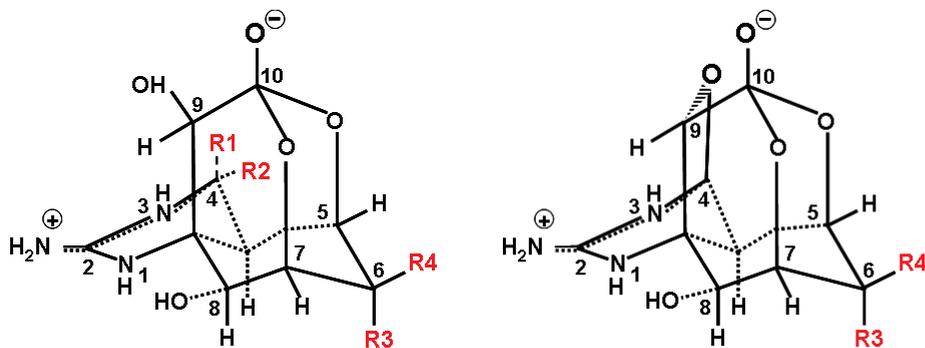
Fig. 2. Forme in equilibrio della tetrodotossina [10].



Nella forma altamente purificata la TTX si scioglie facilmente in acido acetico diluito e in altri acidi; è scarsamente solubile in acqua, etanolo ed etere, insolubile in altri solventi organici. In soluzione acquosa si pensa presenti una carica positiva sul gruppo guanidinico come anfoione e come catione; è stabile in soluzione neutra o leggermente acida e non si decompone alle normali temperature di cottura dei prodotti ittici [11].

Analoghi della TTX sono stati isolati da alcune specie di pesce palla e confermati in LC/MS/MS [12] (Fig.3).

Fig. 3. Struttura chimica della TTX e suoi analoghi, ritrovati in esemplari di pesci palla.



	R1	R2	R3	R4	MH ⁺ (m/z)
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	320
4-epTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	320
11-deossiTTX	H	OH	OH	CH ₃	304
6,11-dideossiTTX	H	OH	H	CH ₃	288
5-deossiTTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	304
5,6,11-trideossiTTX	H	OH	H	CH ₃	272
4,9-anidroTTX	O	H	OH	CH ₂ OH	302

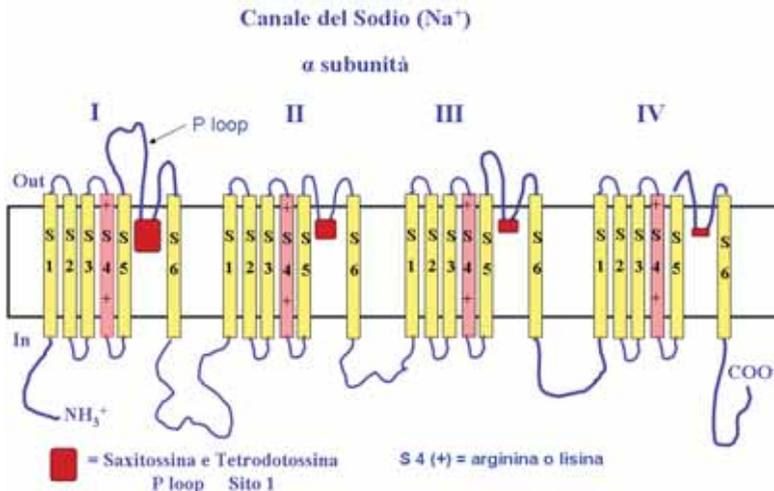
5.2 Meccanismo d'azione

Le tetrodotossine, al pari di altre biotossine marine (vedi saxitossine), agiscono con alta specificità sull'attività dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti, localizzati nella membrana delle cellule di tessuti eccitabili elettricamente, come fibre nervose e muscolari.

I canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti sono composti da glicoproteine multimeriche transmembrana (cioè che attraversano la membrana cellulare) formate da una subunità α , comprendente un grande poro di entrata, e da una o più subunità β ($\beta 1$, $\beta 2$ e anche $\beta 3$) che concorrono alla specificità dell'azione del canale. Le subunità α clonate da vari tessuti di mammiferi sono 10, mentre le subunità β sono 4 [13]. Le subunità α hanno una massa di 250-280 kD (circa 2.000 amminoacidi), con una struttura complessa caratterizzata da 4 domini simili (ognuno comprende 6 segmenti ad α elica) che attraversano la membrana cellulare (Fig.4) [14], tra loro collegati attraverso dei *loops* intra ed extracellulari. Questi canali, che permettono il passaggio dello ione Na⁺ dall'esterno (dove la concentrazione è di 440 nM) all'interno della cellula (concentrazione di 50nM), sono responsabili della fase ascendente del potenziale d'azione. In un solo canale aperto possono passare 10 milioni di ioni al secondo [15]. Il potenziale a riposo di una cellula nervosa è di circa -70/-90 mV; se la membrana si depolarizza fino a circa -55mV (cosiddetto "valore soglia") si ha l'apertura del canale permettendo che ioni positivi entrino nella cellula, depolarizzando ulteriormente la membrana fino a valori di +35 mV. Questa depolarizzazione provoca l'apertura di altri canali e la possibilità che l'impulso elettrico (l'informazione) possa essere trasmesso ad altre cellule.

Similmente a quanto avviene per le saxitossine, è il gruppo guanidinico della tetrodotossina, con la sua carica positiva, a penetrare in profondità nel poro del canale, e ad interagire, tramite complessi legami elettrostatici, con le cariche negative di alcuni amminoacidi che si trovano sulla superficie del poro. La sequenza degli amminoacidi dei quattro *loops* che formano l'entrata del canale e collegano i segmenti S5 e S6 di ogni dominio (D), rivestono un ruolo fondamentale nell'interazione con le TTXs. Tuttavia, anche i gruppi ossidrilici della molecola giocano un ruolo molto importante in questa fase d'interazione, in quanto sembrano formare legami idrogeno con gli amminoacidi che si affacciano nel poro del canale [16].

Fig. 4. Siti di legame di alcune biotossine marine con la subunità α del canale del Na⁺.



L'azione della TTX consiste nell'ostacolare il passaggio di ioni Na^+ , contrastare la depolarizzazione della membrana e l'innesco del potenziale d'azione (PA), impedendo in questo modo che l'impulso elettrico attraversi l'assone delle cellule nervose e si trasformi in risposta chimica, con il conseguente rilascio di neurotrasmettitori nelle fessure sinaptiche nervose o nelle giunzioni neuromuscolari (Fig.5).

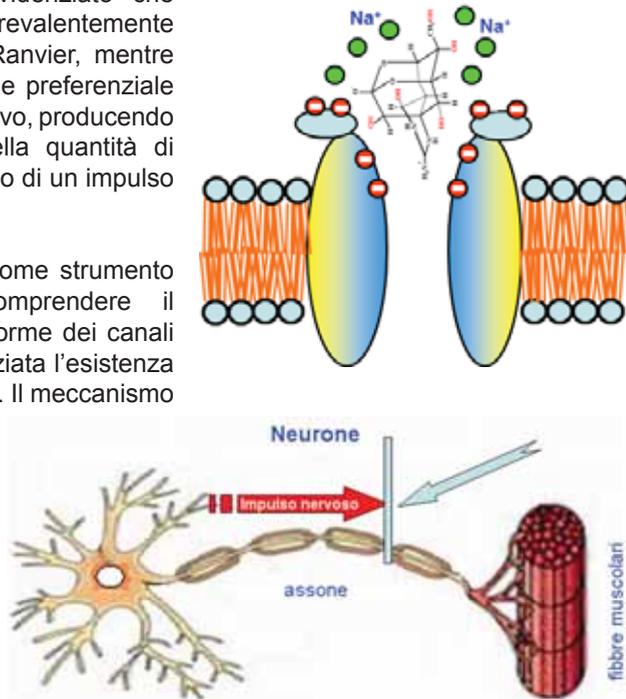
Alcune ricerche hanno evidenziato che la TTX sembra agire prevalentemente sull'assone presso i nodi di Ranvier, mentre la STX sembra avere un'azione preferenziale presso la zona terminale del nervo, producendo una progressiva riduzione della quantità di trasmettitore rilasciato dall'arrivo di un impulso nervoso [17].

La TTX è stata utilizzata come strumento di ricerca per meglio comprendere il funzionamento delle varie isoforme dei canali Na^+ (Na_v). È stata così evidenziata l'esistenza di canali Na^+ resistenti alla TTX. Il meccanismo che determina le differenze di resistenza (affinità o sensibilità) alla TTX di questi canali non è ancora molto chiaro. È stato dimostrato che l'isoforma $\text{Na}_v1.5$, espressa prevalentemente nei cardiomiociti atriali e ventricolari, mostra un'affinità per la TTX, espressa come

concentrazione inibente (IC_{50}), $\geq 1 \mu\text{M}$, inferiore di 10^3 volte il valore delle tre isoforme localizzate nel cervello ($\text{Na}_v1.1-1.3$) e di quello del muscolo scheletrico ($\text{Na}_v1.4$) [18,20]. Questo diverso comportamento dei canali Na^+ sembra dipendere dalla diversa sequenza di aminoacidi che compongono il P loop del dominio I, dove vi è il sito di legame della tossina. In particolare, è la presenza di un aminoacido aromatico (fenilalanina o tirosina) che sembra caratterizzare le isoforme ad alta affinità ($\text{Na}_v1.1-1.4$), diversamente da quanto avviene nell'isoforma $\text{Na}_v1.5$, a bassa affinità, che presenta invece l'amminoacido cisteina [19]. L'isoforma espressa prevalentemente nei cardiomiociti ($\text{Na}_v1.5$) è molto più sensibile al blocco del canale per via della presenza di cationi bivalenti che mostrano un'alta affinità con la cisteina rispetto ai residui aromatici, concorrendo in questo modo con la TTX [20,21].

Il meccanismo d'azione delle TTXs è molto complesso, la mutazione di un solo aminoacido nel P loop in D1 sembra capace di determinare la non completa chiusura del canale Na^+ (scarsa affinità), come avviene del resto anche per le saxitossine [22]. Questo potrebbe spiegare la capacità di accumulo e di tolleranza alla TTX che mostrano alcune specie di pesce palla, che presentano canali Na^+ resistenti, modificati in tempi ancestrali.

Fig. 5. Meccanismo d'azione della TTX.



5.3 Eziologia

La capacità di sintesi della TTX negli organismi marini, sebbene non ancora chiaramente definita, è attribuita ad alcune specie di batteri che agiscono o come simbiotici/endosimbionti in alcuni organismi bentonici, o attraverso la catena trofica. Alcuni ricercatori hanno isolato specie di batteri marini appartenenti ai generi *Vibrio*, *Alteromonas*, *Plesiomonas* e *Pseudomonas* capaci di sintetizzare TTX. Actinomiceti isolati in sedimenti di varie zone marine hanno pure dimostrato di essere in grado di produrre TTX [23]. Dalla superficie di un'alga rossa calcarea, *Jania* sp., (conosciuta per contenere TTX [24]) sono stati isolati due ceppi batterici produttori di TTX: uno di *Listonella pelagia* e uno di una nuova specie *Shewanella alga* sp. nov. [25]. Ceppi coltivati di *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Vibrio*, isolati da *Hapalochlaena maculosa* (gli esemplari di questo genere sono definiti “polpi dagli anelli blu”), conosciuto per essere estremamente tossico per TTX, hanno dimostrato di poter produrre TTX [26]. Batteri produttori di TTX sono stati isolati in vari organismi marini: *Vibrio alginolyticus* ritrovato nella stella marina *Astropecten polyacanthus* [27]; *Vibrio* sp. nel granchio *Atergatis floridus* [28]; *Vibrio* ceppo LM-1 isolato nel contenuto stomacale del pesce palla *Fugu vermicularis radiatus* [29]; *Bacillus horikoshii* isolato dal fegato di un pesce palla di una specie non identificata [30].

Per confermare il coinvolgimento di batteri marini nella produzione di TTX, è stato condotto un esperimento su ceppi di specie batteriche tipiche dell'ambiente marino; sono stati scelti 15 ceppi appartenenti alla famiglia delle *Vibronaceae*, 5 ceppi del genere *Alteromonas* e 1 ceppo di *Escherichia coli*. Dei 15 ceppi appartenenti alle *Vibronaceae*, 10 hanno mostrato capacità di produrre anidro-TTX. Né *E. coli*, né i 5 ceppi di *Alteromonas* hanno prodotto TTX [31]. I risultati sono schematizzati in Tab.1.

Tab. 1. Determinazione di TTX e anidro-TTX in cellule batteriche [31].

+, chiaramente rilevata; ±, difficoltà di rilevamento; -, tossina non rilevata; ^a, ceppi coltivati in acqua dolce

Ceppi batterici	Tossina rilevata tramite analisi in:		
	TTX	HPLC anidro-TTX	GC-MS
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	-	+	+
<i>V. alginolyticus</i> NCMB 1903	-	+	+
<i>V. anguillarum</i> NCMB 829	-	+	+
<i>V. anguillarum</i> NCMB1291	-	+	+
<i>V. costicola</i> (<i>V. costicolus</i>) NCMB 701	-	+	+
<i>V. fischeri</i> NCMB 1281	-	±	-
<i>V. fischeri</i> (<i>Photobacterium fischeri</i>) NCMB 1381	-	±	±
<i>V. harveyi</i> (<i>Aeromonas harveyi</i>) NCMB 2	-	±	+
<i>V. marinus</i> Ps 207	-	±	±
<i>V. parahaemolyticus</i> NCMB 1902	-	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	-	+	+
<i>Photobacterium phosphoreum</i> NCMB 844	±	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> NCMB 89	±	+	-
<i>A. hydrophila</i> NCMB 89 ^a	-	±	-
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174	±	+	+
<i>A. salmonicida</i> ATCC 14174 ^a	±	±	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i> ATCC 14029	±	+	+
<i>Escherichia coli</i> IAM 1268	-	-	-
<i>E. coli</i> IAM 1268 ^a	-	±	±
<i>Alteromonans communis</i> IAM 12914	-	±	±
<i>A. haloplanktis</i> IAM 1218	-	-	-
<i>A. nigrifaciens</i> IAM 13010	±	±	±
<i>A. undina</i> IAM 12922	-	-	-
<i>A. vaga</i> IAM 12923	±	-	±

Le continue ricerche sui produttori primari di TTX conducono ad un rapido aumento del numero di ceppi batterici capaci di produrre questa tossina; la maggior parte di questi appartiene al genere *Vibrio* (famiglia delle *Vibrionaceae*). Alcuni ceppi di *Vibrio alginolitycus*, specie diffusa sia negli organismi marini che nell'acqua di mare delle zone temperate e tropicali, producono TTX [27], rappresentando un potenziale pericolo per molte aree che ancora non conoscono il problema.

5.4 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

5.4.1 Tossicità negli animali

La tossicità della tetrodotossina e dei suoi analoghi (TTXs) si determina, generalmente, tramite *mouse-test*, mediante iniezione intraperitoneale di un estratto acido di parte edibile di prodotto ittico. La tossicità è espressa in UT (unità topo), definita come la quantità di tossina che uccide un topo maschio (ceppo ddY o ICR) di 20g in 30 minuti. La sintomatologia che il topo manifesta dopo iniezione intraperitoneale di TTX, è di natura neurotossica: sfregamento ripetuto del muso con le zampe anteriori; progressivo stato di debolezza che porta alla paralisi degli arti posteriori; movimenti scoordinati; respirazione affannosa; insorgenza di convulsioni seguite da salti e paralisi respiratoria. La quantità di tossina rilevabile è di 0,2 µg di TTX (corrispondente a 1UT) e la potenza letale di 1mg di TTX varia dalle 5.000 alle 6.000 UT [32,33]. Topi maschi (ceppo ddY) di 15g di peso, trattati via i.p. con una dose di 15 µg di 6,11-dideoxyTTX morivano in 3 minuti, mentre topi di 18 g trattati con 4 µg della stessa tossina, pur mostrando leggeri sintomi neurotossici, sopravvivevano oltre le 24 ore. La LD₅₀ (quantità di tossina in grado di uccidere la metà delle cavie durante l'esperimento, in questo caso *mouse test* via i.p.) per 6,11-dideoxyTTX era calcolata in 450 µg/kg p.c., per TTX era di 10 µg/kg p.c. [34] e per 11- deoxyTTX era di 70 µg/kg p.c. [35]. In un altro studio di tossicità, la LD₅₀ per TTX in topi, somministrata per via intraperitoneale (i.p.), sottocutanea (s.c.) e intragastrica (i.g.), era rispettivamente di: 10,7 , 12,5 e 532µg/kg p.c.. In esemplari di coniglio, la somministrazione di TTX per via intramuscolare (i.m.) e per via venosa (i.v.), mostrava una dose minima letale (MLD) rispettivamente di 5,3 e 3,1 µg/kg., mentre la dose letale (LD) era calcolata in 5,8 e 3,8 µg/kg p.c. [36]. Nel gatto domestico, la dose minima di TTX in grado di fare insorgere la sintomatologia è di 1µg/kg p.c..

La concentrazione di TTXs che alcune specie di pesci o altri organismi marini accumulano nei loro organi o tessuti muscolari, senza apparentemente manifestare disturbi o mortalità, può essere di molte volte superiore alla concentrazione considerata letale per l'uomo. Alcune ricerche indirizzate a verificare la resistenza alla TTX, iniettata per via i.p., in alcuni organismi marini come crostacei e pesci (gobidi, tetrodonti tossici e non tossici, ecc.) hanno consentito di determinare valori di MLD per la TTX, espressi come UT (Tab.2). I tetrodonti tossici mostrano valori di MLD di molte volte superiori a tutti gli altri pesci (compresi i tetrodonti non tossici) ma non ai crostacei. I pesci non tetrodonti hanno una MLD <1UT/g [37]. La resistenza alla TTX mostrata dai crostacei sembra dovuta alla possibilità che la tossina possa venire sequestrata, durante il trasporto, da alcune proteine dell'emolinfa [38].

Tab. 2. Resistenza alla TTX di alcuni organismi [63].

	Specie	MLD* (UT/20 g)	Rif.
Organismi vettori di TTX	Granchi della famiglia Xanthidae	1.000	[39]
	Pesci tropicali della famiglia Gobiidae	>300	[40]
	Tritone giapponese	>10.000	[64]
		<i>Alteigatis floridus</i> <i>Yongeichtys criniger</i> <i>Cynops pyrrhogaster</i>	
Pesci-palla tossici	<i>Takifugu niphobles</i>	700-750	[41]
	<i>T. pardalis</i>	500-550	
	<i>T. rubripes</i>	300-500	
Pesci-palla non tossici o raramente tossici	<i>Lagocephalus wheeleri</i>	15-18	[41]
	<i>L. gloveri</i>	19-20	
	<i>Liosaccus cutaneus</i>	13-15	
Pesci-palla non tossici	<i>Ostracion immaculatum</i>	0,9-1,3	[41]
Teleostei privi di TTX	<i>Oplegnathus punctatus</i>	0,8-0,9	[41]
	<i>O. fasciatus</i>	0,8-1,8	
	<i>Girella punctata</i>	0,3-0,5	
	<i>Mus musculus</i>	1	

*MLD di = Dose minima letale di TTX (UT/20 g di peso corporeo) che uccide il 100% degli organismi sottoposti a test, tramite iniezione intraperitoneale (i.p.)

Il meccanismo d'azione, di trasporto, accumulo ed eliminazione delle TTXs negli organismi marini non è ancora del tutto chiarito. TTX iniettata per via intramuscolare in esemplari allevati di tetrodonti non tossici (*Takifugu rubripe*) veniva accumulata solo in piccola parte nel fegato; la maggior parte (il 90%) rimaneva nel corpo, e di seguito era trasferita e accumulata nella pelle. La stessa concentrazione di tossina, somministrata però attraverso la dieta, uccideva i pesci ed era ritrovata nel muscolo [42].

Alcune ricerche hanno dimostrato che i pesci tetrodonti tossici sono dotati di specifiche proteine nel plasma capaci di legarsi alle TTXs e di trasportarle nei vari tessuti [43,44].

Nelle acque del Giappone sono state individuate 22 specie tossiche di tetrodonti; in questi, le TTXs vengono accumulate in varie parti dell'organismo, a seconda della specie, del periodo fisiologico dell'esemplare e della stagione. Generalmente il muscolo, la testa e la pelle sono le parti a più bassa tossicità (<10 UT/g), mentre i visceri, specialmente il fegato e le gonadi (sia maschili che femminili), sono quelle a più alta tossicità, con livelli di TTX talvolta superiori a 1000 UT/g [45].

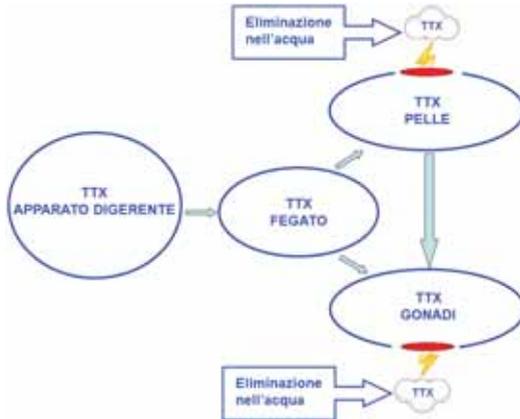
In Tab.3 è evidenziata la localizzazione di TTX nel corpo di alcuni esemplari femmina di diverse specie di pesci palla [46].

Tab. 3. Localizzazione di TTXs in alcune specie di pesci palla

Specie	µg TTX / g peso umido				
	ovaie	fegato	pelle	intestino	muscolo
<i>Fugu pardalis</i>	200	1000	100	40	1
<i>F. vermicularis vermicularis</i>	400	200	100	40	4
<i>F. vermicularis porphyreus</i>	400	200	20	40	1
<i>F. rubripes rubripes</i>	100	100	10	20	< 0,2
<i>F. ocellatus obscurus</i>	1000	40	20	40	< 0,2
<i>F. niphobles</i>	400	1000	40	400	4
<i>Lagocephalus infernus</i>	0,4	1	< 0,2	0,4	0,4

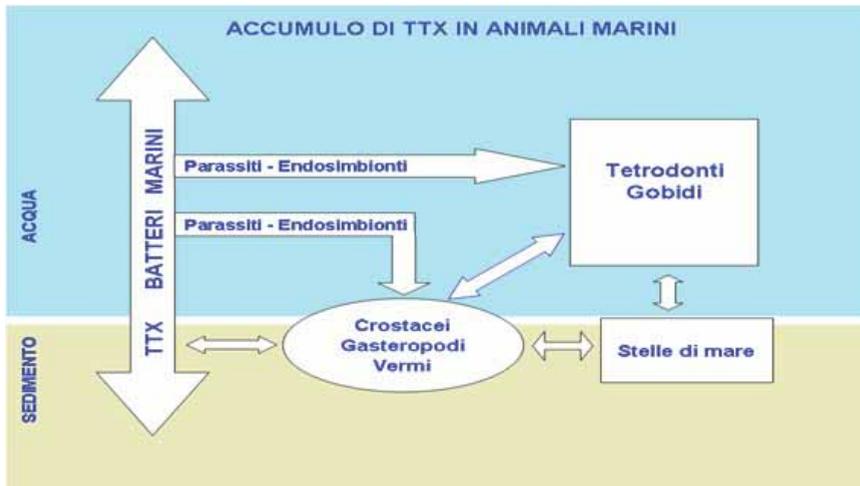
Nel periodo della maturazione delle ovaie, come schematizzato in Fig.6, la TTX tende a spostarsi dal fegato e dalla pelle nelle gonadi; questo viene interpretato come un meccanismo di difesa della specie nei confronti dei predatori [47].

Fig. 6. Trasporto della TTX dal fegato e dalla pelle dei pesci alle ovaie in maturazione.



Oltre ai pesci, altri organismi marini, come molluschi bivalvi, gasteropodi, cefalopodi, echinodermi, legati dalla catena alimentare bentonica, possono accumulare TTX (Fig.7) [26].

Fig. 7. Proposta di meccanismo di accumulo di TTX in animali marini.

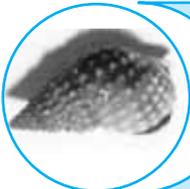


In effetti, i pesci tetrodonti non sono gli unici organismi implicati nei casi di avvelenamento da TTX; nell'Isola di Taiwan, dal 1986 al 2008 su 36 episodi di avvelenamento registrati, 23 erano attribuibili a pesci palla, 8 a gasteropodi e 3 a gobidi [26].

Persone intossicate da TTX per consumo di gasteropodi della specie *Zeuxis sufflatus* e *Niotha clathrata* presentavano sintomi quali: parestesia generale, paralisi delle falangi e delle estremità, vomito, afasia e coma. Sui campioni di gasteropodi incriminati sono state rilevate concentrazioni di TTX di 345-1640 unità topo (UT) per *Z. sufflatus* e di 190-643 UT per *N. clathrata*. La tossicità della ghiandola digestiva e delle altre parti dell'organismo era rispettivamente di 1.120 ± 477 UT e 497 ± 238 UT per *Z. sufflatus*, e di 683 ± 113 UT e 289 ± 169 MU per *N. clathrata* [49].

In Tab.4 vengono riportati alcuni esempi di organismi marini in grado di accumulare TTX.

Tab. 4. Tossicità da TTX rilevata in diversi organismi marini

Organismo	Tossicità da TTX	Rif. Bibl.
	<p><i>Astropecten sp.</i></p> <p>16.821 UT/g p.e.</p>	<p>[48]</p>
	<p><i>Veremolpa scabra</i></p> <p>33 UT/g p.e.</p> <p>(http://catalog.digitalarchives.tw/item/00/11/28/23.html)</p>	<p>[48]</p>
	<p><i>Niotha clathrata</i></p> <p>490 UT/g p.e.</p>	<p>[48]</p>
	<p><i>Zeuxis sufflatus</i></p> <p>730 UT/g p.e.</p>	<p>[48]</p>
	<p><i>Charonia lampas lampas</i></p> <p>31,5 mg/100g GD</p>	<p>[50]</p>
	<p><i>Demania cultripes</i></p> <p>52,1 UT/g visceri</p> <p>(http://www.hindawi.com/journals/jt/2010/172367/fig2/)</p>	<p>[51]</p>
	<p><i>Hapalochlaena maculosa</i></p> <p>1.000 UT/g gh. salivare</p> <p>(http://techhouse.brown.edu/~spg/blueringed.html)</p>	<p>[52]</p>

5.4.2 Tossicità nell'uomo

L'avvelenamento da TTX è una delle più potenti e drammatiche intossicazioni neurotossiche; coinvolge prevalentemente le popolazioni dei Paesi della regione Indo-Pacifica, di alcuni Paesi dell'Oceano Atlantico e del Golfo del Messico. La quantità di TTX letale per l'uomo varia da 1 a 4 mg; la MLD_{50} (dose minima letale) è fissata in 10.000 UT (corrispondente a circa 2 mg di TTX); disturbi seri possono insorgere già con una dose di $10\mu\text{g}$ TTX/kg p.c.[53]. La morte può insorgere in tempi molto rapidi per paralisi respiratoria, a causa del blocco dei muscoli che supportano la respirazione. L'avvelenamento da TTX determina sia sintomi neurologici che gastrointestinali, la cui evoluzione e gravità è dipendente dalla quantità di tossina ingerita, dallo stato di salute della persona intossicata e dalla rapidità di intervento. Se il paziente giunge al pronto soccorso cosciente e nella fase che precede l'arresto respiratorio, se supera le 24 ore ha buone possibilità di sopravvivenza. In relazione ai numerosi casi di avvelenamento umano riscontrati nel tempo, i sintomi clinici da TTX sono stati classificati, già dal 1941, in quattro stadi a crescente gravità (Tab.5) [54].

Tab. 5. Classificazione dei sintomi clinici da TTX in relazione alla loro gravità

Stadio di gravità	Sintomatologia	Tempo di insorgenza dei sintomi
1° Stadio (sintomatologia leggera)	Lieve torpore delle labbra e della lingua, talvolta accompagnato da sintomi gastrointestinali (principalmente nausea ^a).	5-45 minuti
2° Stadio (sintomatologia moderata)	Torpore del viso e di altre aree, parestesia avanzata, paralisi motoria delle estremità, incoordinazione, cattiva articolazione della parola. I riflessi sono comunque normali.	10-60 minuti
3° Stadio (sintomatologia grave)	Incoordinazione del sistema muscolare, afonia, disfagia, dispnea, cianosi, diminuzione della pressione sanguigna, pupille fisse e dilatate, dolore precordiale. La vittima è ancora cosciente.	da 15 minuti ad alcune ore
4° Stadio (sintomatologia gravissima)	Grave insufficienza respiratoria e ipossia, grave ipotensione, bradicardia, aritmia cardiaca, il cuore continua a pulsare per un breve periodo.	15 minuti -24 ore

^a) la TTX è considerata il più potente agente emetico in quanto agisce direttamente sul chemiorecettore midollare [55,56].

Tale sintomatologia evidenzia che la TTX non è in grado di superare la barriera ematoencefalica; il paziente, nonostante sia completamente paralizzato, può ancora rimanere in uno stato di coscienza e lucidità fino a poco prima dell'insorgenza della morte, che, in genere, avviene entro 4-6 ore, ma che può anche verificarsi in tempi rapidissimi (20 minuti circa) [57].

In alcuni pazienti ricoverati per avvelenamento con sintomatologia grave, la concentrazione di TTX nelle urine variava da 169 a 325 ng/mL, mentre i livelli nel sangue non superavano gli 8 ng/mL, indicando in tal modo che la principale via di eliminazione della tossina era il sistema urinario [58].

Non ci sono antidoti per la TTX che possano essere somministrati alle persone intossicate, quindi il trattamento medico è esclusivamente di supporto: ventilazione meccanica per favorire l'ossigenazione, lavanda gastrica per eliminare la tossina non assorbita, ingestione di carbone attivo per sequestrare la tossina onde evitarne ulteriore assorbimento, ecc.

Nonostante i numerosi casi di morte da sindrome neurotossica per ingestione di pesce palla, non si riesce a proibirne il consumo nei Paesi asiatici (area tropicale e sub tropicale), dove è considerato un piatto tradizionale. Per assecondare tali consuetudini, legate alla cultura alimentare, la legge giapponese consente il consumo di *Tetraodontidae*, ma solo in ristoranti ufficialmente autorizzati, che si avvalgono di cuochi altamente specializzati nella manipolazione di tali pesci. Inoltre, nel 1983 il Ministero della Salute giapponese ha pubblicato, sulla base dell'esperienza e delle ricerche scientifiche, un elenco (aggiornato successivamente, nel 1993 e nel 1995) della commestibilità delle parti abitualmente utilizzate delle varie specie di pesci palla (Tab.6), con il divieto assoluto di commercializzazione e consumo del fegato di questi pesci [59]. E' stato osservato che la localizzazione della TTX all'interno del corpo dei pesci palla sembra essere specie-specifica. Nelle specie marine fegato e ovario generalmente sono le parti maggiormente tossiche, seguite dall'intestino e dalla pelle, mentre di solito muscolo e testicoli non sono tossici o lo sono solo leggermente.

Tab. 6. Commestibilità delle diverse parti edibili di alcune specie di pesci palla secondo la legislazione giapponese. commestibile non commestibile

Famiglia	Specie	Parte edibile		
		muscolo	pelle	testicolo
Tetraodontidae	<i>Takifugu niphobles</i> (Kasafugu)			
	<i>T. poecilonotus</i> (Komonfugu)			
	<i>T. pardalis</i> (Higanfugu)			
	<i>T. snyderi</i> (Shousaifugu)			
	<i>T. vermicularisa</i> (Nashifugu)*			
	<i>T. porphyreus</i> (Mafugu)			
	<i>T. obscurus</i> (Mefugu)			
	<i>T. chrysops</i> (Akamefugu)			
	<i>T. rubripes</i> (Torafugu)			
	<i>T. chinensis</i> (Karasu)			
	<i>T. xanthopterus</i> (Shimafugu)			
	<i>T. stictonotus</i> (Gomafugu)			
	<i>Lagocephalus inermis</i> (Kanafugu)			
	<i>L. wheeleri</i> (Shirosabafugu)			
	<i>L. gloveri</i> (Kurosabafugu)			
	<i>Sphoeroides pachygaster</i> (Yoritofugu)			
<i>Takifugu flavidus</i> (Sansaifugu)				
Diodontidae	<i>Chilomycterus reticulatus</i> (Ishigakifugu)			
	<i>Diodon holocanthus</i> (Harisenbon)			
	<i>D. liturosus</i> (Hitozuraharisenbon)			
	<i>D. hystrix</i> (Nezumifugu)			
Ostraciidae	<i>Ostracion immaculatum</i> (Hakofugu)			

*indicazioni valide per le specie catturate nella Baia di Shimabara e di Tachibana, nel mare internodi Kagawa e Okayama, e per i testicoli dei pesci catturati nella Baia di Shimabara di Tachibana.

commestibile non commestibile

Tale regolamentazione tuttavia non riesce ad arrestare i casi di avvelenamento da TTX che ogni anno continuano a verificarsi, riconducibili prevalentemente al consumo di pesce palla selvatico non acquistato attraverso la catena commerciale controllata.

I controlli comunque sono risultati molto efficaci nel crollo del tasso di mortalità che, in Giappone, è passata dal 58% del 1965 (106 episodi che hanno visto coinvolte 152 persone, con 88 casi di morte), al 5,4% nel 2008 (40 incidenti che hanno visto coinvolte 56 persone, con 3 decessi); nel 2009 e nel 2010, pur in presenza di fenomeni di intossicazione, non si sono avuti decessi [65]. Secondo le Autorità giapponesi i casi di mortalità da TTX sono attribuibili per il 50% al consumo di fegato, per il 43% al consumo di gonadi e per il 7% al consumo di pelle [59].

In Europa il Regolamento (CE) N.853/2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, per le tossine nocive alla salute umana (All.III; Sez.VIII; Cap.V; Paragrafo E) dichiara:

1. Non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi delle seguenti famiglie: *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* e *Canthigasteridae*.

2. Non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca contenenti biotossine (ad esempio la ciguatossina o le tossine che paralizzano i muscoli). Tuttavia, i prodotti della pesca ottenuti da molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini possono essere immessi sul mercato se sono stati prodotti a norma della sezione VII e soddisfino i requisiti di cui al capitolo V, punto 2, di detta sezione.

Altri Paesi hanno introdotto nella loro legislazione il divieto di importazione e commercializzazione di pesci tetrodonti; nonostante questo, casi di avvelenamento da TTX sono registrati in tutto il mondo. Ciò è attribuito principalmente alla commercializzazione abusiva di questi prodotti (popoli asiatici che si spostano in altri Paesi tendono a mantenere le loro tradizioni culinarie), a frodi commerciali (il pesce commercializzato, spesso congelato e toelettato, è di difficile riconoscimento da parte dell’Autorità competente, così il nome riportato sull’etichettatura può non coincidere con la reale specie), ma anche alla colonizzazione di nuove aree da parte dei batteri produttori primari di TTX, che sembra legata ai cambiamenti climatici (aumento delle temperature dell’acqua).

Di seguito sono riportati alcuni episodi emblematici, per evidenziare quanto sia complicato e difficile per l’Autorità competente impedire la diffusione di questo tipo di tossina, come di altre, accumulate nei pesci o altri prodotti della pesca:

- a) In Italia casi di grave intossicazione alimentare da TTX si sono verificati nell’estate del 1977, con 10 persone coinvolte (7 a lesolo, 3 a Roma) e decessi. La causa fu attribuita al consumo di pesci tetrodonti tossici provenienti da Taiwan, mescolati in proporzione del 4% a partite commercializzate sotto la falsa dicitura di *Lophius piscatorius* (rana pescatrice). La concentrazione di TTX presente nei pesci incriminati variava da 50 a 3.000 µg/100g p.e. [61]. Un analogo incidente fu registrato nel 1978 in provincia di Pavia (con 3 casi di intossicazione): la concentrazione di TTX rilevata nei pesci congelati incriminati era di 750 µg/100 p.e. [62].
- b) California, 29 aprile 1996: tre casi di avvelenamento da TTX per consumo di fugu (pesce palla) importato dal Giappone come prodotto preconfezionato e pronto per essere consumato. Le indagini condotte dal *San Diego Department of Environmental Health* (SDEH) e dalla *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) dimostrarono che le quantità di prodotto consumate da ciascun individuo erano molto piccole: ¼ di oncia (circa 7g); ½ oncia (circa 14g); 1 oncia (28,35 g). Le persone intossicate

mostrarono i primi sintomi da intossicazione dopo 3-20 minuti dal pasto e vennero immediatamente ricoverate.

- c) Nel settembre 2006 casi da intossicazione da TTX sono stati registrati nell'Illinois, in California e alle Hawaii per consumo di tetrodonti provenienti dalla Cina commercializzati come *Lophius piscatorius* [60].
- d) Spagna, ottobre del 2007: un uomo accusò intensi disturbi intestinali accompagnati da vomito e difficoltà nella respirazione dopo aver consumato le carni e la ghiandola digestiva del gasteropode *Charonia lampas lampas*. Ricoverato, entrò in coma e fu mantenuto in vita col supporto della respirazione meccanica; dopo 72 ore i sintomi scomparvero. L'analisi chimica dimostrò la presenza di TTX nella ghiandola digestiva del mollusco, con una concentrazione di circa 31,5 mg/100 g di g.d. [50].

Il caso spagnolo del 2007 di avvelenamento da TTX per consumo di gasteropodi, dimostra che i produttori primari di questa tossina sono presenti anche in Europa e la loro diffusione può interessare anche aree di mare diverse da quelle fin qui segnalate. Inoltre, la TTX presente in questi gasteropodi marini potrebbe trasferirsi ad altri organismi marini legati tra loro dalla catena trofica.

5.4.3 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tetrodotossina (TTX)

In Tab.7 è espressa una sintesi della valutazione del rischio per la TTX elaborata da quanto in precedenza riportato.

Tab. 7. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da TTX.

Distribuzione	Intossicazioni da TTX sono state documentate per consumo di prodotti ittici pescati nella fascia tropicale e subtropicale dell'Oceano Indiano e dell'Oceano Pacifico, ma anche nell'Oceano Atlantico, nel Golfo del Messico e della California. Nel 2007 TTX è stata segnalata in Spagna in un gasteropode (<i>Charonia lampas lampas</i>).
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Assorbimento, accumulo ed eliminazione delle TTXs negli organismi marini non sono ancora del tutto chiariti. In specie tossiche di tetrodonti le TTXs sono accumulate in varie parti dell'organismo, a seconda della specie, del periodo fisiologico dell'esemplare e della stagione. Generalmente il muscolo, la testa e la pelle sono le parti a più bassa tossicità, mentre i visceri, specialmente il fegato e le gonadi (sia maschili che femminili) sono quelle a più alta tossicità. TTX iniettata per via intramuscolare in esemplari allevati di tetrodonti non tossici viene accumulata solo in piccola parte nel fegato; la maggior parte (il 90%) rimane nel corpo, e di seguito è trasferita e accumulata nella pelle. Alcune ricerche hanno dimostrato che i pesci tetrodonti tossici sono dotati di specifiche proteine nel plasma capaci di legarsi alla TTX e di trasportarla nei vari tessuti. In alcuni pazienti ricoverati per avvelenamento da TTX con sintomatologia grave, la principale via di eliminazione della tossina era il sistema urinario.
Meccanismo d'azione	Le TTXs agiscono sui canali dello ione Na ⁺ voltaggio-dipendenti (glicoproteine multimeriche trans-membrana) bloccando il passaggio del Na ⁺ . Questi canali sono localizzati nella membrana delle cellule di tessuti eccitabili elettricamente, come le fibre nervose ed i muscoli scheletrici e il loro blocco determina la mancanza di informazioni fra le stesse cellule. La TTX è stata utilizzata come strumento di ricerca per meglio comprendere il funzionamento delle varie isoforme dei canali Na ⁺ (Na _v); è stata evidenziata l'esistenza di canali Na ⁺ resistenti alla TTX. Il meccanismo che determina le differenze di resistenza (affinità o sensibilità) alla TTX di questi canali non è ancora molto chiaro.
Tossicità in animali (topo)	La tossicità acuta (LD ₅₀) di TTX somministrata in topo per via intraperitoneale (i.p.) è circa 10 µg/kg p.c.; per via sottocutanea 12 µg/kg; per via intragastrica (i.g.) 532 µg/kg p.c..

Tossicità nell'uomo	<p>L'avvelenamento da TTX è una delle più potenti e drammatiche intossicazioni neurotossiche; la quantità di TTX letale per l'uomo varia da 1 a 4 mg; la MLD₅₀ (dose minima letale) è fissata in 10.000 UT (corrispondente a circa 2 mg di TTX); disturbi seri possono insorgere già con una dose di 10 µg TTX/kg p.c.. La morte può insorgere in tempi molto rapidi per paralisi respiratoria, a causa del blocco dei muscoli che supportano la respirazione. L'avvelenamento da TTX determina sia sintomi neurologici che gastrointestinali, la cui evoluzione e gravità dipendono dalla quantità di tossina ingerita, dallo stato di salute della persona intossicata e dalla rapidità di intervento. I sintomi clinici sono classificati in quattro stadi a crescente gravità:</p> <ul style="list-style-type: none"> - sintomi leggeri: lieve torpore di labbra e lingua, talvolta accompagnato da sintomi gastrointestinali (principalmente nausea). Si manifestano entro 1 ora; - sintomi moderati: torpore del viso e di altre aree, parestesia avanzata, paralisi motoria delle estremità, incoordinazione, cattiva articolazione della parola. I riflessi sono comunque normali. I sintomi si manifestano entro l'ora; - sintomi gravi: incoordinazione del sistema muscolare, afonia, disfagia, dispnea, cianosi, diminuzione della pressione sanguigna, pupille fisse e dilatate, dolore precordiale. La vittima è ancora cosciente. I sintomi si manifestano dopo pochi minuti o anche dopo alcune ore; - sintomi gravissimi: grave insufficienza respiratoria e ipossia, grave ipotensione, bradicardia, aritmia cardiaca, il cuore continua a pulsare per un breve periodo. I sintomi si manifestano dopo pochi minuti e non oltre le 24 ore.
----------------------------	---

L'Unione europea, col Regolamento (CE) 853/2004 del 29 aprile 2004 stabilisce che:

1. non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi delle seguenti famiglie: *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* e *Canthigasteridae*;
2. non devono essere immessi sul mercato prodotti della pesca contenenti biotossine (ad esempio la ciguatomina o le tossine che paralizzano i muscoli).

5.5 Bibliografia

1. Hashimoto Y., 1979. *Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 369.
2. Fuhrman F.A., 1986. *Tetrodotoxin, Tarichatoxin, and Chiriquitoxin: Historical Perspectives*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479: 1-14.
3. Davis W. 1988. *Zombification*. *Science, New Series*, 240(4860): 1715-1716.
4. Robson W., Robinson E., Forster G., 1777. *A Voyage Round the World*. London, Vol. 2: 403-424.
5. Goto T., Kishi Y., Hirata Y., Takahashi S., 1965. *Tetrodotoxin*. *Tetrahedron*, 21(8): 2059-2088.
6. Tsuda K., Ikuma S., Kawamura M., Tachikawa R., Sakai K., Tamura C., Amakasu O. 1964., *Tetrodotoxin. VII. On the structures of tetrodotoxin and its derivatives*. *Chem. Pharm. Bull.*, 12: 1357-1374.
7. Woodward R.B., 1964. *The structure of tetrodotoxin*. *Pure. Appl. Chem.*, 9(1): 49-74.
8. Mosher H.S., Fuhrman F.A., Buchwald H.D., Fischer H.G., 1964. *Tarichatoxin-tetrodotoxin: A potent neurotoxin*. *Science*, 144(3622): 1100-1110.
9. Fuhrman F.A., 1986. *Tetrodotoxin, tarichatoxin, and chiriquitoxin: historical perspectives*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 479: 1-14.
10. Ohyabu N., Nishikawa T. and Minoru I., 2003. *First Asymmetric Total Synthesis of Tetrodotoxin*. *J. AM. CHEM. SOC.*, 125(29): 8798-8805
11. Narahashi T., 2001. *Pharmacology of tetrodotoxin*. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 20: 67-84.
12. Jang J.H, Yotsu-Yamashita M., 2007. *6,11-Dideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu pardalis**. *Toxicon*, 50(7): 947-951.
13. Catterall W.A., Goldin A.L., Waxman S.G., 2005. *Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels*. *International Union of Pharmacology. XLVII. Pharmacol. Rev.*, 57(4): 397-409.
14. Ogata N. and Ohishi Y., 2002. *Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels*. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 88(4): 365-377.
15. Ackerman M.J., Clapham D.E., 1997. *Ion channels - Basic science and clinical disease*. *N. Engl. J. Med.*, 336: 1575-1586.
16. Kao C.Y., 1986. *Structure-activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin, and analogues*. *Ann. NY Acad. Sci.* 479: 52-67.
17. Evans M.H., 1969. *Differences between the effects of saxitoxin (paralytic shellfish poison) and tetrodotoxin on the frog neuromuscular junction*. *Br. J. Pharmac.*, 36: 426-436.
18. Goldin A.L., 2001. *Resurgence of sodium channel research*. *Annu. Rev. Physiol.*, 63: 871-894.
19. Satin J., Kyle J.W., Chen M., Bell P., Cribbs L.L., Fozzard H.A., Rogart R.B., 1992. *A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties*. *Science*, 256: 1202-1205.
20. Favre I., Moczydlowski E., Schild L., 1995. *Specificity for block by saxitoxin and divalent cations at a residue which determines sensitivity of sodium channel subtypes to guanidinium toxins*. *J. Gen. Physiol.*, 106(2): 203-229.
21. Doyle D.D., Guo Y., Lustig S.L., Satin J., Rogart R.B., Fozzard H.A., 1993. *Divalent cation competition with [3H]saxitoxin binding to tetrodotoxin-resistant and -sensitive sodium channels*. *J. Gen. Physiol.*, 101: 153-182.
22. Noda M.H., Suzuki H., Numa S., Stuhmer W., 1989. *A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II*. *FEBS Lett.*, 259(1): 213-216.

23. Do H.K., Kogure K., Imada C., Noguchi T., Ohwada K., Simidu U., 1991. *Tetrodotoxin production of actinomycetes isolated from marine sediment*. J. Appl. Bacteriol., 70: 464–468.
24. Yasumoto T., Yasumura D., Yotsu M., Michishita T., Endo A., Kotaki Y., 1986. *Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin*. Agric. Biol. Chem., 50: 793-795.
25. Simidu U., Kita-Tsukamoto K., Yasumoto T. and Yotsu M., 1990. *Taxonomy of Four Marine Bacterial Strains That Produce Tetrodotoxin*. International Journal of Systematic Bacteriology, 40(4): 331-336.
26. Hwang D.F., Arakawa O., Saito T., Naguchi T., Simidu U., Tsukamoto K., Shida Y., Hashimoto K., 1989. *Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus Octopus maculosus*. Marine Biology February, Volume 100, Issue 3, pp 327-332
27. Narita H., Matsubara S., Miwa N., Akahane S., Murakami M., Goto T., Nara M., Noguchi T., Saito T., Shida Y. and Hashimoto K., 1987. *Vibrio alginolyticus, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish Astropecten polyacanthus*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 53: 617-621.
28. Noguchi T., Jeon J.K., Arakawa O., Sugita H., Deguchi Y., Shida Y., Hashimoto K., 1986. *Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in Vibrio sp. isolated from intestines of xanthid crab, Atergatis floridus*. J. Biochem., 99: 311-314.
29. Lee M.J., Jeong D.Y., Kim W.S., Kim H.D., Kim C.H., Park W.W., Park Y.H., Kim K.S., Kim H.M. and Kim D.S., 2000. *A tetrodotoxin-producing Vibrio strain, LM-1, from the puffer fish Fugu Vermicularis radiatus*. Appl. Environ. Microbiol., 66(4): 1698–1701.
30. Yan L., Rulzao Y., 2009. *Bacillus horikoshii, a tetrodotoxin-producing bacterium isolated from the liver of puffer fish*. Ann. Microbiol., 59(3): 453-458.
31. Simidu U., Noguchi T., Hwang D.F., Shida Y. and Hashimoto K., 1987. *Marine bacteria which produce tetrodotoxin*. Appl Environ Microbiol., 53(7): 1714-1715.
32. Hori S., Tanaka T. and Murakami R., 2005. *Puffer toxin*. In: *Pharmaceutical Society of Japan (Ed.), Methods of analysis in health science*. Kanehara Co.,Ltd., Tokyo (in Japanese) pp. 278-285.
33. Noguchi T. and Ebesu J.S.M., 2001. *Puffer poisoning: epidemiology and treatment*. J. Toxicol.-Toxin Reviews, 20: 1–10.
34. Kao C.Y., Fuhrman F.A., 1963. *Pharmacological studies on tarichatoxin, a potent neurotoxin*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 140: 31–40.
35. Yasumoto T., Yotsu M., Murate M., Naoki H., 1988. *New tetrodotoxin analogues from the newt Cynops ensicauda*. J. Am. Chem. Soc., 110(7): 2344–2345.
36. Xu Q., Huang K., Gao L., Zhang H., Rong K., 2003. *Toxicity of tetrodotoxin towards mice and rabbits*. J. Hyg. Res. (Wei Sheng Yan Jiu), 32(4): 371-374.
37. Shiomi K., Yamaguchi S., Kikuchi T., Yamamori K. Matsui, T., 1992. *Occurrence of tetrodotoxin-binding high molecular weight substances in the body fluid of shore crab (Hemigrapsus sanguineus)*. Toxicon , 30(12): 1529-1537.
38. Nagashima Y., Yamamoto K., Shimakura K., Shiomi K., 2002. *A tetrodotoxin-binding protein in the hemolymph of shore crab Hemigrapsus sanguineus: purification and properties*. Toxicon, 40(6): 753-60
39. Koyama K., Noguchi T., Uzu A., Hashimoto K., 1983. *Resistibility of toxic and nontoxic crabs against paralytic shellfish poison and tetrodotoxin*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49(3): 485-489.
40. Noguchi T., Hashimoto Y., 1973. *Isolation of tetrodotoxin from a goby Gobius criniger*. Toxicon , 11: 305-307.
41. Saito T., Noguchi T., Harada T., Murata O., Abe T., Hashimoto K., 1985. *Resistibility of*

- toxic and nontoxic pufferfish against tetrodotoxin*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51: 1371.
42. Ikeda K., Emoto Y., Tatsuno R., Wang J.J., Ngy L., Taniyama S., Takatani T. and Arakawa O., 2010. *Maturation-associated change in toxicity of the pufferfish Takifugu poecilonotus*. Toxicon, 55(2-3): 289–297.
43. Matsui T., Yamamori K., Furukawa K. and Kono M., 2000. *Purification and some properties of a tetrodotoxin binding protein from the blood plasma of kusafugu, Takifugu niphobles*. Toxicon, 38(3): 463–468.
44. Yotsu-Yamashita M., Sugimoto A., Terakawa T., Shoji Y., Miyazawa T. and Yasumoto, T., 2001. *Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, Fugu pardalis*. Eur. J. Biochem., 268(22): 5937–5946.
45. Aracawa O., Hwang D.F., Taniyama S. and Takani T., 2010. *Toxins of Puffer Fish that Cause Human Intoxications*. In: Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea; Eds., Ishimatsu, A., and Lie, H.J., Eds.; TERRAPUB and Nagasaki University: Tokyo, Japan; pp. 227-244.
46. Tani I., 1945. *Studies on Japanese Pufffish in Association with Poisoning due to Ingestion of Them*. Teikoku Tosho; Tokyo, Japan, p.103.
47. Kanoh S., 1988. *Distribution of tetrodotoxin in vertebrates*. In: Recent Advances in Tetrodotoxin Research; Hashimoto, K., Ed.; Koseisha-Koseikaku: Tokyo, Japan; pp. 32-44.
48. Lin S.J., Hwang D.F., 2001. *Possible source of tetrodotoxin in the starfish Astropecten scoparius*. Toxicon, 39(4): 573–579.
49. Hwang D.F., Shiu Y.C., Hwang P.A., Lu Y.H., 2002. *Tetrodotoxin in gastropods (snails) implicated in food poisoning in Northern Taiwan*. J Food Prot., 65(8): 1341-1344.
50. Cassiday L., 2008. *First report of TTX in a European trumpet shell*. Anal. Chem., 80 (15), p.5675.
51. Asakawa M., Gomez-Delan G., Tsuruda S., Shimomura M., Shida Y., Taniyama S., Barte-Quilantang M., Shindo J., 2010. *Toxicity Assessment of the Xanthid Crab Demania cultripes from Cebu Island, Philippines*. J. Toxicol., Article ID 172367, 7 pages; doi:10.1155/2010/172367.
52. Sheumack D.D., Howden M.E.H., 1978. *Maculotoxin: a neurotoxin from the venom glands of the octopus Hapalochlaena maculosa identified as tetrodotoxin*. Science, 199(4325): 188-189.
53. Klaassen C.D. (ed). 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th ed. McGraw-Hill, NY, pp. 1079.
54. Fukuda A., Tani A. 1941. *Records of puffer poisonings*. Report 3. Nippon Igaku Oyobi Kenko Hoken, 3528: 7–13.
55. Kao C.Y., 1966. *Tetrodotoxin, saxitoxin, and their significance in the study of excitation phenomena*. Pharmacol. Rev., 18(2): 997–1049.
56. Sims J.K., Ostman D.C., 1986. *Pufferfish poisoning: Emergency diagnosis and management of mild human tetrodotoxication*. Ann. Emerg. Med., 15(9): 1094–1098.
57. FDA, U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition Organization. 2008. Tetrodotoxin. In: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. (disponibile sul sito: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070842.htm>)
58. Tsai Y.H., Hwang D.F., Cheng C.A., Hwang C.C., Deng J.F., 2006. *Determination of tetrodotoxin in human urine and blood using C18 cartridge column, ultrafiltration and LC-MS*. J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 832(1): 75-80.

59. Noguchi T. and Arakawa O., 2008. *Tetrodotoxin – Distribution and Accumulation in Aquatic Organisms, and Cases of Human Intoxication*. Mar. Drugs, 6(2): 220-242.
60. FDA, U.S. Food and Drug Administration. May 24, 2007. Warning on Mislabeled Monkfish. Fish Believed to be Puffer Fish; Contains Deadly Toxin.
61. Pocchiari F., 1977. *Trade of misbranded frozen fish: medical and public health implications*. Ann. Ist. Super. Sanità 13(4): 767-772.
62. Viviani R., D'Alessandro F., Manzo L., Crema A., 1978. *Le biotossine marine*. In: "Problemi igienico-giuridici della produzione e distribuzione delle sostanze alimentari". Atti del Convegno, S. Felice Circeo, 4-5-6 giugno.
63. Noguchi T. and Arakawa O., 2008. *Tetrodotoxin – Distribution and Accumulation in Aquatic Organisms, and Cases of Human Intoxication*. Mar. Drugs, 6: 220-242.
64. Arakawa K., 2001. *Resistibility against TTX and PSP*. In *Studies on the Toxicity of a Japanese Newt Cynops pyrrhogaster*. Doctoral thesis, Nagasaki University: Nagasaki; pp. 50-53.
65. Noguchi T., Onuki K., Arakawa O., 2011. *Tetrodotoxin Poisoning Due to Pufferfish and Gastropods, and Their Intoxication Mechanism*. ISRN Toxicology, vol. 2011, Article ID 276939, 10 pages. doi:10.5402/2011/276939

Capitolo 6

Intossicazione da Palitossine (PITXs)

Capitolo 6

INTOSSICAZIONE DA PALITOSSINE (PITXs)

Leggenda

"Nello stagno di Muolea collegato con l'Oceano, nel quartiere di Hana, cresce un muschio velenoso. La leggenda racconta che la punta delle lance e frecce venisse impregnata di quel muschio di colore rossastro per renderle più mortali" [1].

Leggenda antica:

Col calare della notte, ancora una volta, grida di angoscia furono udite nel piccolo villaggio di pescatori sull'isola Hawaiana di Maui, nei pressi del porto di Hana perché un pescatore non era rientrato col suo pescato. Gli abitanti del villaggio, cercando di dare una risposta a questa scomparsa, accusarono il gobbo che viveva solitario sulla cima della rupe. Strappate le vesti al gobbo scoprirono che sulle spalle spuntava una grande bocca con lunghe file di denti triangolari. Il gobbo fu sospettato di essere un Dio Shark (uno squalo fatto uomo) insaziabile di carne umana. Ogni giorno, infatti, quando i marinai uscivano con le loro barche per pescare, il gobbo attraversava lentamente il paese e andava a fare il bagno per procurarsi il cibo. I pescatori infuriati uccisero senza pietà il gobbo, bruciarono il suo corpo e le ceneri furono gettate in un vicino stagno creato dalla marea dell'Oceano. La maledizione del Dio trasformò l'acqua del piccolo stagno in un luogo di morte facendo ricoprire la roccia immersa con anemoni di colore rossastro. Dopo poco tempo si venne a sapere che impregnando la punta della freccia o della lancia con queste "limu" (anemoni) la maledizione del Dio Shark rinasceva procurando sicura morte a coloro che venivano colpiti da quelle punte. Il piccolo stagno divenne noto come "Limu Make O Hana" (alghe della morte di Hana).

Leggenda moderna:

Nel 1961 alcuni ricercatori dell'Università delle Hawaii interessati a trovare prodotti naturali scoprirono un manoscritto nel quale si parlava di un veleno hawaiano (Malo) che serviva per impregnare la punta delle lance per renderle più mortali: Limu Make O Hana. Pochi erano i nativi di Maui che sapevano di questo veleno e del luogo in cui crescevano quelle alghe, ma nessuno era disposto a parlare e accompagnare i ricercatori in quel luogo. Un abitante, tuttavia, dopo aver bevuto abbondantemente Okole Maluna (una birra locale), accompagnò uno degli scienziati allo stagno, considerato un luogo sacro, dove crescevano quelle alghe. Mentre i biologi si apprestavano a prendere campioni di materiale dallo stagno, un gruppo di indigeni cercò di fermarli spiegando loro che secondo un'antica leggenda lo stagno era considerato kapu (tabù), e la raccolta delle alghe poteva risvegliare il demone e la sua maledizione. "Noi non crediamo a queste superstizioni" dissero gli scienziati mentre raccoglievano i campioni. Tuttavia, quello stesso giorno un incendio distrusse l'edificio principale del laboratorio dell'Istituto di Biologia Marina Hawaiian Coconut Island in Kaneohe Bay (Oahu). In seguito gli scienziati dimostrarono che i campioni raccolti nello stagno appartenevano ad una nuova specie di anemone che denominarono *Palythoa toxica*. Gli estratti di *Palythoa toxica* dimostrarono contenere un potentissimo veleno: palytoxin (palitossina) [2].

6.1 Introduzione

Il gruppo di J. Scheuer dell'Università delle Hawaii ha isolato la palitossina per la prima volta nel 1971 da alcuni celenterati marini appartenenti al genere *Palythoa* (zoantidi) [3]. Successivamente questi zoantidi sono stati identificati come appartenenti alla specie *Palythoa toxica* [2]. La palitossina è stata trovata in seguito anche in altri zoantidi come *P. tuberculosa*, *P. mammilosa* e *P. caribaeorum*. La palitossina è considerata una delle più potenti e letali tossine marine conosciute di natura non proteica. La complessità della sua struttura chimica è senza precedenti (fatta eccezione per i biopolimeri) ed è stata molto difficile da determinare.

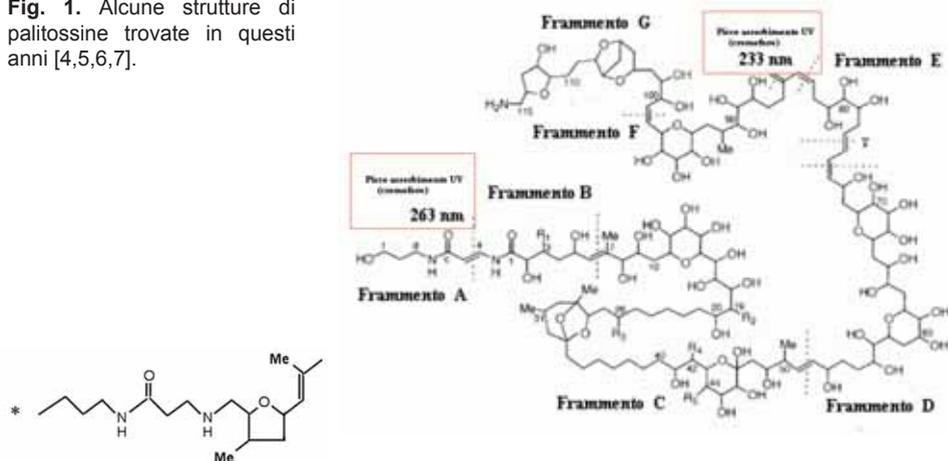
La struttura planare della palitossina è stata determinata in maniera conclusiva nel 1981, indipendentemente e contemporaneamente da 2 gruppi di ricerca, uno alle Hawaii diretto da R. Moore [4] e uno a Nagoya, Giappone, diretto da Y. Hirata [5]. L'anno successivo, un gruppo dell'Università di Harvard diretto da Y. Kishi, in collaborazione con il gruppo di Y. Hirata, determinò la stereochimica assoluta della molecola [6].

6.2 Struttura chimica

La molecola base della palitossina ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$) ha un peso molecolare di 2680 Da ed è costituita da una lunga catena alifatica parzialmente insatura contenente eteri ciclici, 64 centri chirali, 40-42 gruppi idrossilici e 2 gruppi ammidici (Fig.1) [4,6]. Palitossine sono state isolate e caratterizzate da *Palythoa tuberculosa* e *Palythoa toxica*. Esse sono state denominate: homopalitossina, bishomopalitossina, neopalitossina, deossipalitossina e 42-idrossipalitossina [5, 7]. La palitossina stereochimica della PITX consente teoricamente di avere un numero di isomeri enormemente elevato, circa 2×10^{71} [6,8]. L'abbreviazione (PITX) e i suoi analoghi, in virtù dei due cromofori della molecola, mostrano uno spettro di assorbimento ai raggi ultravioletti (UV) con λ_{max} a 233 e 263 nm. Le PITXs sono insolubili in solventi non polari, scarsamente solubili in metanolo ed etanolo e solubili in piridina e acqua. Sono resistenti al calore.

Un analogo della palitossina chiamato ostreocina-D (OSD) ($C_{127}H_{219}N_3O_{53}$) è stato isolato da *Ostreopsis siamensis* e caratterizzato mediante risonanza magnetica nucleare (NMR), tecnica che ha permesso di spiegarne la struttura planare (42-idrossi-3,26-dimetil-19,44-dideossipalitossina) [9]. Recentemente da *Ostreopsis ovata* è stato isolato un nuovo analogo della PITX chiamato ovatossina-a (OVTX-a) con un peso molecolare di 2.648 Da ($C_{129}H_{223}N_3O_{52}$) e 2 atomi di ossigeno in meno rispetto alla PITX [10].

Fig. 1. Alcune strutture di palitossine trovate in questi anni [4,5,6,7].



	n	R1	R2	R3	R4	R5	X	Y	Z
palitossina	1	Me	OH	Me	H	OH	-	-	-
homopalitossina	2	Me	OH	Me	H	OH	-	-	-
bishopalitossina	3	Me	OH	Me	H	OH	-	-	-
neopalitossina	1	Me	OH	Me	H	OH	*	-	-
deossipalitossina	1	Me	OH	Me	H	OH	-	⁷⁶ CH ₂ CH=CHCH=CHCH ₂ CH ₂ -	-
isopalitossina	1	Me	OH	Me	H	OH	-	⁷⁶ CH ₂ CH=CHCH=CHCHOHCH ₂ -	-
ac.palitossincarbossilico	1	Me	OH	Me	H	OH	-	-	OH
42-idrossipalitossina	1	Me	OH	Me	H	OH	-	-	-
ostreocina-D	1	H	H	H	OH	H	-	-	-

6.3 Eziologia

La produzione di palitossina ed analoghi, anche se ritrovati in invertebrati marini (*Palythoa* spp.), sembra attribuibile a microalghe bentoniche ed epifite che hanno la loro massima diffusione nelle zone tropicali e subtropicali, le dinoficee del genere *Ostreopsis*. *Ostreopsis siamensis* elabora un derivato della palitossina chiamato ostreocina-D [9]. *Ostreopsis mascarenensis* produce invece dei composti chiamati mascarenotossine con molte caratteristiche simili alla palitossina, ma con pesi molecolari più bassi di circa 100 Da [11]. *Ostreopsis* cf. *siamensis* del Mediterraneo e della costa del Brasile è stata identificata come produttrice di palitossine [12]. Gli estratti di *Ostreopsis lenticularis* delle Isole Vergini [13] e di Porto Rico [14] contengono sostanze altamente tossiche ma non ancora caratterizzate. Due analoghi della palitossina, chiamati CA-I e CA-II, sono stati segnalati in *Chondria armata*, una macroalga rossa [15].

Cellule di *Ostreopsis ovata* raccolte in aree costiere italiane del Mar Tirreno e del Mar Adriatico e coltivate in laboratorio hanno mostrato la presenza di un analogo della palitossina [16] individuato in seguito come ovatossina-a (OVTX-a) [10]. Più recentemente approfondite indagini svolte in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione su un estratto di colture di *Ostreopsis ovata*, isolata nel Mare Adriatico lungo la costa marchigiana, hanno permesso di riconfermare la presenza di OVTX-a e di individuare altre ovatossine: OVTX-b, -c, -d, -e [17].

Non è comunque da escludere una possibile origine della tossina da parte di altri organismi, compresi i batteri simbiotici.

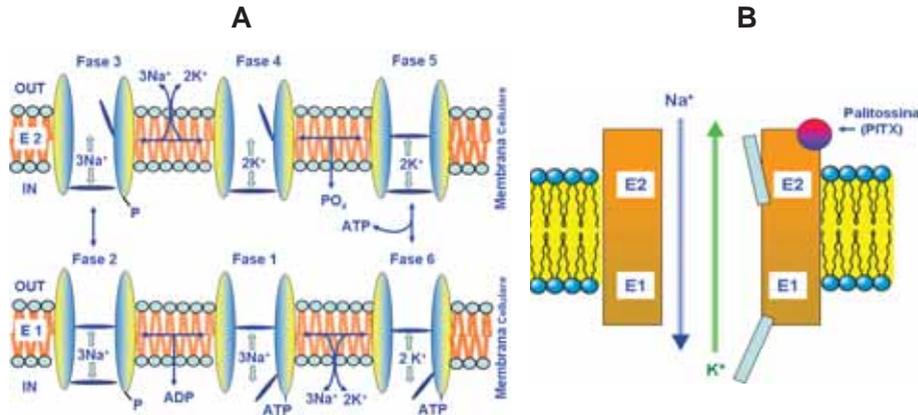
Palitossine sono state trovate in diversi organismi marini (molluschi bivalvi, echinodermi, crostacei e pesci) e questo dimostra la loro capacità di diffondersi in tutta la catena trofica marina [18].

6.4 Meccanismo d'azione

L'elevata tossicità della PITX e l'ampio spettro degli effetti farmacologici da essa provocati negli organismi viventi hanno stimolato, negli ultimi decenni, molti ricercatori a definirne il meccanismo d'azione, tuttavia questo non è stato ancora ben definito. Studi farmacologici ed elettrofisiologici hanno evidenziato che la PITX agisce come un'emolisina ed altera la funzione delle cellule eccitabili [19,20].

Studiando gli effetti tossici della PITX su alcuni organi isolati (tessuto muscolare cardiaco di cane e di coniglio), i ricercatori, sin dal 1977, avevano ipotizzato che questi effetti derivassero dall'azione della tossina sulla Na⁺/K⁺-ATPasi (chiamata anche pompa Na⁺/K⁺ o semplicemente pompa del Na⁺) [21].

Fig. 2. **A)** normale funzionamento della pompa Na^+/K^+ - ATPasi; **B)** azione della palitossina;



Il meccanismo base d'azione della PITX è stato scoperto casualmente attraverso un test emolitico con l'utilizzo della tossina su eritrociti [22].

Le ricerche hanno ampiamente dimostrato che la PITX interagisce con la pompa Na^+/K^+ - ATPasi disarticolandola e trasformandola in un canale non selettivo per cationi monovalenti con conduttanza di 10 pS (Fig. 2) [19]. Quest'azione altera l'equilibrio ionico intracellulare (omeostasi) provocando una depolarizzazione cellulare con una serie di conseguenze che coinvolgono l'equilibrio osmotico e la vitalità cellulare. La PITX è in grado d'interagire con tutte le cellule eccitabili e non del tessuto animale, promuovendo una serie di reazioni intracellulari che si possono riassumere in tre principali vie:

1. La prima azione è l'apertura dei canali cationici non altamente selettivi e a bassa conduttanza della membrana cellulare che porta a:
 - a) depolarizzazione della membrana per effetto dell'afflusso di ioni Na^+ ed efflusso di K^+ . La membrana depolarizzata apre i canali Ca^{++} voltaggio-dipendenti nelle sinapsi terminali dei nervi, delle cellule cardiache e delle cellule del muscolo liscio e striato [23];
 - b) l'afflusso di Na^+ favorisce l'entrata Ca^{++} dai canali a scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ nei terminali sinaptici delle cellule cardiache e in quelle vascolari del muscolo liscio. Un aumento di Ca^{++} intracellulare stimola il rilascio di neurotrasmettitori dei nervi terminali, di istamina dai mastociti e di fattori vasoattivi dalle cellule epiteliali vascolari [24];
 - c) altri effetti legati all'aumento di Ca^{++} intracellulare possono essere l'attivazione della fosfolipasi C [25] e della fosfolipasi A_2 [26]. La tossina ha pertanto l'effetto di far sentire la sua azione prolungata nel tempo.
2. Un'altra azione principale è l'apertura dei canali H^+ con la conseguente attivazione dei canali Na^+/H^+ [27,28].
3. Una terza azione è l'innalzamento del Ca^{++} intracellulare indipendentemente dall'attivazione dei canali voltaggio-dipendenti del Ca^{++} e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ [29,30]. Queste due azioni possono coinvolgere l'apertura di canali specifici $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.

Altri studi hanno enfatizzato l'effetto citotossico della PITX come potente emolitico in eritrociti [31,32]. Si tratta di un'emolisi ritardata che non ha effetti diretti sulla membrana cellulare, ma avviene per effetto del rigonfiamento cellulare e conseguente rottura della membrana [31,33]. Tale lisi è ostacolata da glucosidi cardiaci come l'ouabaina, che a concentrazioni elevate è in grado di bloccare l'azione della PITX sulla Na^+/K^+ - ATPasi.

In cellule umane di neuroblastoma trattate con palitossina ed ostreocina-D si sono viste, oltre all'aumento della permeabilità della membrana con innesco della depolarizzazione e all'aumento di afflusso di Ca^{++} , alterazioni morfologiche a carico del citoscheletro con notevoli perdite di actina polimerizzata [34].

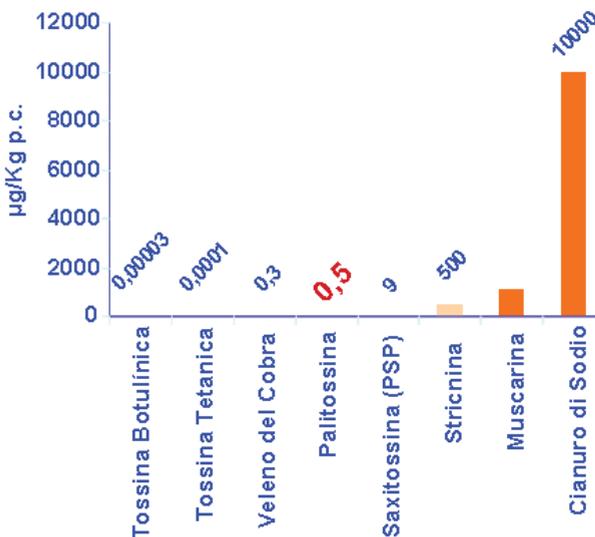
6.5 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

6.5.1 Tossicità negli animali

Palitossina purificata o estratti da organismi acquatici contenenti palitossina iniettati per via intraperitoneale (i.p.) in topi e ratti hanno dimostrato un'eccezionale tossicità, anche rispetto ad altri tipi di tossine (Fig.3). I topi e i ratti trattati con PITX purificata da *Palythoa vestitus*, *P. tuberculosa*, *P. caribaeorum* e da *Radianthus macrodactylus* mostrano valori di LD_{50} molto costanti, che sono compresi fra 0,45 e 0,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo (p.c.) [19,35].

Fig. 3. Tossicità acuta di alcune tossine espressa in $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.



I sintomi iniziali dell'intossicazione da palitossina, purificata da *Ostreopsis* spp. o da pesci e granchi, si manifestano in topi e ratti con atassia, paralisi degli arti posteriori, difficoltà respiratorie, cianosi e talvolta diarrea [36]. L'analisi istologica dei tessuti di questi animali ha evidenziato la presenza di edemi e necrosi dei villi intestinali e vacuolizzazione dell'epitelio intestinale. Altri organi bersaglio comprendono il cuore, il rene ed il fegato ed è stata inoltre segnalata necrosi dei tessuti linfatici [36,37]. In topi trattati con palitossina purificata

o palitossina estratta da *Ostreopsis* spp. e da *Scarus oivrons* sono stati osservati aumenti di creatinfosfochinasi (CPK) nel siero [39]. Questa osservazione è di grande importanza perché la palitossina contenuta in prodotti ittici potrebbe indurre anche negli esseri umani che se ne alimentano danni al muscolo cardiaco.

La palitossina ha dimostrato di essere altamente tossica negli animali per diverse vie di somministrazione quali: intravena (i.v.) con un LD_{50} 0,15-0,62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. [39, 40], intramuscolare (i.m.) con un LD_{50} 0,05-0,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. [39,40]; sottocutanea (s.c.) con un LD_{50} 0,29-0,54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. [40]; per instillazione intratracheale con un LD_{50} 0,23-0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. [39, 40]. La palitossina, inoltre, esibisce la sua tossicità con effetto irritante e gonfiore anche per applicazione attraverso percussione sulla pelle con un (LD_{50} 400-1.700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.) [41].

L'applicazione nell'occhio del coniglio di palitossina provoca irritazione, rigonfiamento delle cellule, congiuntivite, edemi ed ulcerazioni [41].

In uno studio comparato la palitossina somministrata per via orale in topi, attraverso un sondino gastrico (*gavage*), è risultata meno tossica di 700 volte rispetto alla somministrazione per iniezione intraperitoneo. Similmente, un estratto grezzo di *Ostreopsis siamensis* era 1000 volte più tossico per iniezione intraperitoneo che per somministrazione orale. La tossicità orale della PITX aveva un LD₅₀ di ~ 510 µg/kg p.c.. In questo studio non erano presentati dati istologici o biochimici [43].

Altre prove di tossicità effettuate somministrando PITX e OSD in topi per via orale (sondino gastrico), intratracheale e intraperitoneale hanno messo in evidenza quanto segue:

- per via orale i topi non morivano e non mostravano cambiamenti in alcun organo alla concentrazione massima di 200 µg/kg p.c. di PITX e 300 µg/kg p.c. di OSD. Tuttavia a concentrazioni più elevate erano visibili danni nello stomaco, piccolo intestino, polmoni e reni. Questi danni suggerivano un LOAEL di 200 µg/kg p.c. per entrambe le tossine (PITX e OSD);
- per via intratracheale 2 µg/kg p.c. di PITX uccidevano i topi in 2 ore, mentre con 11 µg/kg p.c. di OSD i topi morivano in 6 ore. Nei topi trattati erano visibili sanguinamenti e distruzione alveolare polmonare;
- per via intraperitoneale PITX alla concentrazione di 1,5 µg/kg p.c. uccideva i topi dopo alcune ore, mentre per OSD questo avveniva con una concentrazione di 5 µg/kg p.c.. La sintomatologia consisteva in un'evidente paralisi agli arti e, per entrambe le tossine, congestione ed erosione dello stomaco e dell'intestino. La peritonite era caratteristica della PITX ma non di OSD.

Nello stesso esperimento PITX e OSD somministrate per via sublinguale alla concentrazione di circa 200 µg/kg p.c. provocavano cambiamenti e lesioni in polmoni, nell'apparato gastrointestinale e nei reni [44].

In uno studio di tossicità acuta in topi CD1 con PITX somministrata *per os* a varie concentrazioni da 300 a 1.697 µg/kg p.c., i segni di tossicità e di mortalità dei topi registrati durante le 24 ore hanno permesso di ricavare un LD₅₀ pari a 767 µg/kg p.c. (livello di confidenza 95%: 549-1.039 µg/kg p.c.). Gli esami ematoclinici hanno mostrato un aumento dei livelli di creatinfosfochinasi (CPK), lattato deidrogenasi (LDH) e aspartato transaminasi (AST). Gli esami istologici hanno mostrato alterazioni nel fegato e pancreas e infiammazione del prestomaco, mentre le cellule del muscolo cardiaco e scheletrico rivelavano soltanto alterazioni ultrastrutturali visibili al microscopio elettronico. Questo studio di tossicità acuta stimava per PITX un NOAEL di 300 µg/kg p.c. [45].

6.5.2 Tossicità nell'uomo

Le palitossine sono state implicate in alcune gravi intossicazioni umane per consumo di crostacei e pesci. L'intossicazione umana da palitossina è caratterizzata da molti sintomi osservati anche negli animali, benché i disturbi gastrointestinali sembrano essere prevalenti nelle persone rispetto agli animali. Sebbene non ci siano molti dati sulla concentrazione di palitossine che portano all'avvelenamento umano, gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, una prolungata ischemia coronarica, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco. La sintomatologia delle persone intossicate si manifesta inizialmente e molto rapidamente con vomito, diarrea, dolori agli arti, spasmi muscolari e difficoltà respiratorie [45].

Nel caso mortale di una donna del Madagascar (1994) per ingestione di sardine (*Herklotsichthys quadrimaculatus*), la vittima accusava un sapore metallico del cibo,

seguito da un malessere generale, vomito incontrollato, diarrea, paralisi degli arti inferiori e delirio. La morte avvenne dopo poche ore dall'ingestione del cibo. Inizialmente a questo tipo di tossina venne attribuito il nome di clupeotossina [46].

Gli effetti tossici sull'uomo ed i risultati biochimici/patologici si sono dimostrati ripetitivi. Vomito e diarrea sono osservati in tutti i casi, così come dolori muscolari e parestesia delle estremità degli arti. Nei casi mortali, difficoltà respiratoria e cianosi precedono il decesso. In molti casi di intossicazione umana è stata osservata mioglobinuria associata ad alti livelli di creatinfosfochinasi (CPK), aspartato transaminasi (AST), lattato deidrogenasi (LDH) [47,48]. I risultati di un'autopsia eseguita su una persona che aveva mangiato il pesce *Lopho-zoymus pictor* contaminato evidenziavano un'emorragia nell'intestino tenue e crasso [49].

6.6 Contaminazione dei prodotti ittici

Palitossina o composti palitossina simili sono stati ritrovati in policheti (*Hermodice carunculata*) [50], in una stella marina (*Acanthaster planci*) che si nutre di invertebrati del genere *Palythoa* [51], in molluschi spagnoli [52], greci [53], francesi [65] ed italiani [78]. Palitossine sono state ritrovate nei crostacei *Lopho-zoymus pictor* e *Demania alcalai* delle Filippine. La tossina era distribuita nelle branchie [1,8-160] $\mu\text{g/g}$, visceri [2,0-100] $\mu\text{g/g}$, carapace [1,6-20] $\mu\text{g/g}$ e nella parte edibile delle chele [0,2-4,0] $\mu\text{g/g}$ [33,54,55,56,57]. In un singolo esemplare della stessa specie (*Demania alcalai*) del peso di 129 g, sono stati trovati 11 mg di palitossina, equivalente a 85 mg/kg di parte edibile [54].

Per quanto riguarda i pesci, palitossine sono state trovate in una sardina del Madagascar (*Herklotsichthys quadrimaculatus*) [46,58], nello sgombro delle Filippine (*Decapterus macrosoma*) [47], nel pesce pappagallo del Giappone (*Scarus ovifrons*) [59,60] ed in altri tetrodontidi [61,62]. In Giappone 11 persone si sono intossicate dopo aver consumato filetto, visceri e/o fegato bolliti di una cernia del genere *Epinephelus* [63]. Palitossine sono state ritrovate in un pesce della famiglia dei balistidi, *Melichthys vidua*, pescato in Micronesia, sul quale sono state eseguite analisi separando il filetto dai visceri. La carne del filetto mostrava livelli di palitossina molto bassi (0,003 $\mu\text{g/g}$), mentre i visceri contenevano livelli più alti (0,31 $\mu\text{g/g}$) [64].

Nei casi gravi di intossicazione umana registrati in Giappone per consumo di pesce pappagallo si è potuto constatare che la palitossina si concentrava prevalentemente nel fegato, mentre il filetto risultava esente.

6.7 Diffusione in Europa delle PITXs

Le palitossine in Europa sono state associate alla presenza *Ostreopsis* spp. ritrovata in alcuni Paesi del Mediterraneo: Spagna, Francia, Italia e Grecia [12,65,16,53]. La diffusione di *Ostreopsis* è in aumento in tutto il mondo. Questo fenomeno può essere spiegato anche dall'aumentata ricerca di queste microalghe attraverso appositi monitoraggi. Le fioriture di *Ostreopsis ovata* ritrovate regolarmente in alcune zone del Mediterraneo durante il periodo estivo sono state associate a disturbi di carattere respiratorio nelle persone che soggiornavano sulla spiaggia.

Dai dati emersi dalle indagini presentate al Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" svoltosi a Genova il 5 dicembre 2005 risulta che la presenza di questa microalga è segnalata in varie regioni italiane quali: Liguria, Toscana, Lazio, Campania, Calabria, Puglia, Sicilia e Sardegna (Fig.4) [66,67,68,69]. Nell'ottobre del 2006 è stata segnalata la presenza di *Ostreopsis ovata* anche nelle regioni Marche (Totti C., comunicazione personale), Friuli-Venezia Giulia [70] ed Abruzzo (Fig.4).

Nonostante la sua diffusa presenza nelle regioni italiane, soltanto in alcune aree, peraltro assai limitate (Genova levante, provincia di La Spezia, litorale apuano a levante del porto di Marina di Carrara, provincia di Latina, Palermo-Bagheria e Mola di Bari) sono stati segnalati casi di disturbi alle prime vie respiratorie e talvolta stati febbrili ai bagnanti che stazionavano sulla spiaggia (Fig.5) [66,71,72,73,74].



Fig. 4. Regioni in cui è stata segnalata la presenza di *Ostreopsis* spp.

- 2005: Liguria, Toscana, Lazio, Campania, Calabria, Puglia, Sicilia, Sardegna;
- 2006: Friuli-Venezia Giulia, Abruzzo, Marche.



Fig. 5. Regioni in cui sono stati segnalati disturbi respiratori nelle persone [66].



In particolare, nell'estate del 2005, 240 persone che soggiornavano in riva al mare a Genova sono ricorse alle cure ospedaliere perché accusavano sintomi quali [74]: febbre, faringodinia, tosse, dispnea, cefalea, nausea, rinorrea, congiuntivite, vomito e dermatite (Tab.1). La causa di questi sintomi è stata attribuita ad *Ostreopsis ovata*.

Tab. 1. Caso di Genova 2005: aspetti epidemiologici riscontrati su 225 pazienti [74].

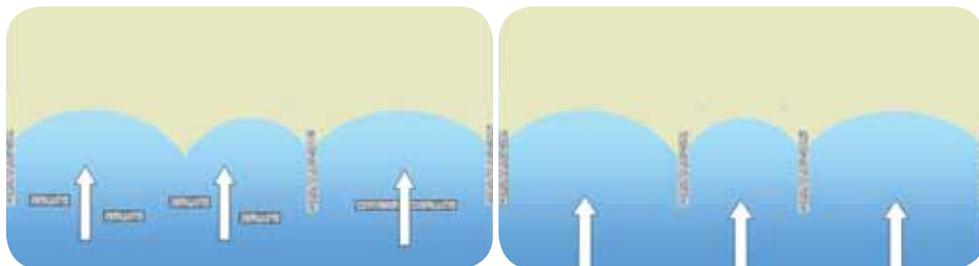
Sintomi (Percentuale di pazienti)		Frequenza dei quadri clinici	
Febbre	64 %	<u>109 casi con 3 sintomi</u>	
Faringodinia	50 %	Febbre con tosse e faringodinia	36 %
Tosse	40 %	Febbre con tosse e dispnea	34 %
Dispnea	39 %	Tosse con faringodinia e dispnea	28 %
Cefalea	32 %	<u>69 casi con 4 sintomi</u>	
Nausea	24 %	Febbre con tosse, faringodinia e dispnea	36 %
Rinorrea	21 %	Febbre con tosse, faringodinia e rinorrea	25 %
Congiuntivite	16 %	Febbre con tosse, dispnea e rinorrea	23 %
Vomito	10 %		
Dermatite	5 %		

Queste microalgahe sono state raccolte ed analizzate per verificare la presenza di eventuali tossine. L'analisi chimica in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ha mostrato la presenza di palitossine [16]. Inoltre ad *Ostreopsis ovata* in fioritura sono stati attribuiti gravi fenomeni di sofferenza ambientale riguardante principalmente l'epibenthos sessile (cirripedi, bivalvi, gasteropodi) e mobile (echinodermi, cefalopodi e piccoli pesci) [67,68].

Nell'estate del 2006 il fenomeno si è ripresentato con le stesse caratteristiche in Liguria (Genova e La Spezia) e nelle coste siciliane di Bagheria, Ficarazzi, Santa Flavia, Capaci, Isola delle Femmine, Terrasini, Trappeto, Balestrate ed Erice.

La morfologia delle aree marino-costiere interessate a questo fenomeno presentano caratteristiche molto simili. Alcuni ricercatori hanno osservato che fioriture algali di *Ostreopsis ovata*, verificatesi nelle stagioni estive degli anni 1998, 2000 e 2001 nel mare costiero apuano (Toscana nord-occidentale), hanno avuto la loro intensità massima in un tratto di litorale nel quale opere di difesa dall'erosione circoscrivevano uno specchio marino a debole ricambio idrico, dove le acque raggiungevano temperature molto elevate (Fig.6). In concomitanza con tali fioriture algali si sono registrati numerosi casi d'intossicazione in persone che soggiornavano in queste zone. L'aerosol marino è stato indicato come il vettore di sostanze tossiche che hanno causato malesseri di diversa intensità alle prime vie respiratorie delle persone. Inoltre sono state osservate, nella stessa area, estese morie di organismi appartenenti a diverse cenosi bentoniche animali e vegetali [68,71].

Fig. 6. Morfologia delle aree della costa apuana (Toscana nord-occidentale) interessate da fenomeni di intossicazione umana



Alcuni ricercatori hanno descritto le caratteristiche geo-morfologiche dei 2 siti dove sono avvenuti i fenomeni di intossicazione umana per aerosol a Genova nell'estate del 2005 attribuiti ad una fioritura di *Ostreopsis ovata*. Il primo è un tratto di spiaggia caratterizzato da una baia chiusa con substrato roccioso, ciottoloso, ai piedi di una falesia; l'altro è un tratto di costa con presenza di pennelli e barriere artificiali per il contenimento dell'erosione marina: in entrambi i siti si è in presenza di uno scarso dinamismo dell'acqua [67].

Nei due episodi la fioritura algale si è manifestata nell'acqua superficiale con aggregati di tipo "foaming" di colore marrone chiaro con dimensioni fino ad alcuni metri quadrati. Le stesse microalghe ricoprivano come una pellicola gli strati rocciosi e le macroalghe. Anche in questi casi il massimo accrescimento della microalga era favorito da condizioni meteo-marine stabili, moto ondoso estremamente ridotto, un elevato irraggiamento solare che portava l'acqua a temperature di 25-26 °C.

Una morfologia costiera del tutto simile a quella sopra descritta caratterizza anche tutti gli altri siti in cui si sono registrati casi di intossicazione umana (alcune decine di persone) correlati alla presenza di *Ostreopsis*:

- in Italia ed in particolare in Puglia durante il periodo estivo negli anni dal 2001 al 2005 [69,72,73], in Sicilia a Bagheria (Circoscrizione di Aspra) negli anni 2005-2006 (circa 40 persone intossicate), Ficarazzi, Santa Flavia, Capaci, Isola delle Femmine, Terrasini, Trappeto, Balestrate ed Erice.

- in altri Paesi europei del Mediterraneo quali la Spagna (La Fosca – Costa Brava) [75] ed in alcune isole della Grecia [76].

L'elemento che sembra scatenare l'intossicazione umana è una forte mareggiata, capace di distaccare le microalghe dal loro supporto naturale, convogliarle in un'area molto ristretta e disperdere i loro frammenti sottoforma di particolato nell'aerosol marino. Questa situazione è preceduta da situazioni meteo-marine e climatiche molto stabili con temperature elevate sia dell'acqua che dell'aria e un'alta pressione atmosferica.

La validazione di queste ipotesi necessitano di ulteriori e più approfondite ricerche a carattere multidisciplinare nei siti marini a maggior rischio, al fine di chiarire in maniera definitiva:

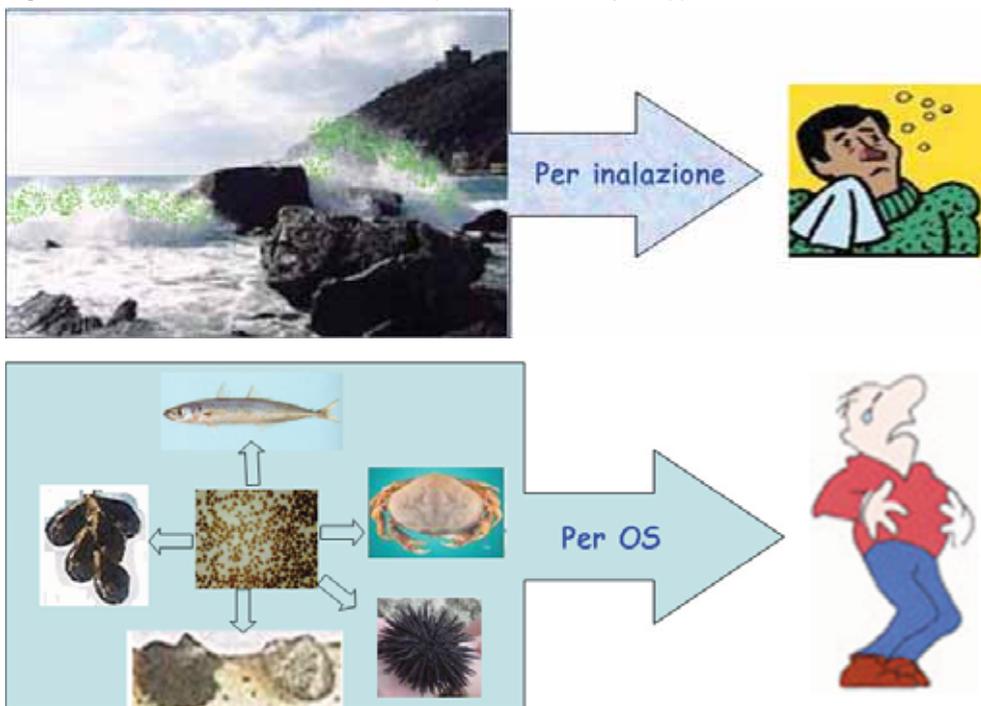
- a) l'individuazione dei composti biologicamente attivi (biotossine) presenti nell'aerosol attribuibili o non, eziologicamente, alla microalga;
- b) la farmacocinetica dei principi attivi individuati;
- c) il ruolo giocato dalle macroalghe come supporto alla crescita microalgale e anche la loro eventuale implicazione nell'aerosol tossico;
- d) il ruolo giocato da eventuali batteri simbiotici che possono essere trasferiti nell'aerosol;
- e) l'analisi quali-quantitativa del particolato dell'aerosol in quanto possibile agente tossico;
- f) le condizioni meteo-climatiche con particolare riferimento a:
 1. temperatura dell'acqua;
 2. stagnazione dell'acqua;
 3. pressione atmosferica;
 4. forza e direzione del vento;
 5. forza del mare;
- g) il ruolo della morfologia costiera con particolare riferimento agli insediamenti rocciosi o a barriere frangiflutti;
- h) il ruolo di eventuali sorgenti di nutrienti indispensabili per la crescita algale (fiumi, canali di scolo, condotte a mare, ecc.).

Il fenomeno è molto complesso e pur essendo stata dimostrata la produzione di palitossine da parte di *Ostreopsis ovata*, la conoscenza dei fattori sopraesposti potrà fornire utili elementi per la gestione del rischio sanitario.

La sintomatologia di questi casi appare molto simile a quella che si osserva in Florida (Stati Uniti) a seguito delle fioriture della dinoficea pelagica *Karenia brevis* (*Gymnodinium breve*), produttrice di brevetossine che agiscono a livello della membrana cellulare sui canali Na^+ voltaggio-dipendenti. Nelle zone interessate dal fenomeno delle fioriture di *K. brevis*, l'associazione tra esposizione ad aerosol e disturbi respiratori è stata accertata in maniera inequivocabile. Gli studi eseguiti hanno inoltre verificato la presenza di brevetossine nell'aerosol marino [77].

Possibili intossicazioni umane da consumo di prodotti ittici, pescati nelle aree interessate alla proliferazione di *Ostreopsis ovata*, non sono state per ora segnalate (Fig.7).

Fig. 7. Possibili vie di diffusione delle tossine prodotte da *Ostreopsis* spp.



Tuttavia la mancanza di segnalazioni di intossicazioni umane non può non preoccupare le Autorità competenti preposte alla salute del consumatore. Un'attenta e mirata indagine sui prodotti ittici pescati e raccolti nelle aree interessate dal fenomeno dovrebbe essere portata avanti per dare una ragionevole sicurezza al consumatore.

Le palitossine non sono regolamentate dalla Comunità europea.

6.8 Valutazione del Rischio dei prodotti ittici contaminati da PITXs

In Tab.2 è schematizzata la valutazione del rischio quando si hanno prodotti ittici contaminati da palitossina e ostreocina-D.

Tab. 2. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine PLTXs.

(LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level ; NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

Distribuzione	Le PLTXs sono ritrovate in microalghe, molluschi bivalvi, crostacei e pesci. Le aree di massima diffusione sono quelle tropicali e subtropicali. Dal 1995 tali tossine sono state ritrovate anche nel Mediterraneo.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Agiscono sui canali della pompa Na ⁺ /K ⁺ ATPasi
Meccanismo d'azione	Le ricerche hanno ampiamente dimostrato che la PITX interagisce principalmente con la pompa Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi disarticolandola e trasformandola in un canale non selettivo per cationi monovalenti. Quest'azione altera l'equilibrio ionico intracellulare (omeostasi) provocando una depolarizzazione cellulare con una serie di conseguenze che coinvolgono l'equilibrio osmotico e la vitalità cellulare. La PITX è in grado d'interagire con tutte le cellule eccitabili e non del tessuto animale promuovendo molteplici reazioni intracellulari.

Tossicità in animali (topo)	Per iniezione intraperitoneale la palitossina è eccezionalmente tossica. LD ₅₀ di palitossina pura, in topo, è di 0,72 µg/kg p.c.. La palitossina è meno tossica se somministrata per via orale (LD ₅₀ di 510 µg/kg p.c.). Palitossina e ostreocina-D somministrate per via sublinguale alla concentrazione di circa 200 µg/kg p.c. provocano cambiamenti e lesioni in polmoni, apparato gastrointestinale e reni.
Tossicità umana per via orale	Gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco. Sintomi: sapore metallico o amaro, nausea, ipersalivazione, vomito, dolori addominali, diarrea, paralisi degli arti inferiori, spasmi muscolari e difficoltà respiratoria. Casi mortali di persone che avevano mangiato pesci e crostacei sono stati attribuiti a palitossine.
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	EURLMB sulla base dei dati ricavati dalla tossicità animale per via orale (LD ₅₀ di 510 µg/kg p.c) ha proposto un NOAEL di 320 µg di PITX/kg p.c. ed ha applicato a questo dato un fattore di incertezza (FI) di 300 per ottenere un ARfD di 1,07µg di PITX/kg p.c. (64 µg di PITX/persona). EFSA-CONTAM sulla base dei dati disponibili relativi alla sperimentazione animale ha ricavato un LOAEL 200 µg/kg p.c.. A questo dato è stato applicato un FI di 1000 portando quindi a un ARfD di 0,2 µg PITX+ OSD/kg p.c. (12 µg PITX+OSD/persona).

Di seguito (Tab.3) sono riportati i valori dei Limiti Guida:

Tab. 3. Valori dei Limiti Guida in relazione alla parte edibile assunta.

Parte edibile ingerita in grammi	Limite Guida * µg PITX + OSD/kg p.e.	
	EURLMB	EFSA CONTAM
100	642	120
250	256	58
400	160	30

*Calcolo dei limiti elaborati da Poletti sull'indicazione del EURLMB "CRL Working group on Toxicology in Cesenatico, October 2005 " e EFSA/CONTAM [78].

6.9 Bibliografia

1. Malo D., 1838. Hawaiian antiquities. Translated from the Hawaiian by Emerson, N.B., 1898, Bishop Museum Press, Special Publication 2, Second Edition, 1971, Honolulu.
2. Walsh G.E. and Bowers R.L., 1971. *A review of Hawaiian zoanthids with descriptions of three new species*. Zool. J. Linn. Soc. 50:161-80.
3. Moore R.E. and Scheuer P.J., 1971. *Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate*. Science 172: 495-498.
4. Moore R.E. and Bartolini G., 1981. *Structure of palytoxin*. J. Am. Chem. Soc. 103, 2491-2494.
5. Uemura D., Ueda K., Hirata Y., Naoki H., Iwashita T., 1981. *Further studies on palytoxin. II. structure of palytoxin*. Tetrahedron Letters 22 (29): 2781-2784.
6. Cha J.K., Christ W.J., Finan J.M., Fujioka H., Kishi Y., Klein L.L., Ko S.S., Leder J., McWhorter Jr. W.W., Pfaff K.P., Yonaga M., Uemura D., Hirata Y., 1982. *Stereochemistry of palytoxin. Part 4. Complete structure*. J. Am. Chem. Soc. 104: 7369-7371.
7. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L., Florio C., Lorenzon P., De Bortoli M., Tubaro A., Poli M., Bignami G., 2009. *Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian Palythoa subspecies*. Chem. Res. Toxicol. 22, 1851-1859.
8. Moore R.E., Bartolini G., Barchi J., Bothner-By A.A., Dadok J., Ford J., 1982. *Absolute stereochemistry of palytoxin*. J. Am. Chem. Soc. 104: 3776-3779.
9. Usami M., Satake M., Ishida S., Inoue A., Kan Y., Yasumoto T., 1995. *Palytoxin analogs from the dinoflagellate Ostreopsis siamensis*. J. Am. Chem. Soc. 117: 5389-5390.
10. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N., 2008. *Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in Ostreopsis ovata collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 19: 111-120.
11. Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Bernard C., Hennion M.C., 2004. *First evidence of palytoxin analogues from an Ostreopsis mascarenensis (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean*. J. Phycol. 40: 1042-1051.
12. Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobó P., Vernesi C., 2005. *Characterization of Ostreopsis and Coolia (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences*. J. Phycol. 41, 212-225.
13. Tindall D.R., Miller D.M., Tindall P.M., 1990. *Toxicity of Ostreopsis lenticularis from the British and United States Virgin Islands*. In: Toxic Marine Phytoplankton, Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (eds.). Elsevier, New York: 424-429.
14. Escalona de Motta G.E., Rodriguez-Costas I., Tosteson T.R., Ballantine D.L., Durst H.D., 1986. *Lysis of red blood cells by extracts from benthic dinoflagellates. Puerto Rico. Health Sci. J. 5: 133-136*.
15. Maeda M., Kodama T., Tanaka T., Yoshizumi H., Nomoto K., Takemoto T., Fujiki T., 1985. *Structures of insecticidal substances isolated from a red alga, Chondria armata*. Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, 27: 616-623.
16. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G.S., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N., 2006. *The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean Ostreopsis ovata by a new liquid chromatography tandem*

- mass spectrometry method.* Anal. Chem. 78 (17): 6153-6159.
17. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L., Guerrini F., Pistocchi R., 2010. *Complex palytoxin-like profile of Ostreopsis ovata. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry.* Rapid Commun. Mass Spectrom. 24: 2735-2744.
 18. Aligizaki K., Katikou P., Milandri A., Diogène J., 2011. *Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art.* Toxicon 57 (3): 390-399.
 19. Haberman E., 1989. *Palytoxin acts through the Na⁺/K⁺-ATPase.* Toxicon 27 (11): 1171-1187.
 20. Scheiner-Bobis G., Meyer zu Heringdorf D., Christ M., Habermann E., 1994. *Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump.* Mol. Pharmacol. 45: 1132-1136.
 21. Weidmann S., 1977. *Effects of palytoxin on the electrical activity of dog and rabbit heart.* Cellular and Molecular Life Sciences 33 (11): 1487-1489.
 22. Habermann E. and Chhatwal G.S., 1982. *Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319: 101-107.
 23. Ecault E. and Sauviat M.P., 1991. *Characterization of the palytoxin induced sodium conductance in frog skeletal muscle.* Br. J. Pharmacol. 102: 523-529.
 24. Chhatwal G.S., Ahnert-Hilger G., Beress L., Habermann E., 1982. *Palytoxin both induces and inhibits the release of histamine from rat mast cells.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 68 (2): 97-100.
 25. Habermann E. and Laux M., 1986. *Depolarization increases inositol phosphate production in a particulate preparation from rat brain.* Naunyn-Schmiederberg's Arch. Pharmacol. 334: I-15.
 26. Levine L. and Fujiki H., 1985. *Stimulation of arachidonic acid metabolism by different types of tumor promoters.* Carcinogenesis 6: 1631-1635.
 27. Frelin C., Vigne P., Breittmayer J.P., 1990. *Palytoxin acidifies chick cardiac cells and activates the Na⁺/H⁺ antiporter.* FEBS Letters 264 (1): 63-66.
 28. Yoshizumi M., Houchi H., Ishimura Y., Masuda Y., Morita K., Oka, M., 1991. *Mechanism of palytoxin induced Na⁺ influx into cultured bovine adrenal chromaffin cells: possible involvement of Na⁺/H⁺ exchange system.* Neurosci. Lett. 130 (1): 103-106.
 29. Frelin C., Vigne P., Breittmayer J.P., 1990. *Mechanism of the cardiotoxic action of palytoxin.* Mol. Pharmacol. 38 (6): 904-909.
 30. Satoh E. and Nakazato Y., 1991. *Mode of action of palytoxin on the release of acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes.* J. Neurochem. 57: 1276-1280.
 31. Habermann E., Ahnert-Hilger G., Chhatwal G.S., Beress L., 1981. *Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics.* Biochim. Biophys. Acta 649: 481-486.
 32. Bignami G.S., 1993. *A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin.* Toxicon 31 (6): 817-820.
 33. Lau C.O., Tan C.H., Li Q.T., Ng F.H., Yuen R., Khoo H.E., 1995. *Bioactivity and mechanism of action of Lophozozymus pictor toxin.* Toxicon 33 (7): 901-908.
 34. Louzao M.C., Ares I.R., Vieytes M.R., Valverde I., Vieites J.M., Yasumoto T., Botana L.M., 2007. *The cytoskeleton, a structure that is susceptible to the toxic mechanism activated by palytoxins in human excitable cells.* FEBS Journal 274 (8): 1991-2004.
 35. Rhodes L., Towers N., Briggs L., Munday R., Adamson J., 2002. *Uptake of palytoxin-*

- like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 36: 631-636.
36. Ito E., Ohkusu M., Yasumoto T., 1996. *Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice*. Toxicon 34 (6): 643-652.
37. Terao K., Ito E., Yasumoto T., 1992. *Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice*. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 85: 494-496.
38. Taniyama S., Arakawa O., Terada M., Nishio S., Takatani T., Mahmud Y., Noguchi T., 2003. *Ostreopsis sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish Scarus ovifrons*. Toxicon 42 (1): 29-33.
39. Wiles J.S., Vick J.A., Christensen M.K., 1974. *Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species*. Toxicon 12 (4): 427-433.
40. Vick J.A. and Wiles J.S., 1975. *The mechanism of action and treatment of palytoxin poisoning*. Toxicology and Applied Pharmacology 34 (2): 214-223.
41. Fujiki H., Suganuma M., Nakayasu M., Hakii H., Horiuchi T., Takayama S., Sugimura T., 1986. *Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis*. Carcinogenesis 7 (5): 707-710.
42. Rhodes L. and Munday R., 2004. *Palytoxins: a risk to human health? Proceedings. 20th Marine Biotoxin Science Workshop, Wellington, New Zealand, New Zealand Food Safety Authority*.
43. Ito E. and Yasumoto T., 2009. *Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes*. Toxicon 54 (3): 244-251.
44. Sosa S., Del Favero G., De Bortoli M., Vita F., Soranzo M.R., Beltramo D., Ardizzone M., Tubaro A., 2009. *Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice*. Toxicology Letters 191: 253-259.
45. Fusetani N., Sato S., Hashimoto K., 1985. *Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish (Ypsiscarus ovifrons) which is probably responsible for a parrotfish liver poisoning*. Toxicon 23 (1): 105-112.
46. Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteau S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H., Yasumoto T., 1999. *Identification of putative palytoxin as the cause of clupectoxism*. Toxicon 37 (1): 55-65.
47. Kodama A.M., Hokama Y., Yasumoto T., Fukui M., Manea S.J., Sutherland N., 1989. *Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to Decapterus macrosoma (mackerel)*. Toxicon 27 (9): 1051-1053.
48. Okano H., Masuoka H., Kimei S., Seko T., Koyabu S., Tsuneoka K., Tamai T., Ueda K., Nakazawa S., Sugawa M., Suzuki H., Watanabe M., Yatani R., Nakano T., 1998. *Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humped parrotfish*. Intern Med. 37 (3): 330-333.
49. Tan C.T.T. and Lee E.J.D., 1988. *A fatal case of crab toxin (Lophozozymus pictor) poisoning*. Asia Pacific J. Pharmacol. 3: 7-9.
50. Gleibs S., Mebs D., Werding B., 1995. *Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef*. Toxicon 33 (11): 1531-1537.
51. Gleibs S., Mebs D., 1999. *Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals*. Toxicon 37 (11): 1521-1527.
52. EU-NRLs on Marine Biotoxins, VIII meeting 26-28 October 2005, Cesenatico, Italy.
53. Aligizaki K., Katikou P., Nikolaidis G., Panou A., 2008. *First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from Ostreopsis species (Aegean Sea, Greece)*. Toxicon 51, 418-427.
54. Yasumoto T., Yasumura D., Ohizumi Y., Takahashi M., Alcalá A.C., Alcalá L.C., 1986.

- Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines.* Agric. Biol. Chem. 50: 163-167.
55. Lau C.O., Khoo H.E., Yuen R., Wan M., Tan C.H., 1993. *Isolation of a novel fluorescent toxin from the coral reef crab, Lophozozymus pictor.* Toxicon 31 (10): 1341-1345.
56. Lau C.O., Tan C.H., Khoo H.E., Yuen R., Lewis R.J., Corpuz G.P., Bignami G.S., 1995. *Lophozozymus pictor toxin: a fluorescent structural isomer of palytoxin.* Toxicon 33 (10): 1373-1377.
57. Lau C.O., Tan C.H., Khoo H.E., Li Q.T., Yuen R., 1995. *Ethanol extraction, purification, and partial characterization of a fluorescent toxin from the coral reef crab, Lophozozymus pictor.* Nat. Toxins 3 (2): 87-90.
58. Yasumoto T., 1998. *Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific.* Toxicon 36 (11): 1515-1518.
59. Noguchi T., Hwang D.F., Arakawa O., Daigo K., Sato S., Ozaki H., Kawai N., Ito M., Hashimoto K., 1987. *Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning.* In: Progress in Venom and Toxin Research: Proceedings of the First Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Gopalakrishnakone, P. e Tan, C.K. (eds.) Singapore Nat. Univ.: 325-335.
60. Taniyama S., Arakawa O., Terada M., Nishio S., Takatani T., Mahmud Y., Noguchi T., 2003. *Ostreopsis sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish Scarus ovifrons.* Toxicon 42 (1): 29-33.
61. Hashimoto Y., Fusetani N., Kimura S., 1969. *Aluterin: a toxin of filefish, Alutera scripta, probably originating from a zoantharian, Palythoa tuberculosa.* Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 35: 1086-1093.
62. Taniyama S., Mahmud Y., Tanu M.B., Takatani T., Arakawa O., Noguchi T., 2001. *Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer Tetraodon sp. toxin.* Toxicon 39 (5): 725-727.
63. Taniyama S., Mahmud Y., Terada M., Takatani T., Arakawa O., Noguchi T., 2002. *Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid Epinephelus sp. in Japan.* Journal of Natural Toxins 11 (4): 277-282.
64. Fukui M., Murata M., Inoue A., Gawel M., Yasumoto T., 1987. *Occurrence of palytoxin in the trigger fish Melichtys vidua.* Toxicon 25: 1121-1124.
65. Amzil Z., Sibat M., Chomerat N., Grossel H., Marco-Miralles F., Lemee R., Nezan E., Sechet V., 2012. *Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to Ostreopsis cf. ovata blooms on the French Mediterranean coast.* Mar. Drugs 10: 477-496.
66. Poletti R. e Pompei M., 2005. *Lo stato delle conoscenze sul fenomeno Ostreopsis lungo le coste italiane.* Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
67. Grillo C. e Melchiorre N., 2005. *Il Caso Liguria: azione integrata per il riconoscimento del fenomeno. Aspetti Ambientali.* Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
68. Casotti M., 2005. *Fioriture tossiche di Ostreopsis ovata nelle acque costiere del litorale apuano.* Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
69. Ungaro N., 2005. *Il caso Puglia: fioriture di Dinoficce del genere Ostreopsis nelle acque costiere dell'Adriatico Pugliese.* Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
70. Monti M., Minocci M., Beran A., Ivesa L., 2007. *First record of Ostreopsis cf. ovata on macroalgae in the Northern Adriatic Sea.* Mar. Pollut. Bull. 54: 598-601.

71. Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Fustighi L., 2003. *Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente*. *Biologia Ambientale* 17 (1): 17-23.
72. Gallitelli M., Addante L.M., Procacci V., Staiano C., Poletti R., Ungaro N., Mazzone M., Gentiloni Silveri N., Sabbà C., 2004. *Toxic Algal Blooms and Public Health Risks*. *Annali Italiani di medicina*. 105° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Interna. Palermo, 23-26 ottobre 2004.
73. Gallitelli M., Ungaro N., Addante L.M., Gentiloni Silveri N., Sabbà C., 2005. *Respiratory illness as reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate*. *J.A.M.A.* 293: 2599-2600.
74. Icardi G. e Marensi L., 2005. *Aspetti epidemiologici*. Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
75. Masò M., Vila M., Alvare P., 2005. *Ostreopsis along the Catalan coast (NE Spain): ecological aspects and epidemiologic study*. Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
76. Aligizaki K., Koukaras K., Nikolaidis G., 2005. *The genus *Ostreopsis* in Greek coastal waters*. Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova 5 dicembre 2005.
77. Chen Y.S., Zhou Y., Irvin C.M., Pierce R.H., Naar J., Backer L., Fleming L.E., Kirkpatrick B., Baden D., 2005. *Characterization of marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins*. *Environ. Health Perspect.* 113: 638-643.
78. EFSA, 2009. *Marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group*. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 7 (12): 1393 (40 pp.)

Capitolo 7

Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

Capitolo 7

Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

La sindrome diarroica da molluschi bivalvi, *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), è una definizione proposta da Yasumoto *et al.* [1,2] dopo numerosi casi diarroici a elevata morbosità verificatisi in Giappone alla fine degli anni settanta.

Anche se la prima relazione scientifica di quest'avvelenamento è relativamente recente, si ritiene che esso esista da secoli nel folklore giapponese. Infatti, nella tradizione popolare giapponese, si raccomandava di non raccogliere i bivalvi, perché tossici, nei mesi di giugno e luglio durante la stagione della fioritura della *Paulownia* (pianta molto diffusa nei giardini giapponesi). DSP è considerato uno dei pericoli più frequenti per la salute umana, soprattutto in quei Paesi dove i bivalvi sono un'importante fonte alimentare. L'intossicazione è nettamente diversa da quella da PSP e NSP, sia per sintomatologia sia per eziologia e si manifesta rapidamente dopo il consumo di bivalvi. Le Dinofitiche tossiche accumulate nei bivalvi sono considerate le responsabili di questa sindrome, che pur non essendo letale per l'uomo, rappresenta un importante problema sanitario in tutto il mondo. La natura dei sintomi dell'avvelenamento è di tipo gastrointestinale: diarrea, nausea, vomito e crampi addominali.

La tossina implicata nella sindrome DSP è un composto liposolubile chiamato acido okadaico, isolato per la prima volta in una spugna nera, *Halichondria okadai*, ed in seguito in *Pandaros acanthifolium*. La vera origine dell'acido okadaico e derivati è stata per la prima volta individuata in una Dinofitica, bentica ed epifita, il *Prorocentrum lima* [3]. Successive ricerche hanno dimostrato che la fonte maggiore di acido okadaico e derivati erano delle Dinofitiche rappresentate dalle *Dinophysis* [2,4].

Alla sindrome DSP sono state associate altre tossine liposolubili, trovate originariamente, molto spesso, nell'estratto acetoneico insieme all'acido okadaico e suoi derivati, quali le yessotossine e le pectenotossine. Dalla metà degli anni '90 alle DSP sono stati associati, perché estratti nella stessa fase acetoneica, anche gli azaspiracidi, implicati in disturbi gastrointestinali. Attualmente si ritiene opportuno associare alla DSP soltanto l'acido okadaico e i suoi derivati e classificare le altre tossine (YTXs, PTXs, AZAs) in gruppi distinti perché hanno caratteristiche chimiche, meccanismi d'azione e risposte tossiche diverse. A questa conclusione sono giunti gli esperti riuniti ad Oslo nel 2004 "*Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs*" che hanno indicato una nuova classificazione [5]:

- tossine acide: acido okadaico e dinophysitossine (OAs - DTXs);
- tossine neutre: pectenotossine (PTXs);
- yessotossina e derivati (YTXs);
- azaspiracido e derivati (AZAs).

Questo tipo di classificazione ci permette di caratterizzare in modo più appropriato i pericoli prodotti dalla singola tossina e i suoi derivati, al fine di formulare un'analisi del rischio specifica, considerando che gli effetti tossicologici non sono completamente sovrapponibili.

7.1 Bibliografia

1. Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., 1978. *Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tokohu District*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish; 44:1249-55.
2. Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara W., Fukuyo Y., Oguri H., Igarashi T. and Fujita N.. 1980. *Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46:1405-1411.
3. Murakami Y., Oshima Y. and Yasumoto T., 1982. *Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate Prorocentrum lima*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48: 69.
4. Lee J. T., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Pand H. Yasumoto T., 1989. *Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species*. J. Appl. Phycol. 1: 147-152.
5. Report of the Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, September 26-30, 2004.

Capitolo 8

Acido Okadaico e derivati (AOs)

Strutturalmente la DTX1 è un 35-metil-acido okadaico, la DTX2 ha invece un solo metile nella posizione C35 (R3). La DTX3 comprende una serie di composti nei quali l'idrogeno in R1 è esterificato con molecole di acidi grassi (acile). Queste possono avere una lunghezza in atomi di carbonio dai 14 ai 22 e un numero di insaturazione non superiore a 6. Esterificazioni simili sono possibili anche per quanto riguarda acido okadaico e DTX1 nella stessa posizione C7 (R1) [6]. La tossina esterificata può essere idrolizzata facilmente da enzimi come le lipasi durante la conservazione, ma anche in ambiente basico con metanolo caldo (75 °C per 40 minuti). L'acido okadaico e i derivati non esterificati non sono stabili in acidi forti come l'HCl. Le DTX4 e DTX5, che contengono gruppi solfato, sono idrosolubili e sono rapidamente idrolizzate per formare AO [7].

8.1 Meccanismo d'azione

L'acido okadaico e i suoi derivati, essendo liposolubili, possono attraversare il doppio strato dei fosfolipidi della membrana cellulare [8] e gli effetti tossicologici di queste molecole sono le conseguenze di reazioni biochimiche alterate rispetto a quelle che normalmente si svolgono in una cellula. L'AO è un potente inibitore di proteina fosfatasi 1 e 2A (PP1 e PP2A), due delle quattro principali classi di enzimi (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) che agiscono defosforilando i residui serina/treonina delle proteine nelle cellule eucariote. L'azione delle PP1 e PP2A rappresenta il 90% dell'attività delle proteine fosfatasi nella cellula [9]; esse intervengono in molti processi cellulari quali: divisione cellulare, differenziazione cellulare, attività neuronale, contrazione muscolare e funzioni metaboliche (Fig.2).

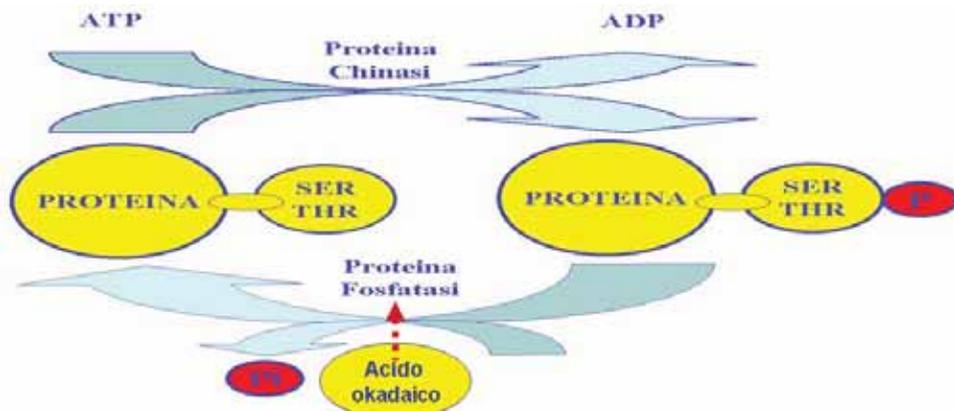


Fig. 2. Schematizzazione del meccanismo d'azione dell'acido okadaico.

L'AO ha uno scarso effetto sulla PP2B (Ca²⁺-calmodulina dipendente) e nessun effetto sulla PP2C (Mg²⁺-dipendente). La IC₅₀ (concentrazione che inibisce il 50% dell'enzima bersaglio) di acido okadaico sulla PP2A è di 0,2 nM, più bassa di quella sulla PP1 (IC₅₀ 2nM) e notevolmente più alta per PP2B (IC₅₀ 5 µM).

Una delle conseguenze dell'inibizione della PP2A, inefficace idrolisi degli esteri fosforici delle proteine, è la mancata polimerizzazione dell'actina che funge da supporto cellulare. Manipolazioni strutturali dell'acido okadaico hanno dimostrato che la modifica del gruppo carbossilico in C1 (Fig.1) provoca una diminuzione significativa nella capacità della tossina di inibire l'attività delle fosfatasi [10]. Infatti un metil estere in C1 rende completamente inefficace l'azione inibitrice dell'acido okadaico sulle fosfatasi. Lo stesso studio ha dimostrato che la metilazione associata agli OH in C2, C7, C24 e C27 provoca

una sostanziale diminuzione in termini di efficacia della tossina. Questo evidenzia che non soltanto il gruppo carbossilico ma anche i gruppi ossidrilici della molecola (C-2, C-7, C-24 e C-27) svolgono un ruolo importante nell'interazione sulle proteine fosfatasi, e pertanto l'integrità di questi elementi strutturali è importante per il potenziale tossico dell'acido okadaico [11].

Tuttavia l'attività farmacologia dell'acido okadaico non è ancora completamente chiarita e non si può escludere che altre fosfatasi o altri tipi di enzimi possano essere interessati alla sua azione.

L'AO oltre ad essere inibitore delle proteine fosfatasi PP1 e PP2A è promotore di tumori con meccanismo d'azione diverso dagli esteri del forbolo; è un promotore di trasformazioni cellulari; inibitore di accrescimento cellulare [12,13]. La fosforilazione delle proteine rappresenta un meccanismo molecolare chiave interessato al controllo della differenziazione cellulare, della proliferazione ed anche della morte cellulare programmata (apoptosi). Le ricerche sul ruolo dell'AO nell'ambito dei promotori di tumori indicano che l'AO può funzionare sia come promotore [14,8] che soppressore di tumori [15], in relazione all'agente trasformante e al tipo di cellula [16]. Ciò pone il problema se questo sia un rischio significativo per la salute pubblica, ma è un interrogativo che non ha trovato ancora risposta [17]. Gli effetti di inibizione di crescita cellulare dell'AO sembrano contraddire la sua attività di promotore di tumori. Si deve tuttavia considerare che molti dei risultati che dimostrano l'inibizione sono ottenuti con concentrazioni intermedie o alte (e spesso anche tossiche) del principio attivo per un breve periodo di tempo, mentre la promozione di crescita tumorale viene osservata a concentrazioni assai basse e nel corso di settimane. E' possibile che elevate o basse concentrazioni di acido okadaico abbiano differenti effetti [13]. Recentemente è stato dimostrato che l'attivazione di una proteina chinasi, la P-53 che accompagna la morte delle cellule cancerose di mammella, è indotta dall'AO [18]. Altre ricerche indicano diversi effetti molecolari responsabili della morte di cellule MCF-7 (cancro della mammella) ed HELA (cellule umane epiteliali) [19].

Il principale sintomo riscontrato nell'uomo dall'avvelenamento di acido okadaico e derivati è la diarrea. Questa è attribuita ad un rapido aumento delle proteine fosforilate che controllano la secrezione dello ione sodio nelle cellule intestinali per effetto dell'inibizione delle PP1 e PP2A [12]. Studi recenti hanno portato alla conclusione che AO ingerito dagli animali o dall'uomo provoca diarrea senza stimolare direttamente la secrezione intestinale, ma attraverso un aumento della permeabilità paracellulare delle cellule epiteliali intestinali. La permeabilità cellulare misurata attraverso il mannitolo è risultata di tre volte superiore quando le cellule sono trattate con acido okadaico [20]. L'acido okadaico, per quanto detto in questo capitolo, può essere considerato uno dei più interessanti strumenti di ricerca scientifica per la conoscenza delle funzioni cellulari.

8.2 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

8.2.1 Tossicità negli animali

L'acido okadaico e i suoi derivati (AOs) hanno una tossicità diversa in relazione alla loro struttura chimica. Tale tossicità è generalmente espressa in unità topo (UT). Una UT è la quantità di tossina, acido okadaico o derivati, che uccide un topo di 20 grammi dopo iniezione intraperitoneale (i.p.) in 24 ore e corrisponde a circa 4 µg di AO o a 3,6 µg di DTX1. Un test sul topo [21] è tuttora utilizzato nei Paesi della Unione europea e nella stragrande maggioranza dei Paesi di tutto il mondo per saggiare l'idoneità al consumo

umano dei prodotti della pesca.

Studi sulla tossicità dell'AO e derivati sono stati condotti in animali (topi e ratti) prevalentemente come effetto acuto, che rappresenta il reale rischio per l'uomo nel normale consumo di molluschi bivalvi; scarsi sono invece i dati sull'effetto cronico che, pur non rappresentando un reale rischio per il consumatore, definisce meglio gli aspetti sui limiti della tossicità protratta nel tempo. La sperimentazione nel topo sulla tossicità acuta dell'acido okadaico ha mostrato una grande variabilità in relazione alla struttura della molecola e alle vie di somministrazione: intravenosa (i.v.), intraperitoneo (i.p.), orale (*per os*). Nella seguente tabella sono riportati alcuni valori di queste tossicità per peso corporeo (p.c.).

Tab. 2. Tossicità acuta di AO, DTX1 e DTX3 per via intraperitoneo (i.p.) e venosa (i.v.).

	Tossicità LD ₉₉ µg/kg i.p.	Rif.Bibl.	Tossicità LD ₅₀ µg/kg i.v.	Rif.Bibl.
AO	200	[22]	192	23
DTX1	160	[22]	200	24
DTX3	500	[22]	166	25

Alcuni ricercatori hanno riportato per AO e DTX2, iniettati intraperitoneo, un LD₅₀ di 204 e 352 µg/kg p.c. rispettivamente [25], evidenziando in questo caso che DTX2 ha una tossicità 0,6 volte più bassa rispetto all'acido okadaico, mentre altri [26] hanno trovato per AO un LD₅₀ di 225 µg/kg p.c.. Nello stesso studio 5 topi iniettati con 159 µg di AO/kg p.c. non morivano nelle 24 ore, mentre di quelli iniettati con 200 µg di AO/kg p.c. ne morivano 2 su 5. Inoltre, i topi trattati con AO (200-400 µg/kg p.c.) mostravano all'esame autoptico aree scure nel fegato. Topi trattati con DTX1 per i.p. a varie concentrazioni (50-500 µg/kg p.c.) hanno evidenziato alterazioni principalmente a livello dell'intestino tenue con degenerazione dell'epitelio e distruzione dell'apparato del Golgi, cosa che suggerisce un possibile attacco diretto a questa struttura cellulare [27]. L'effetto distruttivo sull'epitelio a carico dell'intestino tenue è stato dimostrato anche per le altre tossine acide quali AO e DTX3 [28].

La tossicità di AO per somministrazione orale (*per os*) in topi è stata valutata in 200-300 µg/kg p.c., quella della DTX1 in 100-300 µg/kg p.c. [29]. Tuttavia ulteriori studi mettono in evidenza che la tossicità acuta *per os* varia notevolmente e questo a conferma della necessità di adottare un protocollo validato per poter confrontare i dati prodotti. Infatti, la dose letale di AO per via orale nel topo, nei vari studi prodotti, può essere del tutto simile a quella i.p., ma anche 10 volte superiore. La somministrazione di AO *per os* (sondino gastrico) in topi (CD-1 femmine di 18-20 g) alla concentrazione di 1 mg/kg p.c. non causava la morte dei 5 topi trattati, mentre alla concentrazione di 2 mg/kg p.c. procurava la morte di 4 topi su 5. Tutti i topi trattati mostravano macchie scure nel fegato e la stessa sintomatologia: diarrea, incapacità di moto, ipotermia e cianosi [26]. Acido okadaico somministrato *per os* in topi (Swiss albini) alla concentrazione di 50 µg/kg p.c., dose che non produce diarrea, è stato rilevato dopo 24 ore nel contenuto intestinale (36,3% della dose somministrata), nelle urine (11,6%), nella pelle (8,3%), nelle feci (6,6%), nel sangue (4,3%), nel muscolo (3%), nel tessuto intestinale (2,6%) e in concentrazioni percentualmente più basse nel fegato e cistifellea > stomaco > reni > cervello > polmoni > milza > cuore (≤ 1,0%) [30]. La distribuzione era del tutto simile a quella rinvenuta negli animali trattati con una dose che provoca diarrea (90 µg/kg p.c.) ad eccezione del fatto che l'AO diminuiva significativamente nello stomaco, ma

aumentava nel tessuto intestinale.

La somministrazione di AO a varie concentrazioni a topi (ICR maschi di 4 settimane) *per os* (sondino gastrico) evidenziava la dose letale in 400 µg/kg p.c.. Nello stesso esperimento si dimostrava che l'AO a dosi subletali di 75, 150 e 250 µg di AO/kg p.c. dopo 5 minuti era ritrovato in polmoni, fegato, cuore, reni e intestino piccolo e crasso. Inoltre si notava una ipersecrezione nel piccolo intestino che diventava sempre più importante dopo 15 minuti, sino a raggiungere un massimo nelle 24 ore per la dose più alta. L'attenzione dei ricercatori era comunque rivolta ai cambiamenti patologici nei vari organi dei topi trattati con la dose intermedia (150 µg/kg p.c.). Questa indagine rilevava che i danni ai polmoni, stomaco, piccolo intestino, intestino crasso e cieco erano indotti nelle prime 2 ore della fase della sperimentazione. Nonostante le gravi alterazioni della mucosa intestinale, degenerazione dell'epitelio, della lamina propria, desquamazione ed erosione dei villi intestinali e perdita di sangue, il ripristino dello stato normale iniziava già dopo le prime 6 ore dalla somministrazione della tossina. Tuttavia, AO continuava ad essere rilevato nei polmoni, fegato, cuore, reni e vasi sanguigni 2 settimane dopo la somministrazione e, nonostante l'escrezione di AO attraverso le urine, l'intestino cieco e crasso cominciasse dopo 5 minuti dalla somministrazione, questa continuava attraverso la via intestinale per altre 4 settimane [31].

La dose letale per topi (ddY maschi) trattati con DTX1 *per os* è stata calcolata in circa 300 µg/kg p.c., concentrazione inferiore a quella imputata all'AO [29].

AO, DTX1 e DTX3 somministrati *per os* in topi (ICR maschi) e ratti (Wistar) alla concentrazione di 750 µg/kg p.c. producono diarrea molto intensa e le lesioni provocate dalla DTX3 agli organi degli animali sono limitate soltanto al tratto gastrointestinale [32]. In una recente conferenza, Ito (2006) ha evidenziato che i ratti sono più tolleranti all'AO *per os* rispetto ai topi e ha proposto per i topi, sulla base dell'accumulo di liquido intestinale, un LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) e un NOAEL (*NO Observed Adverse Effect Level*) di 75 e 50 µg/kg p.c. rispettivamente. Per i ratti invece il LOAEL per AO era valutato in 400 µg/kg p.c. per la tossina veicolata con soluzione salina, oppure 200 µg/kg p.c. per quella veicolata con trioleina.

AO e DTX1 hanno dimostrato di essere dei promotori tumorali nella pelle (papillomi e carcinomi) del topo, quando somministrati insieme a dimetil-benzantracene, un iniziatore tumorale [33,34].

A seguito dell'osservazione che l'AO induce l'attività dell'ornitina decarbossilasi nello stomaco ghiandolare dei ratti, attività tipica di altri promotori tumorali, è stato suggerito che questa tossina possa essere anche un promotore di tumori dello stomaco. Studi a tale proposito, eseguiti somministrando *per os* a ratti AO in acqua e come iniziatore tumorale N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG), hanno portato alle seguenti conclusioni [33,35]:

- AO alla concentrazione di 14,29 µg/kg p.c. non produce alcun effetto (NOAEL) in topi, sia in termini di perdita di peso, sia per quanto riguarda neoplasie;
- AO alla concentrazione di 28,57 µg/kg p.c. produce ritardi (LOAEL) in termini di aumento di peso, ma non sono individuate neoplasie;
- AO alla concentrazione di 14,29 µg/kg p.c., somministrato con MNNG, produce neoplasie.

In altre ricerche è stata evidenziata anche una possibile attività genotossica dell'AO, a seguito dell'osservazione di addotti al DNA su colture cellulari ed embrioni di pesce [36].

E' stato dimostrato che AO somministrato per via orale in topi (Swiss-Webster) può attraversare la placenta e interessare il feto [37].

Nella tabella seguente sono riportati alcuni studi di tossicità acuta per AO e DTXs [38].

Tab. 3. Studi di tossicità acuta con tossine del gruppo dell'AO.

Tossina	Specie	Dose µg/kg p.c.	Via di somministrazione	Tossicità acuta	NOAEL µg/kg p.c.	Commenti	Rif.Bibl.
AO	topo	200	i.p.	letalità	ND	Stime variabili	[22]
AO	topo	400-2000	orale	letalità	ND		[31,26,39]
AO	topo	75-750	orale	diarrea	50		[30,31,32,40]
AO	ratto	200-400	orale	diarrea	ND		[40]
AO	topo	200	i.p.	danni intestinali	ND		[41]
AO	ratto	375	i.p.	danni intestinali	ND		[32]
AO	topo	150-2000	orale	danni intestinali	ND		[31,26,32,41]
AO	ratto	750	orale	danni intestinali	ND		[32]
AO	topo + ratto	375	i.p.	danni epatici	ND		apoptosi: 115-1300; lesioni degenerative: 1000-2000
AO	topo	115-2000	orale	danni epatici	750 topo + ratto		[26,39,32]
DTX1	topo	160	i.p.	letalità	ND	danni osservati in topi e ratti a 350 µg/kg p.c.	[22]
DTX1	topo	100-400	orale	letalità	ND		[29]
DTX1	topo	750	orale	diarrea	ND		[31]
DTX1	topo	50-500	i.p.	danni intestinali	ND		[32,41,27]
DTX1	topo + ratto	750	orale	danni intestinali	ND		[32,41]
DTX1	topo + ratto	375	i.p.	danni epatici	ND		[32]
DTX1	topo + ratto		orale	danni epatici	750		[32]
DTX2	topo	350	i.p.	danni epatici	ND		[25]
DTX3	topo	250-500	i.p.	letalità	ND	danni minori sono osservati per i.p.	22,42
DTX3	topo	750	orale	diarrea	ND		32
DTX3	topo + ratto	375	i.p.	danni intestinali	ND		32,41
DTX3	topo	150	orale	danni intestinali	ND		41
DTX3	ratto	750	orale	danni intestinali	ND		32
DTX3	topo + ratto	375	i.p.	danni epatici	ND		32
DTX3	topo + ratto	750	orale	danni epatici	ND		32

ND = Non determinabile

8.2.2 Tossicità nell'uomo

Intossicazioni da acido okadaico e derivati (comunemente definite come DSP) nell'uomo sono state segnalate in tutto il mondo, ma nonostante i numerosi casi le informazioni sul dettaglio degli eventi sono molto limitate, impedendo una corretta visione della dinamica epidemiologica. Ciò condiziona l'azione delle Autorità competenti (medici, veterinari, biologi, ecc..) preposte ad assicurare il consumatore attraverso l'azione di prevenzione e di controllo e, nel caso, di cure più appropriate. La quantità di molluschi o crostacei consumati, il profilo tossicologico delle tossine presenti e la loro quantificazione, i metodi di cottura, la conservazione del prodotto, altri dettagli sul pasto consumato che ha procurato disturbi e la rapidità di acquisizione di questi dati sono elementi importanti per meglio individuare il pericolo e fare una corretta analisi del rischio.

La sintomatologia dell'AO è stata descritta per la prima volta in Giappone quando nei mesi di giugno e luglio 1976 e 1977 circa 164 persone, a seguito del consumo di cozze o cappellete, hanno accusato disturbi gastrointestinali quali: diarrea (92%), nausea (80%), vomito (79%) e dolori addominali (53%). La comparsa dei primi sintomi variava dai 30 minuti alle 7 ore, con una media di circa 4 ore nel 70% dei casi. Raramente i sintomi superavano le 12 ore dall'ingestione dei bivalvi contaminati e la loro durata poteva durare fino a 3 giorni nei casi più gravi, senza lasciare conseguenze [1]. Per valutare i livelli di tossine associate alla intossicazione furono analizzati i mitili non consumati durante i pasti dalle persone intossicate, utilizzando per l'individuazione di questa tossina, inizialmente sconosciuta e in seguito caratterizzata come DTX1 [43], un test sul topo. I livelli di tossine furono quantificate in unità topo (UT)/grammi di epatopancreas (la parte dei bivalvi che generalmente accumula più tossine lipofile), definendo come 1 UT la più piccola concentrazione di tossina che uccide il topo per iniezione intraperitoneale (i.p.) nelle 24 ore. La minima quantità di tossina che dava sintomi da DSP, definiti leggeri, era valutata in 12 UT, corrispondente a circa 48 µg di AO o 38 µg di DTX1, supponendo che 1 UT è equivalente a 4 µg di AO o 3,2 µg di DTX1. Questo primo episodio d'intossicazione umana attribuito a tossine lipofile del tipo DSP ha dato un notevole impulso alle ricerche sulla farmacologia di questi composti, a definire e migliorare i sistemi di controllo igienico-sanitario sui molluschi bivalvi e a chiarire vecchi episodi ricorrenti d'intossicazione umana che non avevano trovato fino ad allora una valida spiegazione scientifica.

Non si conoscono casi mortali per intossicazione da AO e derivati, ma la rapidità della comparsa dei sintomi, simili a quelli attribuiti a tossinfezioni batteriche e virali, può rappresentare un elemento per predisporre rapidamente le cure del caso.

A proposito dell'attività di promotore tumorale dell'AO, in Francia è stato condotto uno studio sulla popolazione di 59 zone costiere per verificare se il consumo di molluschi bivalvi contaminati con bassi livelli di AO poteva influenzare i tassi di cancro dell'apparato digerente (esofago, stomaco, colon, fegato e pancreas). I risultati dello studio non hanno evidenziato nessuna associazione [44].

I dati ricavati dall'intossicazione di circa 400 persone registrata nella primavera e autunno del 1984 in Norvegia, per consumo di mitili con concentrazioni di DSP di 10-15 UT (equivalenti a 40-60 µg AO) [45] e in Svezia nella primavera e autunno del 1984 con concentrazioni di DSP superiori a 17 UT/100g di parte edibile (p.e.) corrispondenti a 68 µg AO o 53 µg DTX1/100g, hanno permesso di determinare un LOAEL di 48-65 µg di tossina per una persona di 60 kg [46].

Di seguito si riporta una sintesi di episodi attribuiti a DSP verificatisi in Europa in seguito al consumo di molluschi bivalvi e crostacei:

A. Inghilterra

- 1) Nel 1994, 2 pazienti dopo avere mangiato mitili accusavano, entro circa 2 ore, sintomi DSP che perduravano per 36 ore. Nei molluschi analizzati (test sul topo e analisi chimica in cromatografia liquida ad alta pressione, HPLC) veniva confermata la presenza di AO ad una concentrazione di 2.030 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ p.e.. Gli esperti calcolavano che le persone intossicate avevano mangiato circa 50 g di mitili cotti con una assunzione di 1.015 μg di AO eq./persona, corrispondente a 17 μg AO eq./kg p.c. [38].
- 2) Nel giugno del 1997, 49 persone, dopo avere mangiato in due ristoranti di Londra mitili (*Mytilus edulis*) raccolti in Inghilterra, accusavano sintomi da DSP dopo 30 minuti. I sintomi si protraevano per oltre 8 ore. Le analisi sulle feci di alcuni pazienti escludevano la presenza di batteri patogeni o virus, mentre quelle chimiche in HPLC sui mitili incriminati indicavano la presenza di AO ad una concentrazione compresa tra 25,3 e 36,7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ di p.e. [47].
- 3) Nel giugno 2006, 150 persone accusavano sintomi da DSP dopo avere mangiato mitili (*M. edulis*) in una catena di ristoranti di Londra. La sintomatologia procurata da questi molluschi si manifestava, nella maggior parte delle persone intossicate, tra le 2 e le 12 ore dopo il pasto. L'analisi chimica in LC/MS di alcuni campioni dei mitili incriminati evidenziava la presenza di AO e DTXs ad una concentrazione di 258-302 μg AO eq./kg p.e.) e presenza di pectenotossine (PTXs). L'assunzione di acido okadaico nelle persone che accusavano sintomatologia da DSP era calcolata in 40-80 μg [38].

B. Portogallo

- 1) Nel 1998, sintomi da DSP erano accusati da circa 18 persone che avevano mangiato telline (*Donax trunculus*). Un campione di queste telline analizzato in HPLC evidenziava la presenza di bassi livelli di AO (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.e.), tuttavia dopo l'idrolisi alcalina dell'estratto dei molluschi, procedura necessaria per evidenziare l'eventuale presenza degli esteri (DTX3), l'AO totale era quantificato in 1.300 μg AO/kg p.e., con una assunzione di circa 117-130 μg di AO equivalente per ogni persona [48].
- 2) Nell'estate 2001, sintomi DSP erano accusati da 6 persone per il consumo di cannolicchi (*Solen marginatus*) e granchi (*Carcinus maenas*). I sintomi iniziarono, nei casi più gravi, dopo le 5 ore con diarrea (96%), nausea (80%), vomito (79%) e dolori addominali (53%) protraendosi per 3 giorni. Campioni di cannolicchi e granchi, raccolti nelle aree di provenienza del materiale coinvolto nell'intossicazione, analizzati in LC/MS mostravano: per i cannolicchi una concentrazione di 500 μg AO eq./kg p.e. (presenza di AO ma principalmente di DTX3 e anche di acido domoico); per i granchi una concentrazione di 322 μg AO eq./kg p.e. (presenza di AO ma principalmente di DTX3 e anche di acido domoico, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.e.) [49].

C. Norvegia

- 1) Nell'estate del 2002, circa 200 persone che avevano mangiato dei granchi (*Cancer pagurus*) raccolti nella costa sud della Norvegia accusavano sintomi di avvelenamento tipici di DSP [50]. Tali sintomi si presentavano in forma non molto grave e ad insorgenza ritardata. Granchi pescati nella stessa zona di quelli incriminati nell'intossicazione, analizzati con LC/MS, mostrarono livelli di DTX3 pari a 1.050-1.500 μg AO eq./kg p.e.. L'assunzione della tossina per persona veniva calcolata in 75-150 μg AO equivalente, ovvero 1,25-2,5 μg AO eq./kg p.c. [51,52].

- 2) Nel 2001, 39 persone presentavano la tipica sintomatologia DSP per consumo di mitili (*M. edulis*). L'analisi dei molluschi confermava la presenza di tali tossine alla concentrazione di 550-650 µg AO eq./kg p.c. [51,52].

D. Italia

- 1) Nel giugno 1989, nel Mare Adriatico lungo la costa dell'Emilia-Romagna 100 persone accusavano sintomi da DSP per consumo di mitili (*Mytilus galloprovincialis*). L'Autorità competente inizialmente indirizzava le analisi su batteri e virus, ma i ricercatori del Centro Ricerche Marine di Cesenatico dimostrarono che i disturbi gastrointestinali (prolungata diarrea, nausea e vomito) erano imputabili alla presenza di tossine DSP, supportati dal rilevamento di *Dinophysis fortii* sia nell'acqua di mare che nell'epatopancreas dei mitili e dai risultati dei saggi biologici (*mouse test*) eseguiti sul topo [55]. Questo fenomeno si estese, interessando diverse aree costiere del bacino Adriatico (Abruzzo, Marche, Veneto e Friuli-Venezia-Giulia). Indagini più approfondite, svolte nell'ambito di una collaborazione tra il Centro Ricerche Marine di Cesenatico, il Dipartimento di Biochimica Veterinaria dell'Università di Bologna e il Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università di Napoli, su notevoli quantità di epatopancreas raccolto dai mitili tossici, hanno reso possibile, dopo ripetute separazioni cromatografiche associate al test di biotossicità sul topo in ogni frazione, dimostrare la formula di struttura di un complesso polietere identificato come acido okadaico mediante spettrometria 1HNMR [56]. Le analisi biologiche (test sul topo) eseguite durante il periodo 1989-1998 per la determinazione delle DSP in 9665 campioni di molluschi bivalvi appartenenti a specie diverse, raccolti nelle aree costiere sedi di allevamenti e banchi naturali del Friuli-Venezia-Giulia, Veneto ed Emilia-Romagna, hanno evidenziato che soltanto i mitili erano positivi al test sul topo (Tab.4).

Tab. 4. Confronto di campioni positivi da DSP nelle diverse specie di molluschi bivalvi analizzati nel periodo 1989-1998.

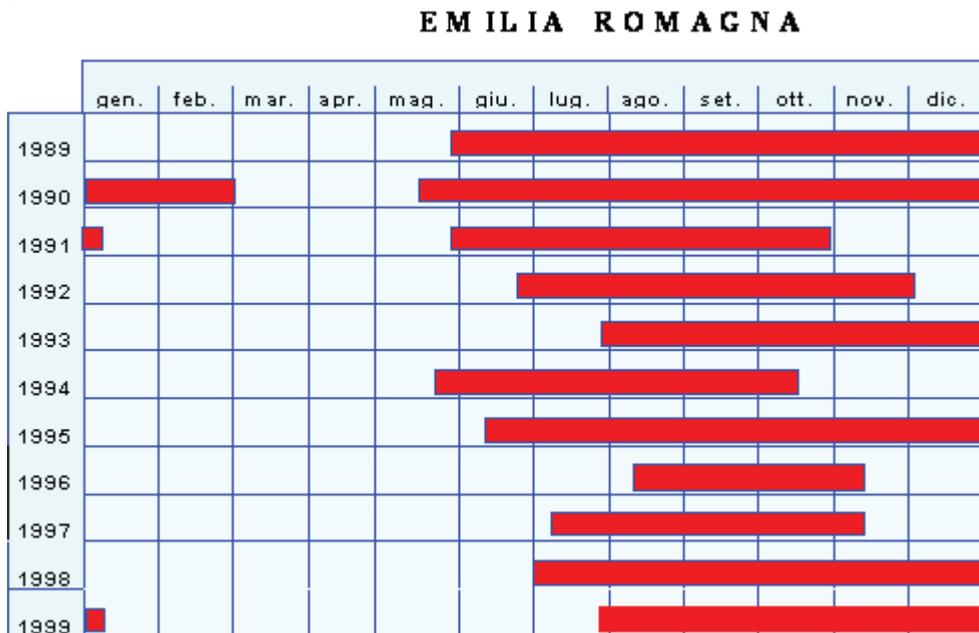
Specie	DSP		
	N° campioni	Campioni positivi *	%
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	8.313	2.406	29
<i>Tapes philippinarum</i>	665		
<i>Callista chione</i>	239		
<i>Cardium</i> sp.	45		
<i>Chamelea gallina</i>	239		
<i>Chlamys</i> sp.	38		
<i>Crassostrea gigas</i>	85		
<i>Pecten jacobaeus</i>	41		

* Campioni positivi = morte di 2 topi su 3 entro le 5 ore. I bivalvi non sono idonei al consumo umano.

La positività riscontrata nei molluschi bivalvi ha determinato la sospensione temporanea della raccolta e della commercializzazione degli stessi.

La costa dell'Emilia Romagna rappresenta tuttora l'area di mare in cui si registrano i più lunghi periodi di sospensione di raccolta dei mitili (Fig.3) rispetto alle altre regioni Adriatiche e a quelle di altri mari italiani.

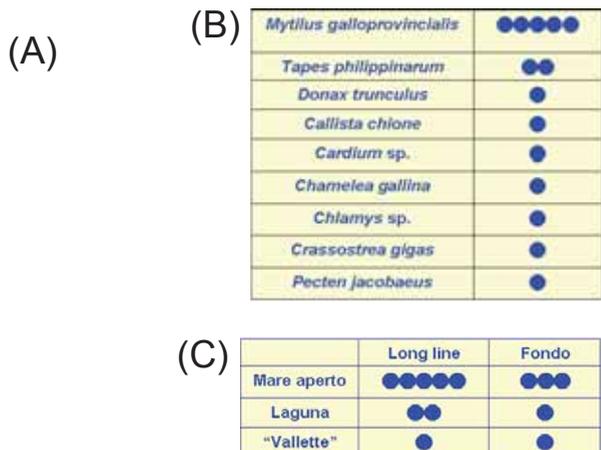
Fig. 3. Periodo di “sospensione temporanea” della raccolta e commercializzazione dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) in Emilia Romagna, dal 1989 al 1999.



Il Centro Ricerche Marine sulla base di decine di migliaia di analisi per DSP eseguite sin dalla fine degli anni '80 in Italia nel suo ruolo di Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine (NRLMB) ha elaborato indicazioni, destinate ai pescatori e all'Autorità competente, sui potenziali rischi di accumulo di DSP (AO e DTXs) nei bivalvi, relativamente al loro potere di filtrazione, al periodo stagionale e alla zona di raccolta (Fig.4).

	DSP (OAs)
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	●
Maggio	●
Giugno	● ● ●
Luglio	● ● ● ●
Agosto	● ● ● ●
Settembre	● ● ● ●
Ottobre	● ● ● ●
Novembre	● ●
Dicembre	●

Fig. 4. A) mesi potenzialmente a rischio per accumulo di AOs nei bivalvi; **B)** capacità fisiologica di accumulo di biotossine marine; **C)** tossicità DSP (AOs) in *Mytilus galloprovincialis* raccolti in aree marine costiere.



8.3 Eziologia

L'acido okadaico e derivati, tossine responsabili della sindrome DSP, sono stati isolati per la prima volta da alcune spugne: *Halichondria okadai* e *Pandaros acanthifolium*. L'origine biogenetica di queste tossine era comunque attribuita, inizialmente ad una Dinoficea bentonica ed epifita, il *Prorocentrum lima* [3]. La più importante fonte delle tossine diarretiche, come hanno dimostrato in seguito numerose indagini, è sempre rappresentata dalle Dinoficee, ma appartenenti al genere *Dinophysis*.

La sindrome DSP è stata registrata in molti parti del mondo: Giappone, coste europee atlantiche, Canada, Paesi del bacino del Mar Mediterraneo e tante altre aree dove il monitoraggio sistematico delle acque e dei molluschi bivalvi si è dimostrato un valido strumento di tutela dei consumatori. Alcune specie di *Dinophysis* vengono ritrovate nel fitoplancton del Mare Adriatico ed in particolare durante l'intossicazione da DSP nel 1989, per consumo di mitili, è stata evidenziata la presenza di *Dinophysis fortii*, *D. tripos*, *D. caudata* ed una specie simile a *D. acuminata* [55]. Ricerche condotte durante questo episodio hanno attribuito alle *Dinophysis* la sintesi di tossine DSP del gruppo dell'AO [56]. In *D. fortii* è stata evidenziata, oltre ad AO e DTX1, la presenza di PTX2 [57] in accordo con quanto dimostrato da altri ricercatori in altri mari [58].

I dati raccolti in 8 anni di monitoraggio (1989-1996) sull'analisi quali-quantitativa di microalghe tossiche in 48 stazioni costiere tra Trieste e Cattolica (in totale 3 regioni dell'Alto e Medio Adriatico), per un numero complessivo di 17.238 analisi, hanno messo in evidenza quanto segue [59]:

- lo sviluppo delle cellule microalgali appartenenti al genere *Dinophysis* riguarda un arco temporale prevalentemente compreso tra maggio e ottobre, con un primo picco all'inizio dell'estate e un secondo molto più elevato all'inizio dell'autunno (Fig.5);

- per quanto riguarda la prevalenza delle specie microalgali che determinano il primo incremento stagionale si è riscontrata la dominanza di *Dinophysis sacculus* e di *Dinophysis* sp. cf *acuminata* nelle acque antistanti la costa emiliano-romagnola. Relativamente al secondo incremento, osservato nel periodo fine estate ed inizio autunno, in tutta la fascia costiera si assiste ad un progressivo aumento di *Dinophysis fortii* e *D. caudata*;

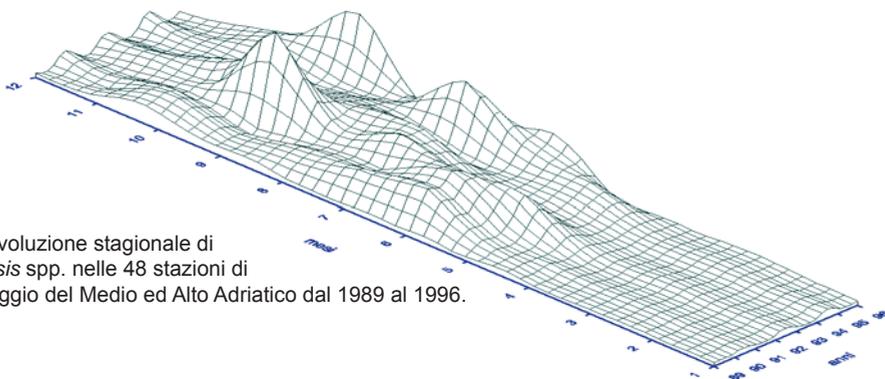


Fig. 5. Evoluzione stagionale di *Dinophysis* spp. nelle 48 stazioni di monitoraggio del Medio ed Alto Adriatico dal 1989 al 1996.

- la distribuzione spaziale di *Dinophysis* spp. nelle tre aree costiere ha andamenti differenti (Fig.6). In particolare nelle stazioni della costa emiliano-romagnola si raggiungono concentrazioni di cellule per litro di acqua più alte rispetto a quelle del Friuli-Venezia-Giulia e molto di più riguardo a quelle del Veneto [59].

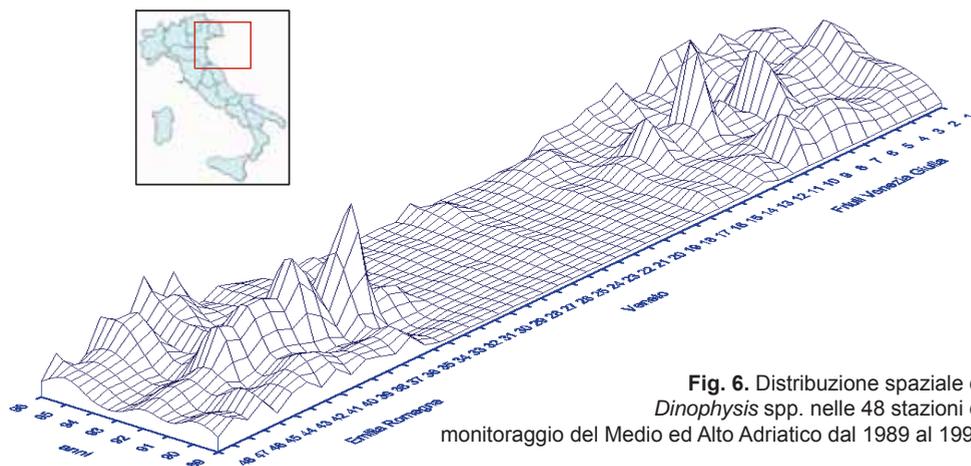


Fig. 6. Distribuzione spaziale di *Dinophysis* spp. nelle 48 stazioni di monitoraggio del Medio ed Alto Adriatico dal 1989 al 1996

Non tutte le specie di *Dinophysis* sono considerate produttrici di tossine DSP; inoltre alcune di queste sviluppano la loro tossicità in alcune aree geografiche ma non in altre. E' evidente che la presenza della tossina nella cellula è regolata da processi complessi, talvolta sconosciuti, di natura genetica e metabolica. L'identificazione della microalga tossica sulla base di caratteristiche morfologiche viene effettuata molto spesso tramite l'utilizzo del microscopio ottico, tecnica che consente di fornire una rapida risposta. Questa attrezzatura è però talvolta non sufficientemente adeguata al numero e alla complessità degli elementi che portano alla identificazione della specie microalgale. Le tecniche che utilizzano la microscopia elettronica e la mappatura genetica sono considerate, attualmente, i sistemi più adeguati alla identificazione delle specie microalgali e dei loro ceppi.

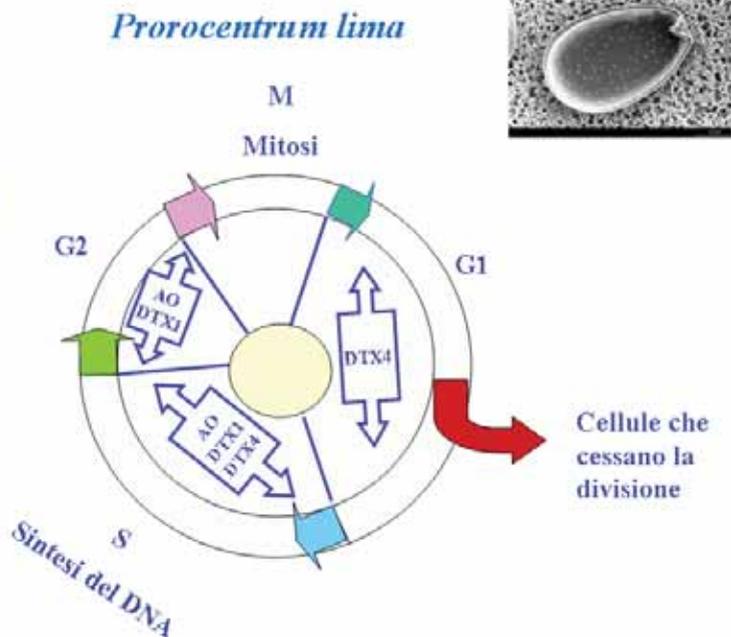
In colture cellulari sono stati studiati i rapporti tra un ceppo tossico di *Prorocentrum lima* che produce AO e DTX1 e la microflora batterica associata. Lo studio ha permesso di individuare un *Proteobacterium* di specie ancora sconosciuta in grado di produrre piccole quantità di AO e DTX1, e di evidenziare inoltre che la microflora batterica aumenterebbe la produzione di tossine da parte di *Prorocentrum lima* quando la coltura è nella fase di decadimento. Questo dimostrerebbe un sinergismo tra Dinofitee e batteri per la sintesi delle tossine AO e DTX1 [60]. Altre ricerche hanno indicato che i batteri del gruppo *Roseobacter* sono quelli maggiormente associati alla produzione di AO nelle Dinofitee del genere *Prorocentrum* e questo gruppo di batteri non si troverebbe in associazione con altre Dinofitee tossiche [61]. In uno studio sulla produzione di AO e derivati in una coltura di *Prorocentrum lima* è stato evidenziato che le tossine sono prodotte dalla cellula durante il periodo di luce. La tossina inizialmente prodotta è la DTX4 durante la fase G1 del ciclo cellulare e persiste nella fase S. Questa tossina precede di alcune ore (3 o 6 ore) AO e DTX1 che si ritrovano nella fase avanzata S e nella fase avanzata G2 (Fig.7) [62].

Fig. 7. Fasi di produzione di acido okadaico e derivati in cellula di *Prorocentrum lima* in coltura.

Ciclo Cellulare

14 ore di luce e
10 ore di buio

Le tossine vengono prodotte durante le ore di luce
AO e DTX1 sono prodotte nelle fasi avanzate S e G2



La produzione di DSP è stata confermata, per ora, in alcune specie di *Dinophysis* e in Dinoficee bentoniche ed epifite del genere *Prorocentrum*: *Dinophysis fortii*, *D. norvegica*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. sacculus*, *Prorocentrum lima*, *P. concavum* e *P. redfieldii* [16,63,64,65].

Nella tabella seguente (Tab.5) sono elencate alghe produttrici di AO e dinophysitossine (DTXs) in alcune aree del mondo.

Tab. 5. Microalghe produttrici di acido akadaico e derivati

Specie	Distribuzione	Rif.Bibl.
<i>D. acuminata</i> e <i>D. acuta</i>	Spagna	66,16
<i>D. acuminata</i> , <i>D. sacculus</i> e <i>P. lima</i>	Francia	66,16
<i>D. acuminata</i> e <i>D. redfieldii</i>	Olanda	66,16
<i>D. acuta</i> , <i>D. sacculus</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>D. caudata</i> e <i>P. lima</i>	Portogallo	66
<i>D. acuminata</i> , <i>D. acuta</i> , <i>D. norvegica</i> <i>P. lima</i> e <i>P. concavum</i>	Scandinavia	66,16
<i>D. acuta</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>P. lima</i> , <i>P. concavum</i>	Irlanda	66,67,68
<i>Dinophysis</i> spp., <i>D. sacculus</i> , <i>D. acuminata</i> e <i>D. fortii</i>	Mar Adriatico	16,66,69
<i>D. caudata</i>	Golfo del Messico	16
<i>D. fortii</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>P. lima</i>	Australia	70,71
<i>D. norvegica</i> e <i>P. lima</i>	Canada	72,73
<i>D. fortii</i> , <i>P. lima</i>	Giappone	2,3

Nella figura seguente (Fig. 8) sono riportate immagini relative ad alcune specie di *Dinophysis* che si sviluppano nel Mare Adriatico.

Fig.8. Specie di *Dinophysis* del Mar Adriatico.

E' diffusa convinzione che le specie algali produttrici di tossine DSP così come l'espansione dei casi di contaminazione nel mondo siano destinati ad aumentare. Il ritrovamento continuo di microalghe tossiche in vaste aree marine di tutto il mondo è indubbiamente legato ad una loro più facile diffusione specialmente attraverso i traffici marittimi, ma anche ad un notevole aumento di ricerche e monitoraggi in mare dettati dalla necessità di commercializzare prodotti ittici idonei al consumo umano.

8.4 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da AOs

In Tab.6 è schematizzata la valutazione del rischio associato a prodotti ittici contaminati da tossine del tipo AOs.

Tab. 6. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine AOs.

Diffusione	Le tossine AOs sono state trovate in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud America, Oceania.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	AOs sono rapidamente assorbiti e distribuiti in tutto il corpo: contenuto intestinale > urine > feci > tessuti intestinali > polmoni > fegato > stomaco > sangue. AOs sono potenti inibitori delle proteine fosfatasi PP1 e PP2A.
Meccanismo d'azione	L'acido okadaico è un potente inibitore di proteina fosfatasi 1 e 2A (PP1 e PP2A), due delle quattro principali classi di enzimi (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) che agiscono defosforilando i residui serina/treonina delle proteine nelle cellule eucariote. L'azione delle PP1 e PP2A rappresenta il 90% dell'attività delle proteine fosfatasi nella cellula; intervengono in molti processi cellulari quali: divisione cellulare, differenziazione cellulare, attività neuronale, contrazione muscolare e funzioni metaboliche.
Tossicità in animali (topo)	Per iniezione intraperitoneale (i.p.): 200 µg/kg (AO); 160 µg/kg (DTX1); 250 µg/kg (DTX3). Per somministrazione orale (<i>per os</i>) la tossicità è inferiore di 3-6 volte rispetto a quella i.p..
Tossicità umana per via orale	Effetto acuto con disturbi gastrointestinali, diarrea, nausea, vomito e dolori addominali sono stati evidenziati con un LOAEL di 1 µg AO eq./kg p.c. (FAO/IOC/WHO) ovvero 60 µg di AO eq./persona. Per EFSA-CONTAM il LOAEL è stato calcolato in 0,8 µg AO eq./kg p.c., ovvero circa 50 µg di AO eq./persona.
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Al LOAEL di 1 µg/kg p.c. (FAO/IOC/WHO) è stato applicato un fattore d'incertezza di 3 per estrapolare un ARfD di 0,33 µg AO eq./kg p.c. (20 µg AO eq./persona). Al LOAEL di 0,8 µg AO eq./kg p.c. (EFSA-CONTAM) è stato applicato un FI di 3 per estrapolare un NOAEL che ha portato a calcolare un ARfD di 0,3 µg AO eq./kg p.c. (18 µg AO eq./persona).

(LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level*; NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level*)

Nella seguente tabella si riportano i valori dei Limiti Guida.

Tab. 7. Limiti Guida in relazione alla parte edibile assunta

Parte edibile ingerita in grammi	Limite Guida * µg AO eq./kg p.e.		Limite µg AO eq./kg p.e. Reg. (CE) 853/2004
	FAO/IOC/WHO	EFSA - CONTAM	
100	200	180	160
250	80	72	
400	50	45	

*Calcolo dei Limiti Guida elaborati da Poletti R., in base alle indicazioni FAO/IOC/WHO [5] e EFSA/CONTAM [74].

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo dell'acido okadaico è stato indicato un limite di 160 µg di AO eq./kg di parte edibile [75].

8.5 Bibliografia

1. Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., 1978. *Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tokohu District*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish; 44:1249-55.
2. Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara W., Fukuyo Y., Oguri H., Igarashi T. and Fujita N., 1980. *Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46:1405-1411.
3. Murakami Y., Oshima Y. and Yasumoto T., 1982. *Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate Prorocentrum lima*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48: 69.
4. Lee J. T., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Pand H. Yasumoto T., 1989. *Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species*. J. Appl. Phycol. 1: 147-152.
5. Report of the Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, September 26-30, 2004.
6. Marr J.C., Jackson A.E. and McLachlan J.L., 1992. *Occurrence of Prorocentrum lima, a DSP toxin-producing species from the Atlantic coast of Canada*. J. Appl. Phycol. 4:17-24.
7. Hu T. M., Curtis J. M., Walter J. A. and Wright J. L. C., 1995. *Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate Prorocentrum lima*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 5: 597-599.
8. Suganuma M., Suttajit M., Suguri H., Ojika M., Yamada K., Fujiki K., 1989. *Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter, in mouse skin*. FEBS Lett. 250:615-8.
9. Cohen P., 1989. *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem. 58:453-508.
10. Suganuma M., Fujiki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K. and Sugimura T., 1988. *Okadaic acid: An additional non-phorbol-12- tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter*. Proceedings Nat Acad Sci USA USA 85, 1768-1771.
11. Nishiwaki H., Fujiki M., Suganuma H., Furuya-Suguri R., Matsushima Y., Iida M., Ojika K., Yamada D., Uemura, Yasumoto T., Schmitz F.J. and Sugimura T., 1990. *Structure activity relationship within a series of okadaic acid derivatives*. Carcinogenesis 11,1837-1841
12. Cohen P., Holmes C.F., Tsukitani Y., 1990. *Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation*. Trends Biochem Sci. Mar;15(3):98-102.
13. Mumby M.C. and Walter G., 1993. *Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth*. Physiol Rev. Oct;73(4):673-699.
14. Fujiki H., Sugunama K., Suguri H., Yoshizawa S., Tagai K., Uda N., Wakamatsu K., Yamada K., Murata M., Yasumoto T. and Sugimura T., 1990. *Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin*. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 79:1089-1093.
15. Sakai R., Ikeda I., Kitani H., Fujiki H., Takaku F., Rapp U., Sugimura T. and Nagao M., 1989. *Flat reversion by okadaic acid of raf and ret-II transformants*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 9945-9950.
16. Viviani R., 1992. *Eutrophication, marine biotoxins, human health*. Sci. Total Environ. Suppl.: 631-662.
17. Hall S., 1991. *Natural Toxins*. In: D.R. Ward and C. Hackney [eds.] Microbiology of marine food products, p. 301-330. Van Nostrand Reinhold, New York.
18. Rossini G.P., Pinna C. e Viviani R., 1997. *Inhibitors of phosphoprotein phosphatases 1-2A and cause activation of a 53 K DA protein kinase accompanying the apoptotic*

- response of breast cells.* FEBS letters 410:347-350.
19. Rossini G.P., Malaguti C. e Viviani R., 1998. *Different molecular events are triggered by okadaic acid in death response of HELA and MCF-7 cells.* Italian Biochemical Society Transactions (IBTS) vol. 11.
 20. Tripuraneni J., Koutsoris A., Pestic L., De Lanerolle P. and Hect G., 1997. *The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability.* Gastroenterology 112, 100-108
 21. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K. and Clardy J., 1984. *Diarrhetic shellfish poisoning.* ACS Symposium Series No. 262. In Ragelis, E.P. ed. Seafood Toxins, pp.207-214. American Chemical Society Symposium Series.
 22. Yasumoto T. and Murata M. 1990. *Polyether Toxins Involved in Seafood Poisoning.* Marine Toxins Chapter 8, pp 120–132
 23. Tachibana T., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Engen D.V., Clardy J., Gopichand Y. and Schmitz F.J., 1981. *Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria.* J. Am. Chem. Soc., 103, 2469–2471.
 24. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G. and Clardy T., 1985. *Diarrhetic shellfish toxins.* Tetrahedron 41. pp. 1019–1023.
 25. Aune, T., Larsen, S., Aasen, J.A.B., Rehmann, N., Satake, M., Hess, P. 2007. *Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice.* *Toxicon* 49, 1-7.
 26. Tubaro A., Sosa S., Carbonatto M., Altinier G., Vita F., Melato M., Satake M., and Yasumoto T., 2003. *Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice.* *Toxicon* 41, 783–792
 27. Terao K., Ito E., Yanagi T., Yasumoto T., 1986. *Histopathological studies on experimental marine-toxin poisoning. I: Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysin-1 and pectenotoxin-1.* *Toxicon* 24:1141-51.
 28. Hamano Y., Kinoshita Y. and Yasumoto T., 1986. *Enteropathogenicity of Diarrhetic Shellfish Toxins in Intestinal Models.* J. Food Hyg. Soc Jap. 27(4): 375-379.
 29. Ogino H., Kumagai M. and Yasumoto T., 1997. *Toxicologic Evaluation of Yessotoxin.* *Nat. Toxins* 5(6): 255-259.
 30. Matias W.G., Traore A., Creppy E.E., 1999. *Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome.* *Human and Experimental Toxicology* 18: 345-350.
 31. Ito E., Satake M., Ofuji K., Higashi M., Harigaya K., McMahon T. and Yasumoto T., 2002. *Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels.* *Toxicon* 40(2): 193-203.
 32. Terao K., Ito E., Ohkusu M., Yasumoto T., 1993. *A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats.* *Toxic Phytoplankton Blooms in the sea.* 581-586. New York, Elsevier.
 33. Suganuma M., Fujiki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Sugimura T., 1988. *Okadaic acid: a new non-12-O-tetradecanoyl phorbol acetate type tumor promoter.* *Proceedings Nat Acad Sci USA* 85: 1768-1773.
 34. Fujiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Takagi K., Uda N., Wakamatsu K., Yamada K., Murata M., Yasumoto T., Sugimura T., 1988. *Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1 is a potent promoter on mouse skin.* *Gann.* 79:1089-93.
 35. Fujiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Tacagi K., Sassa T., Uda N., Wakamatsu K., Yamada K., Yasumoto T., Kato Y., Fusetani N., Hashimoto K., Sugimura T., 1989. *A new tumor promoters from marine sources: The okadaic acid*

- class. In "Mycotoxins and Phycotoxins '88" (Natori S., Hashimoto K., Ueno Y. eds.), Elsevier, Amsterdam, pp 453-460.
36. Fessard V., Grosse Y., Pfohl-Leskowicz A. and Puiseux-Dao S., 1996. *Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes*. *Mutat. Res.* 36: 133-141.
 37. Matias W.G. and Creppy E.E., 1996. *Transplacental passage of okadaic acid*. *Hum Exp Toxicol* 15: 226-30.
 38. COT 2006 Statement on risk assessment of marine biotoxins of the okadaic acid, pectenotoxin, azaspiracid and yessotoxin groups in support of human health - COT 16 December.
 39. Le Hegarat L., Jacquin A.G., Bazin E., Fessard V., 2006. *Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human caco-2 cells and in mice gut cells*. *Environmental Toxicology* 21: 55-64.
 40. Ito E., 2006. *Verification of diarrhetic activities of PTX-2 and okadaic acid in vivo*. 12th International Conference on Harmful Algae.
 41. Ito E. and Terao K., 1994. *Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds*. *Natural Toxins* 2: 371-377.
 42. Yasumoto T., Fukui M., Sasaki K., Sugiyama K., 1995. *Determinations of marine toxins in foods*. *J. AOAC Int.* 78 (2), 574-582.
 43. Murata M., Shimatani M., Sugitani H., Oshima Y., Yasumoto T., 1982. *Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 48: 549-552.
 44. Cordier S., Monfort C., Miossec L., Richardson S., Belin C., 2000. *Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France*. *Environ Res (Section A)* 84:145-50.
 45. Underdal B., Yndestad M. and Aune T., 1985. *DSP intoxication in Norway and Sweden, autumn 1984 – spring 1985*. In *Toxic dinoflagellates*. pp. 489-494. Ed. by D. M. Anderson, A. W. White, and D. G. Baden. Elsevier, New York
 46. Krogh P., Edler L., Granelli E., Nyman U., 1985. *Outbreak of diarrhetic shellfish poisoning on the west coast of Sweden*. Anderson, D. M., White, A. W., and Baden, D. G. *Toxic Dinoflagellates*, 501-504. Amsterdam, Elsevier.
 47. PHLS 1997. *An outbreak of diarrhetic shellfish poisoning*. *Commun Dis Rep Wkly* 7:1-1.
 48. Vale P. and Sampayo M.A., 1999. *Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings*. *Toxicon* 37: 1109-21.
 49. Vale P. and Sampayo M.A., 2002. *First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (Solen marginatus) and green crabs (Carcinus maenas) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton*. *Toxicon* 40: 989-96.
 50. Castberg T., Torgersen T., Aasen J., Aune T. and Naustvoll L.J., 2004. *DSP toxins in Cancer pagurus, Linnaeus 1758, in Norwegian waters (Brachyura, Cancridae)*. *Sarsia* 89, Number 5 (October), pp. 311-317
 51. Torgersen T., Aasen J., Aune T., 2005. *Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (Cancer pagurus) in Norway*. *Toxicon* 46: 572-578.
 52. Aune T., Torgersen T., Aasen J., Castberg T., Naustvoll L.J. and Woll A., 2006. *Risk assessment of DSP toxins in brown crabs (Cancer pagurus)*. In: *Molluscan Shellfish Safety. Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway, Ireland, June 14th-18th, 2004* (Eds.: K. Henshilwood, B. Deegan, T. McMahon, C. Cusack, S. Keaveney, J. Silke, M. O' Cinneide, D. Lyons and P. Hess),

- pp. 464-468.
53. Aune T., 2001 *Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood*. De Koe, W. J., Samson, R. A., Van Egmond, H. P., Gilbert, J., and Sabino, M. Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (May 2000, Guarujá, Brazil). [16], 515-525.
 54. Aune T., 2006. *Personal Communication*.
 55. Boni L., Mancini L., Milandri A., Poletti R., Pompei M., Viviani R., 1992. *First cases of DSP in the Northern Adriatic Sea*. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). Marine coastal eutrophication. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. Sci Total Environ 1992(suppl.):419-26.
 56. Fattorusso E., Ciminiello P., Costantino V., Magno S., Mangoni A., Milandri A., Poletti R., Pompei M., Viviani R., 1992. *Okadaic acid in mussels of Adriatic sea*. Marine pollution Bulletin, Vol. 24, N. 5, 234-237. Pergamon Press.
 57. Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Poletti R., 1996. *First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (Dinophysis fortii) related to seafood poisoning in Europe*. Toxicon 34:923- 35.
 58. Lee J.S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., Yasumoto T., 1989. *Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species*. J Appl Phycol 1:147-52.
 59. Poletti R., Cettul K., Bovo F., Milandri A., Pompei M. and Frate R., 1997. *Distribution of toxic dinoflagellates and their impact on shellfish along the Northwest Adriatic coast*. In: Harmful Algae- VIII International Conference on Harmful Algae, Vigo 88-90.
 60. De Trautenberg C.R., 1993. *Interactions between a dinoflagellate and its associated bacterial microflora: Role of bacteria in the toxicity of Prorocentrum lima*. Hhrenberg (Dodge). Published by Université de Nantes, Nantes (Francia), 244 pp.
 61. De Trautenberg C. R., Geraud M. L., Soyer-Gobillard M. O., Emdadi D., 1995. *The toxic dinoflagellate Prorocentrum lima and its associated bacteria*. I. An ultrastructural study. Eur. J. Protistol., 31, 318-326.
 62. Pan Y., Cembella A.D., Quilliam M.A., 1999. *Cell cycle and toxin production in the benthic Dinoflagellate Prorocentrum lima*. Marine Biology 134: 541- 549.
 63. Aune T. and Yndstad M., 1993. *Diarrhetic shellfish poisoning*. in: IR Falconer (Ed), Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. London: Academic Press 87-104.
 64. Hallegraef G.M., Anderson D.M. and Cembella A.D., 1995. *Manual on harmful marine microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
 65. Wright J.L.C., 1995. *Dealing with seafood toxins: present approaches and future options*. FoodResearch International 28(4): 347-358
 66. Van Egmond H.P., Aune T., Lassus P., Speijers G. and Waldoock M., 1993. *Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation*. J. Nat. Toxins 2: 41-83.
 67. Carmody E.P., James K.J. and Kelly S.S., 1996. *Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland*. Toxicon 34(3): 351-359.
 68. Hu T., Marr J., Defreitas A.S.W., Quilliam M.A., Walter J.A., Wright J.L.C. and Plesance S., 1992. *New diol esters (of okadaic acid) isolated from cultures of the dinoflagellates Prorocentrum lima and Prorocentrum concavum*. J. Nat. Prod. 55:1631-1637.
 69. Sedmak B. and Fanuko N., 1991. *Occurrence of Dinophysis spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic*. J. Appl. Phycol. 3: 289-294.
 70. Hallegraef G.M., 1992. *Harmful algal blooms in the Australian region*. Mar. Poll. Bull. 25(5-8): 186-190

71. Morton S.L. and Tindall D.R., 1995. *Morphological and biochemical variability of the toxic dinoflagellate Prorocentrum lima isolated from three locations at Heron Island, Australia.* J. Phycol. 31: 914-921.
72. McLachlan J.L. et al., 1994. *Effects of Nitrogen Concentration and Cold Temperature on DSP Toxin Concentrations in the Dinoflagellate Prorocentrum lima (Prorocentrales, Dinophyceae).* Nat. Toxins 2: 263-270.
73. Subba Rao D.V. and Pan Y., 1993. *Photosynthetic characteristics of Dinophysis norvegica Claparede & Lachmann, a red-tide dinoflagellate.* J Plank Res;15(8):965-76.
74. Marine biotoxins in shellfish 2008. Okadaic acid and analogues- Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065A) EFSA Journal (2008) 589 1-62.
75. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs.

Capitolo 9

Pectenotossine (PTXs)

Capitolo 9

Pectenotossine (PTXs)

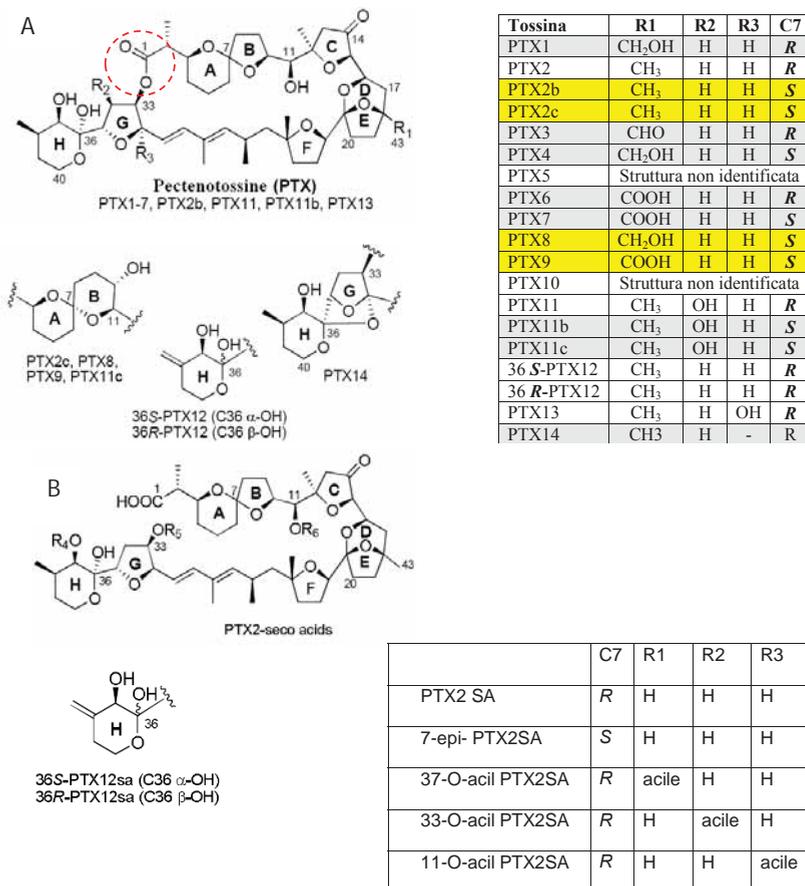
9.1 Struttura chimica

Le pectenotossine (PTXs) sono un gruppo di tossine comunemente associate alle DSP, isolate e caratterizzate per la prima volta nel 1984 dal gruppo del Prof. Yasumoto in bivalvi della specie *Patinopecten yessoensis* [1].

La struttura chimica è stata chiarita attraverso analisi di cristallografia ai raggi X che ha evidenziato la presenza di un gruppo di polieteri e di una funzione lattonica [2]. Ad oggi sono state identificate oltre 20 pectenotossine che si differenziano in due strutture di base (Fig.1): quelle con il macrolattone ciclico chiuso (A) e quelle con macrolattone aperto (B) che mette in evidenza un gruppo carbossilico ed uno alcolico.

Fig. 1. Strutture di pectenotossine: prodotti di biosintesi (caselle bianche); prodotti del metabolismo (caselle gialle); proprietà chimico-fisiche delle pectenotossine sono riportate nella tabella seguente:

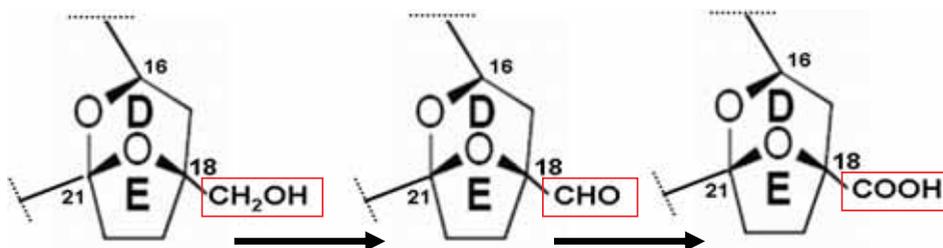
Tab. 1. Proprietà chimico-fisiche di alcune pectenotossine [5].



Tossina	Formula molecolare	Peso molecolare	UV λ_{max} (nm)	Rif. Bibl.
PTX1	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₅	874	235	[1,3]
PTX2	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	858	235	[1,3]
PTX3	C ₄₇ H ₆₈ O ₁₅	872	235	[1,2,3]
PTX4	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₅	874	235	[1,3,8]
PTX5	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₅	876	235	[3]
PTX6	C ₄₇ H ₆₈ O ₁₆	888	235	[3,9]
PTX7	C ₄₇ H ₆₈ O ₁₆	888	237	[8]
PTX8	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₅	874	237	[8]
PTX9	C ₄₇ H ₆₈ O ₁₆	888	239	[8]
PTX10	non identificata			[8]
PTX2SA	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₅	876	235	[4,10]
7-epi-PTX2SA	C ₄₇ H ₆₈ O ₁₆	876	235	[4,10]

Le caratteristiche più importanti che differenziano le PTXs sono riconducibili allo stato di ossidazione che avviene in C43 (Fig.2) e alle diverse configurazioni in C7 [11].

Fig. 2. Stati di ossidazione del gruppo metile



Le PTXs sono molecole molto instabili e questo rende difficile caratterizzare il loro profilo tossico allo stato naturale. L'estrazione chimica può modificarle ed è dimostrato che in acetone acquoso, utilizzato per l'estrazione delle tossine dai molluschi bivalvi, PTX7 si trasforma gradualmente in PTX6. Questo processo è accelerato in ambiente acido per aggiunta di acido trifluoroacetico (0,1% v/v) con la formazione anche di un altro isomero, PTX9. Le variazioni strutturali delle PTXs sono determinate dalla natura del sostituente in C18 [8]. Il riscaldamento delle pectenotossine, così come avviene alla temperatura di una normale cottura dei molluschi bivalvi, causa epimerizzazione a PTX2SA. Questo avviene anche durante la conservazione a secco in contenitori di vetro [12]. I risultati di alcune ricerche hanno indicato che PTX6 e PTX7 sono isomeri strutturali, così come lo sono PTX1 e PTX4; entrambi i set hanno in comune una medesima struttura ma con differenti sostituti in posizione C18. Questo induce ad affermare che PTX4 e PTX7 sono stereoisomeri rispettivamente di PTX1 e PTX6 [8].

9.2 Meccanismo d'azione

Il meccanismo d'azione delle pectenotossine non è ancora completamente chiaro e tuttavia alcune PTXs hanno dimostrato *in vitro* (utilizzando linee di cellule cancerogene) una tossicità ed effetti importanti sul citoscheletro che coinvolgono microtubuli ed actina [13,14]. Sulla base di questa evidente tossicità sono stati condotti ulteriori studi, sempre su linee cellulari cancerogene, per investigare in maniera più approfondita gli effetti delle PTXs [15,16].

Le prime ricerche sulla tossicità delle PTXs con evidenti effetti istopatologici in alcuni tessuti cellulari di topo risalgono al 1986 [17]. PTX1 iniettata per via intraperitoneo al topo provocava negli epatociti intorno alle regioni periportal dei lobuli epatici numerosi vacuoli non contenenti lipidi. Da un esame approfondito in microscopia elettronica di questi epatociti, si ipotizzava che la presenza dei vacuoli potesse essere originata per invaginazione della membrana plasmatica. Altri effetti della PTX1, estatta dai mitili, sono stati studiati *in vitro* in epatociti di topo, utilizzando la microscopia a fluorescenza [14]. Queste ricerche hanno evidenziato una diminuzione e una perdita dell'arrangiamento radiale dei microtuboli citoplasmatici con la rottura delle fibre e accumulo di G-actina alla periferia cellulare. Il danno nelle cellule epatiche causate da PTX1 era reversibile se le cellule erano trattate per non più di 4 settimane con concentrazioni inferiori a 0,5 µg/mL. Dopo 24 ore dalla rimozione di PTX1 gli epatociti ritornavano normali e la distribuzione dei microfilamenti di actina e dei microtuboli ritornava identica a quella delle cellule non trattate.

PTX2, similmente a quanto avviene per PTX1, agisce specificatamente sull'actina e quindi sulla organizzazione strutturale della cellula [14,18]. Gli studi eseguiti in tal senso hanno messo in evidenza che PTX2 porta alla formazione di un complesso 1:4 con G-actina provocando la depolarizzazione dei filamenti di actina [19]. Alla concentrazione di 0,05 µg/mL PTX2 è tossica *in vitro* in cellule KB. Invece, le stesse cellule trattate con PTX2SA e 7-epi-PTX2SA non hanno evidenziato effetti citotossici [4]. La citotossicità delle PTXs è stata attribuita alla integrità del macrolattone ciclico presente nella molecola [20]. In un recente studio è stato dimostrato che anche PTX6 agisce in modo selettivo su F-actina nel citoscheletro di cellule di neuroblastoma provocando cambiamenti nella polimerizzazione dell'actina [21]. Sarebbe interessante verificare se il meccanismo della rottura dei filamenti di actina da parte di PTX1 e PTX2 è lo stesso o diverso da quello della falloidina da *Amanita phalloides* [22]. Questi dati inducono a pensare che le PTXs potrebbero essere utilizzate come strumenti per analizzare le proprietà complesse del citoscheletro che caratterizza la forma, l'organizzazione e i movimenti all'interno del citoplasma nelle cellule eucariote. La capacità della PTX2 di interferire sulla dinamica dell'actina nella formazione del citoscheletro è stata oggetto, recentemente, di ricerche di un eventuale suo ruolo come agente antitumorale [23].

Il fatto che le PTXs accumulino actina alla periferia cellulare può contribuire a comprendere meglio non soltanto i complessi meccanismi che mantengono la normalità del citoscheletro, "motore molecolare" della cellula, ma anche l'attività muscolare e i movimenti nella cellula non muscolare.

9.3 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

9.3.1 Tossicità negli animali

Gli studi sulla tossicità negli animali hanno preso in considerazione due diverse vie di somministrazione della tossina: quella intraperitoneale e quella orale.

9.3.1.1 Tossicità negli animali per via intraperitoneale (i.p.)

Studi sulla tossicità acuta delle PTXs in topi e ratti hanno evidenziato quadri patologici in alcuni organi che sono in relazione alla concentrazione della tossina impiegata, alla struttura della molecola (più o meno ossidata) e alla via di somministrazione. L'organo maggiormente colpito è il fegato, ma anche altri organi, seppure in misura inferiore, subiscono gli effetti tossici: intestino, reni, milza, ecc..

PTX1 iniettata per via i.p. a topi lattanti alla concentrazione di 1000 µg/kg p.c. produce, dopo 60 minuti, gravi danni al fegato nella zona periportale. Questa si presenta congestionata, la superficie dell'organo appare finemente granulosa e gli epatociti, visti al microscopio elettronico, mostrano numerosi vacuoli quale risultato dell'invaginazione della membrana cellulare. Lo stesso esperimento mostra che PTX1 alla concentrazione di 700 e 500 µg/kg p.c. produce al fegato, dopo 2 ore dal trattamento, gli stessi quadri patologici della concentrazione superiore, mentre la somministrazione di PTX1 alle concentrazioni di 200 e 150 µg/kg p.c., provoca pochi cambiamenti nel fegato e nessun cambiamento nei tessuti intestinali, rene e cuore [17].

PTX2 somministrata ai topi per via i.p. alla concentrazione di 250 µg/kg p.c. produce nel fegato un accumulo di liquidi (ascite), versamento pleurico ed evidenti cambiamenti istopatologici in milza e reni. Simili cambiamenti sono evidenziati anche con PTX6 alla concentrazione di 500 µg/kg p.c. [24,25,26].

Uno studio di tossicità acuta con PTX2 riporta una diminuzione del peso del fegato e un aumento significativo di alcuni enzimi plasmatici: alanina aminotrasferasi (ALT), aspartato aminotrasferasi (AST) e D-sorbitolo deidrogenasi, ma non di glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD) [27]. In altri studi la PTX2 non determina cambiamenti di peso in fegato, cuore, milza e polmoni [24], al contrario di quanto avviene per i reni [28]. PTX2SA o 7-epi-PTX2SA somministrate per via i.p. al topo alla concentrazione di 5000 µg/kg p.c. non determinano significativi cambiamenti nel fegato, diaframma, intestino, reni, ghiandola adrenale, trachea, polmoni, cuore, milza, pancreas, timo, cervello, ovaie, apparato urinario [29].

Contrariamente ad altre tossine liposolubili (AO e DTXs) responsabili di DSP, nessun sintomo di diarrea si manifesta in topi trattati con PTX1 alla concentrazione di 1000 µg/kg p.c. o con PTX2, PTX2SA e 7-epi-PTX2SA alla concentrazione di 5000 µg/kg p.c. [17,28,29,30].

I sintomi di tossicità acuta che si manifestano dopo pochi minuti in topi trattati con PTX2 per via i.p. sono: la curvatura del dorso, uno stato di letargia, atassia, un'evidente respirazione addominale, difficoltà nella respirazione con decremento del ritmo respiratorio seguito da cianosi e diminuzione della temperatura corporea. La morte si manifesta dalle 4 alle 10 ore ed è correlata alla concentrazione della tossina somministrata [27,28].

La PTX2 è quella che mostra in topi la più elevata tossicità acuta, seguono PTX11 e PTX1, mentre le forme più ossidate (PTX7, 8, 9) e le PTXSA presentano una scarsa tossicità con valori di LD₅₀ o di MLD talvolta superiori a 5000 µg/kg p.e.. La PTX2 è generalmente indicata come il precursore di altre PTXs prodotte per biotrasformazione nella ghiandola digestiva dei molluschi bivalvi e questo induce a pensare che i bivalvi possono giocare un ruolo metabolico molto importante per ridurre la tossicità di PTX2 [8]. Nella seguente tabella sono riportati i dati di tossicità delle PTXs somministrate per via intraperitoneo al topo [31].

Tab. 2. Tossicità delle PTXs somministrate per via intraperitoneo al topo

Tossina	LD ₅₀ µg/kg p.c.	MLD µg/kg p.c.	Rif. Bibl.
PTX1		250	[3]
PTX2	219		[28]
PTX2	411		[27]
PTX2		192- 499	[3,9,27,28]
PTX3		350	[2]
PTX4		770	[9]
PTX6		500	[9]
PTX7-8-9		> 5000	[8]
PTX11	244		[30]
PTX11		250	[30]
PTX2SA		> 5000	[28,29]
7-epi-PTX2SA		> 5000	[29]

MDL = dose minima letale; LD₅₀ = dose letale in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione di cavie; p.c.= peso corporeo.

9.3.1.2 Tossicità negli animali per via orale (*per os*)

I dati di tossicità acuta delle PTXs per via orale (*per os*) in topi o ratti sono scarsi e talvolta contraddittori. In uno studio del 1997 è stato evidenziato che la tossicità acuta di PTX2 *per os* (sondino gastrico) è simile a quella per i.p., ma i dati sperimentali non mostravano linearità fra la concentrazione della tossina somministrata e la morte dei topi. Infatti, PTX2 somministrata *per os* a gruppi di 4/5 topi mostrava una mortalità degli stessi del 25% sia alla concentrazione di 25 µg/kg p.c. sia a quella di 400 µg/kg p.c.. Alle concentrazioni di 100, 200 e 300 µg/kg p.c. si osservavano mortalità di 0%, 20% e 40% rispettivamente [32].

In un successivo studio topi trattati *per os* con PTX2 alla concentrazione di 5000 µg/kg p.c. non presentavano nessun segno di tossicità ed il loro comportamento era del tutto normale [28]. Questi risultati erano simili a quelli ottenuti con PTX1 e PTX2 somministrate *per os* a topi CD1 alla concentrazione di 100 µg/kg p.c. [24,33]. Altri ricercatori hanno sostenuto che PTX2 *per os* provocava diarrea al topo [34], così come con una miscela di PTXs contenente il 35% di PTX2SA ed il 65% di 7-epi-PTX2SA [35]. Tuttavia, quest'ultimo risultato è stato in seguito rettificato dagli stessi Autori, in quanto ricerche più approfondite hanno dimostrato che il materiale somministrato conteneva altre tossine del tipo DSP e precisamente degli esteri dell'acido okadaico [36].

Questo dimostra, ancora una volta, che gli studi di tossicità condotti con estratti di materiale naturale, quindi non purificato, possono talvolta portare a conclusioni errate. PTX6 somministrata *per os* in topi (ICR maschi di 4/5 settimane, peso 16-21 g) alla concentrazione di 5000 µg/kg p.c. non procurava diarrea e danni agli organi, mentre i ratti (Wistar maschi di 3 settimane, peso 50-60 g) trattati con la stessa tossina sembravano più sensibili e mostravano evidenti sintomi di tossicità alla concentrazione di 2000 µg/kg p.c. [26]. Nello stesso studio PTX2 somministrata in una dose singola di 400 µg/kg p.c. provocava fluidi intestinali, leggeri cambiamenti nell'epitelio intestinale con presenza di vacuoli e superficie dei villi erosa. Non sono stati osservati effetti nell'intestino alla concentrazione di 300 µg PTX2/kg p.c. [37].

Nella seguente tabella sono riportati dati di tossicità acuta di alcune PTXs somministrate a topi con sondino gastrico (*per os*).

Tab. 3. Tossicità di alcune PTXs somministrate *per os* al topo.

Tossina	Via di somministrazione	Sesso	Tossicità acuta µg/kg p.c.	Parametro	Rif.Bibl.
PTX2	sondino gastrico	maschio	~ 200	LD ₅₀	[32]
PTX2	sondino gastrico	femmina	> 5000	MLD	[28]
PTX6	sondino gastrico		> 5000	MLD	[26]
PTX2SA	sondino gastrico	femmina	> 5000	MLD	[28]

MDL = dose minima letale; LD₅₀ = dose letale in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione di cavie; p.c.= peso del corpo

9.3.2 Tossicità nell'uomo

PTXs sono state associate con casi gravi di diarrea che hanno richiesto il ricovero ospedaliero. Un simile episodio di intossicazione è avvenuto nel dicembre del 1997 nella zona orientale dell'Australia causato dal consumo di un bivalve della specie *Donax delatoides*, con 56 persone ospedalizzate su un totale di 100 persone intossicate. I sintomi erano del tutto simili a quelli dell'acido okadaico con nausea, vomito e diarrea. L'analisi dei molluschi bivalvi responsabili dell'avvelenamento contenevano PTX2SA e bassi livelli di PTX2 [12]. Un altro episodio è stato registrato nel marzo del 2000 a nord dell'isola di Stradbroke (Australia) sempre per il consumo di *Donax delatoides*. I molluschi analizzati, anche in questo caso, contenevano alte concentrazioni di PTX2SA, e tuttavia campioni di fitoplancton raccolti nello stesso periodo e nella stessa area mostravano un profilo tossicologico diverso. Questo faceva nascere l'ipotesi che la PTX2SA responsabile dei disturbi gastrointestinali potesse essere convertita in PTX2 nella fase fortemente acida del preassorbimento o in quella alcalina del tratto digestivo. Un'altra ipotesi invece implicava la possibilità che la PTX2SA potesse essere trasformata metabolicamente in PTX2 dal fegato. Al momento non ci sono dati che evidenziano in maniera inequivocabile effetti tossici attribuibili alla PTX2SA; ricerche sono in corso per chiarire meglio questi aspetti [35]. Tuttavia, ulteriori analisi su campioni congelati che avevano provocato i sintomi soprariportati hanno messo in evidenza la presenza di DTX3 [36].

Recenti studi eseguiti da ricercatori giapponesi hanno dimostrato che PTX2 pura somministrata *per os* mediante sondino gastrico alla concentrazione di 2000 µg/kg p.c. causa diarrea al topo e i tessuti dello stomaco, polmoni e fegato mostrano evidenti cambiamenti istologici (Yasumoto, comunicazione personale).

9.4 Eziologia

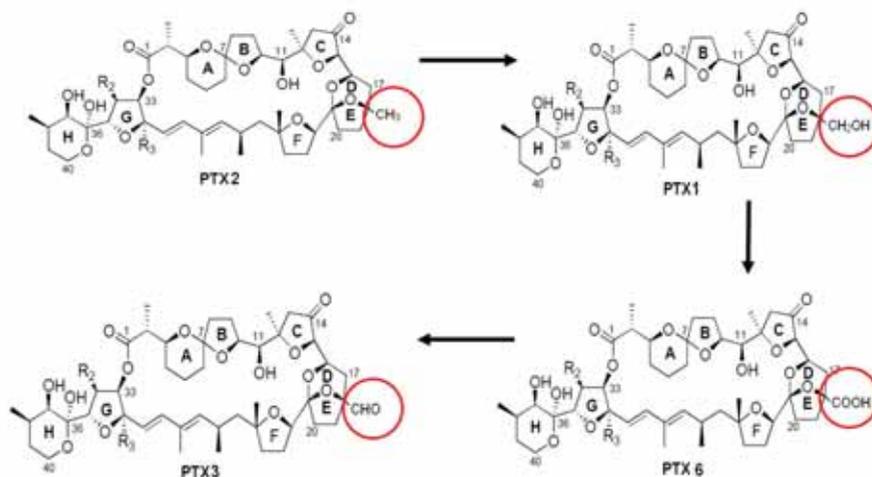
La PTX2 è il composto più comunemente ritrovato nel genere *Dinophysis* e si ritiene, congiuntamente a PTX11 e PTX12, il prodotto di sintesi microalgale [9]. In Europa PTX2 è stata trovata per la prima volta in *Dinophysis fortii* nel Nord Adriatico (Italia), a concentrazioni comunque sempre inferiori a quelle presenti nei mari del Giappone [3,38].

9.5 Prodotti della pesca e contaminazione da PTXs

I Molluschi Bivalvi, ovviamente, sono quelli maggiormente implicati nell'accumulo delle PTXs e le azioni che questi utilizzano per proteggersi dalle tossine sono di depotenziarle attraverso il metabolismo o una loro rapida eliminazione. Diversi studi

hanno evidenziato che le PTXs ingerite dai bivalvi sono metabolicamente trasformate attraverso due vie, rappresentate nella figura seguente (Fig.3). Una è quella che trasforma il gruppo metilico in C18 della PTX2, la tossina maggiormente presente in *Dinophysis* spp., in un alcool (PTX1), di seguito in un'aldeide (PTX3) ed infine ad un gruppo carbossilico (PTX6) [9,11].

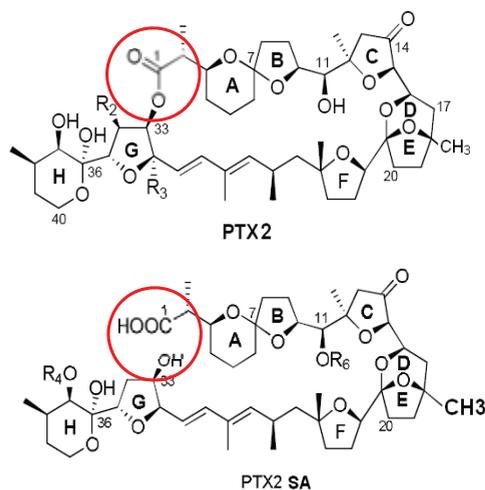
Fig. 3. Azione ossidativa operata dai bivalvi del gruppo metilico in gruppo carbossilico in C18.



L'azione ossidativa della PTX2 è stata individuata per ora in *Patinopecten yessoensis*, un pettinide giapponese di grande interesse commerciale [9,11].

In altri bivalvi neozelandesi *Pecten novaezelandiae* o in mitili della Norvegia (*M. galloprovincialis* o *M. edulis*) è stato dimostrato un processo di detossificazione della PTX2 che passa attraverso l'azione di idrolisi enzimatica della funzione lattonica per arrivare alla PTX2SA (Fig. 4) [39,40,44].

Fig. 4. Azione di detossificazione della PTX2 in PTX2SA.



In vitro, l'idrolisi può essere molto rapida, con un tempo di dimezzamento della PTX2 di appena 7 minuti [28]. L'esame dei profili metabolici dei bivalvi contaminati con PTX2 suggerisce che questa è la principale via metabolica in tutte le specie di bivalvi testati ad eccezione di *Patinopecten yessoensis*. La epi-7-PTX2SA (Fig.5) trovata frequentemente nei bivalvi contaminati da PTXs, potrebbe formarsi da processi di isomerizzazione enzimatica della PTX2SA [41].

Tossicità umana per via orale	In Australia alcuni casi di intossicazione umana (disturbi gastrointestinali) sono stati inizialmente attribuiti a PTXs poi, in un secondo tempo, agli esteri dell'acido okadaico (DTX3).
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Sulla base del LOAEL di 250 µg/kg di p.c., è stato applicato un FI di 3 per ottenere un NOAEL di 80 µg/kg di p.c.. A questo NOAEL è stato applicato un ulteriore FI di 100 per determinare un ARfD di 0,8 µg PTX2 eq./kg p.c. (48 µg/persona).

Di seguito (Tab.5) sono riportati i valori dei Limiti Guida:

Tab. 5. Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Parte edibile ingerita in grammi	Limite Guida * µg/kg p.e.	Limite µg/kg p.e. Reg. (CE) 853/2004
100	480	160
250	192	
400	120	

* Calcolo dei Limiti Guida elaborati da Poletti, R., in base alle indicazioni EFSA/CONTAM [48]

Nel 2005 i partecipanti al 1° *Working Group on Toxicology* (DG-SANCO), svoltosi a Cesenatico il 24-25 ottobre, riuniti a discutere i dati tossicologici, i metodi analitici, lo stato giuridico e i limiti normativi delle tossine lipofile, per quanto riguarda l'analisi del rischio delle PTXs avevano concluso quanto schematizzato nelle Tab.6-7 [49].

Tab. 6. Dose Acuta di Riferimento per pectenotossine

Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Sulla base del NOAEL di 300 µg/kg di p.c., è stato applicato un FI di 100 per ottenere un ARfD di 3 µg PTX eq./kg p.c. (180 µg/persona).
---	--

Tab. 7. Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta		
Parte edibile ingerita in grammi	Limite Guida * µg/kg p.e.	Limite µg/kg p.e. (Reg. CE n° 853/2004)
100	1800	160
250	720	
400	474	

*Calcolo dei limiti elaborati da Poletti, R., in base alle indicazioni degli esperti del 1° *Working Group on Toxicology* DG-SANCO (Cesenatico, 24-25 ottobre 2005).

La differente valutazione dei limiti guida sopra riportata, dovuta ad una diversa stima del NOAEL, dimostra come non sia sempre facile valutare i dati di tossicità ricavati da una sperimentazione animale o da una intossicazione umana. Le tecniche utilizzate per la quantificazione della tossina, test biologici o analisi chimiche, giocano un ruolo molto importante nell'analisi della valutazione del rischio. L'analisi chimica ci consente di specificare e quantificare la presenza delle tossine in un prodotto ittico, e questo è fondamentale per formulare una valutazione del rischio più corretta.

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato i nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo delle pectenotossine non è stato indicato nessun limite [50].

9.7 Bibliografia

1. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K. and Clardy J., 1984. *Diarrhetic shellfish poisoning*. ACS Symposium Series No. 262. In Ragelis, E.P. ed. *Seafood Toxins*, pp. 207-214. American Chemical Society Symposium Series.
2. Murata M., Sano M., Iwashita T., Naoki H., Yasumoto T., 1986. *The structure of Pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins*. *Agric. Biol.Chem* 50, p. 2693.
3. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G.K. and Clardy J., 1985. *Diarrhetic Shellfish Toxins*. *Tetrahedron* 41 (6), 1019-1025.
4. Daiguji M., Satake M., James K.J., Bishop A., MacKenzie L., Naoki H. and Yasumoto T., 1998. *Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels*. *Chem. Lett.* 653-654.
5. Draisci R., Lucentini L. e Mascioni A., 2000. *Pectenotoxins and Yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and Analysis*. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. L.M. Botana. New York, Marcel Dekker: 289-324.
6. Wilkins A.L., Rehmann N., Torgersen T., Rundberget T., Keogh M., Petersen D., Hess P., Rise F. and Miles C.O., 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 (15), 5672-5678.
7. Torgersen T., Sandvik M., Lundve B. and Lindegarth S., 2008. *Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*)*. *Toxicon* Volume 52, issue 3, Pages 418-427
8. Sasaki K., Wright J.L.C., Yasumoto T., 1998. *Identification and characterization of Pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported Pectenotoxins*. *J. Org. Chem.* 63: 2475-2480.
9. Yasumoto T., Murata M., Lee J.S. and Torigoe K., 1989. *Polyether toxins produced by dinoflagellates*. In: *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier, Natori S, Hashimoto K and Ueno Y (ed), Amsterdam, pp. 375-382.
10. James K.J., Bishop A.G., Draisci R., Palleschi L., Marchiafava G., Ferretti E., Satake M., Yasumoto T., 1999. *Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin- 2 analogues from marine phytoplankton and shellfish*. *J Chromatogr. A.* 844:53-65.
11. Suzuki T., Mitsuya T., Matsubara H., and Yamasaki M., 1998. *Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops*. *J Chromatogr. A* 815, 155-160.
12. Eaglesham R.W., Brett S., David B. and Holling N., 2000. *Detection of pectenotoxi-2 and pectenotoxi-e seco acid in phytoplankton and shellfish from the Ballina region of New South Wales, Australia*. X International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins., Brasil.
13. Aune, T., Yasumoto T., Engeland E., 1991. *Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes*. *J.Toxicol. Environ. Health* 34: 1- 9.
14. Zhou Z.H., Komiyama M., Terao K. and Shimada Y., 1994. *Effects of Pectenotoxin-1 on Liver Cells In Vitro*. *Nat. Toxins* 2: 132-135.

15. Jung J.H., Sim C.J., Lee C.O., 1995. *Cytotoxic compounds from two-sponge association*. J. Nat. Prot. 58:1722-1726.
16. Chae H.D., Choi T.S., Kim B.M., Jung J.H., Bang Y.J., Shin D.Y., 2005. *Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors*. Oncogene 24:4813-4819.
17. Terao K., Ito E., Yanagi T. and Yasumoto T., 1986. *Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning: I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of scurkling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1*. Toxicon 24 (11-12), 1141-1151.
18. Spector I., Shochet N.R., Blasberger D. and Kashman Y., 1989. *Latrunculins Novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D*. Cell Motil. Cytoskeleton 13: 127-144.
19. Hori M., Matsuura Y., Yoshimoto R., Ozaki H., Yasumoto T. and Karaki H., 1999. *Actin depolymerisation by marine toxin, pectenotoxin-2*. Nippon Yakurigaku Zasshi, 114 Supplement 1, 225p-229p (in Japanese).
20. Ares I.R., Louzao M.C., Espiña B., Vieytes M.R., Miles C.O., Yasumoto T. and Botana L. M., 2007. *Lactone Ring of Pectenotoxins: a Key Factor for their Activity on Cytoskeletal Dynamics*. Cell Physiol Biochem 19:283-292.
21. 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. *Biochem Pharmacol* 2002; 7235:1-10.
22. Wieland T. 1986. *Peptides of poisonous Amanita mushrooms*. Springer-Verlag New York Inc., New York.
23. Gi-Young Kim, Wun-Jae Kim and, Yung Hyun Choi 2011. *Pectenotoxin-2 from Marine Sponges: A Potential Anti-Cancer Agent - A Review* - *Mar. Drugs* 9, 2176-2187.
24. Munday J.S., Munday R. and Miles C.O., 2004. Unpublished observations University of Georgia School of Veterinary Medicine, Athens, Georgia, USA and AgResearch, Ruakura Research Centre, Hamiltons, New Zealand.
25. Munday J.S., 2008. *Toxicology of the pectenotoxins*. In: *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd edition. CRC Press (Taylor and Francis Group), Botana LM (ed), Boca Raton, Florida, pp. 371-380.
26. Ito E., Suzuki T., Oshima Y. and Yasumoto T., 2008. *Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat*. Toxicon 51 (4), 707-716.
27. Yoon M.Y. and Kim Y.C., 1997. *Acute toxicity of pectenotoxin 2 and its effects on hepatic metabolizing enzyme system in mice*. Korean J. Toxicol 13 (3), 183-186, in Korean. Cited in Munday, 2008 and in FAO/IOC/WHO, 2004b.
28. Miles C.O., Wilkins A.L., Munday R., Dines M.H., Hawkes A.D., Briggs L.R., Sandvik M., Jensen, D.J. Cooney, J.M., Holland P.T., Quilliam M.A., MacKenzie A.L., Beuzenberg V. and Towers N.R., 2004. *Isolation of pectenotoxin-2 from Dinophysis acuta and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities*. Toxicon 43 (1), 1-9.
29. Miles C.O., Wilkins A.L., Munday J.S., Munday R., Hawkes A.D., Jensen D.J., Cooney J.M. and Beuzenberg V., 2006. *Production of 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and assessment of its acute toxicity to mice*. J. Agric. Food Chem. 54, 1530-1534.
30. Suzuki T., Walter J.A., LeBlanc P., MacKinnon S., Miles C.O., Wilkins A.L., Munday, R., Beuzenberg V., MacKenzie A.L., Jensen D.J., Cooney J.M. and Quilliam M.A., 2006.

- Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypeectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate Dinophysis acuta from New Zealand.* Chemical Research in Toxicology 19 (2), 310-319
31. Munday J.S., 2008. *Toxicology of the pectenotoxins*. In: *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd edition. CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Raton, Florida, pp. 371-380.
32. Ogino H., 1997. Ph.D. Thesis, Tohoku University, Japan,.
33. Hamano Y., Kinoshita Y. and Yasumoto T., 1986. *Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models - studies on diarrhetic shellfish toxins* .1. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 27 (4), 375-379.
34. Ishige M., Satoh N., Yasumoto T., 1988. *Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2)*. Hokkaido Institute of Health; Report, 38. p. 15-9.
35. Burgess V. and Shaw G., 2001. *Pectenotoxins – an issue for public health. A review of their comparative toxicology and metabolism*. Environment International 27: 275-283.
36. Burgess V.A., 2003. *Toxicology investigation with the Pectenotoxin-2 seco acids*. National Research Centre for Environmental Toxicology and the School of Public Health. Brisbane, Queensland, Australia, Griffith University, PhD thesis, February 2003.
37. Ito E., 2006. 12th International Conference on Harmful Algae, Abstract PO 08-01, page 198.
38. Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Poletti R., 1996. *First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (Dinophysis fortii) related to seafood poisoning in Europe*. Toxicon 1996;34:923- 35.
39. Suzuki T., Mitsuya T., Matsubara H. and Yamasaki M., 1998. *Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate Dinophysis fortii by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops*. J Chromatogr A 815, 155–160.
40. Suzuki T., MacKenzie L., Stirling D. and Adamson J., 2001. *Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop, Pecten novaezelandiae*. Fish Sci 67, 506–510.
41. Suzuki T., MacKenzie L., Stirling D. and Adamson J., 2001. *Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, Perna canaliculus*. Toxicon 39, 507–514.
42. Miles C.O., Wilkins A.L., Munday J.S., Munday R., Hawkes A.D., Jensen D.J., Cooney J.M. and Beuzenberg V., 2006. *Production of 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and assessment of its acute toxicity to mice*. J. Agric. Food Chem. 54, 1530-1534.
43. Suzuki T., Walter J.A., LeBlanc P., MacKinnon S., Miles C.O., Wilkins A.L., Munday, R., Beuzenberg V., MacKenzie A.L., Jensen D.J., Cooney J.M. and Quilliam M.A., 2006. *Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypeectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate Dinophysis acuta from New Zealand*. Chemical Research in Toxicology 19 (2), 310-319.
44. MacKenzie L., Holland P., McNabb P., Beuzenberg V., Selwood A. and Suzuki T., 2002. *Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (Perna canaliculus), revealed by LC-MS/MS analysis*. Toxicon 40, 1321–1330.

45. Miles C.O., Wilkins A.L., Samdal I.A., Sandvik M., Petersen D., Quilliam M.A., Naustvoll L.J., Rundberget T., Torgersen T., Hovgaard P., Jensen D.J. and Cooney J.M., 2004. *A novel pectenotoxin, PTX-12, in Dinophysis spp. And shellfish from Norway*. Chem Res Toxicol 17, 1423–1433.
46. Suzuki T., Igarashi T., Ichimi K., Watai M., Suzuki M., Ogiso E. and Yasumoto T., 2005. *Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops Patinopecten yessoensis*. Fish Sci 71, 948–955.
47. McNabb P. and Holland P.T., 2002. *Using liquid chromatography mass spectrometry to manage shellfish harvesting and protect public health*. In Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostella, Spain, June 4–8, 2002, ed. Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., and Beiras, R. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, 179–186.
48. Marine biotoxins in shellfish 2009. Pectenotoxin group - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065C) *EFSA Journal* 1109, 1-47.
49. Community Reference Laboratory on marine Biotoxins 2005. Working Group on Toxicology (1st meeting) - 24-25 October 2005, Cesenatico (Italy).
50. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs.

Capitolo 10

Yessotossine (YTXs)

Capitolo 10

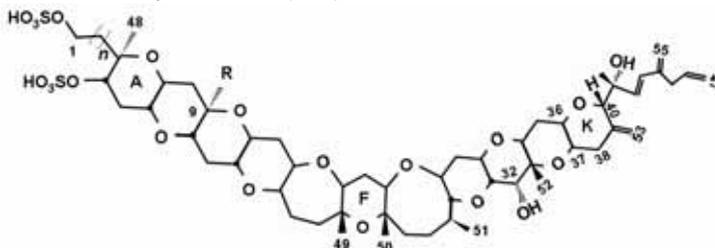
Yessotossine (YTXs)

La yessotossina è stata isolata per la prima volta in Giappone dalla ghiandola digestiva del pettine *Patinopecten yessoensis* [1]. In seguito altri analoghi della yessotossina sono stati isolati da molluschi bivalvi in tutto il mondo. La sua struttura chimica assomiglia a quella della brevetossina (BTX = PbTX da *Ptychodiscus brevis*) e della ciguatossina (CTX), responsabili rispettivamente delle sindromi Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) e Ciguatera Fish Poisoning (CFP). Questa somiglianza strutturale ha, in un primo tempo, richiamato l'attenzione dei ricercatori sulla possibilità che la yessotossina potesse agire a livello dei canali dello ione Na⁺, facilitando l'entrata dello ione alla stessa stregua della brevetossina e della ciguatossina. Non è stato possibile mettere in evidenza questo effetto per la yessotossina [2], ma sono state dimostrate altre proprietà tossicologiche. Le YTXs hanno una struttura chimicamente più stabile, in questo differiscono sia dalle brevetossine (PbTXs), contenenti un ring lattone, sia dalle ciguatossine (CTXs), che hanno un ring spiroacetale. Inoltre, le yessotossine sono diverse dalle due tossine lipofile sopra citate perché contengono nella molecola più di un gruppo solfato, che ne caratterizza l'assorbimento ed il bersaglio tossicologico.

10.1 Struttura chimica

La YTX ed alcuni suoi analoghi (45-idrossiYTX e 45-46-47-trinorYTX) sono state per la prima volta isolate nella ghiandola digestiva di *Patinopecten yessoensis*. La struttura della YTX è stata determinata mediante spettrometria di massa (MS) e spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR), e confermata con altri metodi complementari FAB-MS (*fast atom bombardment* - MS) che hanno condotto alla seguente formula chimica: C₅₅H₈₂O₂₁S₂Na₂ [1,3,4]. La YTX è un polietere a forma di scala, costituito da 11 anelli eteri *trans*-fusi, una catena terminale a 9 atomi di carbonio e due gruppi alcolici solfati (Fig.1). La struttura di base è liposolubile, ma i due gruppi solfato conferiscono alla molecola un carattere anfotero [5]. La presenza dei gruppi solfato rende queste molecole le più polari fra le tossine lipofile e forse per questo motivo una quantità importante di YTXs viene ritrovata nel mezzo di coltura delle microalghe che le producono [6,7,8].

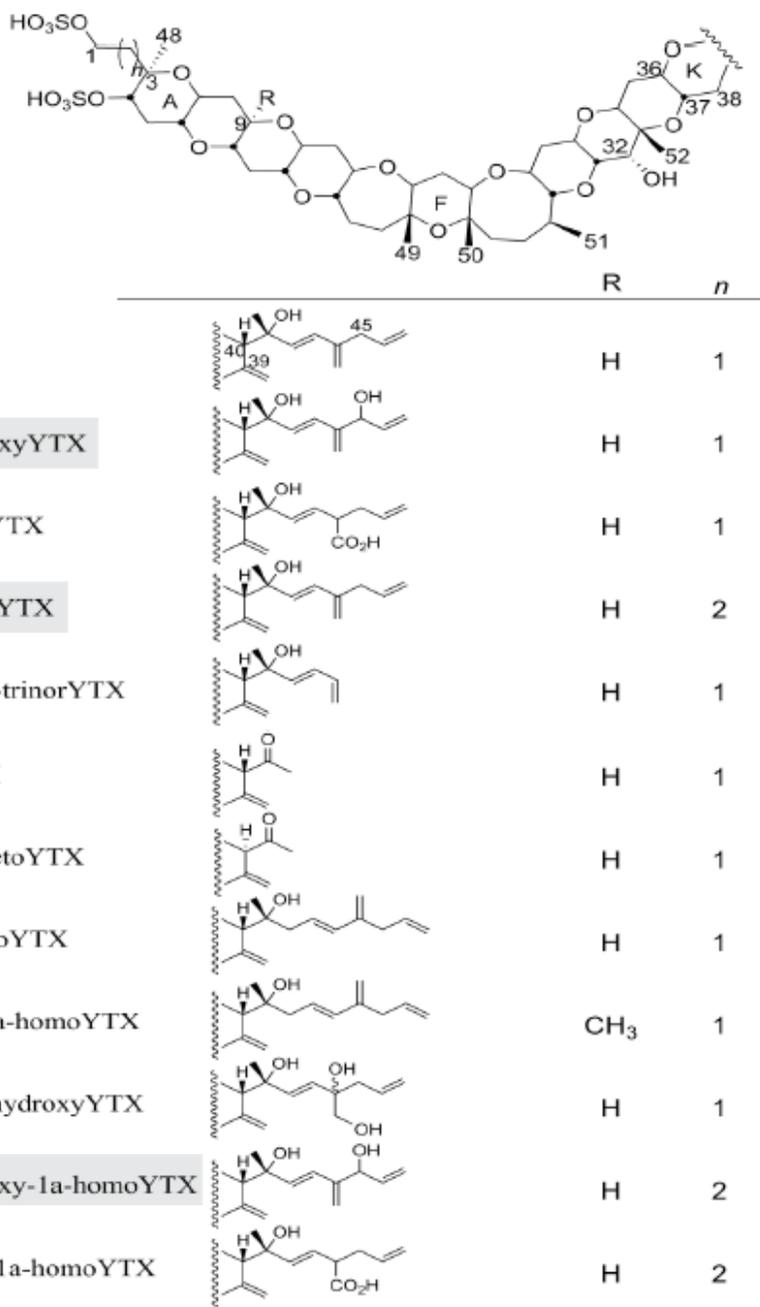
Fig. 1. Struttura chimica della yessotossina (YTX).



Per le YTXs sono stati ipotizzati più di 90 analoghi, per molti dei quali in questi ultimi anni è stata completamente individuata la struttura chimica, per altri invece questa non è stata ancora ben definita [9]. Attualmente sono 36 i derivati naturali della YTX individuati

e caratterizzati da NMR e/o cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS). Alcune YTXs sono direttamente prodotte da Dinoficcee, mentre altre dal metabolismo dei molluschi. Le loro strutture sono riassunte in Fig.2 [9,10,11].

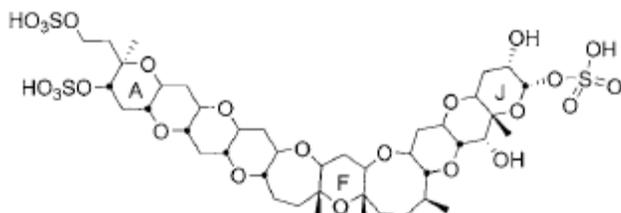
Fig. 2. Struttura chimica di alcune yessotossine. Contrassegnate, le YTXs di interesse igienico-sanitario.



n = numero di gruppi metilici nella molecola

Nel 1996 nel Mare Adriatico sono stati isolati dai mitili (*Mytilus galloprovincialis*) due analoghi della YTX: homoYTX e 45-idrossiYTX [12]. Un nuovo analogo della YTX (Fig.3), mancante dell'anello K e con un altro solfato, è stato isolato in mitili raccolti nel giugno del 1997 al largo della costa dell'Emilia-Romagna e denominato adriatossina (ATX) [13].

Fig. 3. Struttura chimica dell'adriatossina



Successivamente, in mitili raccolti nella stessa area di mare, è stato messo in evidenza un altro analogo della YTX, la carbossiYTX [13].

Alcune proprietà chimico-fisiche delle YTXs sono elencate nella seguente tabella.

Tab. 1. Proprietà chimiche di alcune yessotossine.

Tossina	Formula	Peso molecolare PM	UV λ_{max} (nm)	Rif.Bibl.
YTX	$C_{55}H_{82}O_{21}S_2$	1142	230	[1]
45-idrossiYTX	$C_{55}H_{80}O_{22}S_2$	1158	230	[4]
45,46,47-trinorYTX	$C_{52}H_{78}O_{21}S_2$	1102	226	[4]
1a-homoYTX	$C_{56}H_{84}O_{21}S_2$	1156	231	[12]
45-idrossi-1a homoYTX	$C_{56}H_{84}O_{22}S_2$	1172		[12]
adriatossina (ATX)	$C_{42}H_{56}O_{24}S_3$	1050		[13]
carbossi-1a-YTX	$C_{56}H_{84}O_{23}S_2$	1188		[10]
desulfoYTX	$C_{55}H_{82}O_{18}S$	1062		[15]

10.2 Meccanismo d'azione

Il meccanismo d'azione della yessotossina è stato oggetto di molti studi, ma non è stato ancora completamente chiarito. Le ricerche sono state indirizzate inizialmente alla verifica del potere diarrogeno della tossina in quanto inserita nel gruppo lipofilo delle DSP. Queste ricerche hanno dimostrato che la YTX non provoca diarrea [16] perché, diversamente dall'acido okadaico, non inibisce l'azione delle proteine fosfatasi PP1 e PP2A [17,18]. La struttura chimica della YTX ha inizialmente richiamato l'attenzione degli studiosi sulla possibilità che questa potesse interagire sui canali del Na^+ voltaggio-dipendenti, facilitando l'entrata degli ioni Na^+ , come avviene per brevetossina e ciguatossina, tuttavia non è stato possibile dimostrare quest'azione della YTX [2,19]. Altro motivo d'interesse dei ricercatori per la YTX è stato quello di trovare una spiegazione scientifica, attraverso il meccanismo d'azione, sulla notevole differenza tossica evidenziata dalla sua somministrazione per via orale (*per os*) rispetto a quella per iniezione intraperitoneale (*i.p.*).

Gli studi *in vitro* in cellule di linfociti umani hanno dimostrato che la YTX alla concentrazione di 10^{-6} M modula l'omeostasi citoplasmatica dello ione Ca^{2+} attraverso meccanismi che favoriscono l'entrata nella cellula del Ca^{2+} extracellulare attraverso i canali L-tipo, sensibili alla nifedipina e a SKF 96365 (antagonisti al flusso dello ione Ca^{2+} nel citoplasma), oppure d'inibizione di entrata dello ione Ca^{2+} o una sua rapida eliminazione [20,21].

Linfociti umani trattati con YTX (10^{-7} - 10^{-6} M) alla presenza di Ca^{2+} nel mezzo mostrano una forte attivazione delle fosfodiesterasi (PDE) con la conseguenza di una diminuzione di due importanti secondi messaggeri citoplasmatici quali: l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e la guanosina monofosfato ciclico (cGMP) [22,23]. Tuttavia in altre ricerche, cardiomiociti di ratto trattati con YTX non hanno evidenziato cambiamenti sui livelli di cAMP [24].

L'effetto della YTX sui canali del calcio è stato confermato anche da altri ricercatori [23,25,26]. L'aumento di Ca^{2+} intracellulare in neuroni del cervelletto di topo trattati con YTX (≥ 25 nM), procura la morte della maggior parte delle cellule neuronali trattate e tuttavia, l'aumento di Ca^{2+} non sembra rappresentare l'evento iniziale di questo effetto [23,24]. Altri studi hanno indicato che YTX produce apoptosi per induzione di diverse isoforme di caspasi in vari tipi di cellule come: neuroblastoma umano [27]; cellule tumorali umane HeLa [28] o cellule embrionali (mioblasti) di topo o di ratto [27,29,30]. Gli eventi apoptotici indotti da YTX sono stati associati a danni del citoscheletro attraverso la via mitocondriale [30] ed è stato dimostrato che la distruzione del citoscheletro è causata dalla scissione della tensina, una proteina che collega i microfilamenti alla membrana plasmatica [31]. Le vescicole lisosomiali e i microfilamenti del citoscheletro vengono indicati come i principali componenti cellulari coinvolti nella risposta apoptotica della YTX in fibroblasti di insetti e di topo [32]. Recenti studi *in vitro* hanno dimostrato che la YTX altera il sistema di degradazione delle proteine, provocando l'accumulo di un frammento di 100 KDa della proteina di adesione E-caderina (ECRA 100) nelle cellule epiteliali di carcinoma mammario (MCF-7) [33].

Quest'azione è indotta a basse concentrazioni di YTX (10^{-10} - 10^{-9} M) [34] e non agisce sulla rottura di E-caderina ma interferisce sui normali processi di endocitosi dei frammenti di proteine per una loro completa degradazione a seguito della fase proteolitica [35]. L'aumento dei frammenti di E-caderina (ECRA 100) indotti dall'attività della YTX nelle cellule trattate potrebbe rappresentare un metodo molto sensibile di quantificazione della tossina espressa come EC_{50} [36]. La citotossicità (EC_{50}) della YTX utilizzata come composto di riferimento è stata colcolata in 0,55 nM, mentre per homoyessotossina in 0,62 nM. Questo induce a ritenere che l'introduzione di un metile adiacente ad uno dei gruppi solfato non ne pregiudica il potenziale d'azione. Per 45-idrossihomoyessotossina e carbossiyessotossina le EC_{50} sono state calcolate rispettivamente in circa 9,4 e 26 nM, mentre per la noroxyessotossina, che manca della parte terminale della catena in C9, l' EC_{50} è stata valutata in 50 nM. Le differenze più significative sulla potenzialità tossica degli analoghi delle YTXs in cellule MCF-7 sembrano legate ai cambiamenti strutturali della YTX nella parte terminale della molecola in posizione C9. E' stato ipotizzato che gli effetti delle YTXs potrebbero essere la conseguenza della loro azione su due sistemi recettoriali separati [36].

La seguente tabella mostra una sintesi delle risposte molecolari indotte da YTX in colture cellulari [37].

Tab. 2. Risposte molecolari indotte da YTX in colture cellulari.

Cellule	YTX (M)	Effetti	Tempo di risposta	Rif.Bibl.
Linfociti (uomo), mastociti (ratto), neuroni	10 ⁻⁶	Attivazione fosfodiesterasi (PDE)	secondi/minuti	[22,38,39,40,41,42]
Linfociti (uomo)	10 ⁻⁶	Modulazione dello Ca ²⁺ intracellulare	secondi/minuti	[21]
Immunociti (mitilo)	10 ⁻⁷		minuti/ore	[26]
MH1C1 (ratto)	10 ⁻⁷		secondi/minuti	[43]
Neuroni primari (ratto)	10 ⁻⁸		minuti/ore	[23]
Linfociti (uomo)	10 ⁻⁶	Diminuzione di cAMP Ca ²⁺ dipendente	secondi/minuti	[22]
Linfociti (uomo), mastociti (ratto)	10 ⁻⁶	Diminuzione di cGMP Ca ²⁺ dipendente	secondi/minuti	[44]
MCF7 (uomo), MDCK (cane)	10 ⁻⁹	Alterazione eliminazione proteine	ore	[33,34,35]
IPLB-LdFB (insetto) e 3T3 (topo)	10 ⁻⁹		ore	[32]
Glioma (ratto)	10 ⁻⁶	Apoptosi e morte cellulare	giorni	[18]
HeLa S ₃ (uomo)	10 ⁻¹⁰		giorni	[28,45]
BE(2)-M17 (uomo)	10 ⁻⁸		giorni	[27]
Mioblasti (ratto e topo)	10 ⁻⁷		giorni	[29,30,31]
Neuroni primari (ratto)	10 ⁻⁸		giorni	[23]
IPLB-LdFB (insetto) e 3T3 (topo)	10 ⁻⁸		giorni	[32]
Cardiomiociti primari (ratto)	10 ⁻⁸		giorni	[24]
Immunociti (mitilo)	10 ⁻⁷		Cambiamento morfologico cellulare	minuti/ore

10.3 Tossicità

10.3.1 Tossicità negli animali

Gli studi sulla tossicità negli animali hanno preso in considerazione due diverse vie di somministrazione della tossina: quella intraperitoneale e quella orale.

10.3.1.1 Tossicità acuta per via intraperitoneale (i.p.)

YTX alla concentrazione di 300 µg/kg p.c. iniettata per i.p. a topi maschi (ICR di 23-25 g) non ha provocato comportamenti anomali nelle prime ore del trattamento, ma col passare del tempo gli animali sono diventati più nervosi, la respirazione si è fatta più difficoltosa (dispnea), hanno incominciato a saltellare e sono morti entro le 24 ore [17]. In un altro studio, topi (CD1 femmine) trattati per via intraperitoneale con YTX e homoYTX a varie concentrazioni (375-530-750 µg/kg p.c.) e osservati per 24 ore, hanno mostrato per YTX un LD₅₀ di 512 e di 444 e per homoYTX di 315-830 µg/kg p.c.. I topi trattati con la concentrazione più bassa morivano entro le 7 ore, mentre quelli trattati con la concentrazione più alta in circa 70 minuti. La sintomatologia del topo prima della morte si manifestava con una crescente agitazione seguita da dispnea e salti [46], molto similmente a quanto descritto da altri ricercatori [47] che hanno utilizzato topi femmina NMRI (peso di 15-19 g) trattati con concentrazioni crescenti di YTX (100 - 250 - 500 - 750 - 1.000 µg/kg p.c.). L'esame istologico mediante microscopia elettronica di alcuni organi dei topi iniettati con 500 µg di YTX/kg p.c. ha

messo in evidenza, dopo 3 ore dal trattamento, gravi danni al muscolo cardiaco: cellule endoteliali che rivestono i capillari nel ventricolo sinistro gonfie e degenerate; mitocondri arrotondati; fasci di miofibrille e reticolo sarcoplasmatico separati. Nessun'altra modifica strutturale è stata osservata nel fegato, pancreas, polmoni, ghiandole surrenali, reni, milza e timo [17].

In un altro studio, topi iniettati intraperitoneo con 1.000 µg di YTX/kg p.c. hanno mostrato danni del muscolo cardiaco nel ventricolo sinistro meno severi di quelli soprariportati e localizzati vicino ai capillari [47]. Questa discrepanza sulla gravità dei danni rilevati non è facilmente spiegabile; l'ipotesi più plausibile è quella basata sulla purezza della tossina iniettata o al diverso *strain* dei topi utilizzati. Questi danni sul muscolo cardiaco sono molto simili a quelli riferibili ad altre biotossine marine come le ciguatossine (CTXs), che agiscono sui canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti modificando la permeabilità della membrana cellulare [17].

La YTX desolfatata somministrata per via intraperitoneale al topo alla concentrazione di 300 µg/kg p.c. ha come organo bersaglio il fegato: dopo poche ore dalla sua somministrazione il topo mostra una steatosi epatica, una grave degenerazione dei grassi, una necrosi delle cellule epatiche e del pancreas. Nel fegato c'è evidenza di un aumento di 60 volte dei trigliceridi e di 2 volte dei fosfolipidi rispetto ai topi trattati con YTX. La grave steatosi epatica è stata collegata all'alterazione della struttura degli epatociti e all'aumento dei trigliceridi per la mancata possibilità di una β-ossidazione da parte dei mitocondri alterati. La YTX desolfatata ha determinato anche piccoli depositi di lipidi totali nel muscolo cardiaco [17]. Per alcuni ricercatori la desolfatazione della YTX potrebbe avvenire per opera di microrganismi intestinali durante la fase digestiva [18].

Studi condotti per verificare un'eventuale azione neurotossica della YTX, attraverso esami morfologici, biochimici ed immunocitochimici in alcuni tessuti di topi (CD1) trattati con una singola dose di YTX alla concentrazione di 10 e di 420 µg/kg p.c., hanno evidenziato danni alla corteccia cerebrale nelle cellule del Purkinje per la concentrazione più alta. Le alterazioni principali sono state osservate nel citoplasma e nel nucleo. I cambiamenti di alcune proteine legate al Ca²⁺ e le alterazioni del citoscheletro sono stati attribuiti all'azione neurotossica della YTX. Inoltre, gli esami istopatologici condotti in timo e duodeno hanno mostrato, per entrambe le dosi iniettate, modificazioni strutturali nelle cellule del timo. L'alterata funzione del timo è stata indicata da un aumento consistente del numero di cellule apoptotiche nella giunzione cortico-midollare e medulla, col risultato di una riduzione di timociti maturi [48,49].

Dati sulla tossicità delle YTXs per via intraperitoneale al topo sono sintetizzati nella

seguinte tabella [50].

Tab. 3. Tossicità di alcune YTXs somministrate via intraperitoneo al topo.

Composto	Topo (<i>strain</i>)	Sesso	Parametro	µg/kg p.c.	Rif.Bibl.
yessotossina	ddY	maschio	LD ₅₀	80-100	[18]
yessotossina	NMRI	femmina	LD ₅₀	500-750	[47]
yessotossina	NMRI	femmina	LD ₅₀	314	[51]
yessotossina	NMRI	maschio	LD ₅₀	412	[51]
yessotossina	ICR (CD-1)	femmina	LD ₅₀	380	[51]
yessotossina	ICR (CD-1)	maschio	LD ₅₀	462	[51]
yessotossina	Swiss (CFW-1)	femmina	LD ₅₀	269	[51]
yessotossina	Swiss (CFW-1)	maschio	LD ₅₀	328	[51]
yessotossina	CD-1	femmina	LD ₅₀	512 (312-618) *	[46]
yessotossina	ICR	maschio	LD ₅₀	300 **	[17]
yessotossina	Swiss albino	femmina	LD ₅₀	112 (96-131) *	[52]
yessotossina	C57 Black	femmina	LD ₅₀	136 (112-166) *	[52]
1a-homoYTX	CD-1	femmina	LD ₅₀	444 (315-830) *	[46]
1a-homoYTX	non riportato	non riportato	Dose letale	100	[12]
45-idrossiYTX	non riportato	non riportato	Dose letale	~ 500	[12]
45-idrossi-1a-homoYTX	CD-1	femmina	Dose letale	> 750	[46]
55-carbossiYTX	non riportato	non riportato	Dose letale	~ 500	[10]
55-carbossi-1a-homoYTX	non riportato	non riportato	Dose letale	~ 500	[53]
45,46,47-trinorYTX	non riportato	non riportato	Dose letale	~ 200	[54]
di-desulfoYTX	ICR	maschio	LD ₅₀	301	[17]
1-desulfoYTX	non riportato	non riportato	Dose letale	~ 500	[15]

LD₅₀ = Dose di tossina in grado di uccidere la metà degli animali testati.

* Limite di confidenza al 95%.

** LD₅₀ di topi osservati per 3 ore. (Poiché alcuni sono morti dopo le 3 ore, la LD₅₀ è probabilmente inferiore a quella indicata).

Come si evidenzia in tabella i valori di LD₅₀ per YTX sono notevolmente diversi, variando da circa 100 a 750 µg/kg p.c.. Ciò non è di facile interpretazione, anche in considerazione del fatto che i topi utilizzati appartengono, talvolta, a diversi *strain*. Per spiegare queste differenze è opportuno considerare la possibilità di una conservazione non adeguata della YTX prima della sperimentazione [51]. Recenti studi hanno infatti rilevato che YTX, allo stato secco, è instabile durante la conservazione a lungo termine (> 6 mesi) [55].

10.3.1.2 Tossicità acuta per via orale (*per os*)

In contrasto alla tossicità acuta delle YTXs somministrate ai topi per via intraperitoneale, quella per via orale è notevolmente più bassa.

La somministrazione *per os* di YTX con sondino gastrico (*gavage*) è stata oggetto in questi ultimi anni di diversi studi, soprattutto perché, in mancanza di dati epidemiologici umani, questa via di somministrazione nel topo è quella che più si avvicina a quella utilizzata dall'uomo. Inoltre, in considerazione del fatto che le YTXs si possono accumulare nei molluschi bivalvi a livello di milligrammi (oltre 10 mg/kg p.e.), è importante determinarne il potenziale tossico, seppure per via sperimentale in animali, per una corretta analisi del rischio della tossina.

In un primo studio, topi trattati con YTX somministrata con sondino gastrico alla

concentrazione di 0,5 mg/kg p.c. non morivano [17]. La stessa conclusione si otteneva con 1 mg YTX/kg p.c. [18], con 2 mg YTX /kg p.c. [46] e con 10 mg/kg p.c. [47]. Altri ricercatori hanno riferito che una singola dose di 50 mg YTX/kg p.c. non procurava nel topo sintomi tossici visibili [52].

In uno studio in due fasi, condotto con topi (NMRI di 15-19 g) trattati per *gavage* con singole dosi crescenti di YTX (1,0-2,5-5,0-7,5-10 mg/kg p.c.) e controllati nell'arco di 24 ore per verificare gli effetti della tossina, non si è registrata alcuna mortalità, neppure alla concentrazione più alta. Le analisi istopatologiche in 10 organi (polmoni, cuore, timo, fegato, pancreas, reni, ghiandole surrenali, digiuno, colon e milza) effettuate in microscopia ottica sacrificando 1 topo per ogni dose, dopo la quinta e la ventiquattresima ora, hanno mostrato per le 2 concentrazioni maggiori (7,5 e 10 mg/kg p.c.), e in un topo utilizzato come controllo, un lieve edema nel miocardio. Nella seconda fase dell'esperimento, in topi trattati con dosi crescenti di YTX (2,5-5,0-10 mg/kg p.c.) somministrate per *gavage* e sacrificati dopo 1 ora, per analizzare attraverso la microscopia ottica i tessuti di 7 organi (polmoni, cuore, fegato, reni, duodeno, milza e cervello) non è stato rilevato alcun effetto della tossina. Un esame più approfondito del tessuto del miocardio (parete ventricolare sinistra) tramite microscopia elettronica ha permesso di rilevare lievi modificazioni dei miociti cardiaci vicino ai capillari per i topi trattati con la concentrazione di 2,5 mg YTX/kg p.c.. Alle concentrazioni più alte (5 e 10 mg YTX/kg p.c.), i miociti cardiaci vicino ai capillari si mostravano ingrossati [47].

In altre ricerche sono stati esaminati gli effetti di YTX somministrata per *gavage* (*sondino gastrico*) alla concentrazione di 1 e 2 mg/kg p.c. in topi femmina (CD1, 18-20 g), tenuti in osservazione per 24 ore. Gli organi principali dei topi non hanno presentato alcun segno di tossicità o alterazioni macroscopiche. Gli esami istopatologici degli organi attraverso la microscopia ottica non hanno mostrato cambiamenti morfologici, mentre mediante l'analisi in microscopia elettronica del tessuto cardiaco sono state evidenziate alcune alterazioni dei cardiomiociti adiacenti ai capillari. In particolare sono state rilevate protrusioni citoplasmatiche di miociti cardiaci nello spazio capillare, arrotondamento dei mitocondri ed alterazioni delle fibre muscolari. Questi effetti sul muscolo cardiaco non hanno alterato nel plasma i valori della lattato deidrogenasi (LDH) o della creatinina fosfochinasi (CK), indicatori di danni del tessuto cardiaco. Gli stessi segnali clinici di tossicità sono stati osservati con 1a-homoYTX e 45-idrossiYTX somministrate per *gavage* alla concentrazione di 1mg/kg p.c. [46].

Allo scopo di verificare gli effetti tossici di dosi ripetute di YTX, topi femmina (CD1, 18-20 g) sono stati trattati per 7 giorni con una dose giornaliera di 2 mg YTX/kg p.c. somministrata per *gavage*. Dopo 24 ore dall'ultimo trattamento i topi sono stati sacrificati e sui principali organi (fegato, cuore, polmoni, reni, milza, stomaco, duodeno, digiuno, colon, retto, pancreas, timo, utero, ovaie, muscolo scheletrico, cervello e midollo spinale) è stata effettuata l'analisi istopatologica in microscopia ottica. Il tessuto cardiaco è stato studiato anche mediante microscopia elettronica. Nessuna differenza è stata evidenziata sul tasso di crescita fra i topi trattati e quelli utilizzati come controllo. Gli organi dei topi trattati, analizzati con microscopia ottica non hanno evidenziato cambiamenti. La microscopia elettronica utilizzata per il tessuto cardiaco ha rivelato, similmente a quanto visto per i topi trattati con tossina veicolata per iniezione intraperitoneo, alcune modificazioni dei miociti vicino ai capillari, con mitocondri ingrossati e alterazioni al citoscheletro. Gli effetti osservati nel cuore non sono stati dissimili, anche per intensità, da quelli osservati alla stessa concentrazione della tossina somministrata a dose singola [56].

In un altro studio la YTX è stata somministrata per *gavage* in topi maschi NMRI di 14

g a varie concentrazioni (1-2,5-5 mg/kg p.c.) per 7 volte durante 21 giorni. I topi trattati, esaminati 3 giorni dopo l'ultimo trattamento, non hanno presentato sintomi clinici né differenze di peso rispetto ai controlli. I loro organi (polmoni, cuore, fegato, reni, timo, intestino tenue, milza, pancreas, cervello, testicoli e ghiandole surrenali) esaminati in microscopia ottica non hanno evidenziato effetti patologici. Tuttavia, i miociti cardiaci dei topi trattati con 5 mg YTX/kg p.c., analizzati anche mediante microscopia elettronica, hanno presentato alcuni vacuoli non facilmente interpretabili [57].

In studi più recenti la YTX è stata somministrata per *gavage* alla concentrazione di 1mg/kg p.c. in 3 gruppi di topi (CD1 femmina di 18-20 g) per 7 giorni consecutivi. I 3 gruppi di topi trattati sono stati sacrificati rispettivamente dopo 24 ore e dopo 30 e 90 giorni dall'ultimo trattamento. Ai topi sono stati prelevati campioni di sangue e dei principali organi per le analisi istologiche. Gli esami istologici non hanno evidenziato, con la microscopia ottica, alcun cambiamento. Cuore, fegato, reni e cervelletto sono stati analizzati anche in microscopia elettronica: alterazioni ultrastrutturali sono state osservate soltanto nei miocardiociti e non negli altri organi. I cambiamenti nei miocardiociti sono stati rilevati in prossimità dei capillari (raggruppamenti di mitocondri arrotondati e disorganizzazione delle miofibrille) a 24 ore dall'ultimo trattamento con la tossina. Tali alterazioni sono state osservate in misura minore anche a 30 giorni dall'ultimo trattamento, mentre dopo 90 giorni non erano più evidenti. Questo indica il pieno recupero delle modificazioni ultrastrutturali [58]. Studi dei possibili effetti ultrastrutturali sul muscolo scheletrico della YTX, somministrata *per os* per 7 giorni in topi (CD1 femmina) alla concentrazione di 1 e 2 mg/kg di p.c., non hanno evidenziato alterazioni nelle cellule del muscolo [59].

Le discrepanze tossicologiche osservate nei topi trattati con somministrazione di YTXs per via intraperitoneale e per *gavage* potrebbero essere imputabili ai gruppi solfato presenti nella molecola, gruppi che ne riducono l'assorbimento nel tratto digestivo. Alcuni ricercatori hanno fatto notare che le YTXs possono essere desolfatate dai microrganismi della flora intestinale, determinando così un cammino metabolico differenziato, con le YTXs desolfatate indirizzate a creare cambiamenti nel fegato e nel pancreas. Il fatto poi che le YTXs desolfatate possono avere un *target* tossicologico totalmente diverso dimostra ancora una volta l'importanza di poter disporre di materiale di riferimento specifico per poter meglio delineare il profilo tossicologico.

Per quanto riguarda l'ittiotossicità della YTX, è stato evidenziato che l'esposizione di pesci per un periodo di 24 ore a concentrazioni di YTX pari a 0,5 ppm (420 nM) e 1 ppm (840 nM) non provoca alcuna mortalità [18], al contrario di quanto osservato per la brevetossina, la cui azione ittiotossica si manifesta a concentrazioni molto più basse (18 nM) [60]. Tuttavia la YTX desolfatata ha mostrato un'insignificante ittiotossicità, con 3 pesci morti dopo un'esposizione di 6 ore a 0,5 ppm (420 nM) di tossina [18].

10.3.2 Tossicità nell'uomo

Nell'uomo non sono mai stati segnalati casi di intossicazione attribuiti alle yessotossine nei prodotti della pesca.

10.4 Le YTXs nei prodotti della pesca

La YTX e la 45-idrossiYTX sono state isolate per la prima volta in *Patinopecten yessoensis* [61] e nella stessa specie di bivalvi è stato in seguito identificato anche l'analogo 45, 46, 47-trinorYTX [54]. Nella tabella seguente sono elencate le YTXs ritrovate in molluschi bivalvi.

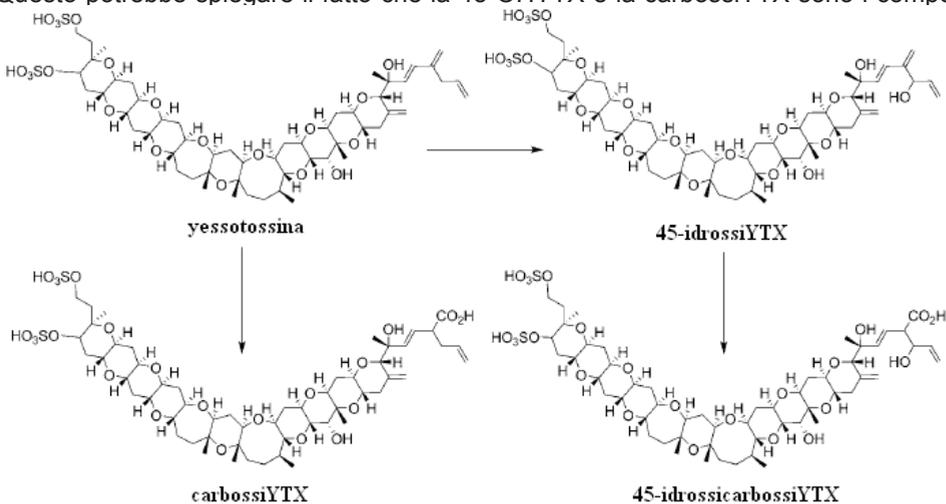
Tab. 4. Yessotossine ritrovate nei molluschi bivalvi.

Composto	Specie di molluschi	Rif.Bibl.
yessotossina	<i>Patinopecten yessoensis</i>	[61]
45-idrossiYTX	<i>Patinopecten yessoensis</i>	[61]
45, 46, 47- trinorYTX	<i>Patinopecten yessoensis</i>	[54]
homoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[12]
45-idrossihomoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[12]
adriatossina	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[13]
1 desulfoYTX	<i>Mytilus edulis</i>	[15]
carbossiYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[10]
carbossi-homoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[53]
noroxo-homoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[62]
noroxoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[63]
41a-homoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[64]
44,45-diidrossiYTX	<i>Perna canaliculus</i>	[65]
45-idrossicarbossiYTX	<i>Mytilus edulis</i>	[66]
1-desulfocarbossi-homoYTX 4-desulfocarbossi-homoYTX	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	[67]

Ricerche sugli effetti tossici delle YTXs sui molluschi bivalvi sono molto scarse e tuttavia il fatto che in specie diverse di bivalvi queste si trovino a concentrazioni molto dissimili potrebbe anche significare una minore o maggiore sensibilità alla tossina in base alla specie, oltre al fatto che l'accumulo è legato a fattori ambientali e fisiologici del bivalve stesso. A tale proposito indagini recenti hanno evidenziato che con molta probabilità i bivalvi sono capaci di ossidare YTX e homoYTX, trasformandole rispettivamente in 45-OHYTX e 45-OHhomoYTX [5]. Nuovi studi hanno indicato che in mitili (*Mytilus edulis*) norvegesi la YTX è rapidamente ossidata a 45-OH-YTX e più lentamente in carbossiYTX. Successivamente la 45-OHYTX è probabilmente metabolizzata a 45-OHcarbossiYTX (Fig.4) [66].

Fig. 4. Stadi di ossidazione della YTX operata da *Mytilus edulis*.

Questo potrebbe spiegare il fatto che la 45-OHYTX e la carbossiYTX sono i composti



maggiormente presenti nei bivalvi [68; 69]. Altri studi confermerebbero questa supposizione in quanto in Dinofitee produttrici di YTXs non sono state trovate 45-OHYTX e carbossiYTX. Tuttavia alcuni ricercatori hanno evidenziato che una piccola percentuale di 45-OHYTX, 45-OHhomoYTX, carbossiYTX e carboxyhomoYTX viene prodotta direttamente dalle microalghe [70]. Questo aspetto controverso non esclude che la maggior parte della 45-OHYTX, della carbossiYTX e le loro forme "homo" siano prodotti del metabolismo di YTX e homoYTX operato dai bivalvi [69].

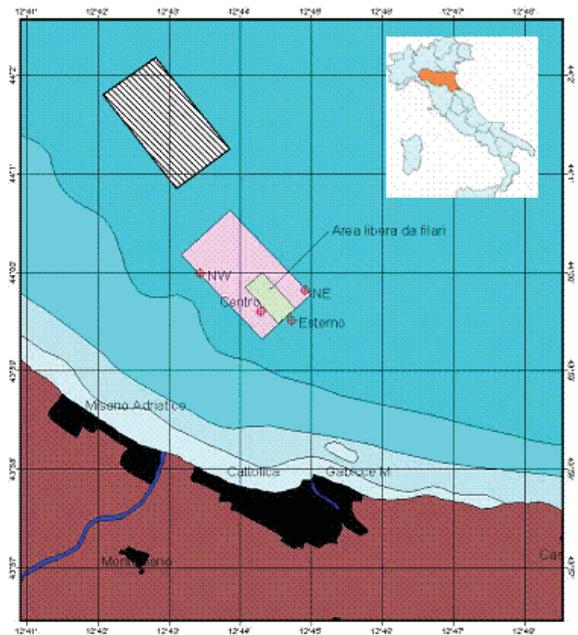
Studi sulla cinetica delle tossine DSP (acido okadaico, dinophysitossina 1, pectenotossina 6 e yessotossina) sono stati condotti su *Patinopecten yessoensis*, iniettando direttamente e singolarmente i 4 principi tossici sia nel muscolo adduttore che nell'epatopancreas e tenendo i bivalvi in osservazione per 72 ore. Le analisi chimiche (LC/MS) delle 4 tossine iniettate nei bivalvi hanno mostrato che quelle iniettate nel muscolo adduttore erano rapidamente trasportate all'epatopancreas e metabolizzate, indicando in tal modo la scarsa capacità del muscolo adduttore di mantenere e metabolizzare le tossine. Quelle iniettate nell'epatopancreas, invece, rimanevano nella ghiandola digestiva ed erano rapidamente metabolizzate. Lo stesso studio evidenziava che *Patinopecten yessoensis* non era insensibile a 8 µg di YTX iniettata nell'epatopancreas. Infatti, i bivalvi trattati, suddivisi in 2 lotti e mantenuti in vasca per 9 giorni, producevano un abbondante muco e alcuni di questi morivano (in un lotto la mortalità era di 6 esemplari su 10 e nell'altro di 7 esemplari su 10) [71].

La presenza di YTXs nel Mare Mediterraneo è stata dimostrata per la prima volta nel 1995, precisamente in mitili dell'Adriatico settentrionale, allevati lungo la costa dell'Emilia-Romagna [14]. La molluschicoltura della costa adriatica ed in particolare quella emiliano-romagnola ha subito in questi ultimi 15 anni, con la comparsa delle YTXs, danni economici di notevole entità. Mitili coltivati o cresciuti in banchi naturali possono accumulare le YTXs a concentrazione superiore ai 10 mg/kg p.e.. Nonostante il settore abbia un grande potenziale di sviluppo, perché la domanda di tali prodotti è in continuo e costante aumento, il divieto della loro raccolta, che si protrae mediamente per diversi mesi l'anno a causa della presenza di yessotossine a concentrazioni superiori al limite di legge (1 mg YTX eq./kg p.e.), mette fortemente a rischio la redditività dell'impresa e quindi la sua sopravvivenza.

Uno studio comparativo condotto dal Centro Ricerche Marine sulle caratteristiche di alcuni metodi disponibili per il dosaggio delle YTXs nei mitili aveva fra gli obiettivi anche quello di verificare, nell'ambito di un allevamento preso come punto di riferimento, la distribuzione spaziale e temporale delle YTXs nei molluschi allevati. Tale obiettivo traeva origine da una obiezione spesso avanzata dai molluschicoltori sulla significatività della misura della contaminazione del loro prodotto. In particolare, si obiettava che la rilevazione di tossine in campioni provenienti da una porzione dell'allevamento non fosse rappresentativa della contaminazione effettiva del prodotto dell'intero impianto. Le operazioni di campionamento dei mitili necessari alla preparazione del materiale oggetto dell'analisi erano svolte presso l'impianto di mitilicoltura, situato a circa 1,5 miglia nautiche al largo di Cattolica (Fig.5), dove è presente una profondità media di circa 10,5 metri.

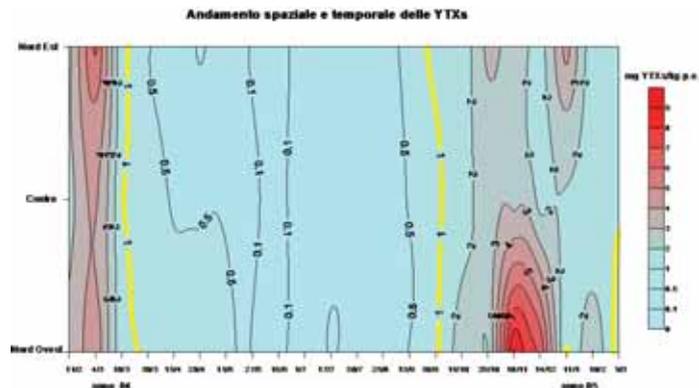
Nell'area in oggetto l'andamento della corrente, seguendo quella generale di bacino, decorre principalmente da NW verso SE, ed attraversa l'impianto lungo il suo asse maggiore, parallelo alla direzione dei filari.

Fig. 5. Rappresentazione cartografica dell'area di campionamento con evidenziati i 3 punti di prelievo denominati: NW, CENTRO e NE.



La sperimentazione protrattasi dal febbraio 2004 al marzo 2005 ha effettivamente evidenziato una variabilità temporale delle YTXs ma soprattutto una variabilità spaziale all'interno dello stesso impianto di molluschicoltura come visualizzato in Fig.6.

Fig. 6. Variabilità temporale e spaziale delle YTXs (mg/kg p.e.) in un allevamento di mitili al largo di Cattolica.



L'andamento temporale delle concentrazioni di yessotossine rilevate con l'analisi chimica in HPLC (Fig.6) è risultata simile nei 3 punti dell'allevamento: tali concentrazioni erano sempre inferiori al limite di legge allora vigente, durante i mesi primaverili ed estivi, mostrando invece valori nettamente superiori a tale limite, in inverno (6,46 mg YTX eq./kg di p.e., nel campione prelevato in NE il 04/03/04) e in autunno (9,62 mg YTX eq./kg di p.e., nel campione prelevato in NW il 18/11/04). A tal riguardo è opportuno evidenziare che ai tempi della ricerca, il valore massimo consentito per le yessotossine era pari a 1 mg YTX eq./kg di parte edibile (Reg. CE n° 853/2004) e che tale limite è stato innalzato a 3,75 mg YTX eq./kg, il 16 agosto 2013 con il Regolamento (UE) n° 786/2013 della Commissione, che modifica l'allegato III del Regolamento (CE) n° 853/2004 del

Parlamento europeo e del Consiglio.

L'andamento spazio-temporale delle concentrazioni di YTXs ha mostrato che le quantità più elevate venivano riscontrate nella stazione NW.

Nello stesso studio sono state eseguite in mitili prelevati nello stesso giorno (17 aprile 2005) analisi multiple, 5 per ogni punto, per verificare anche in questo caso la variabilità spaziale delle YTXs nei 3 punti (Tab.5).

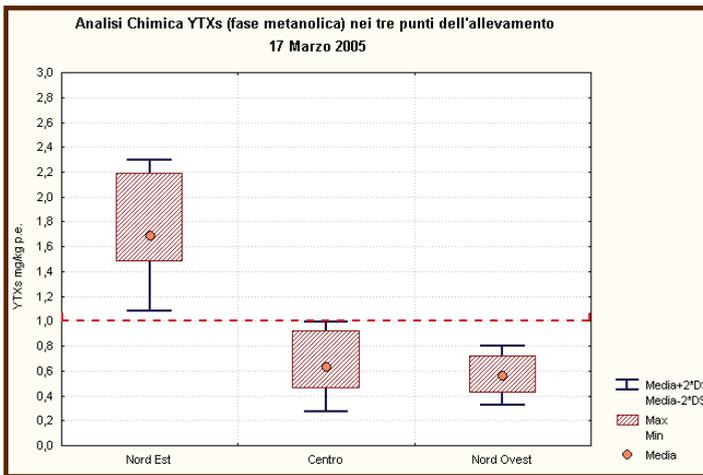
Tab. 5. Risultati dell'analisi chimica per la ricerca delle YTXs in estratti (Step 2) di mitili prelevati durante il CAMPIONAMENTO MULTIPLIO, in data 17 marzo 2005.

Data	Punto di prelievo	HPLC su Step 2		
		YTX mg/kg	45OH-YTX mg/kg	YTXs eq. mg/kg p.e.
17/03/05	N.E.	0,9	0,59	1,49
	N.E.	1,05	0,72	1,77
	N.E.	0,89	0,59	1,48
	N.E.	0,93	0,59	1,52
	N.E.	1,31	0,88	2,19
	Centro	0,44	0,21	0,65
	Centro	0,4	0,21	0,61
	Centro	0,33	0,19	0,52
	Centro	0,49	0,43	0,93
	Centro	0,26	0,20	0,46
	N.W.	0,37	0,22	0,60
	N.W.	0,30	0,17	0,46
	N.W.	0,27	0,16	0,42
	N.W.	0,34	0,26	0,60
	N.W.	0,38	0,34	0,72

E' stato così possibile evidenziare che le concentrazioni di YTXs misurate in ognuno dei 5 punti della stessa area presentavano uniformità, uniformità non riscontrabile invece dal confronto delle 3 diverse aree (NW, CENTRO, NE).

In particolare, il valore medio delle YTXs ottenuto per il punto NE (1,69 mg YTX eq./kg di p.e.) era nettamente superiore a quelli ottenuti per i punti CENTRO e NW (0,63 e 0,56 mg YTX eq./kg di p.e., rispettivamente), come rappresentato nel grafico di Fig.7.

Fig. 7. Variabilità delle concentrazioni di YTXs nei mitili raccolti durante il campionamento multiplo. Per ciascun punto dell'allevamento (NE, CENTRO e NW) è riportato il valore medio \pm DS dei risultati ottenuti.



- - - = 1 mg YTX eq./kg di parte edibile (tenore massimo di legge per yessotossina ed omologhi, vigente ai tempi della ricerca).

Dal 16 agosto 2013 tale limite è stato innalzato a 3,75 mg YTX eq./kg p.e. (Reg. (UE) n. 786/2013).

Tali differenze di tossicità, riscontrate in molluschi che crescono in reste posizionate in differenti punti di un medesimo allevamento, potrebbero essere imputabili ad una diversa disponibilità di popolazioni fitoplanctoniche e ad una loro diversa composizione (qualità e quantità) di specie microalgali tossiche, in relazione anche a quelle non tossiche) dovute allo spostamento delle stesse, in relazione all'andamento generale della corrente nel bacino (da Nord Ovest verso Sud Est).

Le YTXs non sono state trovate soltanto in bivalvi, ma anche in gasteropodi e crostacei.

10.5 Eziologia

La Dinoficea *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann, 1859) Butschli 1885, è stato il primo organismo unicellulare identificato come produttore di YTXs. Ciò è stato confermato da altri ricercatori in diverse parti del mondo: Giappone [72], Italia Mar Adriatico [70], Canada [73], Norvegia [69] e Spagna [6].

Un'altra Dinoficea identificata come produttrice di YTXs (YTX e homoYTX) è *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge 1989, specie presente nel Mare Adriatico per diversi mesi dell'anno [74] e segnalata anche in Galizia nel 2003 [75]. Basse concentrazioni di YTXs sono state individuate, in Inghilterra, in cisti di diversi ceppi di colture di *L. polyedrum* [73].

Altri organismi sono stati riportati come produttori di YTXs: *Coolia monotis* Meunier 1919 è stata individuata come produttrice di un analogo della YTX chiamato cooliatossina (struttura chimica e peso molecolare di una desulfoYTX confermano che di fatto la cooliatossina è un analogo della YTX) [15,76]; anche *Gonyaulax spinifera* è stata indicata come produttrice di YTX [77,78]. Tuttavia questo dato sembra molto controverso ed alcuni ricercatori sono arrivati ad ipotizzare che *G. spinifera*, avendo una morfologia molto simile a quella di *P. reticulatum*, non sia stata correttamente identificata [79]; altri ricercatori suggeriscono che i veri produttori di YTXs sono i batteri associati con le Dinoficee; tuttavia non sembrano per ora sussistere prove solide per affermare questa ipotesi.

10.6 Valutazione del Rischio associato a prodotti ittici contaminati da tossine YTXs

In Tab.6 è schematizzata la valutazione del rischio associato a prodotti ittici contaminati da tossine del tipo YTXs.

Tab. 6. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da YTXs.

Diffusione	YTXs sono state trovate in microalghe e molluschi bivalvi in: Australia, Canada, Giappone, Inghilterra, Italia, Spagna, Nuova Zelanda, Norvegia.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Non ci sono dati per quanto riguarda l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione. L'assorbimento delle YTXs nel tratto gastrointestinale è molto limitato.
Meccanismo d'azione	Il meccanismo d'azione della yessotossina è stato oggetto di molte ricerche, ma non è stato ancora completamente chiarito. Recenti studi <i>in vitro</i> hanno dimostrato che la YTX altera il sistema di degradazione delle proteine, provocando l'accumulo di un frammento di 100 KDa della proteina di adesione E-caderina (ECRA 100) nelle cellule epiteliali di carcinoma mammario (MCF-7). Quest'azione è indotta a basse concentrazioni di YTX (10^{-10} - 10^{-9} M) e non agisce sulla rottura di E-caderina ma interferisce sui normali processi di endocitosi dei frammenti di proteine per una loro completa degradazione a seguito della fase proteolitica. La YTX interviene sull'omeostasi di Ca^{2+} nella cellula, attiva le fosfodiesterasi (PDE) che controllano l'attività dei cAMP e cGMP.
Tossicità in animali (topo)	Per iniezione intraperitoneale, 7 dei 9 analoghi della YTX, mostrano una tossicità (LD50) che varia dai 100 ai 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.. La tossicità <i>per os</i> è notevolmente inferiore. La somministrazione <i>per os</i> di 5 mg/kg p.c., per un breve periodo di tempo, non ha evidenziato effetti tossici. Questo dato è stato utilizzato da EFSA-CONTAM e da FAO-IOC-WHO come NOAEL.
Tossicità nell'uomo per via orale	Non sono mai stati riportati casi di intossicazione ascrivibili a YTXs.
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	FAO-IOC-WHO sulla base del NOAEL di 5 mg/kg p.c. applica un FI di 100 per arrivare a un ARfD di 50 μg YTX eq./kg p.c. (3 mg di YTX eq./persona). EFSA-CONTAM sulla base del NOAEL di 5 mg/kg p.c. applica un FI di 100, più un altro FI di 2 che porta ad un ARfD di 25 μg YTX eq./kg p.c. (1,5 mg/persona).

Tab. 7. Limiti Guida in relazione alla parte edibile assunta.

Parte edibile ingerita in grammi	Limite Guida *		Limite ** mg YTX eq./kg p.e. Reg. (CE) 786/2013
	FAO/IOC/WHO	EFSA CONTAM	
100	30	15	3,75
250	12	6	
400	8	3,75	

* Calcolo dei Limiti Guida elaborati da Poletti, R., in base alle indicazioni FAO/IOC/WHO [80] e EFSA/CONTAM [37].

** Il limite delle yessotossine di 1 mg YTX eq./kg di parte edibile (Reg. CE n. 853/2004) è stato innalzato a 3,75 mg YTX eq./kg il 16 agosto 2013 con il Regolamento (UE) n. 786/2013 della Commissione.

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo delle yessotossine non è stato indicato nessun limite [81].

10.7 Bibliografia

1. Murata M., Masanori K., Lee J.S., Yasumoto T., 1987. *Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning*. Tetrahedron Lett. 28, 5869-5872.
2. Aune T., 1989. *Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes*. In: Mycotoxins and Phycotoxins '88, pp. 461-468 (Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y., Eds.) Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
3. Naoki H., Murata M., Yasumoto T., 1993. *Negative-ion fast-atom bombardment tandem mass spectrometry for the structural study of polyether compounds: structural verification of yessotoxin*. Rapid Commun Mass Spectrom 7: 179-182.
4. Satake M., Ofuji K., James K. J., Furey A., Yasumoto T., 1998. *New toxic event caused by Irish mussels*. In Harmful Algae, Reguera, B.; Blanco, J.; Fernandez, M. L.; Wyatt, T., Eds. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: 1998; pp 468-469.
5. Yasumoto T., Takizawa A., 1997. *Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by highpressure liquid chromatography*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1775-1777.
6. Paz B., Riobó P., Fernández M. L., Fraga S., Franco J. M., 2004. *Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates Protoceratium reticulatum and Lingulodinium polyedrum in culture*. Toxicon 44, 251-258.
7. Paz B., Riobó P., Ramilo I., Franco J. M., 2007. *Yessotoxins profile in strains of Protoceratium reticulatum from Spain and USA*. Toxicon 50, 1-17.
8. Guerrini F., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Fattorusso E., Boni L., Pistocchi R., 2007. *Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate Protoceratium reticulatum in batch-cultures*. Harmful Algae 6, 707-717.
9. Miles C. O., Samdal I. A., Aasen J. A. G., Jensen D. J., Quilliam M. A., Petersen D., Briggs L. R., Wilkins A. L., Rise F., Cooney J. M., MacKenzie L., 2005. *Evidence for numerous analogs of Yessotoxin in Protoceratium reticulatum*. Harmful Algae 4, 1075-1091.
10. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Poletti R., Viviani R., 2000. *A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic Sea mussels*. Eur. J. Org. Chem. 2000, 291-295.
11. Miles C. O., Wilkins A. L., Allan D. H., Selwood A. I., Jensen D. J., Cooney J. M., Beuzenberg V., MacKenzie A.L., 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 Protoceratiumreticulatum*. Toxicon 47, 229-240.
12. Satake M., Tubaro A., Lee J. S., Yasumoto T., 1997. *Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea*. Nat. Toxins 5, 107-110.
13. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magn S., Poletti R., Viviani R., 1998. *Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea*. Tetrahedron Lett 39: 8897-900.
14. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Satake M., Viviani R. and Yasumoto T., 1997. *Yessotoxin in mussels of the Northern Adriatic Sea*. Toxicon 35(2): 177-183.
15. Daiguji M., Satake M., Ramstad H., Aune T., Naoki H. and Yasumoto T., 1998. *Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoyessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway*. Nat. Toxins 6: 235-239.

16. Draisci R., Lucentini L. e Mascioni A., 2000. *Pectenotoxins and Yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and Analysis*. Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection. L.M. Botana. New York, Marcel Dekker: 289-324.
17. Terao K., Ito E., Oarada M., Murata M., Yasumoto T., 1990. *Histopathological studies on experimental marine toxins poisoning. 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from patinopecten yessoensis and of a desulfated derivative*. *Toxicon* 28:1095-104.
18. Ogino H., 1997. Ph.D. Thesis, Tohoku University, Japan.
19. Inoue M., Hiramata M., Satake M., Sugiyama K. and Yasumoto T., 2003. *Inhibition of brevetoxins binding to the voltagegated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A*. *Toxicon* 41, 469–474.
20. De la Rosa L.A., Alfonso A., Vilariño N., Vieytes M.R., Botana L.M., 2001. *Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin*. *Biochem. Pharmacol.* 61, 827-833.
21. De la Rosa L. A., Alfonso A., Vilariño N., Vieytes M. R., Yasumoto T., Botana L. M., 2001. *Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes modulation by yessotoxin, Ca²⁺ channel blockers and kinases*. *Cellular Signalling* 12, 711-716.
22. Alfonso A., De la Rosa L.A., Vieytes M.R., Yasumoto T. and Botana L.M., 2003. *Yessotoxin a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes*. *Biochem Pharmacol* 65,193–208.
23. Pérez-Gómez A., Ferrero-Gutiérrez A., Novelli A., Franco J.M., Paz B. and Fernández Sánchez M.T., 2006. *Potent neurotoxic action of the shellfish biotoxin yessotoxin on cultured cerebellar neurons*. *Toxicol. Sci.* 90, 168-177.
24. Dell'Ovo V., Bandi E., Coslovich T., Florio C., Sciancalepore M., Decorti G., Sosa S., Lorenzon O., Yasumoto T. and Tubaro A., 2008. *In vitro effects of yessotoxin on a primary culture of ratcardiomyocytes*. *Toxicol Sci.* Dec;106(2):392-9.
25. Malagoli D. and Ottaviani E., 2004. *Yessotoxin affects fMLP-induced cell shape changes in Mytilus galloprovincialis immunocytes*. *Cell Biol. Int.* 28, 57-61.
26. Malagoli D., Canarini L. and Ottaviani E., 2006. *Algal toxin yessotoxin signalling pathways involve immunocyte mussel calcium channels*. *Cell Biol. Int.* 30, 721-726.
27. Leira F., Álvarez C., Vieites JM., Vieytes M.R. and Botana L.M., 2002. *Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line*. *Toxicol. in Vitro* 16, 23-31.
28. Malaguti C., Ciminiello P., Fattorusso E., Rossini G. P., 2002. *Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells*. *Toxicol. in Vitro* 16, 357-363.
29. Suárez-Korsnes M., Hetland D. L., Espenes A., Tranulis M. A., Aune T., 2006. *Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse*. *Toxicol. in Vitro* 20, 1077-1087
30. Suárez-Korsnes M., Hetland D. L., Espenes A., Aune T., 2006. *Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell lines via mitochondrial signalling transduction pathway*. *Toxicol. in Vitro* 20, 1419-1426.
31. Suárez-Korsnes M., Hetland D. L., Espenes A., Aune T., 2007. *Cleavage of tensin during cytoskeleton disruption in YTX-induced apoptosis*. *Toxicol. in Vitro* 21, 9-15.
32. Malagoli D., Marchesini E., Ottaviani E., 2006. *Lysosomes as the target of yessotoxin in invertebrate and vertebrate cell lines*. *Toxicol. Lett.* 167, 75-83.
33. Pierotti S., Malaguti C., Milandri A., Poletti R. and Rossini G.P., 2003. *Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples*. *Anal. Biochem.* 312, 208-216.
34. Ronzitti G., Callegari F., Malaguti C., Rossini G. P., 2004. *Selective disruption of the E cadherin–catenin system by an algal toxin*. *Br. J. Cancer* 90, 1100-1107.
35. Callegari F. and Rossini G.P., 2008. *Yessotoxin inhibits the complete degradation of*

- E-cadherin*. Toxicology 244, 133-144.
36. Ferrari S., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Forino M., Malaguti C., Tubaro A., Poletti R., Yasumoto T., Fattorusso E., Rossini G. P., 2004. *Structure-Activity relationships of yessotoxins in cultured cells*. Chem. Res. Toxicol. 17, 1251-1257.
 37. Marine biotoxins in shellfish 2008. Yessotoxin group - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain (Question No EFSA-Q-2006-065D) *EFSA Journal* 907, 1-62
 38. Alfonso A., Vieytes M.R., Yasumoto T. and Botana L.M., 2004. *A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases*. Anal. Biochem. 326, 93-99.
 39. Alfonso C., Alfonso A., Vieytes M.R., Yasumoto T. and Botana L.M., 2005. *Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure*. Anal. Biochem. 344, 266-274.
 40. Pazos M.J., Alfonso A., Vieytes M.R., Yasumoto T., Vieites J.M. and Botana L.M., 2004. *Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions*. Anal. Biochem. 335, 112-118.
 41. Pazos M.J., Alfonso A., Vieytes M.R., Yasumoto T. and Botana L.M., 2005. *Kinetic analysis of the interaction between yessotoxin and analogues and immobilized phosphodiesterases using a resonant mirror optical biosensor*. Chem. Res. Toxicol. 18, 1155-1160.
 42. Pazos M.J., Alfonso A., Vieytes M.R., Yasumoto T. and Botana L. M., 2006. *Study of the Interaction between Different Phosphodiesterases and Yessotoxin Using a Resonant Mirror Biosensor*. Chem. Res. Toxicol. 19, 794-800.
 43. Bianchi C., Fato R., Angelin A., Trombetti F., Ventrella V., Borgatti A. R., Fattorusso E., Ciminiello P., Bernardi P., Lenaz G., Parenti C. G., 2004. *Yessotoxin, a shellfish biotoxin, is a potent inducer of the permeability transition in isolated mitochondria and intact cells*. Biochim.Biophys. Acta 1656, 139-147.
 44. Alfonso A. and Alfonso C., 2008. *Pharmacology and mechanism of action of Yessotoxin: Biological detection*. In: *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection* (Botana, L.M., ed.). 2nd edition, CRC Press (Taylor and Francys Group), Boca Raton, USA, pp. 315-328.
 45. Malaguti C. and Rossini G.P., 2001. *Yessotoxin induces caspase activation and death of HeLa cells*. Proceedings of the 2nd International Joint Meeting "In Vitro Models and Toxicity Mechanisms", Verona (Italy), May 30-Jun.1; 35.
 46. Tubaro A., Sosa S., Carbonatto M., Altinier G., Vita F., Melato M., Satake M. and Yasumoto T., 2003. *Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice*. Toxicon 41, 783-792.
 47. Aune T., Sørby R., Yasumoto T., Ramstad H. and Landsverk T., 2002. *Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice*. Toxicon 40, 77-82.
 48. Franchini A., Marchesini E., Poletti R. and Ottaviani E., 2004. *Lethal and sub-lethal yessotoxin dose-induced morpho-functional alterations in intraperitoneal injected Swiss CD1 mice*. Toxicon. 44(1), 83-90.
 49. Franchini A., Marchesini E., Poletti R. and Ottaviani E., 2004. *Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice*. Toxicon. 43, 347-352.
 50. Munday R., Aune T. and Rossini G.P., 2008. *Toxicology of the yessotoxins*. In *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*", Second Ed., (Botana L. ed.), Taylor & Francis, pp. 329-339.

51. Aune T., Aasen J.A.B., Miles C.O. and Larsen S., 2008. *Effect of mouse strain and gender on LD50 of yessotoxin*. *Toxicon*. 53, 535-540.
52. Munday et al. risultati non pubblicati come riportato da Munday et al. 2008 [50].
53. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Poletti R. and Viviani R., 2000. *Structure determination of carboxyhomoyessotoxin, a new yessotoxin analogue isolated from Adriatic mussels*. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 770-774.
54. Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y. and Yasumoto, T. 1996. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops, *Tetrahedron Lett.* 37: 5955-5958.
55. Loader J.I., Hawkes A.D., Beuzenberg V., Jensen D.J., Cooney J.M., Wilkins A.L., Fitzgerald J.M., Briggs L.M. and Miles C.O., 2007. *Convenient large scale purification of yessotoxin from Protoceratium reticulatum culture and isolation of a novel furanoyessotoxin*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 11093-11100.
56. Tubaro A., Sosa S., Altinier G., Soranzo M.R., Satake M., Della Loggia R. and Yasumoto T., 2004. *Short-term toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice*. *Toxicon* 43, 439-445.
57. Espenes A., Aasen J., Hetland D., Satake M., Smith A., Eraker N. and Aune T., 2006. *Toxicity of YTX in mice after repeated oral exposure*. In: *Molluscan Shellfish Safety* (Henshilwood K, Deegan B, McMahon T, Cusack C, Keaveney S, Silke J, O' Cinneide M, Lyons D and Hess P, ed.). Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway, Ireland, June 14th-18th, 2004, pp. 419-423.
58. Tubaro A., Giangaspero A., Ardizzone M., Soranzo M.R., Vita F., Yasumoto T., Maucher J.M., Ramsdell J.S. and Sosa S., 2008. *Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in 3 months*. *Toxicon* 51, 1225-1235.
59. Tubaro A., Bandi E., Sosa S., Soranzo M.R., Giangaspero A., De Ninis V., Yasumoto T. and Lorenzon P., 2008. *Effects of yessotoxin (YTX) on the skeletal muscle: an update*. *Food Addit. Contam.* 28, 1-6.
60. Lin Y.Y., Risk M., Ray S.M., Vanengen D., Clardy J., Golik J., James J.C., Nakanishi K., 1981. *Isolation and structure of brevetoxin-B from the red tide dinoflagellate Ptychodiscus brevis (Gymnodinium breve)*. *Journal of the American Chemical Society* 103, 6773-6775.
61. Yasumoto T., Murata M., Lee J.S. and Torigoe K., 1989. *Polyether toxins produced by dinoflagellates*. In: *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier, Natori S, Hashimoto K and Ueno Y (ed), Amsterdam, pp. 375-382.
62. Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Poletti R., 2001. *42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxohomoyessotoxin, a new biotoxin from mussels of the northern Adriatic sea*. *Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 596-599.
63. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., 2002 *The detection and identification of 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from adriatic shellfish, by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 979-984.
64. Finch S. C., Wilkins A. L., Hawkes A. D. Jensen D. J., MacKenzie L., Beuzenberg V., Quilliam, M. A., Olseng, C. D., Samdal, I. A., Aasen, J. A. G., Selwood, A. I., Cooney, J. M., Sandvik M., Miles C. O., 2005. *Isolation and identification of (44-R,S)-44,55-dihydroxyessotoxin from Protoceratium reticulatum, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada*. *Toxicon* 46, 160-170.
65. MacKenzie L., Holland P., McNabb P., Beuzenberg V., Selwood A., Suzuki T., 2002. *Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (Perna canaliculus), revealed by LCMS/MS analysis*. *Toxicon* 40, 1321-1330.

66. Aasen J., Samdal I. A., Miles C. O., Dahl E., Briggs L. R., Aune T., 2005. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicol* 45, 265-272.
67. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Magno S., Poletti R., Tartaglione L., 2007. Desulfoyessotoxins from Adriatic Mussels: a new problem for seafood safety control. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 95-98.
68. MacKenzie L., Suzuki T. and Adamson J., 2001. Elimination and differential transformation of yessotoxin by the greenshell mussel *Perna canaliculus* and blue shell mussel *Mytilus galloprovincialis*. In: G. M. Hallegraef, S. I. Blackburn C. J. Bolch & R. J. Lewis, editors. Harmful algal blooms. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 371-374.
69. Samdal I. A., 2005. Yessotoxins in algae and mussels -Studies on its sources, disposition, and levels. In: Oslo, Norwegian School of Veterinary Science, 53.
70. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Guerrini F., Pistocchi R., Boni L., 2003. Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from northwestern Adriatic sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicol* 42, 7-14.
71. Suzuki T., Igarashi T., Ichimi K., Watai M., Suzuki M., Ogiso E. and Yasumoto T., 2005. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fish Sci* 71, 948-955.
72. Satake M., MacKenzie L., Yasumoto T., 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5, 164-167.
73. Stobo L. A., Lewis J., Quilliam M. A., Hardstaff W. R., Gallacher S., Webster L., Smith E., McKenzie M., 2003. Detection of yessotoxin in UK and Canadian isolates of phytoplankton and optimization and validation of LC-MS methods. In: Bates, S., ed. Gulf Fisheries Centre, Moncton, New Brunswick, Canada, 8-14.
74. Draisci R., Ferretti E., Palleschi L., Marchiafava C., Poletti R., Milandri A., Ceredi A., Pompei M., 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicol* 37, 1187-1193.
75. Arévalo F., Pazos Y., Correa J., Salgado C., Morono A., Paz B., Franco J.M., 2004. First report of yessotoxin in mussels of Galician Rias during a bloom of *Lingulodinium polyedra stein* (Dodge). In: Henshilwood, K., Deegan B., McMahon T., Cusak C., Keaveney S., Silke J.O., Cinneide M., Lyons D., Hess P. (Eds.). Fifth International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Galway, Ireland, pp. 184-189.
76. Holmes M.J., Lewis R.J., Jones A., Wong Hoy A.W., 1995. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Natural Toxins* 3, 355-362.
77. Rhodes L., McNabb P., De Salas M., Briggs L., Beuzenberg V. and Gladstone M., 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera* - Harmful Algae Volume 5, Issue 2, March, Pages 148-155
78. Riccardi M., Guerrini F., Roncarati F., Milandri A., Cangini M., Pigozzi S., Riccardi E., Ceredi A., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L. and Pistocchi R., 2009. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic sea: Toxin production and phylogenetic analysis - Harmful Algae Volume 8, Issue 2, January, Pages 279-290
79. Hansen G., Moestrup Ø., Roberts K.R., 1996/97. Light and Electron Microscopical observations on *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae). *Arch. Protistenkd.* 147, 381-391.
80. FAO/IOC/WHO 2004 ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs (Oslo, September 26-30).
81. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs.

Capitolo 11

Azaspiracid Poisoning (AZP)

Capitolo 11

Azaspiracid Poisoning (AZP)

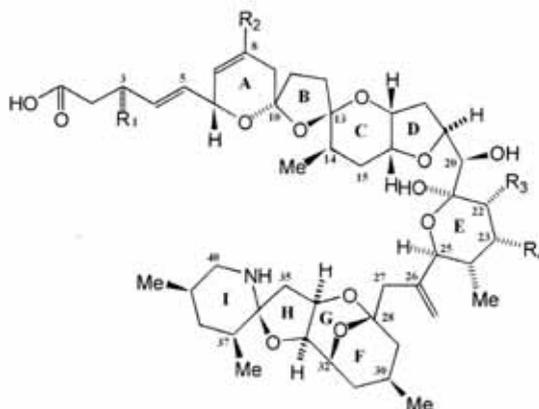
Nella seconda metà degli anni '90 in Irlanda è stata identificata una nuova tossina liposolubile, l'azaspiracido [1], e l'intossicazione ad essa correlata è stata chiamata AZP (*Azaspiracid Poisoning*). Il primo episodio di intossicazione da azaspiracido (AZA) è avvenuto nel 1995, quando i mitili raccolti nella baia di Killary, in Irlanda, causarono in consumatori olandesi forti disturbi gastrointestinali con sintomi tipici da intossicazione tipo DSP. Tuttavia le concentrazioni di acido okadaico e derivati nei bivalvi incriminati (*Mytilus edulis*), erano ben al di sotto di quelle considerate capaci di creare tali disturbi gastrointestinali. Inizialmente questa nuova tossina fu chiamata KT-3 (*Killary Toxin*) dal nome del luogo (Killary Harbour) dove erano stati raccolti i bivalvi. La struttura della tossina fu individuata in Giappone nel 1998 e fu chiamata azaspiracido con riferimento alla presenza nella molecola di un anello azaspiro e di un funzionale acido [1,2].

11.1 Struttura chimica

Inizialmente la struttura chimica dell'AZA, molecola isolata per la prima volta nel 1998 in mitili (*Mytilus edulis*) dell'Irlanda e chiamata AZA1, era riportata come un solido amorfo inodore ed incolore [1], mentre altri studi la riportavano come un olio incolore [3,4]. AZA1 ha formula chimica bruta $C_{47}H_{71}O_{12}$, peso molecolare di 841,5, non presenta nessun massimo di assorbimento UV al di sopra dei 210nm di lunghezza d'onda e a pH fisiologico esiste come zwitterione (una molecola elettricamente neutra nel suo complesso che però presenta sia una carica positiva che negativa) [5]. La struttura proposta, basata principalmente su dati di spettroscopia NMR, si compone di 9 anelli (A, B, C, D, E, F, G, H, I) e 20 centri stereogenici [1]. Ulteriori studi degli spettri NMR e analisi più approfondite hanno portato, nel 2004, ad una revisione della struttura di AZA1 (Fig.1). [3,4]

Le cariche ioniche di AZA1 conferiscono alla tossina un'ampia possibilità di interazione con le strutture biologiche.

Fig. 1. Struttura chimica di AZA1 [3,4].



Subito dopo l'individuazione della struttura della molecola AZA1, sono stati isolati altri 4 analoghi della tossina; le loro strutture sono state determinate mediante tecniche NMR e MS. Due di questi analoghi differiscono soltanto per il numero di gruppi metilici: rispetto alla molecola AZA1, in AZA3 manca il gruppo metile (CH₃) in posizione C22, mentre AZA2 possiede un metile in più in posizione C8. Gli altri 2 analoghi della tossina (AZA4 e AZA5) sono analoghi di AZA3 con l'aggiunta di un gruppo ossidrilico (OH) in posizione C3 per AZA4 e in posizione C23 per AZA5. Gli AZAs fin ora conosciuti sono 32 ma non si esclude che in futuro, come sta avvenendo per altre biotossine marine, si possano ritrovare ulteriori analoghi.

Nella Tab.1 è indicata la struttura di alcuni analoghi AZAs (da AZA1 a AZA24), definita sulla base della spettroscopia NMR e di massa.

Tab. 1. Struttura e massa ionica molecolare [M+H]⁺ di alcuni analoghi AZA [6].

Tossina	Analogo originale	R1 (C3)	R2 (C8)	R3 (C22)	R4 (C23)	[M+H] ⁺
AZA 1		H	H	Me	H	842,5
AZA 2		H	Me	Me	H	856,5
AZA 3		H	H	H	H	828,5
AZA 4	AZA 3	OH	H	H	H	844,5
AZA 5	AZA 3	H	H	H	OH	844,5
AZA 6		H	Me	H	H	841,5
AZA 7	AZA 1	OH	H	Me	H	857,5
AZA 8	AZA 1	H	H	Me	OH	857,5
AZA 9	AZA 6	OH	Me	H	H	857,5
AZA 10	AZA 6	H	Me	H	OH	857,5
AZA 11	AZA 2	OH	Me	Me	H	871,5
AZA 12	AZA 2	Me	Me	H	OH	871,5
AZA 13	AZA 3	H	H	OH	OH	859,5
AZA 14	AZA 1	Me	H	OH	OH	873,5
AZA 15	AZA 6	H	Me	OH	OH	873,5
AZA 16	AZA 2	Me	Me	OH	OH	887,5
AZA 17	AZA 3	H	H	H	H	871,5
AZA 18*	AZA 3	Me	H	H	H	885,5
AZA 19*	AZA 3	H	Me	H	H	885,5
AZA 20*	AZA 3	Me	Me	H	H	899,5
AZA 21*	AZA 3	H	H	OH	H	887,5
AZA 22*	AZA 3	Me	H	OH	H	901,5
AZA 23*	AZA 3	H	Me	OH	H	901,5
AZA 24*	AZA 3	Me	Me	OH	H	915,5

*è presente una funzione carbossilica (COOH) ma la posizione di questo gruppo non è stata ben definita. L'ipotesi è quella del posizionamento in C22 o C23.

Ancora poche informazioni sono disponibili circa la stabilità degli AZAs. Tuttavia, alcune tecniche sono state testate per verificare la stabilità a lungo termine di queste biotossine in estratti di mitili. Studi sul trattamento termico delle tossine AZAs in mitili, evidenziano una loro degradazione ad una temperatura superiore ai 90°C [7]. Utilizzando invece i raggi γ , la tecnica di maggior impiego per stabilizzare le tossine nei materiali di riferimento in matrice biologica, si è potuta riscontrare una scarsa stabilità

degli AZAs. In estratti metanolici di mitili, conservati per diversi mesi, gli AZAs subivano una lenta trasformazione in esteri metilici [6]. Tra tutti gli analoghi, AZA3 sembra quello più facilmente degradabile, caratteristica che potrebbe spiegare perché nei mitili lo si ritrova ad una concentrazione inferiore rispetto ad AZA1 e AZA2.

11.2 Tossicità

11.2.1 Tossicità acuta in topo per via intraperitoneale (i.p.)

Il primo evento di AZP del 1995, per consumo di mitili raccolti nella Killary Harbour (Irlanda), è stato riscontrato attraverso *mouse test* positivo per le tossine liposolubili del tipo DSP. Le analisi chimiche sui mitili responsabili dell'intossicazione non mostrarono concentrazioni significative di tossine note. Durante il *mouse test*, l'iniezione intraperitoneale (i.p.) di estratto liposolubile di mitili determinava sui topi sintomi, prima della morte, che erano chiaramente differenti rispetto a quelli causati da AO e suoi analoghi: lentezza nei movimenti, difficoltà respiratorie, spasmi, paralisi progressiva e decesso entro 20-90 minuti dall'iniezione.

La dose letale della tossina (allora definita KT-3) parzialmente purificata era calcolata in 150 µg/kg p.c. e i topi trattati mostravano rigonfiamento dello stomaco, del fegato e una riduzione del peso del timo e della milza. Gli esami istologici evidenziavano formazioni di vacuoli e accumulo di grassi in epatociti, degenerazione del nucleo delle cellule (picnosi) del pancreas, morte dei linfociti nel timo e milza, erosione e presenza di sangue nello stomaco [8, 9,10,11].

Test di tossicità acuta degli AZAs per via i.p., data la scarsità di materiale (tossina pura), sono stati condotti in questi anni limitatamente agli AZAs da 1 a 5 (Tab. 2):

Tab. 2. Dose letale per il topo (test i.p.) espressa in µg/kg p.c.

Tossina	µg/kg p.c.
AZA1	200
AZA2	110
AZA3	140
AZA4	470
AZA5	<1.000

I test di tossicità mostrano che AZA2 e AZA3 sono più tossici rispetto ad AZA1, mentre AZA4 e AZA5, analoghi idrossilati di AZA3, sono quelli che presentano la più scarsa tossicità [12].

11.2.2 Tossicità acuta in topo per via orale (*per os*)

Studi sulla tossicità acuta degli AZAs *per os* (sondino gastrico) sono stati effettuati sia con materiale grezzo (estratto di bivalvi), sia con materiale più purificato.

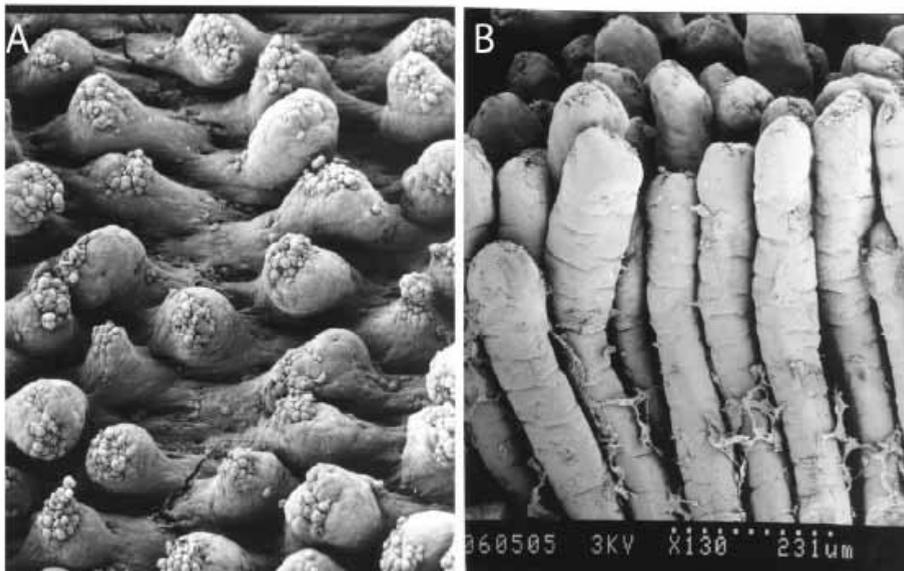
La somministrazione di AZAs (>900 µg/kg p.e.), estratto grezzo (KT3) di mitili, a topi (ceppo ICR di 18 g) veicolata *per os*, aveva come bersaglio quegli organi in cui la sintesi delle proteine è molto attiva, come fegato e pancreas. Altrettanto interessati erano il timo e il tratto digestivo [11]. In questo studio i topi trattati non mostravano comportamenti anomali durante il periodo di sorveglianza (24 ore). Tuttavia, l'autopsia su alcuni topi mostrava, dopo 4 ore dal trattamento, cambiamenti evidenti nell'apparato gastrointestinale, con accumulo di secrezione liquida nell'ileo e nel lume, sulla superficie

dei villi e residui di cellule epiteliali morte. Dopo 8 ore dal trattamento tali effetti erano ancora più evidenti, mentre dopo 24 ore erano in gran parte scomparsi, fatta eccezione per la presenza di microvilli fusi [11]. I cambiamenti dell'apparato digerente soprariportati sono del tutto simili a quelli descritti nei modelli di malattie infiammatorie intestinali, quali il morbo di Crohn e la colite ulcerosa [13].

Studi successivi, con l'impiego di AZA1, estratto e purificato da mitili contaminati, somministrato *per os* a topi ICR maschi, hanno permesso di descrivere con maggiore accuratezza gli effetti della tossina [14]. Gli effetti di AZA1 somministrato a varie concentrazioni (da 300 a 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.) in un'unica dose, hanno individuato la dose minima letale in 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c., con una scarsa linearità fra la concentrazione della tossina e la morte del topo, forse dovuta ad un insufficiente numero di repliche sperimentali. AZA1 alla concentrazione di 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. non mostrava, dopo 1 ora dal trattamento, cambiamenti nell'intestino tenue dei topi, mentre nel fegato si aveva produzione di gocce di grasso.

Macroscopici cambiamenti si evidenziavano invece dopo 3 ore dal trattamento: erosioni dei microvilli dell'intestino tenue, vacuoli nelle cellule epiteliali e atrofia della lamina propria con parziale separazione dalle cellule epiteliali (Fig.2). Questi effetti risultavano accentuati con AZA1 alla concentrazione di 500 e 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.; tuttavia, la maggior parte di questi effetti si attenuava allo scadere delle 24 ore dal trattamento, con la sola eccezione dell'atrofia della lamina propria. I topi trattati con 500 μg di AZA1/kg p.c. mostravano un aumento del peso del fegato pari al 38%. Inoltre, il trattamento dei topi con AZA1 metteva in evidenza la necrosi di cellule del tessuto linfoide come timo, milza e noduli linfatici [14].

Fig. 2. Comparazione tra villi (immagini al microscopio elettronico dell'intestino tenue di topo trattato *per os* con 700 μg di AZA1/kg p.c. a 8 ore dal trattamento (A) e quelli di topo non trattato (B). (Foto, per gentile concessione, del Dr. Emiko Ito, Chiba University, Giappone)



In un'altra serie di studi, AZA1 era somministrato a topi *per os* a dosi ripetute per verificare l'eventuale reversibilità dei danni provocati dalla tossina nel tempo [15]. In questi esperimenti la tossina era somministrata a topi ICR maschi di 4-6 settimane, alla concentrazione di 250, 300, 350 e 450 µg/kg p.c., due volte la settimana. Per i topi sopravvissuti ai 2 trattamenti settimanali, la dose minima letale era calcolata essere inferiore a 450 µg/kg p.c.. Monitorati per 90 giorni, gli effetti patologici della tossina risultarono simili a quelli riportati nella somministrazione acuta; tuttavia, i tempi di recupero di questi effetti su alcuni organi furono molto lenti: 7 giorni per il fegato (aumento di grassi); 10 giorni per i tessuti linfoidei; 56 giorni per i polmoni (edemi, sanguinamento e infiltrazione di cellule nella parete alveolare); oltre 12 settimane per lo stomaco e l'intestino tenue (erosione e accorciamento dei villi).

Nello stesso studio furono misurati gli effetti cronici di dosi subletali di AZA1 (1, 5, 20, 50 µg/kg p.c.) somministrate a topi ICR maschi di 4 settimane per 40 volte, 2 ogni settimana, per un totale di 145 giorni. Alla dose massima di 50 µg/kg p.c., il 90% dei topi furono sacrificati durante la sperimentazione per eccessiva debolezza; quelli sopravvissuti ai dosaggi multipli di tossina, erano controllati a cadenza mensile (alcuni topi furono sacrificati) per 3 mesi per verificare gli effetti della tossina. Il controllo di alcuni organi (cuore, fegato, reni, milza, timo) dei topi trattati evidenziava perdite consistenti di peso, probabilmente per l'effetto dei danni al tratto gastrointestinale (erosione dei villi) che potevano limitare l'assorbimento dei nutrienti. Tuttavia, a bassa concentrazione AZA1 mostrava una leggera infiammazione al fegato e ai polmoni. Sempre nei polmoni si osservavano, seppure con un'incidenza bassa, formazioni tumorali. Iperplasie erano notate anche nello stomaco [15].

11.2.3 Citotossicità

Estratti grezzi di mitili contenenti AZAs mostravano citotossicità in cellule umane d'epatoblastoma (HepG2) e inducevano carcinoma della vescica (ECV-304). Questi effetti tossici erano riscontrati anche per altre linee cellulari (come: linfociti B-Raji; linfociti T- Jurcat E6.1; tumore di mammella - MCF-7; epitelio polmonare - A547; neuroblastoma-BE(2) M17) con la sola eccezione della linea umana di carcinoma del colon Caco-2 [16]. Gli effetti citotossici di AZA1 sono inizialmente evidenziati da cambiamenti morfologici della cellula che coinvolgono il citoscheletro e alcuni organelli cellulari, fino ad arrivare ad una riduzione dell'integrità della membrana e alla lisi cellulare [17].

Esperimenti con cellule cancerogene umane di seno (MCF-7) e di adenocarcinoma di colon umano (Caco-2) trattate con AZA1 mostravano una riduzione, in termini di proliferazione e densità cellulare, molto simile alle azioni indotte da YTXs; tuttavia, AZA1 alla concentrazione 1nM non produceva nelle cellule, durante le 24 ore, nessun cambiamento [18].

In cellule di neuroblastoma umano, AZA1 e un suo enantiomero producevano cambiamenti morfologici ed effetti sul citoscheletro (F actina), dopo 24-48 ore di esposizione. Basse concentrazioni di AZA1 (10nM) sembrano indurre retrazione dei neuriti (assoni), arrotondamento delle cellule e dissesto dell'actina del citoscheletro [19,20].

I primi esperimenti con AZA1 sulle cellule sembravano dimostrare che la tossina non induceva apoptosi, ma necrosi, provocata da lisi cellulare [17]. Tuttavia, recenti prove indicano che AZA1 può indurre apoptosi [20]. Questi risultati evidenziano la necessità di ulteriori studi per meglio definire gli effetti di AZA1 nel percorso apoptotico.

Molti analoghi di AZA hanno dimostrato la capacità di causare una varietà di effetti sui segnali intracellulari.

Linfociti umani esposti ad AZA1 (200 nM) mostrano un aumento di ioni Ca^{2+} citosolico di circa il 50% rispetto ai livelli normali di base [21]. Questa risposta cellulare, sensibile alla concentrazione di ioni Ca^{2+} extracellulari, potenzia l'attivazione di molti processi intracellulari come, ad esempio, l'attività PKC (proteina chinasi C) e l'aumento di AMPc (adenosina monofosfato ciclico). Allo stesso modo, AZA2 e AZA3 aumentano la concentrazione di ioni Ca^{2+} citosolico e di AMPc [22], mentre AZA4 non sembra influenzare i livelli di calcio citosolico [23]. Pertanto, l'effetto di alcuni AZAs sulla membrana cellulare potrebbe essere quella di attivare alcune proteine in grado di aumentare i livelli di calcio citosolico e di AMPc.

Gli effetti degli AZAs sull'actina del citoscheletro sono documentati da molti studi. Inoltre, alcune indagini sembrano mostrare il coinvolgimento di talune proteine di membrana come le claudine e le caderine. Le claudine (24 sono quelle note) sono proteine integrali di membrana, coinvolte nell'adesione tra le cellule, di fondamentale importanza nel settore dei trasporti paracellulari delle cellule epiteliali ed endoteliali. Le Caco-2 (cellule epiteliali) esposte ad AZA1 hanno dimostrato un aumento della frazione solubile e insolubile della proteina claudina-2 e una diminuzione di quella insolubile della claudina-3 [24]. Caco-2 e MCF-7, trattate con AZA1, evidenziavano un accumulo di un frammento di E-caderina (ECRA_{100}), dipendente dalla concentrazione della tossina. La caratterizzazione immunologica di ECRA_{100} rivelava che la E-caderina era priva di dominio intracellulare e gli effetti indotti da AZA1 erano indistinguibili da quelli indotti da yessotossina (YTX) [18]. Recentemente è stato inoltre dimostrato che linfociti T esposti ad AZA1 regolano l'espressione genica e i livelli di recettori di lipoproteine a bassa densità (LDLR) [25], influenzando l'integrità della membrana cellulare attraverso il colesterolo legato alle proteine a bassa densità.

Coerentemente con i dati disponibili *in vitro*, AZA1 sembra avere come *target* una proteina di membrana come claudina, caderina o LDLR, in grado di influenzare le molecole coinvolte nei segnali intracellulari e provocare effetti citotossici; effetti citotossici congruenti con i risultati patologici che si osservano nelle sperimentazioni *in vivo*, compreso il potenziale cancerogeno e la promozione tumorale di questa tossina.

11.2.4 Tossicità nell'uomo

Nel primo episodio d'intossicazione umana da azaspiracido (AZP) avvenuto nel 1995, erano evidenziati sintomi quali: nausea, vomito, forte diarrea e dolori gastrointestinali [9]. Questi sintomi si manifestavano dopo poche ore dal consumo dei bivalvi, potevano protrarsi per 2-3 giorni e la loro scomparsa riportava le persone alla loro normale condizione di salute.

I pochi eventi conosciuti (Tab.3) riconducibili ad AZP, fanno pensare che questo tipo di intossicazione sia un evento poco frequente; questo è anche il frutto dei controlli effettuati dalle Autorità competenti nelle zone di produzione dei Paesi a rischio. La sintomatologia dell'AZP, del tutto simile a quella dovuta ad AO e DTXs, non esclude comunque che ci sia stato un numero maggiore di casi.

Tab. 3. Casi di intossicazione umana attribuiti ad AZAs (1995-2008).

Paese	Data	Specie bivalvi	Area di produzione	N° persone intossicate
Olanda	novembre 1995	<i>Mytilus edulis</i>	Killary Harbour (Irlanda)	8
Irlanda	settembre/ottobre 1997	<i>Mytilus edulis</i>	Arranmore Island (Irlanda)	20-24
Italia	settembre 1998	<i>Mytilus edulis</i>	Clew Bay (Irlanda)	10
Francia	settembre 1998	<i>Pecten maximus</i>	Bantry Bay (Irlanda)	20-30
Regno Unito	agosto 2000	<i>Mytilus edulis</i>	Bantry Bay (Irlanda)	12-16
Francia	aprile 2008	<i>Mytilus edulis</i>	Irlanda	219

Il primo episodio d'intossicazione da AZAs del 1995 non ha permesso alle Autorità competenti di raccogliere dati sufficienti per avviare un'analisi del rischio, in quanto la tossina fu isolata e strutturalmente definita soltanto nel 1998. Una prima valutazione del rischio da AZAs contenuti in mitili fu eseguita dalla *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI) nel 2001, sulla base di dati ricavati dall'analisi chimica (LC/MS) di epatopancreas di mitili raccolti 1-2 mesi dopo il secondo episodio di intossicazione (Arranmore Island, 1997).

I risultati portarono a considerare pericolosa un'assunzione di AZAs per persona tra i 6,7 µg (5 percentile) e i 24,9 µg (95 percentile), con una mediana di 14,5 µg per persona. Il calcolo di questi dati si basava sul presupposto che la tossicità relativa di AZA1, AZA2 e AZA3 fosse simile [26]; in seguito (nel 2006) la FSAI rilevò che AZA2 e AZA3 avevano una tossicità superiore. Queste ed altre osservazioni, quali il rapporto dell'epatopancreas rispetto all'intera parte edibile dei mitili e la riduzione del peso della parte edibile durante la loro cottura (circa il 50%), hanno consentito una nuova stima della dose di AZAs associata all'intossicazione umana, che si colloca tra i 50,1 µg (5 percentile) e 253,3 µg (95 percentile) con una mediana di 113,4 µg per persona [27].

11.3 Molluschi associati ad AZPs

Il consumo di *Mytilus edulis* (cozza) è stato associato al primo avvenimento tossico in Irlanda [9]; altri bivalvi sono stati identificati contenere AZA quali: *Crassostrea gigas* (ostrica concava, ostrica del Pacifico), *Ostrea edulis* (ostrica comune), *Pecten maximus* (cappasanta atlantica), *Tapes philippinarum* (vongola verace), *Cardium edulis* (cuore) ed *Ensis ensis* (cappa di deo, cappa lunga) [28,29]. Il Sistema Europeo di Allerta Rapido (RASFF) ha inoltre segnalato un caso di contaminazione di AZAs in granchi.

11.4 Distribuzione geografica

La necessità di determinare gli AZAs soltanto tramite analisi chimica in LC/MS, limita probabilmente l'individuazione della reale distribuzione di queste tossine nell'area UE. Tuttavia, segnalazioni di AZAs, oltre all'Irlanda, sono pervenute dalla Danimarca, Svezia, Norvegia, Regno Unito, Francia, Spagna, Portogallo (Fig.3), in sostanza i Paesi

europei della costa atlantica.



Fig. 3. Segnalazione della presenza di AZAs in molluschi bivalvi e in crostacei in alcuni Paesi europei.

11.5 Eziologia

La presenza di AZAs è stata per la prima volta dimostrata mediante analisi chimica in LC/MS in una retinata di fitoplancton, in cui una Dinoficea del genere *Protoperidinium* era indicata come produttore primario [30]. Ulteriori ricerche indicarono in *Protoperidinium crassipes* (Kofoid) Balech la specie microalgale produttrice di AZAs [31].



Tuttavia questa affermazione è rimasta in questi anni molto controversa, soprattutto perché colture della microalga incriminata non producevano AZAs ed il ritrovamento di AZAs in bivalvi non era correlato alla presenza nelle acque di *P. crassipes* [32]. Altri dubbi nascevano dal fatto che *P. crassipes* è considerata una Dinoficea eterotrofa nota per predare altre Dinoficee [33] e quindi non era da escludere la possibilità che gli AZAs fossero prodotte da altre microalghe dello stesso gruppo.



Recentemente, durante una crociera di ricerca nel Mare del Nord (giugno 2007), è stata individuata una microalga, ai tempi non ancora identificata, che produceva AZAs, mentre negli stessi campioni di fitoplancton analizzati era esclusa la presenza di *P. crassipes*. La microalga, isolata e messa in coltura, ha mostrato la capacità di produrre AZA1, AZA2 e un isomero di AZA2 [34]. Questa microalga di piccole dimensioni (12-16 µm di lunghezza e 7-11 µm di larghezza) (Fig.4), caratterizzata come genotipo e fenotipo, è stata chiamata *Azadinium spinosum* [34].

Fig. 4. *Azadinium spinosum* Elbrächter & Tillmann, 2009 [35]

(foto:http://www.awi.de/fileadmin/user_upload/News/Press_Releases/2009/1_Quartal/azadinium_utillmann_w.jpg)

Ancor più di recente anche per un'altra specie di *Azadinium* (*A. poporum*) è stata dimostrata la capacità di produrre azaspiracidi [36].

11.6 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da AZAs

In Tab.4 è schematizzata la valutazione del rischio quando si hanno prodotti ittici contaminati da tossine del tipo AZP.

Tab. 4. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine AZA
(LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* ; NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level*)

Distribuzione	Gli AZAs sono stati trovati in molluschi bivalvi raccolti in: Irlanda, Regno Unito, Danimarca, Norvegia, Svezia, Spagna, Francia e Portogallo. La microalga produttrice della tossina è stata identificata in una Dinoficea (<i>Azadinium spinosum</i>).
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Nonostante gli AZAs esercitino grande influenza sulla salute umana, essendo in grado di provocare gravi danni a vari organi, il loro metabolismo è a tutt'oggi poco conosciuto.
Meccanismo d'azione	L'azione di AZA1 è evidenziata da cambiamenti morfologici della cellula che coinvolge la F actina del citoscheletro e alcuni organelli cellulari. L'azione di AZA1 mostra, in linfociti umani, un aumento di ioni Ca ²⁺ citosolico di circa il 50% rispetto ai livelli normali di base. Inoltre, alcune indagini sembrano mostrare il coinvolgimento di talune proteine di membrana come le claudine e le caderine.
Tossicità negli animali (topo)	L'AZA1 provoca gravi danni ad alcuni organi quali: fegato, polmone, pancreas, timo, milza (linfociti T e B) e tratto digestivo. L'AZA1, somministrato con sondino gastrico in topi, alla concentrazione di 250-500 µg/kg p.c., causa alcune morti e seri danni gastrointestinali, polmonari ed epatici. Non ci sono dati di tossicità <i>per os</i> per gli AZAs diversi da AZA1. Sulla base degli studi i.p., la tossicità è: per AZA2 e AZA3 > AZA1 > AZA4 e AZA5.
Tossicità nell'uomo (per via orale)	Effetto acuto: disturbi gastrointestinali. FAO-IOC-WHO, sulla base dei dati di tossicità umana disponibili, propone un LOAEL compreso fra 23 µg e 86 µg/persona. EU SANCO nel 2001 ha proposto un LOAEL compreso tra 0,38 e 1,43 µg/kg p.c.. Dati EFSA-CONTAM indicano un LOAEL di 113 µg/persona (60 kg), 1,9 µg di AZA1 eq./kg p.c..
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Sulla base di un LOAEL calcolato da FAO-IOC-WHO di 23 µg di AZA/persona e applicando un FI di 10, si ottiene un ARfD di 0,04 µg di AZA/kg p.c. (2,4 µg di AZA/persona). Esperti EU SANCO 2001 sulla base del LOAEL di 0,38 µg di AZA/kg p.c. applicando un FI di 3 propongono un ARfD di 0,127 AZA/kg p.c. (7,62 µg di AZA/persona). Gli esperti EFSA-CONTAM sulla base del LOAEL di 113 µg/persona hanno estrapolato un NOAEL applicando un FI di 3 e un ulteriore FI di 3 dal NOAEL, per arrivare ad un ARfD di 0,2 µg AZA1 eq./kg p.c. (12 µg/persona).

Di seguito (Tab.5) sono riportati i valori dei Limiti Guida:

Tab. 5. Valori dei Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Parte edibile ingerita (g)	Limite Guida* <i>Poletti R.</i> (µg AZA1 eq./kg p.e.)			Limite (µg AZA1 eq./kg p.e.) (Reg. (CE) 853/2004)
	FAO/IOC/WHO	EU SANCO	EFSA CONTAM	
100	24	80	120	160
250	9,6	32	48	
400	6,3	19	30	

*Calcolo dei limiti elaborati da Poletti sull'indicazione FAO/IOC/WHO [37], EU SANCO [38] e EFSA/CONTAM [39].

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo dell'azaspiracido è stato indicato un limite di 0,16 mg di azaspiracido/kg di parte edibile [40].

11.7 Bibliografia

1. Satake M., MacKenzie L., Yasumoto T., 1997. *Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin*. Natural Toxins, 5(4): 164-167.
2. Ofuji K., Satake M., McMahon T., Silke J., James K.J., Naoki H., Oshima Y., Yasumoto T., 1999. *Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, Mytilus edulis, involved in human intoxication in Ireland*. Nat Toxins, 7: 99-102.
3. Nicolaou K.C., Koftis T.V., Vyskocil S., Petrovic G., Ling T., Yamada T.M.A., Tang W., Frederick M.O., 2004. *Structural revision and total synthesis of azaspiracid-1, Part 2: Definition of the ABCD domain and total synthesis*. Angew. Chem. Int. Ed Engl., 43(33): 4318-4324.
4. Nicolaou K.C., Vyskocil S., Koftis T.V., Yamada T.M.A. Ling T., Chen D.Y.K., Tang W., Petrovic G., Frederick M.O., 2004. *Structural revision and total synthesis of azaspiracid-1, Part 1: Intelligence gathering and tentative proposal*. Angew. Chem, 116: 2-8.
5. James K.J., Fidalgo Saez M.J., Furey A., Lehane M., 2004. *Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption*. Food Addit. Contam, 21: 879-892.
6. Rehmann N., Hess P., Quilliam M., 2008. *Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid (AZA) in blue mussels (Mytilus edulis) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Comm. Mass Spectrom., 22(4): 549-558.
7. McCarron P., Kotterman M., De Boer J., Rehmann N., Hess P., 2007. *Feasibility of gamma irradiation as a stabilisation technique in the preparation of tissue reference materials for a range of shellfish toxins*. Anal. Bioanal. Chem., 387: 2487-2493.
8. Satake M., Ofuji K., James K.J., Furey A., Yasumoto T., 1998. *New toxic event caused by Irish mussels*. In Harmful Algae, Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. Eds. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp.468-469.
9. McMahon T. and Silke J., 1996. *Winter toxicity of unknown aetiology in mussels*. Harmful Algae News, 14: 2.
10. McMahon T. and Silke J., 1998. *Re-occurrence of winter toxicity*. Harmful Algae News, 17: 12.
11. Ito E., Terao K., McMahon T., Silke J., Yasumoto T., 1998. *Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels*. In Harmful Algae, Reguera, B.; Blanco, J.; Fernandez, M. L.; Wyatt, T., Eds. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 588-589.
12. Ofuji K., Satake M., McMahon T., James K.J., Naoki H., Oshima Y., Yasumoto T., 2001. *Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe*. Biosci Biotechnol Biochem, 65: 740-742.
13. Pizarro T.T., Arseneau K.O., Bamias G., Cominelli F., 2003. *Mouse models for the study of Crohn's disease*. Trends Mol. Med., 9(5): 218-222.
14. Ito E., Satake M., Ofuji K., Kurita N., McMahon T., James K.J., 2000. *Multiple organ damage caused by new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland*. Toxicol, 38: 917-30.
15. Ito E., Yasumoto T., Takai A., Imanishi S. and Harada K., 2002. *Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method*. Toxicol, 40(2): 159-165.
16. Twiner M.J., Rehmann N., Hess P. and Doucette G.J., 2008. *Azaspiracid Shellfish*

- Poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts.* Mar. Drugs, 6(2): 39-72.
17. Twiner M.J., Hess P., Bottein Dechraoui M.Y., McMahon T., Samons M.S., Satake M., Yasumoto T., Ramsdell J.S., Doucette G.J., 2005. *Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines.* Toxicol. 45: 891-900.
 18. Ronzitti G., Hess P., Rehmann N., Rossini G.P., 2007. *Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells.* Toxicol. Sci., 95: 427-435.
 19. Vilariño, N., Nicolaou K.C., Frederick M.O., Cagide E., Ares I.R., Louzao M.C., Vieytes M.R., Botana L.M., 2006. *Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies.* Chem. Res. Toxicol., 19: 1459-1466.
 20. Vilariño N., Nicolaou K.C., Frederick M.O., Vieytes M.R., Botana L.M., 2007. *Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during in vitro azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells.* Biochem. Pharm., 74: 327-335.
 21. Roman Y., Alfonso A., Louzao M.C., De la Rosa L.A., Leira F., Vieites J.M., Vieytes M.R., Ofuji K., Satake M., Yasumoto T., Botana L.M., 2002. *Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets.* Cell. Signal., 14: 703-716.
 22. Roman Y., Alfonso A., Vieytes M.R., Ofuji K., Satake M., Yasumoto T., Botana L.M., 2004. *Effects of azaspiracids 2 and 3 on intracellular cAMP, [Ca²⁺], and pH.* Chem. Res. Toxicol., 17: 1338-1349.
 23. Alfonso A., Vieytes M.R., Ofuji K., Satake M., Nicolaou K.C., Frederick M.O., Botana L.M., 2006. *Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 346: 1091-1099.
 24. Hess P., McCarron P., Rehmann N., Kilcoyne J., McMahon T., Ryan G., Ryan P.M., Twiner M.J., Doucette G.J., Satake M., Ito E., Yasumoto T., 2007. *Isolation and purification of azaspiracids from naturally contaminated materials, and evaluation of their toxicological effects – Final project report ASTOX (ST/02/02).* In Marine Institute – Marine Environment & Health Series, Vol. 28, pp 129.
 25. Twiner M.J., Ryan J.C., Morey J.S., Smith K.J., Hammad S.M., Van Dolah F.M., Hess P., McMahon T., Satake M., Yasumoto T., Doucette G.J., 2008. *Transcriptional profiling and inhibition of cholesterol biosynthesis in human lymphocyte T cells by the marine toxin azaspiracid.* Genomics, 91(3): 289-300.
 26. FSAI. 2001. Risk Assessment of Azaspiracids (AZAs) in shellfish. A Report of the Food Safety Authority of Ireland (FSAI), Dublin, Ireland.
 27. FSAI. 2006. Risk Assessment of Azaspiracids (AZAs) in Shellfish. A Report of the Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland (FSAI), Dublin, Ireland.
 28. Hess P., McMahon T., Slattery D., Swords D., Dowling G., McCarron M., Clarke D., Devilly L., Gibbons W., Silke J., O'Conneide M., 2001. *Biotxin Chemical Monitoring in Ireland 2001.* Proceedings of the Second Irish Marine Science Biotxin Workshop, pp. 8-18.
 29. Furey A., Moroney C., Magdalena A.B., Saez M.J.F., Lehane M., James K.J., 2003. *Geographical, temporal, and species variation of the polyether toxins, azaspiracids, in shellfish.* Environmental Science and Technology, 37: 3078– 3084.
 30. Yasumoto T., 2001. *The chemistry and biological function of natural marine toxins.* Chemical Record, 1(3): 228–242.
 31. James K.J., Moroney C., Roden C., Satake M., Yasumoto T., Lehane M. and Furey A., 2003. *Ubiquitous "benign" alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning.* Toxicol., 41(2):

- 145–151.
32. Moran S., Silke J., Salas R., Chamberlan T., Lyons J., Flannery J., Thornton V., Clarke D. and Devilly L., 2005. *Review of phytoplankton monitoring 2005*. 6th Irish Shellfish Safety Scientific Workshop. Marine Institute, Galway, Ireland.
 33. Gribble K.E. and Andersons D.M., 2006. *Molecular phylogeny of the heterotrophic dinoflagellates, Protoperdinium, Diplopsalis and Preperidinium (Dinophyceae), inferred from large subunit rDNA*. J. Phycol., 42: 1081–1095.
 34. Krogh P., Edler L., Granelli E., Nyman U., 1985. *Outbreak of diarrhetic shellfish poisoning on the west coast of Sweden*. Anderson D.M., White A.W. and Baden D.G. Toxic Dinoflagellates, 501-504. Amsterdam, Elsevier.
 35. Tillmann U., Elbrächter M., Krock B., John U. and Cembella A.D. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. Eur. J. Phycol., 44(1): 63–79.
 36. Gu, H., Luo, Z., Krock, B., Witt, M. & Tillmann, U. (2013). Morphology, phylogeny and azaspiracid profile of *Azadinium poporum* (Dinophyceae) from the China Sea.
 37. Report of the Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, September 26-30, 2004.
 38. EU/SANCO. 2001. Report of the meeting of the working group on toxicology of DSP and AZP. 21–23rd May 2001, Brussels.
 39. EFSA. 2008. Marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal, 723: 1-52.
 40. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs.

Capitolo 12

Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)

Capitolo 12

Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)

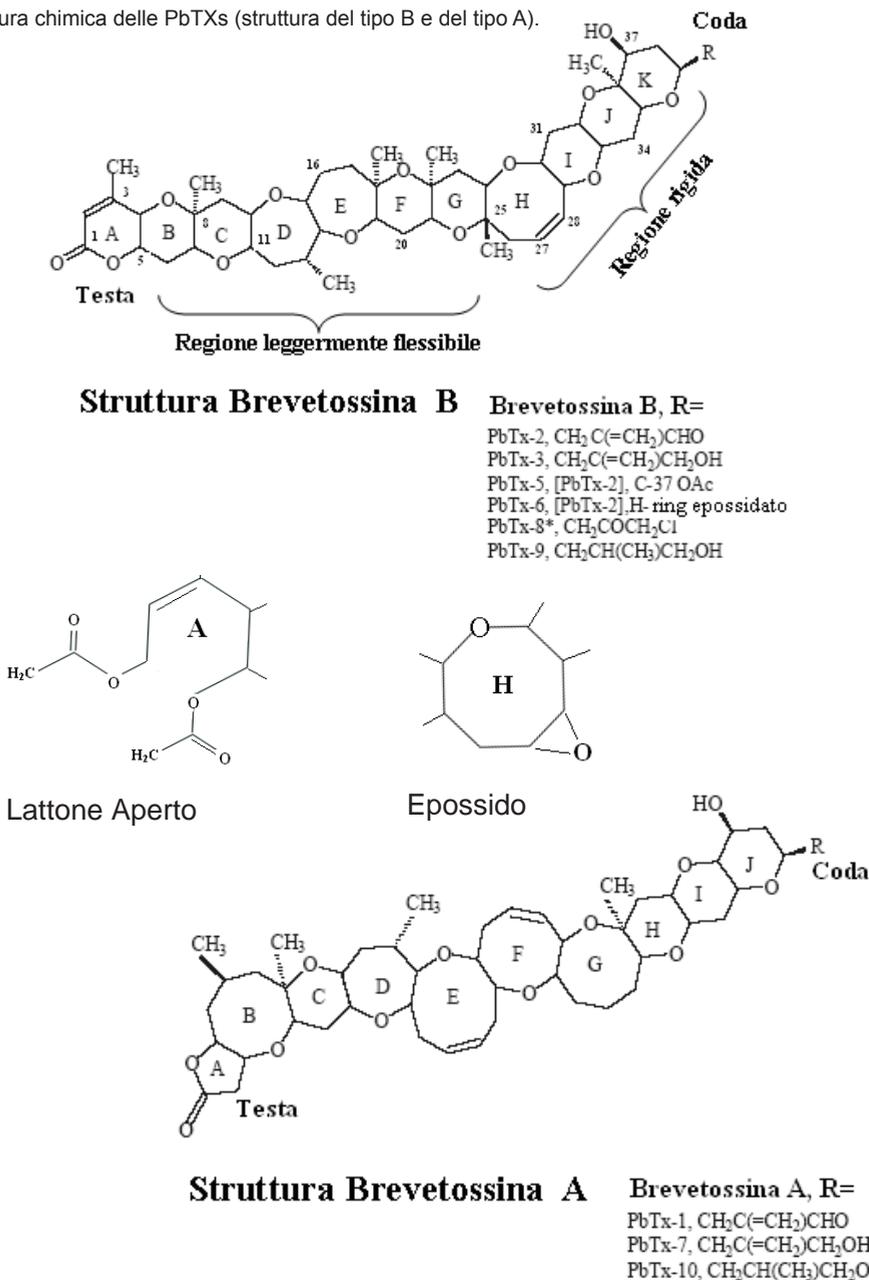
Neurotoxic Shellfish Poisoning è un'intossicazione causata dal consumo di molluschi bivalvi che hanno accumulato un gruppo di tossine chiamate brevetossine. Queste tossine, liposolubili, sono state individuate inizialmente nella Dinoficea *Gymnodinium breve*, denominata poi *Ptychodiscus brevis* e attualmente *Karenia brevis* (C.C.Davis) G.Hansen & Ø.Moestrup. Questa microalga può causare maree colorate (*red tide*) che interessano principalmente il Golfo del Messico, descritte per la prima volta nel 1844 in Florida [1]. Le fioriture, più o meno intense, si presentano generalmente ogni anno a fine estate e possono persistere anche per alcuni mesi (nel 2006, al largo della costa di Sarasota in Florida, la fioritura è durata oltre 12 mesi) [2,3]. Le brevetossine (BTXs = PbTXs da *Ptychodiscus brevis*) sono tossiche per pesci (possono determinare estese morie), uccelli e mammiferi marini; nell'uomo, oltre a causare disturbi neurotossici e gastrointestinali (NSP) tramite il consumo di molluschi bivalvi contaminati, sono implicate nell'insorgenza di disturbi respiratori di persone che passeggiano sulla riva del mare, tramite inalazione di aerosol marino.

12.1 Struttura chimica

La brevetossina 2 (PbTX2) è stata isolata e caratterizzata, per la prima volta da una fioritura di *Ptychodiscus brevis* [4]. Costituita chimicamente da uno scheletro di anelli polieterei *trans*-fusi, fa parte di una classe piuttosto unica di prodotti naturali. Due sono le strutture chimiche di base che caratterizzano le brevetossine (Fig.1): il tipo B (PbTX2 - C₅₀H₇₀O₁₄ e PM di 967,20), è la prima brevetossina strutturalmente chiarita ai raggi X e la più diffusa in natura, costituita da un anello (A) lattone oltre ad altri 10 anelli; e il tipo A (PbTX1 - C₄₉H₇₀O₁₃) con un anello (A) lattone e altri 9 anelli [5,6,7,8].

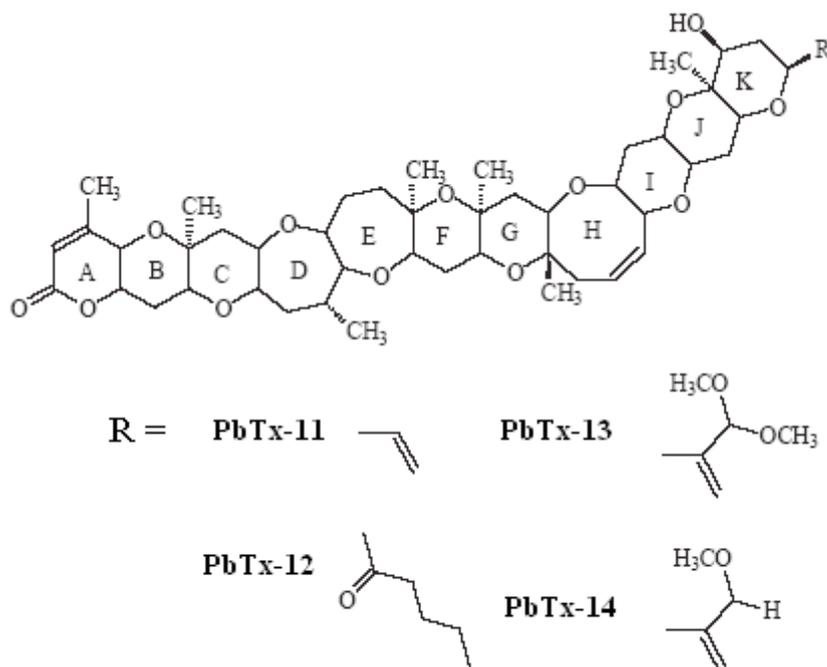
La struttura delle BTXs è relativamente lineare: una curva a metà della molecola e un'ulteriore serie di anelli che formano una scala. Tale struttura è comunemente suddivisa in 4 regioni: la prima zona, caratterizzata dall'anello lattone (che può anche essere aperto), è chiamata testa e conferisce una natura elettrofila alla molecola. Una seconda zona, comprendente gli anelli da B a G, che conferisce alla molecola una struttura leggermente flessibile. Una terza zona, che include gli anelli da H a K (per la struttura di tipo B- PbTX2), rigida. La quarta zona, detta coda, comprende una catena laterale in R.

Fig. 1. Struttura chimica delle PbTXs (struttura del tipo B e del tipo A).



Alle 10 brevetossine naturali inizialmente individuate e caratterizzate, recentemente ne sono state aggiunte altre 5, strutturalmente simili alla PbTX-2 (Fig.2): PbTX11, con una corta catena laterale; PbTX12 con una funzione chetonica nella catena laterale; PbTX13 e PbTX14 considerate degli artefatti originati dall'estrazione e purificazione dalle microalghe con metanolo acido; PbTX-tbm senza catena laterale [8,9].

Fig. 2. Struttura chimica di brevetossine di recente identificazione.



Studi di sintesi hanno dimostrato che le alterazioni che modificano l'anello A-lattone, o che rendono meno rigida la zona che comprende gli anelli da H a K (PbTX₂), riducono in modo significativo la tossicità della molecola.

12.2 Meccanismo d'azione

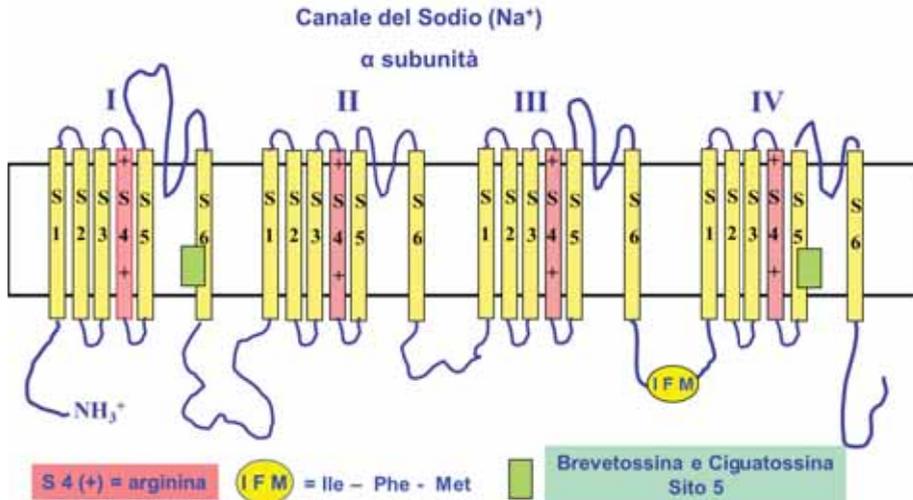
Il meccanismo d'azione delle brevetossine è stato studiato utilizzando cellule di neuroblastoma e sinaptosomi di ratto; è stato dimostrato che i canali dello ione sodio (Na⁺) voltaggio-dipendenti (VSSC = *Voltage Sensitive Sodium Channels*) sono il principale bersaglio di queste tossine [10,11,12,13].

I canali ionici del Na⁺ sono glicoproteine integrali di membrana (attraversano la membrana cellulare) con strutture molecolari e funzioni diverse. Sono formati da una subunità α, che comprende il poro acquoso, e un "gate" (cancello) di attivazione (entrata degli ioni) voltaggio-dipendente (ovvero la probabilità di apertura del canale dipende più o meno marcatamente dal potenziale di membrana), e da una o più subunità β (β₁, β₂ e anche β₃) che concorrono alla specificità dell'azione del canale. La subunità α ha una struttura molto complessa (Fig.3): una massa di 250-280 kD (circa 2.000 amminoacidi), caratterizzata da 4 domini simili collegati attraverso dei *loops* intra e extracellulari; ogni dominio è formato da 6 segmenti α eliche che attraversano la membrana [14].

Questi canali, permettendo il passaggio dello ione Na⁺ dall'esterno (dove la concentrazione è di 440 nM) all'interno della cellula (dove c'è una concentrazione di 50 nM), sono responsabili della fase ascendente del potenziale d'azione. Il potenziale di riposo di una cellula nervosa è circa -70/-90 mV; quando la membrana si depolarizza fino a circa -55 mV ("valore soglia") si ha l'apertura del canale voltaggio-dipendente, permettendo l'ingresso di ioni positivi dentro la cellula che depolarizzano ulteriormente

la membrana fino a valori di +35 mV. Questa depolarizzazione si estende alle zone limitrofe del canale di membrana favorendo l'apertura di altri canali e consentendo così la trasmissione dell'impulso elettrico ad altre cellule.

Fig. 3. Struttura del canale del Sodio voltaggio-dipendente (VSSC).



Le brevetossine, contrariamente a quanto avviene per la tetrodotossina e la saxitossina che occludono il canale del Na⁺ nelle cellule nervose impedendo il passaggio degli ioni e quindi la trasmissione nervosa, agiscono aumentando la conduttanza dello ione Na⁺ attraverso una diminuzione della soglia del potenziale d'azione e una ritardata chiusura del canale, prolungando in questo modo la depolarizzazione della cellula nervosa [10,12].

La diminuzione del potenziale di soglia da parte delle PbTXs sarebbe imputabile al numero di atomi di ossigeno presenti nella molecola, che, interagendo con gli amminoacidi del canale del sodio, ne favorirebbe l'apertura [12,15], provocando eccitazione neuronale prolungata [16]. Inoltre, si ritiene che l'anello A (lattone) e la lunghezza complessiva della molecola delle PbTXs siano gli elementi principali capaci di favorire l'interazione con il cancello (IFM= Isoleucina-fenilalanina-metionina) del VSSC prolungando il passaggio di ioni Na⁺ all'interno della cellula [17,18].

L'attivazione dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti stimolata dalle PbTXs, e la conseguente depolarizzazione delle terminazioni nervose, causa il rilascio dei neurotrasmettitori nella zona sinaptica, provocando una grande varietà di risposte degli organi effettori.

12.3 Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

12.3.1 Tossicità negli animali

Le brevetossine, per la loro azione sui VSSC, sono considerate delle neurotossine; hanno un'alta capacità di bioaccumulo negli organismi marini. La natura lipofila delle PbTXs permette loro di penetrare la barriera ematoencefalica, colpendo in tal modo non soltanto il sistema nervoso periferico (SNP) ma anche il sistema nervoso centrale

(SNC). Tuttavia, le informazioni sui meccanismi d'azione e gli effetti neurotossici delle PbTXs sul SNC sono ancora molto scarse.

Neuroni granulari di cervelletto di ratto trattati con PbTX1 (100 nM) hanno messo in evidenza, dopo 5 minuti, gravi danni neuronali, con rigonfiamento del soma, protuberanze nella membrana, diminuzione graduale dei processi neuronali, fino ad arrivare, dopo alcune ore, alla necrosi cellulare. Il medesimo studio ha quantificato, sulle stesse cellule, l' EC_{50} (effetto della tossina sul 50% delle cellule) di alcune PbTXs: PbTX1 = $9,31 \pm 0,45$ nM; PbTX3 = $53,9 \pm 2,8$ nM; PbTX2 = $80,5 \pm 5,9$ nM; PbTX6 = 1417 ± 32 nM [19].

Le PbTXs producono, in colture di neuroni granulari cerebellari (CGN), un rapido afflusso nella cellula di Ca^{2+} per attivazione del recettore NMDA (recettore N-Metil-D-Aspartato), dei canali Ca^{2+} L-tipo e scambiatori di membrana Na^+/Ca^{++} . Questa alterazione, che modifica l'omeostasi ionica citoplasmatica, se prolungata nel tempo, provoca gravi danni cellulari che possono sfociare nella morte neuronale [20].

Prove di tossicocinetica con PbTX3 marcata, somministrata a ratti per via intravenosa, hanno evidenziato una rapida diffusione (pochi secondi) della tossina nel plasma ma una sua lenta eliminazione (tempo di dimezzamento di circa 112 minuti). Infatti, dopo 1 minuto dall'iniezione il 94% della tossina era distribuita in tutti gli organi e dopo 30 minuti il fegato ne conteneva il 16%, il muscolo scheletrico il 70%, il tratto gastrointestinale l'8%, mentre nel cuore, reni, testicoli, cervello, polmone e milza la concentrazione non era superiore a 1,5% per ogni organo. Dopo 24 ore dal trattamento la tossina diminuiva del 20% nel muscolo scheletrico, rimaneva a concentrazione costante nel fegato, ma aumentava nello stomaco, nell'intestino e nelle feci, suggerendo che l'escrezione avvenga per via biliare. Al sesto giorno dal trattamento la concentrazione della tossina somministrata ai ratti diminuiva dell'86% ed era eliminata, sottoforma di prodotti metabolici più polari, con le urine e le feci in un rapporto di 1:5 [21].

Topi trattati con PbTXs per via intraperitoneale mostrano immediatamente sintomi d'irritabilità, seguiti da paralisi degli arti posteriori, dispnea, salivazione, lacrimazione, minzione, defecazione e insorgenza di morte per paralisi respiratoria. La LD_{50} delle PbTXs è stata calcolata in 0,050 mg/kg di peso corporeo per somministrazione intravenosa e 0,5 mg/kg p.c. per via orale o intraperitoneale [22,23].

Molti sono gli episodi documentati di fioriture di *Karenia brevis* che hanno determinato morie di pesci e di altri organismi marini, compresi gli uccelli che si nutrono di prodotti ittici che hanno accumulato le brevetossine. La contaminazione dell'ambiente è favorita dalla facilità con cui *K. brevis*, considerata una "microalga nuda", subisce lisi cellulare, rilasciando così le PbTXs prodotte al suo interno.

Brevetossine sono state associate anche alla morte di grandi mammiferi marini quali delfini, balene e lamantini. Infatti, nel 1996 lungo la costa sud-occidentale della Florida (USA) la morte di almeno 149 lamantini (*Trichechus latirostris manatus*) era associata ad una fioritura di *K. brevis* presente nella stessa area. Gli animali morti presentavano evidenti e gravi segni di congestione dell'apparato respiratorio (naso, faringe, polmoni), fegato, reni e cervello, facendo ipotizzare che la mortalità poteva essere non di tipo acuto ma cronico per inalazione e ingestione di cibo contaminato dalle PbTXs [24].

Alcuni studi su delfini della specie *Tursiops truncatus*, nella parte orientale del Golfo del Messico (USA), area soggetta a fioriture di *K. brevis*, hanno evidenziato la presenza di brevetossine nelle urine (2 ng PbTX3 eq./g) e nel contenuto gastrico (9 ng PbTX3 eq./g), mentre nelle feci la concentrazione variava da 45 a 23 ng PbTX3 eq./g. [25].

L'azione tossica delle PbTXs sui pesci si esplica sia per via orale, con l'assunzione di cibo contaminato, ma soprattutto attraverso il contatto delle branchie con le molecole di

tossine disperse nell'acqua. Quest'ultimo è il caso delle estese morie di pesci che molto spesso si accompagnano alla fioritura di *K. brevis*.

Pesci onnivori (*Logadon rhomboides* e *Micropogonias undulatus*) mantenuti per 28 giorni in acquario ed alimentati fino al 14° giorno con polpa edibile di bivalvi (*Mercenaria mercenaria*) contaminati con PbTXs non morivano. Le analisi su alcuni pesci, prelevati dopo il 7° e il 14° giorno dall'inizio dell'esperimento, mostravano un accumulo crescente delle PbTXs nei visceri e nei muscoli. La massima concentrazione delle PbTXs si riscontrava in *L. rhomboides* con 2.233 ± 442 ng/g nei visceri e 1.412 ± 151 ng/g nei muscoli, mentre per *M. undulatus* la concentrazione della tossina era rispettivamente di 1.990 ± 166 ng/g e 955 ± 73 ng/g. Un esperimento analogo è stato condotto su pesci planctofagi della specie *Mugil cephalus* (di 3-4 cm); in un primo caso sono stati sottoposti ad osservazione per 24 ore in acquari contaminati con *K. brevis* alle concentrazioni di 500, 1.000, 2.000 e 4.000 cell/mL (concentrazioni molto simili a quelle riscontrate durante le fioriture della stessa microalga nel Golfo del Messico) e facendo molta attenzione a non provocare la lisi microalgale. Contemporaneamente, in altri acquari, i pesci erano collocati in vasche con la stessa concentrazione di microalghe ma preventivamente lisate. Le analisi degli organi viscerali e del tessuto muscolare mostravano, per i pesci trattati con microalghe integre, una concentrazione di PbTXs, già evidente dopo le prime 6 ore di trattamento, maggiore nei visceri rispetto ai muscoli. La concentrazione media delle PbTXs negli organi viscerali di tutti i pesci trattati alle diverse concentrazioni microalgali era, dopo le 24 ore, di 616 ng/g, mentre nel tessuto muscolare la concentrazione media era di 333 ng/g. Nei pesci trattati con cellule lisate la morte era talmente rapida (7-70 minuti) da impedire alla tossina di essere accumulata nei vari organi o tessuti [26].

Su numerosi pesci (138 esemplari) di 32 specie diverse, con differenti abitudini alimentari, raccolti durante le fioriture di *K. brevis*, si sono riscontrate concentrazioni molto elevate di brevetossine: nel fegato di *Lutjanus campechanus*, pesce carnivoro, 16.000 ng/g; nel contenuto stomacale di *Cynoscion nebulosus* (anch'esso carnivoro) 3.955 ng/g; in *Harengula jaguana*, una sardina che si nutre di plancton, le PbTXs nel contenuto stomacale erano 2.839 ng/g.

Nei tessuti muscolari, parte edibile per eccellenza, dei pesci analizzati, le PbTXs non superavano i 581 ng/g (valore massimo riscontrato in *Sardinella aurita*, specie planctofoga) [26].

Queste indagini confermano, ancora una volta, che l'eviscerazione dei pesci prima del loro consumo è un'ottima pratica igienico-sanitaria per prevenire o diminuire i rischi d'intossicazione umana da biotossine marine.

L'ittiotossicità delle PbTXs è stata misurata anche tramite *biotest* di laboratorio, utilizzando pesci delle specie *Gambusia affinis*, *Poecilia sphenops* e *Brachydanio rerio*. Le dosi letali di alcune brevetossine, espresse in nanomoli (nM), e la loro potenza tossica, espressa in LC₅₀ (concentrazione della tossina che provoca nelle 24 ore la morte del 50% degli organismi utilizzati nella prova) sono riportate in Tab.1.

Tab. 1. Comparazione del grado di tossicità tra PbTXs a struttura A e PbTXs a struttura B.

PbTXs	LC ₅₀ (nM)
Struttura tipo A	
PbTX-1	3-4
PbTX-7	4-5
PbTX-10	Non disponibile
Struttura tipo B	
PbTX-2	16-25
PbTX-3	10-37
PbTX-8	30
PbTX-9	35

Nei pesci i sintomi d'intossicazione da brevetossine si manifestano con torsioni violente, nuoto in circoli molto ristretti (a cavatappi), defecazione, rigurgito, paralisi delle pinne pettorali, curvatura della pinna caudale, perdita di equilibrio, quiete, vasodilatazione ed infine convulsioni che precedono la morte, che insorge per gravi danni respiratori. Le brevetossine riferibili alla struttura "A" evidenziano una potenzialità tossica maggiore di quelle con struttura "B" e questo non sembra fare riferimento alla loro natura idrofobica [27].

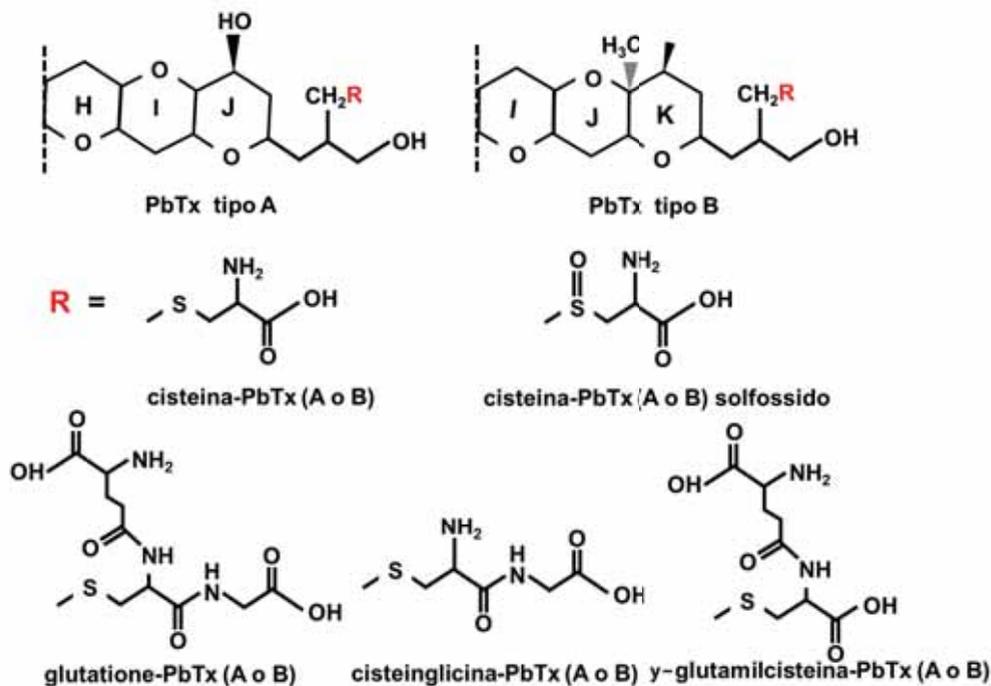
L'accumulo di PbTXs nei bivalvi sembra avvenire senza creare evidenti problemi alla loro salute. Tuttavia, in allevamenti di cappesante (*Argopecten irradians concentricus*) di alcune aree costiere del North Carolina, interessate da dicembre 1987 alla fine di gennaio 1988 da fioriture di *Karenia brevis*, sono state documentate anomale morie di bivalvi adulti e di novellame. Altri bivalvi, come *Mercenaria mercenaria* e *Crassostrea virginica*, raccolti in quelle stesse aree, non evidenziavano mortalità anomala [28].

In un esperimento sono stati alimentati con *Karenia brevis* 4 esemplari giovanili di molluschi bivalvi di alcune specie caratteristiche della Florida, per verificare se si evidenziavano anomalie riferibili ad effetti tossici della microalga. L'esperimento mostrò che i pectinidi *Argopecten irradians* subivano una riduzione del tasso d'alimentazione del 79% rispetto al controllo, in *Crassostrea virginica* ci fu una riduzione del 38% mentre per *Perna viridis* (cozza verde) e *Mercenaria mercenaria* la riduzione assunse un valore intermedio ai primi due. Questi dati documentavano che i pectinidi (*Argopecten irradians*) erano più sensibili agli effetti della microalga *Karenia brevis* [29]. Tuttavia, non era chiaramente dimostrato che questi comportamenti anomali sul tasso di alimentazione dei bivalvi fosse attribuibile alle brevetossine.

I molluschi bivalvi sono capaci di accumulare concentrazioni di brevetossine tali da creare seri disturbi neurotossici (NSP) alle persone. Ostriche della specie *Crassostrea gigas*, mantenute per un periodo di 24 ore in acquario con *Karenia brevis* alla concentrazione di $10\text{-}25 \times 10^6$ cell/ostrica, sono in grado di accumulare dalle 25 alle 100 UT di PbTXs/100 g p.e. Bivalvi naturalmente esposti a *K. brevis* possono accumulare anche centinaia di UT/100g p.e.: *Donax variabilis* 550 UT [30]; *Mercenaria campechiensis* 270 UT [30]; *Crassostrea virginica* 180 UT [31]; *Crassostrea gigas* 146 UT [32]; *Macrocallista nimbosa* 140 UT [30]; *Chione cancellata* 95 UT [33]; *Mercenaria mercenaria* 69 UT [32]. Una unità topo (UT) è quella quantità di residuo di estratto lipidico grezzo di bivalvi, iniettato per via intraperitoneale, che in media uccide il 50% degli animali test (topi di 20 g) in 930 minuti [34]. Sulla base sperimentale di un LD₅₀ (i.p.) per PbTX2 e PbTX3 è stato ipotizzato che 1 UT corrisponde a 4 µg equivalenti di PbTX2 [23]. Attualmente per la NSP il limite che stabilisce l'edibilità dei bivalvi è stato fissato, in alcuni Paesi, in 20 UT/100g p.e. ovvero 800 µg/kg p.e. [35].

Alcune ricerche hanno dimostrato che le PbTXs rapidamente accumulate in *Crassostrea virginica* sono poi metabolizzate ed eliminate molto lentamente. Nei bivalvi le brevetossine si ritrovano principalmente sottoforma di metaboliti [36,37]. Infatti, in ostriche la PbTX2 assorbita dalle microalghe è ampiamente metabolizzata in PbTX3 e in due cisteine coniugate chiamate cisteina-PbTX e cisteina-PbTX solfossido. Altri metaboliti coniugati sono stati individuati e vedono implicato il glutazione e una serie di aminoacidi coniugati (Fig.4) [38,37,39,40].

Fig. 4. Strutture di brevetossine e loro metaboliti rilevati con analisi chimica LC/MS [40].



Ostriche naturalmente esposte ad una fioritura di *K. brevis* sono risultate tossiche (*mouse test*) dopo 75 giorni dalla fine della fioritura [36]. In prove di laboratorio le ostriche conservavano i metaboliti di PbTX2 per molto tempo e la loro tossicità era rilevata per un periodo di 6 mesi [38].

12.3.2 Tossicità nell'uomo

Similmente a quanto avviene per i mammiferi marini, anche l'uomo può essere intossicato dalle PbTXs; ciò avviene principalmente attraverso due vie: tramite il consumo di prodotti ittici, soprattutto molluschi bivalvi, e per inalazione.

12.4 Intossicazione da consumo di molluschi bivalvi (NSP)

Nel caso di consumo di prodotti ittici contaminati (soprattutto molluschi bivalvi), l'intossicazione, conosciuta come *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP), si può manifestare dai 15 minuti fino alle 18 ore dopo l'ingestione; i sintomi possono durare da 1 ora fino ad un massimo di 18 ore (di solito mai oltre le 24 ore). Tuttavia, l'avvelenamento da brevetossine è considerato un evento poco frequente e la sintomatologia non è sempre indagata scientificamente [41]. Fra gli episodi di NSP più documentati ci sono:

quelli avvenuti in Nuova Zelanda dal 1992 al 1993, con oltre 180 casi segnalati nel corso di diverse settimane; quello occorso negli Stati Uniti (1987) nella Carolina del Nord [42,43]. Nei casi della Nuova Zelanda i bivalvi incriminati (mitili, vongole e ostriche) contenevano, oltre a PbTXs, anche altri gruppi di tossine.

I sintomi da NSP sono generalmente di natura gastrointestinale, con dolori addominali (48%), nausea (44%), diarrea (33%) vomito (10%). Sono noti anche sintomi di natura neurologica, come parestesia al volto, al tronco, agli arti (81%), mialgia (13%), atassia (27%), vertigini (60%), debolezza motoria (31%) e inversione della sensazione caldo/freddo (17%). Altri sintomi, ma poco comuni, includono tremore (6%), disfagia, bradicardia, diminuzione dei riflessi e midriasi [43]. Questa sindrome presenta sintomatologie molto simili a quelle della CFP (*Ciguatera Fish Poisoning*), ma non presenta aspetti di accumulo della tossina nell'organismo umano e di cronicità dei sintomi, anche se i due gruppi di tossine interagiscono sullo stesso sito nei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti. La gravità dei sintomi da NSP è considerata lieve rispetto a quella da PSP e da CFP, se non ci sono già in atto nella persona intossicata altre patologie che possono magnificare la gravità dei sintomi; in ogni caso, non sono mai stati registrati casi di morte [44,45].

Il rischio maggiore per i consumatori di prodotti ittici è dovuto al consumo di molluschi bivalvi; quelli maggiormente implicati nella sindrome da NSP sono: vongole, ostriche e mitili. La concentrazione delle PbTXs nelle ostriche implicate in alcuni casi d'intossicazione umana è compresa tra 35 e 60 UT per 100 g p.e. (1.400-2.400 µg PbTX2 eq./kg p.e.), con un numero di ostriche consumate, in alcuni casi, di 12 [43]. Ulteriori indagini hanno rilevato che le ostriche raccolte nell'area di pesca incriminata presentavano una concentrazione di brevetossine da 48 a 170 UT (1.720-6.800 µg PbTX2 eq./kg p.e.).

In questi ultimi anni nello Stato della Florida, una delle aree più colpite dalle fioriture di *K. brevis*, gli eventi registrati di NSP sono stati pochi ed hanno interessato un numero molto esiguo di persone (2 casi nel 1995, 3 casi nel 1996, 2 casi nel 2001 e 4 nel 2005) [46]. Questo dimostra l'efficacia dell'azione preventiva (monitoraggio) che l'Autorità competente ha messo in atto per il controllo dell'idoneità dei bivalvi prima di destinarli al consumo umano.

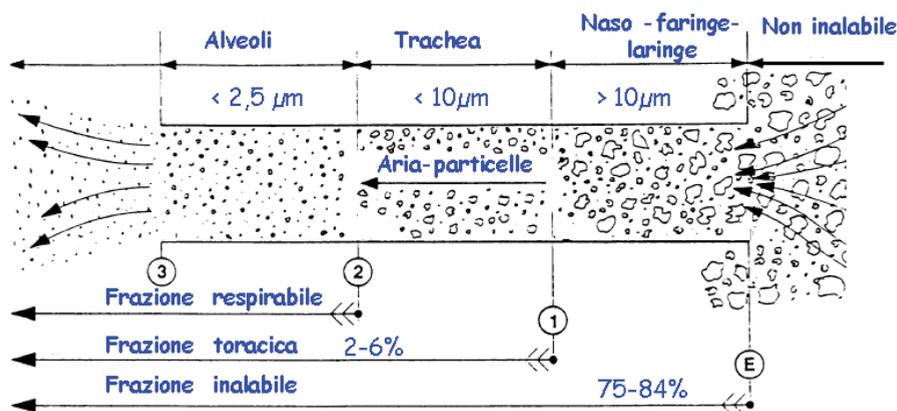
12.5 Associate a disturbi respiratori

La microalga *Karenia brevis*, responsabile di massicce fioriture, ha una teca piuttosto fragile che l'azione meccanica del vento può facilmente rompere favorendo il rilascio delle PbTXs nell'acqua di mare. L'intensità della fioritura, congiunta all'azione del vento, può far sì che le PbTXs si trasferiscano nell'aerosol marino, fino a raggiungere una concentrazione tale da determinare seri disturbi respiratori nelle persone che soggiornano lungo la costa. Inoltre, l'azione dei raggi ultravioletti può modificare il profilo tossicologico delle PbTXs e di altri composti biologicamente attivi [47]. La prima segnalazione che metteva in relazione le tossine trasportate nell'aerosol marino con disturbi respiratori alle persone, risale al 1948 [48] e da quel momento, vista la rilevanza del numero delle persone coinvolte, numerosi ricercatori hanno cercato di definire meglio il rischio associato alle fioriture di questa microalga. Le persone esposte ad aerosol marino a media o alta concentrazione di brevetossine (da 36 ad 80 ng/m³) manifestano sintomi associati ad irritazione della parte superiore della via respiratoria (lacrimazione, congestione nasale, irritazione alla gola, tosse) e della parte inferiore (oppressione toracica, respiro sibilante e affannoso). Altri sintomi documentati sono prurito e cefalea [49]. Dallo studio dei dati epidemiologici si evince che anche basse

concentrazioni di PbTXs ($3-4 \text{ ng/m}^3$) possono far insorgere i primi sintomi d'irritazione della via respiratoria superiore (tosse, irritazione della gola e prurito agli occhi) [50]. Studi sulle particelle microalgali rinvenute nell'aerosol marino durante le fioriture di *K. brevis*, hanno evidenziato che la frazione inalabile più consistente (75-84%, di dimensioni superiori ai $10 \mu\text{m}$) si deposita nella regione extratoracica (naso, faringe, laringe), mentre un'altra frazione (2-6%, di dimensioni inferiori ai $10 \mu\text{m}$) si deposita nella regione tracheobronchiale (Fig.5) [51].

Fig. 5. Classi di frequenza del particolato microalgale in aerosol marino e penetrabilità delle particelle lungo le vie respiratorie umane.

Disturbi per aerosol Penetrabilità delle particelle



Aerosol - Classi di frequenza particolato algale		
1°	3 – 10 μm	
2°	10 – 25 μm	
3°	1,3 – 3 μm	
4°	0,5 – 1,3 μm	

A tale proposito, cavie *Guinea pigs* Hartley, trattate con PbTX3 veicolata per inalazione e gocce depositate sulle narici, mostrano una forte resistenza delle vie aeree [52]. Gli effetti (broncospasmi) indotti da brevetossina possono essere efficacemente bloccati da atropina, da cromolin sodico (un inibitore della degranolazione dei mastociti) e clorfenamina istamina H1 antagonista [53,54]. L'effetto della brevetossina sui mastociti, i più importanti produttori di istamina nelle vie aeree, può spiegare in parte i disturbi respiratori alle persone, con una maggiore incidenza di attacchi di asma per quelle già sofferenti di questa patologia. Ne scaturisce la raccomandazione alle persone asmatiche o con altre malattie respiratorie (es. broncopneumopatia cronica ostruttiva) di non soggiornare per molto tempo sulla spiaggia quando è in atto una fioritura evidente di microalghie produttrici di aerosol con brevetossine (marea rossa) [53,55,56].

12.6 Eziologia

La Dinofitea *Karenia brevis* (ex *Gymnodinium breve*, ex *Ptychodiscus brevis*) è la microalga che maggiormente è in grado di produrre PbTXs, neurotossine capaci di provocare mortalità diffusa, durante le maree colorate (Golfo del Mexico, Mar dei Caraibi e Nuova Zelanda), di organismi marini e uccelli marini, creando gravi danni all'economia ittica e a quella turistica. *Karenia brevis* ha un diametro di 20-40 μm , possiede una teca relativamente fragile che, all'azione del moto ondoso, si sgretola facilmente liberando nell'acqua le tossine contenute nel citoplasma. Numerose altre specie del genere *Karenia* possono produrre brevetossine; fra queste: *K. mikimotoi*, *K. brevisulcata*, *K. selliformis* (Fig.5), *K. papilionacea* (Fig.6), *K. bicuneiformis*, *K. concordia*. Produzione di brevetossine è stata attribuita anche a *Chattonella* cf. *verruculosa* una Rafidofitea implicata nel 2000 in una grande moria di pesci (Delaware, USA). Campioni della fioritura della microalga (con una concentrazione di circa 10^7 cell/L) contenevano elevati livelli di brevetossine (PbTX2, PbTX3, PbTX9) [57]. Attualmente questa microalga è stata attribuita ad un altro taxon: appartiene alle Dictiocofitee con il nome di *Pseudochattonella verruculosa* [58]. Sulla capacità di microalghe appartenenti alle Rafidofitee (*Chattonella* spp., *Heterosigma* spp., *Fibrocapsa* spp.) di produrre BTXs ancora non si è giunti a conclusioni certe [59].

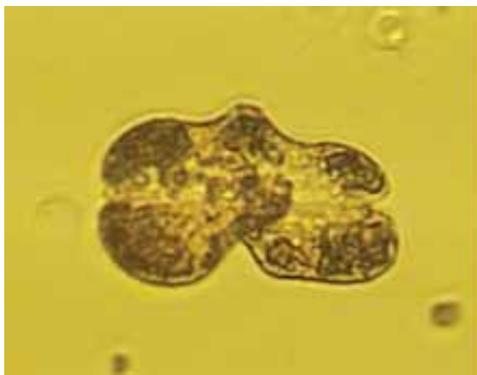


Fig. 5. *Karenia* cf. *papilionacea*
(dimensioni: 18-48 μm larghezza, 18-32 μm altezza) [60].
(Foto CRM, Cesenatico)

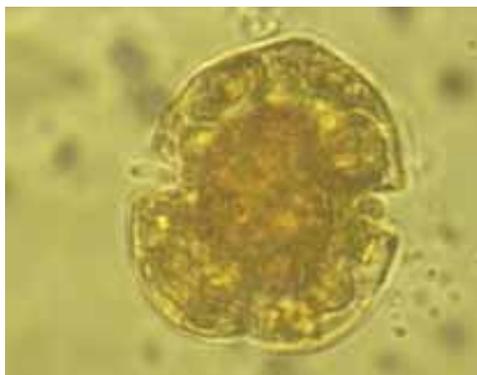


Fig. 6. *Karenia* cf. *selliformis*
(dimensioni: 16-30 μm larghezza, 20-30 μm altezza) [60].
(Foto CRM, Cesenatico)

12.7 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da BTXs

In Tab.3 è schematizzata la valutazione del rischio quando si hanno prodotti ittici contaminati da brevetossine.

Tab. 3. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da brevetossine.

Distribuzione	Tossina ritrovata in microalghe e molluschi bivalvi in: Australia, Nuova Zelanda ed U.S.A.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Rapido assorbimento e distribuzione in tutto il corpo, incluso il SNC. Vengono metabolizzate nel fegato. Nel plasma hanno un tempo di dimezzamento inferiore ad 1 minuto, nel resto del corpo la scomparsa avviene in circa 6 giorni. Sono eliminate a livello di feci e bile.
Meccanismo d'azione	Le PbTXs, contrariamente a quanto avviene per la tetrodotossina e la saxitossina che occludono il canale del Na ⁺ nelle cellule nervose impedendo il passaggio degli ioni e quindi la trasmissione nervosa, agiscono aumentando la conduttanza dello ione Na ⁺ attraverso una diminuzione della soglia del potenziale d'azione e una ritardata chiusura del canale, prolungando in questo modo la depolarizzazione della cellula nervosa. L'attivazione dei canali del Na ⁺ voltaggio-dipendenti e la conseguente depolarizzazione delle terminazioni nervose, causa il rilascio dei neurotrasmettitori nella zona sinaptica, provocando eccitazione neuronale e una grande varietà di risposte degli organi effettori.
Tossicità negli animali (topo)	Per i.p.: PbTX1 LD50 100 µg/kg p.c.; PbTX2 LD50 200 µg/kg p.c.. Per os: LD ₅₀ varia da 500 µg/kg p.c. (PbTX3) a 6.600 µg/kg p.c.(PbTX2). PbTXs sono tossiche per pesci, uccelli e mammiferi marini.
Tossicità nell'uomo (per os)	Nei pochi casi umani di intossicazione NSP, la concentrazione di brevetossine variava da 300 a 1.180 UT/ Kg p.e. (vale a dire 1.200- 4.720 µg PbTX3). Sulla base di intossicazione da NSP in una persona di 60 kg di peso che ha consumato circa 100-150 g di bivalvi con 1.200 µg PbTX3 eq./kg p.e., è stata stimata una esposizione di 2-3 µg PbTX3 eq./kg di peso corporeo.
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	I dati sulla tossicità, per via orale, delle brevetossine sono a tutt'oggi insufficienti per la determinazione di un ARfD.
Limite di Legge	In alcuni Stati il limite di legge è stato fissato in: 200 UT/kg p.e. (800 µg PbTX-2 eq./kg p.e.) [35]

Nel 2008 il CODEX STAN 292-2008 ha indicato nuovi limiti per le biotossine marine nei molluschi bivalvi; per il gruppo delle brevetossine è stato indicato un limite di 200 UT/kg p.e. o equivalenti [61].

12.8 Bibliografia

1. Walker S.T., 1884. *Fish Mortality in the Gulf of Mexico*. Proc. U.S. Nat. Mus. 6(6): 105-109.
2. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission. Red Tides in Florida: Harmful Algal Bloom Historical Database, Version 2.0; 1954-2002 (CD-ROM); St. Petersburg, Florida, 2001.
3. Heil C.A., Reich A., 2005. *Recreational Water and Harmful Algal Blooms in Florida*. In Conference on Promoting Public Health Through Safe Water, Orlando, FL, USA, January 2005.
4. Lin Y.Y., Risk M., Ray S.M., Vanengen D., Clardy J., Golik J., James J.C., Nakanishi K. 1981. *Isolation and structure of brevetoxin-B from the red tide dinoflagellate Ptychodiscus brevis (Gymnodinium breve)*. Journal of the American Chemical Society, 103(22): 6773-6775.
5. Rein K.S., Baden D.G. and Gawley R.E., 1994. *Conformational analysis of the sodium-channel modulator brevetoxin-A, comparison with brevetoxin-B conformations, and a hypothesis about the common pharmacophore of the site-5 toxins*. Journal of Organic Chemistry, 59: 2101-2106.
6. Gawley R.E., Rein K.S., Jeglisch G., Adams D.J., Theodorakis E.A., Tiebes J., Nicolaou K.C., Baden D.G., 1995. *The relationship of brevetoxin "length" and A-ring functionality to binding and activity in neuronal sodium channels*. Chemistry & Biology, 2(8): 533-541.
7. Lee M.S., Qin G., Nakanishi K. and Zagorski M.G., 1989. *Biosynthetic Studies of brevetoxins, Potent Neurotoxins produced by the Dinoflagellate Gymnodinium breve*. J. Am. Chem. Soc., 111(16): 6234-6241.
8. Baden D.G., Bourdelais A.J., Jacocks H., Michelliza S. and Naar J., 2005. *Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects*. Environ. Health Perspect., 113(5): 621-625.
9. Bourdelais A.J. and Baden D.G., 2004. *Toxic brevetoxin complexes are in aqueous solutions*. Abstract. Toxicologist, 78(1-S): 807.
10. Catterall W.A., Risk M., 1981. *Toxin T₄₆ from Ptychodiscus brevis (Formerly Gymnodinium breve). Enhances Activation of Voltage-Sensitive Sodium Channels by Veratridine*. Molecular Pharmacology, 19(2): 345-348.
11. Catterall W.A., Gainer M., 1985. *Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel*. Toxicon, 23(3): 497-504.
12. Poli M., Mende T.J., Baden D., 1986. *Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels bind to specific sites in rat synaptosomes*. Mol. Pharmacol., 30(2): 129-135.
13. Risk M.A., Norris J.P., Coutinho-Netto J., Brandford H.F., 1982. *Actions of Gymnodinium breve red tide toxin on metabolic and transmitter-releasing properties of synaptosomes*. J. Neurochem, 39:1485-1488.
14. Ogata N. and Ohishi Y., 2002. *Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na⁺ Channels*. Jpn. J. Pharmacol., 88(4): 365-377.
15. Poli M.A., Musser S.M., Dickey R.W., Eilers P.P. and Hall S., 2000. *Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: a case study from Florida*. Toxicon, 38(7): 981-993.
16. Huang, J.M.C., Wu, C.H., Baden, D.G. 1984. *Depolarizing Action of a Red-tide Dinoflagellate Brevetoxin on Axonal Membranes*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 229: 615-621.
17. Gawley R.E., Rein K.S., Kinoshita M., Baden D., 1992. *Binding of brevetoxins and*

- ciguatoxin to the voltage-sensitive sodium channel and conformational analysis of Brevetoxin B*. *Toxicon*, 30: 780–785.
18. Jeglitsch G., Rein K., Baden D.G., Adams D.J., 1998. *Brevetoxin (PbTx-3) and its derivatives modulate single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat sensory neurons*. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 284: 516–525.
 19. Berman F.W. and Murray T.F., 1999. *Brevetoxins Cause Acute Excitotoxicity in Primary Cultures of Rat Cerebellar Granule Neurons*. *JPET*, 290(1): 439–444.
 20. LePage K.T., Baden D.G., Murray T.F., 2003. *Brevetoxin derivatives act as partial agonists at neurotoxin site 5 on the voltage gated Na⁺ channel*. *Brain Res.*, 959(1): 120-27.
 21. Poli M.A., Templeton C.B., Pace J.G., Hines H.B., 1990. *Detection, metabolism, and pathophysiology of brevetoxins*. In *Marine Toxins: Origins, Structure and Pharmacology*; Hall, S., Strichartz, G., Eds.; American Chemical Society, ACS Symposium Series: Washington, DC, USA, 1990; Volume 418, pp. 176-191.
 22. Trieff N.M., Ramanujam V.M.S., Alam M., Ray S.M. and Hudson J.E., 1975. *Isolation, physicochemical, and toxicologic characteristics of toxins from *Gymnodinium breve* Davis*. Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms (LoCicero, V.R., ed) pp. 309-321, Massachusetts Scientific Technical Foundation, Wakefield.
 23. Baden D.G., and Mende T.J., 1982. *Toxicity of two toxins from the Florida's red tide dinoflagellate *Ptychodiscus brevis**. *Toxicon*, 20: 457-462.
 24. Bossart G.D., Baden D.G., Ewing R.Y., Roberts B., Wright S.D., 1998. *Brevetoxicosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 epizootic: gross, histologic, and immunohistochemical features*. *Toxicol. Pathol.*, 26(2): 276-282.
 25. Van Dolah F.M., Doucette G.J., Gulland F.M.D., Rowles T. and Bossart G.D., 2003. *Impacts of algal toxins on marine mammals*. In: J.G. Vos, G.D. Bossart, M. Fournier and T. J. O'Shea, eds. *Toxicology of marine mammals*. Taylor and Francis, New York, pp. 247-269.
 26. Naar J.P., Flewelling L.J., Lenzi A., Abbott J.P., Granholm A., Jacocks H.M., Gannon D., Henry M., Piercec R., Baden D.G, Wolny J. and Landsberg J.H., 2007. *Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish*. *Toxicon*, 50(5): 707–723.
 27. Baden G.D., 1989. *Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins*. *The FASEB Journal*, 3: 1807-1817.
 28. Summerson H.C. and Peterson C.H., 1990. *Recruitment failure of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*, during the first red tide, *Ptychodiscus brevis*, outbreak recorded in North Carolina*. *Estuaries and Coasts* 13(3): 322-331.
 29. Leverone J.R., Sandra E., Shumway S.E. , Blake N.J., 2007. *Comparative effects of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on clearance rates in juveniles of four bivalve molluscs from Florida, USA*. *Toxicon*, 49: 634–645
 30. Cummins J.M., Jones A.C., Stevens A.A., 1971. *Occurrence of toxic bivalve molluscs during a *Gymnodinium breve* "red tide"*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1: 112–116.
 31. Tester P.A., Fowler P.K., 1990. *Brevetoxin contamination of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*: A management issue*. In: Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.). Proceedings of the 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Academic Press, New York, pp. 499–503.
 32. Pierce R.H., Henry M.S., Dickey R., Plakas S., 2004. *NSP Toxins and metabolites in oysters, clams, and whelks*. *Harmful Algae 2002*. Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R. and Vargo, G.A. (Eds.). Florida Fish and Wildlife Conservation Commission

- and International Oceanographic Commission of UNESCO, p. 294-296.
33. Steidinger K.A., Carlson P., Baden D.G., Rodriguez C., Seagle J., 1998. *Neurotoxic shellfish poisoning due to toxin retention in the clam Chione cancellata*. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, Xunta de Galicia, Spain, pp. 457–458.
 34. APHA. 1970. *Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish*. 4. American Public Health Association, Washington, DC, USA. *Method for the bioassay of Gymnodinium breve toxin(s) in shellfish*; pp. 61–66.
 35. U.S. Food and Drug Administration. 2001. *Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance*. 3rd Edition. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, US Food and Drug Administration; Rockville, MD, p. 74.
 36. Dickey, R., Jester E., Granade R., Mowdy D., Moncreiff C., Rebarchik D., Robl M., Musser S., Poli M., 1999. *Monitoring brevetoxins during a Gymnodinium breve red tide: comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay for determination of neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts*. *Natural Toxins*, 7(4): 157-165.
 37. Wang Z., Plakas S.M., El Said K.R., Jester E.L.E., Granade H.R., Dickey R.W., 2004. *LC/MS analysis of brevetoxin metabolites in the Eastern oyster (Crassostrea virginica)*. *Toxicon*, 43: 455–465.
 38. Plakas S.M., El Said K.R., Jester E.L.E., Granade H.R., Musser S.M., Dickey R.W., 2002. *Confirmation of brevetoxin metabolism in the Eastern oyster (Crassostrea virginica) by controlled exposures to pure toxins and to Karenia brevis cultures*. *Toxicon*, 40: 721–729.
 39. Morohashi A., Satake M., Murata K., Naoki H., Kaspar H.F., Yasumoto T., 1995. *Brevetoxin B3, a new brevetoxin analog isolated from the greenshell mussel Perna canaliculus involved in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand*. *Tetrahedron Lett.*, 36(49): 8995–8998.
 40. Plakas S.M., Wang Z., El Said K.R., Jester E.L.E., Granade H.R., Flewelling L., Scott P., Dickey R.W., 2004. *Brevetoxin metabolism and elimination in the Eastern oyster (Crassostrea virginica) after controlled exposures to Karenia brevis*. *Toxicon*, 44: 677–685.
 41. Fleming L.E., Backer L., Rowan A., 2001. *The epidemiology of human illness associated with harmful algal blooms*. In: *Handbook of Neurotoxicity* Vol. 1, Massaro, E.J., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, USA; pp. 365-384.
 42. Todd K., 2002. *A Review of NSP Monitoring in New Zealand in Support of a New Programme*. Cawthron Report No. 660; Cawthron Institute: Nelson, New Zealand.
 43. Morris P.D., Campbell D.S., Taylor T.J. Freeman J.I., 1991. *Clinical and Epidemiological Features of Neurotoxic Shellfish Poisoning in North Carolina*. *Am. J. Pub. Health*, 81: 471-473.
 44. Kirkpatrick B., Fleming L.E., Squicciarini D., Backer L.C., Clark R., Abraham W., Benson J., Cheng Y.S., Johnson D., Pierce R., Zaias J., Bossart, G.D., Baden D.G., 2004. *Literature review of Florida red tide: implications for human health effects*. *Harmful Algae*, 3(2): 99–115.
 45. Watkins S.M., Reich A., South R., Terzagian R., Hammond R., Blackmore C., Flewelling L., Plakas S.M., Abraham A., Dickey R.W., Landsberg J., 2007. *Features of neurotoxic shellfish poisoning from recreationally harvested clams in Florida, 2006: epidemiologic and clinical factors*. 135th Annual Meeting and Exposition. American Public Health Association.
 46. Terzagian R., 2006. *Five Cluster of Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) in Lee County*,

- July 2006. Florida Department of Health Epi Updates, October 20.
47. Pierce R.H., Henry M.S., Blum P.C., Hamel S.L., Kirkpatrick B., Cheng Y.S., Zhou Y., Irvin C.M., Naar J., Weidner A., Fleming L.E., Backer L.C., Baden D.G., 2005. *Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins*. Harmful Algae, 4: 965–972
 48. Woodcock A.H., 1948. *Note concerning human respiratory irritation associated with high concentrations of plankton and mass mortality of marine organisms*. J. Marine Res., 7: 56–62.
 49. Backer L.C., Fleming L.E., Rowan A., Cheng Y.S., Benson J., Pierce R.H., Zaias J., Beang J., Bossart G.D., Johnson D., Quimbo R., Baden G.D., 2003. *Recreational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events*. Harmful Algae, 2:19–28.
 50. Cheng Y.S., Villareal T.A., Zhou Y., Gao J., Pierce R.H., Wetzel D., Naar J., Baden D.G., 2005. *Characterization of red tide aerosol on the Texas coast*. Harmful Algae, 4: 87–94
 51. Cheng Y.S., Zhou Y., Irvin C.M., Pierce R.H., Naar J., Backer L.C., Fleming L.E., Kirkpatrick B. and Baden D.G., 2005. *Characterization of Marine Aerosol for Assessment of Human Exposure to Brevetoxins*. Environ. Health Perspect., 113(5): 638-643.
 52. Wells J.H., Lerner M.R., Martin D.F., Strecker R.A., Lockey R.F., 1984. *The effect of respiratory exposure to red tide toxin on airway resistance in conscious Guinea pigs*. J. Allergy Clin. Immunol., 73(1): 128.
 53. Abraham W.M., Bourdelais A.J., Ahmed A., Sereberiaikov I., Baden D.G., 2005. *Effects of inhaled brevetoxins in allergic airways: toxin–allergen interactions and pharmacologic intervention*. Environ. Health Perspect., 113: 632–637.
 54. Singer L.J., Lee T., Rosen K.A., Baden D.G., Abraham W.M., 1998. *Inhaled Florida red tide toxins induce bronchoconstriction (BC) and airway hyperresponsiveness (AHR) in sheep*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157(3): A158.
 55. Fleming L.E., Kirkpatrick B., Backer L.C., Bean J.A., Wanner A., Reich A., Zaias J., Cheng Y.S., Pierce R., Naar J., Abraham W.M., Baden D.G., 2007. *Aerosolized red-tide Toxins (Brevetoxins) and asthma*. Chest., 131(1): 187-194.
 56. Milian A., Nierenberg K., Fleming L.E., Bean J.A., Wanner A., Reich A., Backer L.C., Jayroe D., Kirkpatrick B., 2007. *Reported respiratory symptom intensity in asthmatics during exposure to aerosolized Florida red tide toxins*. J. Asthma., 44(7): 583-587.
 57. Bourdelais A.J., Tomas C.R., Naar J., Kubanek J., Baden D.G., 2002. *New Fish Killing Alga in Coastal Delaware Produces Neurotoxins*. Env. Health Perspect., 110: 465-470.
 58. Moestrup Ø. 2010. *Pseudochattonella verruculosa* (Hara & Chihara) Tanabe-Hosoi, Honda, Fukuya, Inagaki & Sako, 2007. Accessed through: Moestrup, Ø., Akselman, R., Cronberg, G., Elbraechter, M., Fraga, S., Halim, Y., Hansen, G., Hoppenrath, M., Larsen, J., Lundholm, N., Nguyen, L. N., Zingone, A. (Eds) (2010) IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae at <http://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=531446> on 2012-02-13.
 59. MacKenzie L., 2008. *Ecobiology of the Brevetoxin, Ciguatoxin, and Cyclic Imine Producers*. In: Botana, L.M. (Ed). 2008. Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection, Second Edition, CRC Press, pp. 430-476.
 60. Haywood A.J., Steidinger K.A., Truby E.W., Bergquist P.R., Bergquist P.L., Adamson J. and MacKenzie L., 2004. *Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus Karenia (Dinophyceae) from New Zealand*. Journal Phycology, 40: 165-179.
 61. CODEX STAN 292-2008 - Standard for live and raw bivalve molluscs.

Capitolo 13

Ciguatera Fish Poisoning (CFP)

Capitolo 13

Ciguatera Fish Poisoning (CFP)

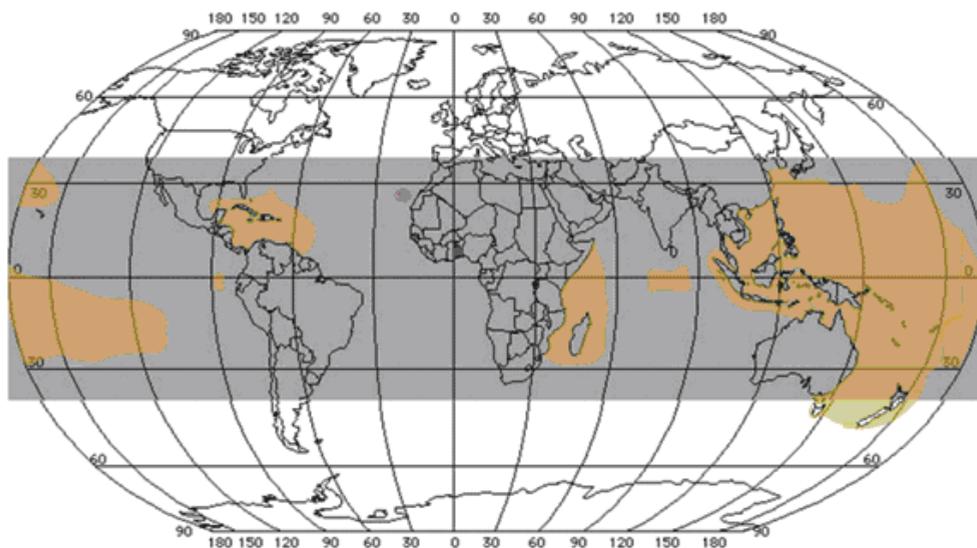
13.1 Introduzione

Ciguatera è un termine utilizzato per indicare l'intossicazione umana causata dal consumo di prodotti ittici che hanno accumulato ciguatossine. Tali composti sono prodotti dalla microalga *Gambierdiscus toxicus*, una Dinofitea bentonica che si trova come epifita su macroalghe o parti di coralli. Il legame tra la biointossicazione e la microalga fu stabilito nel 1977 quando un gruppo di ricercatori francesi e giapponesi, nel corso di una estesa epidemia di Ciguatera Fish Poisoning (CFP) per consumo di pesce, trovarono un considerevole numero queste microalghe in detriti raccolti nelle isole Gambier, nella Polinesia francese [1].

Il termine ciguatera è stato coniato nel 1787 nelle Antille spagnole a seguito di un avvelenamento per consumo del gasteropode marino *Livona pica*, comunemente chiamato dagli spagnoli "cigua". Tuttavia questo tipo di avvelenamento era già conosciuto nelle Indie Occidentali (America centrale), come riportato da Pietro Martyr de Anghera sin dal 1511, nell'Oceano Indiano come riportato da Harmansen nel 1601 e nei vari arcipelaghi dell'Oceano Pacifico [2,3,4].

Ciguatera indica ora il tipo d'avvelenamento (CFP) causato dal consumo di pesci sarcotossici e caratterizzato da manifestazioni gastrointestinali e neurotossiche.

Fig. 1. Distribuzione mondiale di ciguatera. La zona grigia indica le regioni della barriera corallina situata tra i 35° Nord e 35° Sud di latitudine; in marrone sono indicate le aree dove la ciguatera è considerata malattia endemica [5].



Si calcola che ogni anno il numero delle persone intossicate da CFP varia dalle 10.000 alle 50.000 e le regioni più colpite si trovano nella zona tropicale e subtropicale dell'Oceano Pacifico, dell'Oceano Indiano e del Mare dei Caraibi, tra la latitudine 35° N e 35° S (Fig.1). In quelle popolazioni dove la fonte principale di proteine è il pesce, l'incidenza annuale dell'intossicazione da ciguatossine (CTXs) è di circa il 10% [6,7]. Sebbene la CFP rappresenti una delle intossicazioni più importanti fra i consumatori di prodotti ittici, è stata a lungo piuttosto sottovalutata nei Paesi delle aree temperate (Europa ed America del Nord). Negli ultimi 10 anni, tuttavia, anche in queste aree gli episodi di intossicazione attribuibili a ciguatossine sono in aumento in relazione al consumo di pesce importato dalle zone a rischio così come sono sempre più frequenti le segnalazioni di sintomatologie riconducibili a ciguatossine da parte di persone rientrate da soggiorni in queste aree.

13.2 Struttura chimica

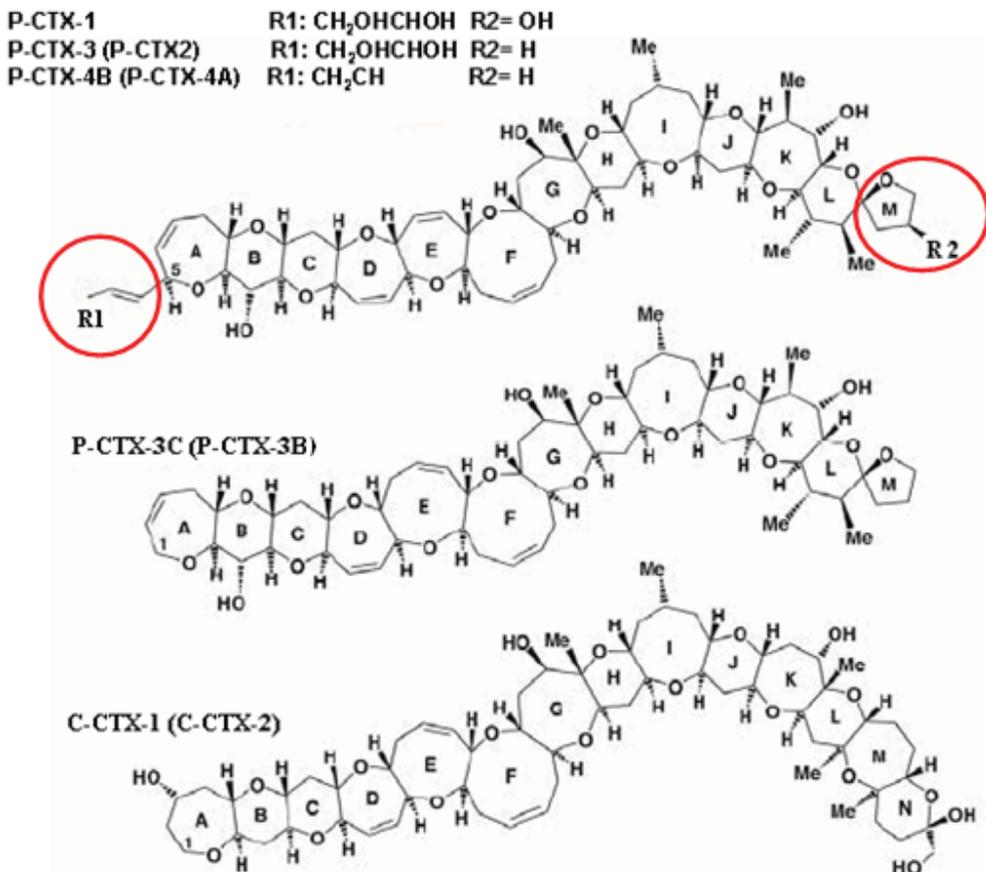
Le ciguatossine sono dei polieterei liposolubili costituiti da 13-14 anelli *trans*-fusi legati in una struttura per lo più rigida a forma di scala [8,9]. La caratterizzazione chimica è stata per molto tempo impedita dall'assenza di composti purificati. Inoltre nei pesci ciguatossici, oltre a basse concentrazioni di ciguatossine, sono presenti, molto spesso, altri tipi di tossine come acido okadaico, palitossina e maitotossina.

Un primo isolamento di ciguatossine in una forma non completamente pura è avvenuto da parte di ricercatori dell'Università delle Hawaii [10] dalla carne di murena (*Lycodontis javanicus*) e dal fegato di pesce chiamato comunemente red bass (*Lutjanus bohar*). Allo stato puro si presentano come una polvere bianca, solubile in metanolo, etanolo, propanolo ed acetone, scarsamente solubile in cloroformio e in etere etilico, quasi insolubile in acqua o in benzene, termostabile alle normali temperature di cottura dei pesci e relativamente stabile a condizioni medie di acidità o basicità. Differenti ciguatossine sono state isolate successivamente in pesci pescati nella zona del Pacifico e dei Caraibi (Fig 2): cinque diverse molecole da pesce pappagallo e nove da murena [11,12]. Quelle isolate e caratterizzate dai visceri di murena (*Lycodontis javanicus*) sono state proposte come CTX-1, 2 e 3 e sono quelle maggiormente presenti nelle carni edibili di pesci ciguatossici [9].

Sulla base della risonanza magnetica nucleare (NMR) e della spettrometria di massa (MS) la ciguatossina (CTX-1) ha un peso molecolare di $1.111,7 \pm 0,31$ e una formula $C_{60}H_{86}NO_{19}$ [13,14].

La ciguatossina (CTX-1) sembra avere come precursore la gambiertossina-4B (GTX-4B) prodotta dalla microalga *Gambieridiscus toxicus* insieme ad altri stereoisomeri come GTX-4A (52-epi-GTX-4B). In questa microalga sono state isolate altre 9 gambiertossine [15].

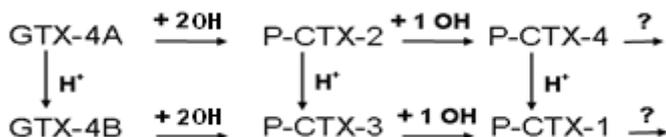
Fig. 2. Strutture di ciguatossine (CTXs) della zona del Pacifico (P) e dei Caraibi (C).



La bioconversione da gambiertossina a ciguatossina è stata studiata nel tratto gastrointestinale di pesci erbivori bentonici e in 2 specie di gasteropodi [16].

I ricercatori hanno suggerito che queste bioconversioni sono il prodotto del metabolismo ossidativo a livello dei citocromi del fegato del pesce e rendono più polare la molecola [13]. E' stato valutato che nella biotrasformazione della GTX-4B a CTX-1 vi è un aumento della potenza tossica di 10 volte [8].

Fig. 3. Bioconversione di gambiertossine in ciguatossine in pesci. Le frecce verticali indicano il processo di spiro isomerizzazione per catalisi acida [15].



Studi epidemiologici hanno suggerito che le ciguatossine dei Caraibi possono essere diverse da quelle del Pacifico o dell'Oceano Indiano, pertanto alcuni ricercatori hanno suggerito di introdurre una lettera per indicare e differenziare gli omologhi della ciguatossina isolati nell'Oceano Pacifico (P-CTX), nell'Oceano Indiano (I-CTX) e nel Mare dei Caraibi (C-CTX) [17,18].

Più di 20 congeneri di ciguatossine sono stati definiti e le modifiche strutturali riguardano le parti terminali della molecola [19,20].

Tab. 1. Caratteristiche strutturali e di tossicità definite di ciguatossine: dell'area del Pacifico (P-CTX), Caraibica (C-CTX) e dell'Oceano Indiano (I-CTX) [18].

Ciguatossine	Altra denominazione	Origine	Massa (Da)	i.p. LD ₅₀ ^a mg/kg p.c.
P-CTX-1	CTX, CTX-1B	Pesci carnivori	1110	0,25
P-CTX-2	52-epi P-CTX-3	Pesci carnivori	1094	2,3
P-CTX-3		Pesci carnivori	1094	0,9
P-CTX-3C		<i>G. toxicus</i>	1044	ND
2,3 diidrossi P-CTX-3C	CTX-2A1	Pesci carnivori	1056	1,8
5 idrossi P-CTX-3C		Pesci carnivori	1038	0,27
CTX-4A ^b	52-epi GT-4B	<i>G. toxicus</i> /Pesci erbivori	1060	2
CTX-4B ^b	GT-4B	<i>G. toxicus</i> /Pesci erbivori	1060	4
C-CTX-1		Carnivori	1140	3,6
C-CTX-2	52-epi C-CTX-1	Carnivori	1140	1
I-CTX-1		Carnivori	1140	~ 0,5
I-CTX-2		Carnivori	1140	~ 0,5

^a = Dose letale al topo valore mediano

^b = Conosciute formalmente come gambiertossine (GTX-4A e GTX-4B).

13.3 Meccanismo d'azione

Le ciguatossine agiscono prevalentemente sulle membrane delle cellule eccitabili, sui canali voltaggio-dipendenti dello ione Na⁺, alterando la generazione e propagazione di potenziali d'azione fondamentali per il funzionamento di nervi e muscoli [21]. Il meccanismo di azione della ciguatossina, analogo a quello della brevetossina, interessa il sito 5 della α subunità del canale del Na⁺ ma con un'affinità di legame 30 volte superiore [22]. Concentrazioni nanomolari di P-CTX-1 provocano, a livello delle fibre nervose mielinate e delle cellule di neuroblastoma, potenziali d'azione di membrana spontanei molto più negativi rispetto alla condizione ordinaria. Questi potenziali sono soppressi con l'aggiunta di TTX (tetrodotossina), confermando l'azione delle ciguatossine sui canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti [23,24].

L'apertura dei canali Na⁺ lungo i nervi periferici, in particolare nei nodi di Ranvier, provoca un afflusso di ioni Na⁺ e conseguentemente l'apertura dei canali dello ione Ca²⁺ con l'ingresso di questo ione e successivo rilascio di neurotrasmettitori.

Il prolungamento dell'apertura dei canali Na⁺ indotto dalle ciguatossine impedisce alla cellula di mantenere l'equilibrio ionico interno (omeostasi) e ne altera i meccanismi bioenergetici. Il movimento d'acqua attraverso la membrana cellulare provoca un rilevante aumento del volume della cellula e la formazione di vescicole sulla membrana [25,26]. L'aumento di volume cellulare è stato osservato in assoni mielinati, nei terminali dei nervi motori e cellule di Schwann durante l'azione di P-CTX-1, PCTX-4B e PCTX-3C [26,27].

Studi di neurofisiologia hanno evidenziato che l'azione delle ciguatossine si esplica inoltre in un significativo rallentamento della velocità di conduzione nervosa. La prolungata e intensa depolarizzazione esercitata a livello delle piccole fibre mielinate A δ e nocicettori C-polimodali spiegherebbe la sofferenza sensoriale alle basse temperature ambientali esterne avvertita e descritta dai soggetti intossicati: la sensazione di doloroso

formicolio, punture, di prurito e bruciore prolungato [28,29,30,31,32].

Altri studi sono stati eseguiti per cercare di capire gli effetti delle ciguatossine sul sistema nervoso centrale in quanto una loro azione caratteristica sul topo è la pronunciata diminuzione della temperatura corporea: i topi perdono infatti la capacità di regolare la temperatura del corpo come se fossero animali pecilotermi. I risultati indicano che l'azione delle CTXs interessa l'ipotalamo e la regione del tronco encefalico. Azioni neuroeccitatorie sono evidenziate nella regione del tronco encefalico che riceve i segnali delle reazioni viscerali e di termoregolazione [33].

L'entrata di Na^+ nella cellula, per azione delle ciguatossine, riduce l'efficacia dello scambiatore antiporto $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ generando una maggiore concentrazione di Ca^{2+} che induce un rilascio di ioni calcio dai depositi (reticolo sarcoplasmatico). Come osservato in pazienti colpiti da CFP vi è un aumento della concentrazione di ioni Ca^{2+} nelle cellule del muscolo cardiaco. Analogo meccanismo si verifica nelle cellule dell'epitelio intestinale ma in questo caso si ha secrezione di fluidi che si presentano come diarrea [34]. Nel topo la diarrea provocata da ciguatossine può essere contrastata pretrattando l'animale con atropina. Ciò suggerisce un'azione delle ciguatossine sui recettori colinergici del sistema autonomo [35].

Studi di neurofisiologia indicano che i canali Na^+ di pesci marini sono suscettibili alla ciguatossina, come i canali Na^+ dei mammiferi [36,37]. I ricercatori hanno dimostrato che la ciguatossina trovata nel muscolo di sgombri (*Scomberomorus commersoni*) è legata a delle proteine del peso molecolare di 37.000- 40.600 Da. Questo potrebbe suggerire un meccanismo adottato dal pesce per sequestrare tale tossina e impedirne l'interazione con i canali Na^+ delle membrane eccitabili [38].

13.4. Tossicità

Per quanto concerne gli studi di tossicità, occorre distinguere il caso umano dalla sperimentazione animale.

13.4.1 Tossicità negli animali

Ciguatossina estratta dai visceri di murena (*Gymnothorax javanicus*) della Polinesia francese è stata somministrata a topi maschi (ICR 23-26 g di 4 settimane) per via intraperitoneale e *per os* (sondino gastrico) per verificarne gli effetti tossici. Dall'esperimento si evidenziavano le stesse dosi letali e gli stessi sintomi clinici per entrambe le vie di somministrazione. Tuttavia la sintomatologia diarroica, probabilmente causata da ipersecrezione di muco a livello del colon, si presentava soltanto a seguito della somministrazione per via intraperitoneale a concentrazioni variabili da un 1/7 UT a 1 UT (in questo studio per UT s'intende la concentrazione di tossina che uccide un topo di 15 g in 24 ore e corrisponde a 7 ng). Tale sintomatologia era molto simile a quella indotta dalla tossina colerica, ma con una potenza fino a 8.500 volte maggiore [39]. Cambiamenti morfologici e danni erano osservati nei tessuti intestinali. In topi maschi ICR ai quali venivano somministrate ciguatossine (0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di p.c.) per via orale e intraperitoneale sono stati evidenziati cambiamenti istopatologici e ultrastrutturali a livello di vari organi come il cuore, ghiandole surrenali e sistema nervoso autonomo [33]. Gli effetti tossici di ciguatossine e gambiertossine somministrate per via intraperitoneale a topi di 18-20 g sono riportati nella tabella seguente [40].

Tab. 2. Tossicità per via intraperitoneale di ciguatossine e gambiertossine.

Tossina	DL ₅₀ µg/kg p.c.	UT ¹ ng	Sintomi	Tempo di morte Min./Max. ²
P-CTX-1	0,25	5	Ipotermia (circa 33°C), erezione del pelo, diarrea, lacrimazione, ipersalivazione, dispnea, andatura traballante, boccheggiamento, convulsioni terminali con erezione della coda, morte per danno respiratorio	37 min./~24 ore
CTX-1B	0,33			tempo medio ³ 10-20 ore
P-CTX-2	2,3	9	Come per P-CTX-1 e progressiva paralisi degli arti posteriori	53 min/100 ore
CTX -2A2	1,9			tempo medio ³ 10-20 ore
CTX -2A1	3,5			tempo medio ³ 3,5 - 4,5 ore
P-CTX-3	0,9	18	Come per P-CTX-1	60 min./~24 ore
CTX-3C	2,5			tempo medio ³ 10-20 ore
P-CTX-3C	1,3	26	----	
CTX-4B	10			tempo medio ³ 3 - 5 ore
P-CTX-4B	4,0	80	Come per P-CTX-1 e paralisi degli arti posteriori	
C-CTX-1 ⁴	3,6			
C-CTX-2 ⁵	1			

1) UT è la concentrazione DL₅₀ per un topo di 20 g [41]; 2) Il tempo massimo di morte è stimato dagli effetti della dose vicino alla DL₅₀ [33]; 3) Tempo medio di morte [42]; 4) [33]; 5) [34].

Ciguatossine pure (CTX-1 e CTX-2) aggiunte all'acqua hanno dimostrato essere letali per pesci marini e d'acqua dolce. L'azione tossica si evidenziava, prima del decesso, con manifesti movimenti opercolari e un nuoto scoordinato. Per *Gambusia affinis* la LD₅₀ di CTX-1 e CTX-2 era rispettivamente 0,5 e 2,1 nM/L, 20 volte più alta della LD₅₀ delle brevetossine [43,44].

In uno studio sono stati quantificati gli effetti della ciguatossina sugli embrioni di pesce (*Oryzias latipes*). Le uova iniettate con 0,1-0,9 pg/uovo di ciguatossina evidenziavano successivamente nell'embrione conseguenze cardiovascolari, muscolari e anomalie scheletriche. Le uova trattate con concentrazioni superiori (1,0-9,0 pg/uovo) mostravano una significativa ridotta capacità di schiusa [45].

13.4.2 Tossicità nell'uomo

La ciguatera (CFP) è considerata l'intossicazione dovuta al consumo di pesci più diffusa tra la popolazione mondiale. I sintomi dell'avvelenamento da ciguatera sono comunque estremamente variabili e molto spesso non è facile fare una corretta diagnosi, in relazione anche alla mancanza di metodologie analitiche specifiche e rapide in grado di evidenziare la presenza di ciguatossine a basse concentrazioni. Tuttavia, nonostante l'elevata potenza tossica, le ciguatossine sono raramente accumulate nei pesci a concentrazioni tali da risultare fatali per l'uomo. In uno studio condotto nella Polinesia francese, su 3.007 casi di CFP, furono registrati soltanto 3 decessi, con un tasso di mortalità < 0,1% [46]. Tuttavia, in un altro evento d'intossicazione da CFP registrato sulla costa est del Madagascar per consumo di carne di squalo (*Carcharhinus amboinensis*)

delle 500 persone coinvolte nell'avvelenamento, oltre 98 furono i decessi con un tasso di mortalità di circa il 20% [47].

I sintomi clinici più frequenti per il consumo di pesci ciguatossici, pur nella loro complessità e nel loro vario modo di presentarsi, sono sostanzialmente riconducibili a 3 categorie:

- a) disturbi gastrointestinali con nausea, vomito, diarrea e dolori addominali;
- b) disturbi neurologici con parestesie (zona periorale, estremità inferiori), prurito grave, disestesia termica (inversione della sensibilità termica per cui oggetti caldi sono avvertiti freddi mentre si ha sensazione di bruciore o di dolore quando si viene a contatto o si bevono liquidi freddi), artralgie, mialgie, cefalea, convulsioni, paralisi muscolare, allucinazioni visive ed uditive, vertigini e perdita dell'equilibrio;
- c) disturbi cardiovascolari con bradicardia (40-50 battiti al minuto), polso irregolare o tachicardia (100-200 battiti al minuto), ipotensione e ipertensione.

I sintomi gastrointestinali si manifestano entro le 24 ore (generalmente nelle prime 3-6 ore) dopo il consumo del pesce tossico e sono caratterizzati da manifestazione di vomito più o meno prolungato, diarrea acquosa, nausea e dolori addominali. Questi disturbi si esauriscono generalmente nei primi 2 giorni [48].

I sintomi neurologici sono considerati quelli più caratteristici per contraddistinguere l'avvelenamento da ciguatera: compaiono in tempi più lunghi, 1 o 2 giorni (mediamente dopo le 12 ore) dall'ingestione, e coinvolgono il sistema nervoso periferico (SNP) ma anche quello centrale (SNC). Il coinvolgimento del SNP provoca nell'individuo debolezza e intensa sudorazione ma soprattutto porta a neuropatie sensoriali con parestesie della zona periorale e delle estremità (mani e piedi), prurito generalizzato, mialgia, artralgia, nocicezione accresciuta, disgesia (alterazione del gusto), forte senso di fatica e disestesia termica che si manifesta con inversione della sensazione del caldo e del freddo (oggetti, cibi e bevande calde sono percepite fredde e viceversa). Questa sindrome di inversione della temperatura, che provoca un bruciore fastidioso nelle persone che toccano oggetti o ingeriscono liquidi freddi (come toccare il ghiaccio secco), viene indicata come il sintomo clinico tipico che caratterizza l'avvelenamento da ciguatera [30,49]. Sono presenti talvolta sintomi come allucinazioni e incubi notturni [14].

Gli individui colpiti da CFP si ristabiliscono entro alcune settimane (di solito 1-4 settimane), ma i sintomi neurologici possono ripresentarsi periodicamente. In particolare le parestesie e il senso di debolezza e affaticamento possono persistere in forme più o meno gravi per settimane o mesi dopo la fase acuta della malattia. Quando i sintomi neurologici regrediscono molto lentamente, le persone tendono a manifestare disturbi psicologici che portano ad uno stato ansioso e depressivo [50].

I sintomi cardiovascolari provocati da CFP sono acuti ed essendo la sintomatologia analoga a quella riscontrata in soggetti con patologie cardiovascolari generalmente si ricorre al ricovero. In un'indagine condotta su oltre 3.000 pazienti colpiti da CFP il 15% aveva la pressione sistolica inferiore a 100 mmHg e il 13,6% una frequenza cardiaca inferiore a 60 bpm [46,51].

Le ciguatossine, essendo molecole di natura lipofila, sono facilmente trasferibili ai lattanti attraverso il latte materno; esse sono inoltre in grado di superare la barriera placentare e giungere al feto. Alcuni individui colpiti da ciguatera riferiscono rapporti sessuali dolorosi e questo potrebbe indicare che le ciguatossine sono escrete attraverso i fluidi corporei [56].

Inoltre, studi e evidenza clinica dimostrano che le ciguatossine si accumulano nelle cellule adipose del corpo umano: qualsiasi attività quindi che comporta un aumento del

metabolismo dei lipidi, come intenso esercizio fisico, perdita di peso rapida, stress o uso di alcool, può rimettere in circolo le ciguatossine e far riemergere la sintomatologia [57]. Nei casi gravi di avvelenamento da CFP il decesso può essere causato dalla paralisi della muscolatura respiratoria o dalla completa insufficienza cardiaca [58,59]. Anche un trattamento non adeguato della disidratazione causata da vomito e diarrea nelle fasi iniziali di intossicazione può provocare la morte in soggetti deboli come bambini mal nutriti [60].

Studi epidemiologici sulle intossicazioni da CFP hanno evidenziato che la durata, la gravità e il numero dei sintomi che un individuo può manifestare sono correlati alla tipologia e alla quantità di ciguatossine ingerite, al tipo di pesce consumato (se erbivoro o carnivoro) e al luogo di pesca del pesce. Infatti, la sintomatologia legata al consumo di pesci ciguatossici provenienti dall'Oceano Pacifico o Indiano è in prevalenza di tipo neurotossico, mentre il consumo di pesci ciguatossici provenienti del Mare dei Caraibi porta a problemi prevalentemente gastrointestinali [46,48,52,53,54,55].

E' stato evidenziato che in casi gravi di intossicazione umana la concentrazione della tossina (P-CTX-1) ingerita variava da 1 a 0,5 µg/kg p.c., mentre in casi lievi la P-CTX-1 ingerita variava da 0,05 a 0,001 µg/kg p.c. [61]. Una commissione di tossicologi internazionali esperti in biotossine marine, riunitasi a Cesenatico (Italia) nel 2005, ha indicato in 1,75 ng/kg p.c. la quantità di ciguatossine che una persona può assumere in un pasto a base di pesce. Prendendo questo dato come LOAEL ed applicando un fattore d'incertezza (FI) di 10, un limite guida per la ciguatossine potrebbe essere di 40 ng/kg di parte edibile [62].

13.5 Eziologia

Le microalghe del genere *Gambierdiscus* sono produttrici di precursori di ciguatossine e la specie più conosciuta è la Dinoficea bentonica *Gambierdiscus toxicus* [63] indicata inizialmente come *Diplopsalis* sp.[64], che vive come epifita in macroalghe brune, rosse o verdi ma si trova anche libera sui sedimenti e detriti di corallo [40]. Le aree interessate allo sviluppo di queste microalghe sono le barriere coralline tropicali e subtropicali (Oceano Pacifico, Indiano, Caraibi, ecc.), ma vivono bene anche in pozze di marea, in lagune e in sabbie colorate [65]. Le molecole tossiche prodotte da *Gambierdiscus toxicus* sono le gambiertossine (CTXs), le maitotossine (MTXs) e il gambierolo e i suoi acidi. Le gambiertossine P-CTX-3C, P-CTX-4A e il presunto P-CTX-4B sono molecole considerate precursori più polari delle CTXs trovate nei pesci [14,34]. La produzione qualitativa e quantitativa di CTXs da *Gambierdiscus* spp. è stata associata ai diversi cloni, e recenti studi hanno mostrato in *G. toxicus* una tossicità differente a seconda delle condizioni ambientali quali temperatura, luce e salinità [66,67,68].

Altre specie di *Gambierdiscus* sono state associate alla produzione di tossine, sebbene alcune di queste specie non siano mai state coinvolte in focolai di CFP: *G. yasumotoi* [69], *G. belizeanus* [65], *G. pacificus*, *G. polynesiensis* e *G. australes* [70].

Analisi sulle caratteristiche morfologiche e filogenetiche sono state recentemente effettuate in uno studio di revisione sulle specie di *Gambierdiscus* ed hanno portato all'individuazione di altre 4 nuove specie: *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri* e *G. ruetzleri* [71]. Su queste specie non sono disponibili ad ora dati tossicologici.

Più di 400 specie di pesci appartenenti a diverse famiglie sono state descritte come potenziali accumulatrici di ciguatossine, ma i dati acquisiti dimostrano che molto più basso è il numero di specie coinvolte negli episodi di ciguatera.

Famiglie e specie di pesci maggiormente implicate negli episodi di CFP:



(Foto di Attilio Rinaldi, 2012)

- *Acanthuridae: Acanthurus lineatus.*
Pesce di piccole dimensioni, erbivoro che vive nelle barriere coralline tropicali della regione indopacifica in acque poco profonde [72]. Può raggiungere una lunghezza massima di 38 cm.



- *Balistidae: Balistes carolinensis.*
Vive nella zona tropicale e subtropicale (Atlantico e Golfo del Messico), in acque costiere poco profonde della barriera corallina. E' onnivoro e può nuotare per lunghe distanze [73]. Raggiunge una lunghezza massima di 60 cm e un peso di circa 6 kg.



Foto: investigacion.izt.uam.mx - **Caranx latus**

- *Carangidae: Caranx latus*
Seriola fasciata.
Vivono in acque calde dell'Oceano Atlantico, sono pelagici e si nutrono di pesci [74]. *Caranx latus* può raggiungere una lunghezza di 1 m e un peso di 13 kg, *Seriola fasciata* una lunghezza di circa 70 cm e un peso di 7 kg.



Foto: Investigacion.izt.uam.mx - **Seriola fasciata**



Foto: Attilio Rinaldi 2012

- *Carcharhinidae: Carcharhinus longimanus.*
Vive nella profondità degli oceani di tutto il mondo ed è carnivoro [72]. Può raggiungere una lunghezza massima di 4 m e un peso di 170 kg.



Foto di Attilio Rinaldi 2012
Cheilinus undulatus

- *Labridae: Cheilinus undulatus,*
Lachnolaimus maximus.
Vivono nell'Oceano Atlantico occidentale, Oceano Indiano e Oceano Pacifico e si nutrono di zoobentos e detriti [72,75]. *Cheilinus undulatus* può raggiungere una lunghezza di circa 2 m e un peso di 190 kg, *Lachnolaimus maximus* può raggiungere una lunghezza massima di 90 cm e un peso di 11 kg.



Foto di Randal, J.E. 1997 - **Lachnolaimus maximus**

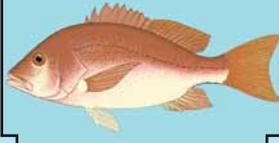


Foto di Cada, R.N. 1993
Lutjanus campechanus



Foto di Randal, J.E. 1997 - **Ocyurus chrysurus**



Symphorus nematophorus

- **Lutjanidae: Lutjanus campechanus**
Ocyurus chrysurus
Symphorus nematophorus

Vivono nelle regioni tropicali e subtropicali (Oceano Atlantico occidentale e Golfo del Messico) in ambiente marino ed estuarino. Sono carnivori e si nutrono di crostacei e pesci [72,75]. Possono raggiungere lunghezze di 1 m e pesi superiori ai 20 kg.



Foto: Investigacion.izt.uam.mx - **Megalops atlanticus**

- **Megalopidae: Megalops atlanticus**

Vive nelle acque tropicali e subtropicali e la dieta è composta da zoobentos, pesci e cefalopodi [74]. Può raggiungere una lunghezza di 2,5 m ed un peso di 160 kg.



Foto: Investigacion.izt.uam.mx - **Mugil capurrii**

- **Mugilidae: Mugil capurrii**

Vive nell'area subtropicale e si nutre di macroalghe e detriti [76]. Raggiunge una lunghezza massima circa 45 cm.



Foto di Randal, J.E. 1997 - **Gymnothorax javanicus**

- **Murenidae: Gymnothorax javanicus**

Vive negli anfratti delle barriere coralline della zona tropicale indopacifica ed è predatore notturno di molluschi cefalopodi, crostacei e pesci [72]. Può raggiungere una lunghezza di 3 m e un peso di 30 kg.

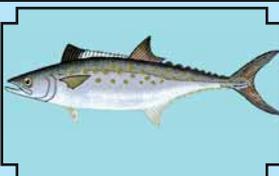


Foto di Cada, R. N. 1990

- **Scombridae: Scomberomorus maculatus.**

Vive nell'Oceano Atlantico occidentale e si nutre di pesci e cefalopodi [73]. Può raggiungere una lunghezza massima circa 90 cm e un peso di 6 kg.



Foto di Randal, J.E. 1997
Scarus coeruleus



Foto di Randal, J.E. 1997 - **Chlorurus gibbus**

- **Scaridae: Scarus coeruleus**
Chlorurus gibbus

Vivono in acque relativamente poco profonde degli oceani tropicali e subtropicali di tutto il mondo. Il numero maggiore di specie vive nella zona Indo-Pacifica popolando le barriere coralline, le coste rocciose e le praterie di fanerogame. La loro alimentazione è rappresentata da coralli e sono un importante vettore di ciguatossine per i pesci carnivori [73]. *Scarus coeruleus* può raggiungere 1,20 m di lunghezza, mentre *Chlorurus gibbus* può raggiungere una lunghezza di 70 cm.



Foto: NOAA
Epinephelus morio



Foto di Randal, J.E. 1997 - **Plectropomus maculatus**

- **Serranidae: Epinephelus morio**
Plectropomus maculatus

Vivono in acque temperate e calde delle barriere coralline e in mare aperto (Oceano Atlantico occidentale e Oceano Pacifico occidentale). Sono carnivori e si nutrono di pesci e cefalopodi [73]. *Epinephelus morio* raggiunge una lunghezza massima di 1,25 m e un peso di 23 kg, mentre *Plectropomus maculatus* può avere una lunghezza di circa 1 m e un peso di 25 kg



Foto: NOAA

- **Sparidae: Calamus calamus.** Vive nella barriera corallina dell'Oceano Atlantico occidentale e si nutre di zoobentos [73]. Raggiunge una lunghezza massima di 56 cm e un peso di 68 kg.



Foto di Attilio Rinaldi 2012

- **Sphyraenidae: Sphyraena barracuda**
E' un pesce carnivoro che nuota molto velocemente e può raggiungere dimensioni molto importanti. Vive nella regione indopacifica e dell'Atlantico occidentale [73]. Raggiunge una lunghezza massima di circa 2 m e un peso di 50 kg



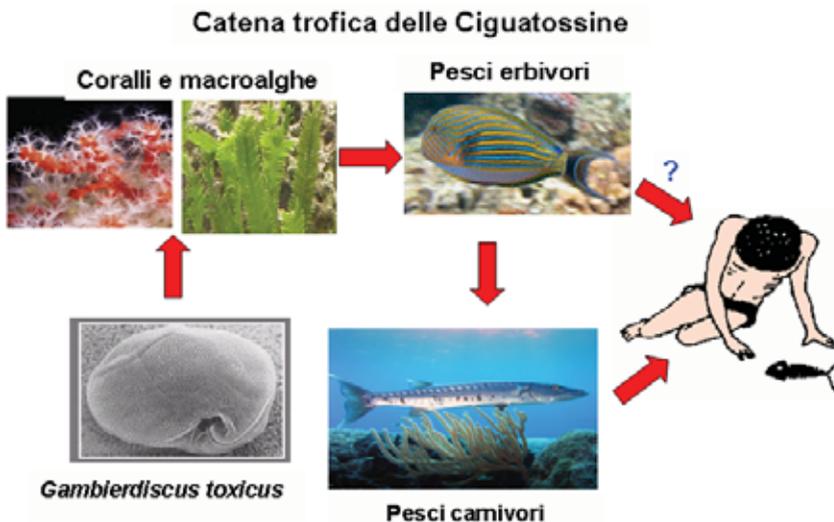
Foto di CAFS 2006

- **Xiphiidae: Xiphias gladius.**
Vive nell'Oceano Atlantico e Oceano Pacifico ed è carnivoro [73]. Raggiunge una lunghezza massima di circa 4,5 m e un peso di 650 kg.

I pesci di piccole dimensioni della barriera corallina che si nutrono di macroalghe o detriti, veicolano le ciguatossine prodotte dalla microalga bentonica *Gambierdiscus toxicus* ai pesci predatori. Nella maggioranza dei casi infatti i pesci nocivi all'uomo sono i grandi predatori all'apice della catena trofica dove la tossina si può concentrare per un fenomeno di biomagnificazione (Fig.4).

I molteplici fattori che favoriscono la comparsa di *G. toxicus* e la sua colonizzazione di macroalghe o di detriti di coralli, unitamente a quelli altrettanto complessi che caratterizzano la catena trofica di una barriera corallina, non consentono però di identificare con sicurezza tutte le specie di pesci che possono accumulare ciguatossine.

Fig. 4. Trasferimento delle ciguatossine dalle microalghe all'uomo.



Tuttavia, gli abitanti di alcune aree dove CFP è endemica evitano, per tradizione popolare, di pescare pesci in alcuni periodi dell'anno e in specifiche zone [14].

Nei Caraibi i pesci erbivori ciguatossici, anche se poco utilizzati per l'alimentazione umana, non sono generalmente associati a intossicazioni da CFP. Le ciguatossine in questi pesci, infatti, si accumulano soprattutto nel contenuto stomacale e nei visceri che generalmente vengono allontanati prima della cottura.

Nei pesci carnivori, specialmente in quelli di grossa taglia, le ciguatossine sono concentrate principalmente in alcuni organi viscerali (fegato, reni e milza), ma in misura minore anche nel muscolo. L'accumulo di ciguatossine nei pesci è un meccanismo molto complesso che avviene con differenti modalità [77,78]: i ricercatori hanno rilevato infatti che il contenuto di ciguatossina nel tessuto muscolare può essere fino a 50 volte inferiore rispetto a quello del fegato ed inoltre questo rapporto non è costante nelle diverse specie di pesci.

In alcune aree a rischio è stato evidenziato che, fra le molte specie di pesci pescati, quelli ciguatossici rappresentano una percentuale variabile dal 10% allo 0,01% [79].

13.6 Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da tossine CFP

La caratterizzazione del pericolo di intossicazione da ciguatossine, alla luce di quanto emerge dalle ricerche e dagli episodi di ciguatera, rende difficile elaborare

un'analisi del rischio che possa prevenire o attenuare l'avvelenamento del consumatore da CFP. Specialmente il sistema di prevenzione della CFP, basato sui controlli dei prodotti ittici, appare molto complicato, in quanto moltissime specie ittiche possono essere potenzialmente tossiche e la concentrazione della tossina che provoca i disturbi nei consumatori è talmente bassa che le analisi chimiche possono non essere in grado di evidenziarla. Questo tipo di intossicazione, come è stato dimostrato, non sempre è riconducibile alle sole ciguatossine, in quanto in molti casi l'analisi chimica dei pesci incriminati ha rilevato la presenza di altre biotossine marine quali maitotossine, acido okadaico e palitossine anche esse prodotte da microalghe bentoniche ed epifite. A tale proposito mancano dati epidemiologici sui possibili effetti di intossicazione causata dalla presenza congiunta di più tossine negli alimenti.

In Tab.3 è schematizzata la valutazione del rischio quando si hanno prodotti ittici contaminati da ciguatossine.

Tab. 3. Valutazione del Rischio per prodotti ittici contaminati da ciguatossine (CTXs).

Distribuzione	Le CTXs sono state individuate in microalghe e in molte specie di pesci endemici della zona tropicale e subtropicale. Recentemente la microalga che produce le CTXs è stata ritrovata nel Mediterraneo. La presenza di CTXs è stata confermata in alcune carni di pesci pescati in Israele.
Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione	Rapido assorbimento e distribuzione in tutto il corpo. Le CTXs si legano ai canali del Na ⁺ (α subunità - sito 5), aumentando l'entrata dello ione Na ⁺ e depolarizzando la membrana neuronale. Le ciguatossine si possono accumulare nella parte lipofila della cellula.
Meccanismo d'azione	Le ciguatossine svolgono la loro azione prevalentemente sui canali voltaggio-dipendenti dello ione Na ⁺ della membrana delle cellule eccitabili, generando e propagando i potenziali d'azione fondamentali per il funzionamento di nervi e muscoli. Il prolungamento dell'apertura dei canali Na ⁺ indotto dalle ciguatossine impedisce alla cellula di mantenere l'equilibrio ionico interno (omeostasi) e ne altera i meccanismi bioenergetici. Questo provoca l'apertura dei canali dello ione Ca ²⁺ e successivo rilascio di neurotrasmettitori. La prolungata e intensa depolarizzazione esercitata a livello delle piccole fibre mielinate Aδ e nocicettori C-polimodali spiegherebbe la sofferenza sensoriale alle basse temperature esterne che si manifesta nei soggetti intossicati, la sensazione di un doloroso formicolio, di bruciore prolungato, di punture e prurito. Azioni neuroeccitatorie delle CTXs sono evidenziate nella regione del tronco encefalico che riceve i segnali delle reazioni viscerali e di termoregolazione.
Tossicità negli animali (topo)	P-CTX-1 somministrata per iniezione intraperitoneale ai topi alla concentrazione di 0,25 µg/kg p.c. provoca sintomi quali: ipotermia, erezione del pelo, diarrea, lacrimazione, ipersalivazione, dispnea, andatura traballante, boccheggiamento, convulsioni terminali con erezione della coda, morte per danno respiratorio. Il tempo di morte dei topi trattati varia dai 37 minuti alle 24 ore.
Tossicità nell'uomo (per via orale)	I sintomi provocati da CTXs nell'uomo sono di natura: - neurologica: parestesia della bocca e degli arti, atassia, mialgia, emicrania, vertigini, debolezza muscolare, inversione sensitiva di caldo e freddo, tremore, salivazione, - gastrointestinale: nausea, diarrea, vomito, dolori addominali; - cardiovascolare: aritmia, bradicardia, ipotensione, tachicardia. I sintomi si manifestano dalle 4 alle 16 ore dopo l'ingestione del pesce. I sintomi neurologici, nei casi gravi, perdurano per mesi e in alcuni casi per anni.
Dose Acuta di Riferimento (ARfD)	Sulla base dei dati ricavati dalla tossicità umana per consumo di pesce il Laboratorio di Riferimento Comunitario per le Biotossine Marine (EURLMB) propone un LOAEL di 1,75 ng di CTX/kg p.c.. A questo dato è stato applicato un FI di 10 che porta ad un limite guida di 40 ng di CTX/kg p.e.. Gli esperti dell'EFSA-CONTAM, considerando la scarsità dei dati tossicologici, non ritengono opportuno ricavare un ARfD. Tuttavia, sulla base dei casi di CFP nell'area del Pacifico per consumo di pesci contenenti da 0,1 a 5,0 µg di P-CTX-1/kg p.e., propone di applicare alla concentrazione più bassa (0,1 µg P-CTX-1 eq./kg p.e.), associata ad una sintomatologia leggera nell'uomo, un FI di 10 che porta ad un limite guida di 10 ng P-CTX-1 eq./kg p.e..

(LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level*; NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level*)

Di seguito (Tab.4) sono riportati i valori dei Limiti Guida:

Tab. 4. Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta.

Parte edibile ingerita (grammi)	Limite Guida* (ng P-CTX-1 eq./kg p.e.)		Limite (ng P-CTX-1 eq./kg p.e.) Reg. (CE) 853/2004
	CRLMB	EFSA-CONTAM	
500	40	10	---

*Limiti su indicazione del CRLMB [62] e EFSA-CONTAM [80].

L'Unione europea col Regolamento (CE) n. 853/2004 del 29 aprile 2004 stabilisce che:

- non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi delle seguenti famiglie: *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* e *Canthigasteridae*;
- non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca contenenti biotossine (ad esempio la ciguatossina o le tossine che paralizzano i muscoli).

L'elevato numero di specie ittiche potenzialmente interessate dall'accumulo di ciguatossine, la difficoltà di rilevazione analitica per queste tossine a concentrazioni pericolose per la salute umana creano notevoli difficoltà all'Autorità competente nel mettere in atto efficaci sistemi di controllo, Tuttavia le tradizioni alimentari delle popolazioni delle zone dove questi fenomeni sono endemici ed il contributo dei dati dei monitoraggi sull'ambiente marino possono suggerire alcuni semplici comportamenti che ogni consumatore dovrebbe adottare per attenuare il rischio CFP:

- verificare, quando è possibile, dove i pesci siano stati pescati;
- evitare il consumo di pesci di grandi dimensioni appartenenti alle famiglie
 - Lutjanidae (red bass and snappers)
 - Murenidae (moray eels)
 - Scombridae (mackerel and tunas)
 - Serranidae (coral trout, seabass and groupers)
 - Sphyraenidae (barracuda),
- evitare il consumo di pesci considerati potenzialmente a rischio se non sono di piccole dimensioni (peso inferiore a 2 kg);
- se non è possibile evitarlo, mangiare soltanto porzioni molto piccole di carne di grandi pesci predatori;
- evitare di mangiare uova, fegato, testa o visceri dei pesci, organi nei quali le tossine si accumulano in concentrazioni più elevate;
- pulire i pesci eviscerandoli accuratamente e lavandoli abbondantemente prima di consumarli.

13.7 Bibliografia

1. Yasumoto T., Nakajima I., Bagnis R., Adachi R., 1977. *Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43: 1021-1026.
2. Russell F.E., 1965. *Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals*. Advan. Mar. Biol., 3: 225.
3. Bagnis R., 1981. *L'Ichtyosarcotossismo de type ciguatera: processus biologiques connus et perspectives au seuil des années 80*. Ann. Inst. Océanogr. Paris, 57: 5-24.
4. Legrand A.M., 1998. *Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans*. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L. & T. Wyatt (Eds.), Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC, Vigo Spain, pp. 39-43.
5. Pérez-Arellano J.L., Luzardo O.P., Perez Brito A., Hernández Cabrera M., Zumbado M., Carranza C., Angel-Moreno A., Dickey R.W. and Boada L.D., 2005. *Ciguatera fish poisoning, Canary Islands*. Emerg. Infect. Dis. 11:1981-1982.
6. Lewis R.J., 1992. *Socioeconomic impacts and management of ciguatera in the Pacific*. 4th Int.on ciguatera fish poisoning, Tahiti. P.11.
7. Ting J., Brown A.F., Pearn J.H., 1998. *Ciguatera poisoning: an example of a public health challenge*. Aust NZ J Public Health; 22 (1):140-142.
8. Murata M., Legrand A.M., Ishibashi Y., Fukui M. and Yasumoto T., 1990. *Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus**. J. Am. Chem. Soc. 112: 4380-4386.
9. Lewis R.J., Sellin M., Poli M.A., Norton R.S., MacLeod J.K. and Sheil M.M., 1991. *Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, *Muraenidae*)*. Toxicon 29: 1115-1127.
10. Scheuer P.J., Takahashi W., Tsutsumi J., Yoshida T., 1967. *Ciguatoxin isolation and chemical nature*. Science 155 (767): 1267-1268.
11. Legrand A.M., Fukui M., Cruchet P., Ishibashi Y., Yasumoto T., 1992. *Characterization of ciguatoxins from different fish species and wild *Gambierdiscus toxicus**. In Tosteson, T.R. ed. Of the Third International Conference on Ciguatera Fish Poisoning, Puerto Rico, Polyscience Publications, Quebec, pp. 25-32.
12. Lewis R.J., 2001. *The changing face of ciguatera*. Toxicon 39: 97-106.
13. Yasumoto T. and Murata M., 1990. *Polyether toxins involved in seafood poisoning*. In Hall and G. Strichartz (Eds). Marine toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology, pp. 120-132.
14. Scheuer P.J., 1994. *Ciguatera and its off-shoots -chance encounters en route to a molecular structure*. Tetrahedron 50 (1):3-18.
15. Lewis R.J. and Holmes M.J., 1993. *Origin and transfer of toxins involved in ciguatera*. Comparative Biochemistry and Physiology 106C(3): 615-628.
16. Hahn S.T., 1991. *Toxicology of ciguatera*. Ph.D Thesis. Queensland University of Technology.
17. Vernoux J. P., Lewis R. J., 1997. *Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*)*. Toxicon, 35, 889-900.
18. Nicholson G.M. and Lewis R.J., 2006. *Ciguatoxins: Cyclic Polyether Modulators of Voltage-gated Ion Channel Function*. Mar. Drugs 4, 82-118.
19. Naoki H., Fujita T., Cruchet P., Legrand A.M., Igarashi T. and Yasumoto T., 2001. *Structural determination of new ciguatoxin congeners by tandem mass spectrometry*. In De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. & Sabino M., eds. Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium. Proceedings

- of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 475-482. Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen.
20. Yasumoto T., Igarashi T., Legrand A.M., Cruchet P., Chinain M., Fujita T. and Naoki H., 2000. *Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc. 122: 4988-4989.
 21. Rayner M.D., 1972. *Mode of action of ciguatoxin*. Fed. Proc. 31, 1139-1145.
 22. Lombet A., Bidard J.N., Lazdunski M., 1987. *Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel*. FEBS Lett. 219 (2), 355-359.
 23. Bidard J.N., Vijverberg H.P., Frelin C., Chungue E., Legrand A.M., Bagnis R., Lazdunski M., 1984. *Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin*. J. Biol. Chem. 259: 8353-8357.
 24. Benoit E., Legrand A.M., Dubois J. M., 1986. *Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre*. Toxicon 24, 357-364.
 25. Cameron J., 1991. *Effects of ciguatoxin on nerve excitability in rats (part I)*. J. Neurol. Sci. 101, 87-92.
 26. Mattei C., Dechraoui M.Y., Molgó J., Meunier F. A., Legrand A. M., Benoit E., 1999. *Neurotoxins targetting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons*. J. Neurosci. Res. 55: 666-673.
 27. Molgó J., Juzans P. and Legrand A.M., 1994. *Confocal laser scanning microscopy: a new tool for studying the effects of ciguatoxin (CTX-1b) and mannitol at motor nerve terminals of the neuromuscular junction in situ*. Mem. Queensl. Mus, 34: 577-585.
 28. Allsop J. L., Martini L., Lebris H., Pollard J., Walsh J., Hodgkinson S., 1986. *Neurologic manifestations of ciguatera. 3 cases with a neurophysiologic study and examination of one nerve biopsy*. Rev. Neurol. 142, 590-597.
 29. Cameron J., Flowers A.E., Capra M.F., 1991. *Electrophysiological studies on ciguatera poisoning in man (Part II)*. J. Neurol. Sci. 101: 93-97.
 30. Cameron J., Capra M.F., 1993. *The basis of the paradoxical disturbance of temperature perception in ciguatera poisoning*. J. Toxicol Clin. Toxicol. 31 (4): 571-579.
 31. Gybels J., Handwerker H.O., Van Hees J., 1979. *A comparison between the discharges of human nociceptive nerve fibres and the subjects ratings of his sensations*. J. Physiol. 292, 193-206.
 32. Schmelz M., Schmidt R., Bickel A., Handwerker H.O., Torebjork H.E., 1997. *Specific C receptors for itch in human skin*. J. Neurosci. 17 (20), 8003-8008.
 33. De Fouw J.C., Van Egmond H.P., Speijers G.J.A., 2001. *Ciguatera fish poisoning: a review*. RIVM Report No. 388802021.
 34. Lehane L. and Lewis R.J., 2000. *Review Ciguatera: recent advances but the risk remains*. Int. J. Food Microbiol. 61: 91-125.
 35. Terao K., Ito E., Oarada M., Ishibashi Y., Legrand A. M., Yasumoto T., 1991. *Light and electron microscopic studies of pathologic changes induced in mice by ciguatoxin poisoning*. Toxicon 29 (6): 633-643.
 36. Capra M.F., Cameron J. and Flowers A.E., 1987. *The effects of ciguatoxin on nerve conduction parameters in teleost fish*. In: Gopalakrishnakone, P. and C.K. Tan (eds), Progress in Venom and Toxin Research, pp. 411-417. University of Singapore.
 37. Capra M.F., Flowers A.E., Cameron J., 1987. *The effects of ciguatoxin on the rate of Na⁺ efflux in unmyelinated olfactory nerves in teleosts*. In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K. (Eds.), Progress in Venom and Toxin Research, pp. 418-422. University

- of Singapore.
38. Capra M.I.F., 1997. *Ciguatera*. In Foodborne Microorganisms of Public Health Significance, 5th ed., A. D. Hocking et al, eds. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group, Sydney. Chapter 21, pp. 573- 82.
 39. Ito E., Yasumoto T., Terao K., 1996. *Morphological observations of diarrhea in mice caused by experimental ciguatericosis*. *Toxicon* 34: 111-122.
 40. Hallegraef G.M., Anderson D.M. and Cembella A.D., 1995. Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
 41. Lewis R.J., Sellin M., 1992. *Multiple ciguatoxins in the flesh of fish*. *Toxicon* 30, 915–919.
 42. Dechraoui M.Y., Naar J., Pauillac S. and Legrand A.M., 1999. *Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels*. *Toxicon* 37: 125-143.
 43. Lewis R.J., 1992. *Ciguatoxins are potent ichthyotoxins*. *Toxicon* 30, 207–211.
 44. Capra M.F., Cameron J., Flowers A.E., Coombe I.F., Blanton C.G., Hahn S.T., 1988. *The effects of ciguatoxins on teleosts*. In: Proceedings 6th International Coral Reef Symposium, 8–12 August, Townsville, Australia 3, pp. 37–41.
 45. Edmunds J.S.G., McCarthy R.A., Ramsdell J.S., 1999. *Ciguatoxin reduces larval survivability in finfish*. *Toxicon* 37, 1827–1832.
 46. Bagnis R., Kuberski T., Laugier S., 1979. *Clinical observations on 3009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28 (6): 1067–1073.
 47. Habermehl G.G., Krebs H.C., Rasoanaivo P., Ramialiharisoa A., 1994. *Severe ciguatera poisoning in Madagascar: a case report*. *Toxicon* 32, 1539–1542.
 48. Gillespie N.C., Lewis R.J., Pearn J.H., Bourke A.T.C., Holmes M.J., Bourke J.B., Shields W. J., 1986. *Ciguatera in Australia: occurrence, clinical features, pathophysiology and management*. *Med. J. Aust.* 145: 584-590.
 49. Bagnis R., 1968. *Clinical aspects of ciguatera (fish poisoning) in French Polynesia*. *Hawaii Med. J.* 28, 25-28.
 50. Pearn J.H., 2001. *Neurology of ciguatera*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70: 4-8.
 51. Chan T. Y., Wang A. Y., 1993. *Life-threatening bradycardia and hypotension in a patient with ciguatera fish poisoning*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 71.
 52. Narayan Y., 1980. *Fish poisoning in Fiji*. *Fiji Med. J.* 8, 567.
 53. Holt R.J., Miro G., Del Valle A., 1984. *An analysis of poison control center reports of ciguatera toxicity in Puerto Rico for one year*. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 22, 177-185.
 54. Bagnis R.A., Legrand A.M., 1987. *Clinical features on 12890 cases of ciguatera (fish poisoning) in French Polynesia*. In: Gopalakrishnakone, P. and Tan, C.K. (eds), *Progress in Venom and Toxin Research*, pp 372-384. University of Singapore.
 55. Hamilton B., Hurbungs M., Vernoux J. P., Jones A., Lewis R.J., 2002. *Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin*. *Toxicon* 40: 685-693.
 56. Lehane L., 1999. *Ciguatera fish poisoning: a review in a risk assessment framework*. Report B004936, National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry-Australia, Canberra.
 57. Adams M.J., 1993. *An outbreak of ciguatera poisoning in a group of scuba divers*. *Journal of Wilderness Medicine* 4: 304-311.
 58. Dawson J., 1977. *Fish poisoning in American Samoa*. *Hawaii Med. J.* 36, 239-243.
 59. Lewis R. J., 1987. *Ciguatera in south-eastern Queensland*. In: *Toxic Plants and Animals: a Guide for Australia*; Covacevich, J.; Davie, P.; Pearn, J., Eds.; Queensland Museum: Brisbane. pp 181-187.

60. Withers N.W., 1988. *Ciguatera fish toxins and poisoning*. In: Handbook of Natural Toxins and Venoms; Tu, A. T., Ed. Marcel Dekker: New York. Vol. 3, pp 31-61.
61. Lehane L., 2000. *Ciguatera update*. Med. J. Aust. 172 (4): 176-179.
62. CRLMB (Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins) 2005. Working Group on Toxicology. 1st Meeting. Cesenatico, Italy, 24-25 October.
63. Adachi R. and Fukuyo Y., 1979. *The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate Gambierdiscus toxicus gen. et sp. nov. collected in a ciguatera endemic area*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 45: 67-71.
64. Bagnis R., Chanteau S. et Yasumoto T., 1977. *Découverte d'un agent étiologique vraisemblable de la ciguatera*. Compte-Rendus de l'Académie des Sciences, 28 (1): 105 - 108.
65. Faust M.A., 1995. *Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species*. J. Phycol. 31: 996-1003.
66. Bomber J.W., Morton S.L., Babinchak J.A., Norris D.R., Morton J.G., 1988. *Epiphytic dinoflagellates of drift algae - another toxigenic community in the ciguatera food chain*. Bull. Mar. Sci. 43, 204-214.
67. Morton S.L., Bomber J.W., Tindall D.R., Aikman K.E., 1993. *Response of Gambierdiscus toxicus to Light: Cell Physiology and Toxicity*. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, pp. 541-546.
68. Chinain M., Darius H., Ung A., Cruchet P., Wang Z., Ponton D., Laurent D., Pauillac S., 2010. *Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate Gambierdiscus polynesiensis (Dinophyceae) in culture*. Toxicon 56 (5): 739-50.
69. Holmes M.J., 1998. *Gambierdiscus yasumotoi sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from southeastern Asia*. J. Phycol. 34: 661-668.
70. Chinain M., Faust M.A., Pauillac S., 1999. *Morphology and molecular analyses of three new toxic species of Gambierdiscus (Dinophyceae): G. pacificus, sp. nov., G. australes, sp. nov., and G. polynesiensis, sp. nov.* J. Phycol. 35, 1282-1296.
71. Litaker R., Vandersea M., Faust M., Kibler S., Chinain M., Holmes M., Holland W., Tester P., 2009. *Taxonomy of Gambierdiscus including four new species, Gambierdiscus caribaeus, Gambierdiscus carolinianus, Gambierdiscus carpenteri and Gambierdiscus ruetzleri (Gonyaulacales, Dinophyceae)*. Phycologia 48 : 344-390.
72. Dalzell P., 1991. *Management of ciguatera fish poisoning in the South Pacific*. Inshore Fisheries Research Project, South Pacific Commission, BP D5 Noumea Cedex, New Caledonia.
73. Farstad D.J. and Chow T., 2001. *A brief case report of ciguatera poisoning*. Wilderness Environ. Med. 12: 263-269.
74. Halstead B.W., 1970. *Results of a field survey on fish poisoning in the Virgin and Leeward Islands during 7-18th January*. p. 15. UNDP/FAO Caribbean Fisheries Development Project, Barbados.
75. Olsen D.A., Nellis D.W. and Wood R.S., 1984. *Ciguatera in the eastern Caribbean*. Mar. Fish. Rev. 46(1): 13-18.
76. Dammann A.E., 1969. *Study of the fisheries potential of the Virgin Islands*. Special Report. Contribution No. 1. Virgin Islands Ecological Research Station.
77. Helfrich P., Piyakarnchana T., Miles P.S., 1968. *Ciguatera fish poisoning 1. Ecology of ciguateric reef fishes in the Line Islands*. Occasional Papers, Bernice P. Bishop Museum, Hawaii 23: 305-370.
78. Vernoux J.P., Lahlou N., Abbad El Andaloussi S., Rieyche N., Magras L., 1985. A

- study of the distribution of ciguatoxin in individual Caribbean fish. Acta Trop. 42 (3): 225–233.*
79. Banner A.H., 1976. *Ciguatera: a disease from coral reef fish*. Biology and Geology of Coral Reefs. Jones, O.A.; Endean, R., Eds.; Academic Press: London, Vol. 3, pp 177-213.
80. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish 2010. Emerging toxins: Ciguatoxin group EFSA. Journal 8(6):1627.

Dedica

Ho scritto questo libro pensando ai Maestri che hanno plasmato la mia vita professionale: il prof. Romano Viviani e il prof. Lanfranco Mancini.

NOTA DELL'AUTORE

Il libro affronta, seppure sinteticamente, il problema delle biotossine marine che, accumulate nei prodotti della pesca, possono creare danni, talvolta anche molto gravi, alla salute dei consumatori e condizionare pesantemente l'economia della pesca e della commercializzazione. E' pensato principalmente per i medici veterinari, medici igienisti, tecnici della prevenzione e per tutte quelle categorie professionali chiamate, in base alla legislazione europea, a svolgere attività di controllo e vigilanza sulla salubrità dei prodotti della pesca destinati al consumo umano. La necessità per l'Unione Europea di importare oltre il 50% dei prodotti della pesca anche da Paesi che non hanno una lunga tradizione di controlli sanitari, ha reso sempre più difficile, complesso ed insidioso, il compito dell'Autorità competente. Sono richieste nuove conoscenze scientifiche, aggiornamenti e valutazioni sull'uso e il consumo umano dei prodotti della pesca provenienti, sempre più frequentemente, da Paesi extracomunitari.

In generale, le biotossine marine prese in considerazione in questo volume, sono trattate seguendo uno schema che fornisce informazioni riguardanti:

- leggende e cenni storici che hanno favorito l'individuazioni di questi principi attivi;
- il meccanismo d'azione;
- l'eziologia;
- le conoscenze sulla tossicità;
- uso e consumo di prodotti della pesca d'interesse commerciale implicati nei casi di avvelenamento;
- analisi del rischio.

Questa pubblicazione è stata pensata per essere utilizzata come strumento di lavoro per tutti coloro che si interessano a queste problematiche, in quanto può fornire:

- elementi scientifici per una corretta analisi del rischio, così come richiesto dai Regolamenti europei all'Autorità competente;
- conoscenze sullo stato di diffusione e di accumulo di queste tossine nei principali prodotti della pesca destinati al consumo umano;
- indicazioni scientifiche per tutti coloro che vogliono approfondire gli aspetti affascinanti della biochimica marina.

Ringraziamenti

Alla fine di questo lavoro mi sono reso conto che quello che avevo scritto era anche il risultato del contributo di tutti quelli che mi sono stati vicini, amici e colleghi, durante la mia vita professionale. Alcuni di questi meritano un ringraziamento particolare perché hanno dato un fattivo contributo alla stesura di questo libro: Monica Cangini, Anna Milandri, Silvia Pigozzi, Marinella Pompei, Elena Riccardi.

Rivolgo infine un sentito ringraziamento per i preziosi suggerimenti all'amico Gian Paolo Rossini, e per il supporto a Gabriele Squintani, Anna Padovani e Nicola Quadrelli della Regione Emilia-Romagna.

Impaginazione e stampa presso il Centro Stampa della Regione Emilia-Romagna

