

CONSUMO DI MOLLUSCHI BIVALVI E RISCHI ASSOCIATI

**Auditorium Azienda USL 10 Firenze
Sesto Fiorentino (FI) 20 Novembre 2012**

RISCHI DA BIOTOSSINE ALGALI

R.Poletti

LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER LE BIOTOSSINE MARINE

NATIONAL REFERENCE LABORATORY ON MARINE BIOTOXINS

(G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)

V.le A. Vespucci, 2 - 47042 - CESENATICO (FC) ITALY

Tel +39 0547 80278 Fax + 39 0547 75094

Le Biotossine Marine

Le conoscenze acquisite ci indicano che la sintesi delle biotossine marine d'interesse igienico sanitario, chimicamente definite, ha come origine il **fitoplancton**, il **fitobentos** ma anche i **batteri**.

Queste biomolecole manifestano il loro effetto come tali o attraverso le trasformazioni metaboliche che si possono verificare nei vari passaggi della catena alimentare; sono considerate dei metaboliti secondari termostabili.

Chimicamente sono un gruppo eterogeneo di composti strutturalmente diversi raggruppati in relazione alla loro struttura chimica in:

- A) Amminoacidi (ac. domoico ed analoghi);
- B) Purine Derivati purinici (saxitossine ed analoghi);
- C) Imine cicliche (spirolidi, gymnodimine e pinnatoxin A);
- D) Polieteri lineari e macrociclici non contenenti azoto (ac. okadaico ed analoghi, pectenotossine, azaspiracidi, primnesine);
- E) Polieteri transfusi (brevetossine, yessotossine, ciguatossine).

Biotossine marine

Produttori

1) Tossine **idrosolubili**

- **PSP** (Paralytic Shellfish Poisoning)



Alexandrium minutum
Halim



Alexandrium catenella
(Whedon & Kofoed) Balech

- **ASP** (Amnesic Shellfish Poisoning)



Pseudo-nitzschia pungens Hasle

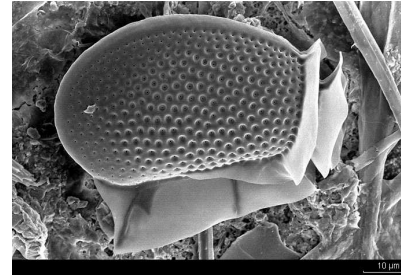
- **TTX** (Sindrome neurotossica da pesce palla)

Vibrio
Bacillus
Moraxella

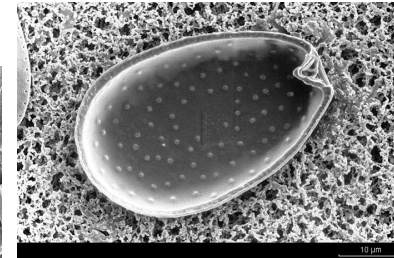
2) Tossine liposolubili

Produttori

DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning)

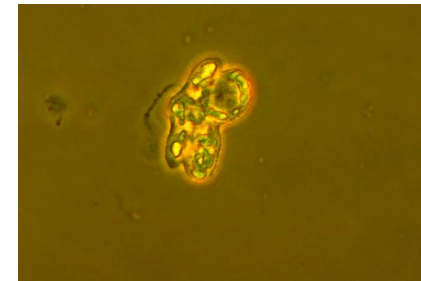


Dinophysis fortii Pavillard



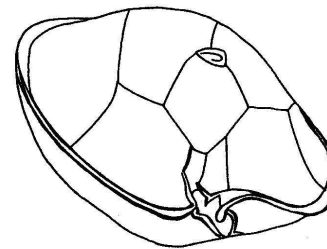
Prorocentrum lima
(Ehrenberg) Dodge

NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning)



Gymnodinium breve Davis

Ciguatera o CFP



Gambierdiscus toxicus Adachi & Fukuyo

LIMITI BIOTOSSINE MARINE

REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine e animale

CAPITOLO V: NORME SANITARIE PER I MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

2. Essi non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente) superiori ai seguenti limiti:

- a) PSP («Paralytic Shellfish Poison»): 800 µg/kg pe;**
- a) ASP («Amnesic Shellfish Poison»): 20 mg ac. domoico/kg pe;**
- b) Acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 µg di equivalente acido okadaico/kg pe;**
- c) yessotossine: 1 mg di equivalente yessotossine/kg pe;**
- d) azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/kg pe.**

Nel 2004 la comunità scientifica (Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs - Oslo, Norway, 27 September -1 October 2004) stabilisce:

a) le biotossine marine devono essere classificate sulla base della loro struttura chimica in otto gruppi:

- 1. Azaspiracidi (AZAs)**
- 2. Acido Okadaico e DTXs**
- 3. Pectenotossine (PTXs)**
- 4. Yessotossine (YTXs)**
- 5. Brevetossine (NSP- PbTXs)**
- 6. Imine cicliche**
- 7. Acido Domoico (DAs)**
- 8. Saxitossine (STXs)**

INOLTRE gli esperti concordano che:

b) il consumo dei molluschi bivalvi deve essere **considerato a carattere saltuario**. La tossicità delle biotossine algali, accumulate nella parte edibile dei bivalvi, è valutata come **tossicità acuta**. In questa situazione, il parametro adottato nella valutazione del rischio è **la Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**.

C) L' **ARfD** è definita come "Valutazione della quantità di una sostanza in un alimento, espressa normalmente in milligrammi per kg di peso corporeo (60 kg di p.c.) che può essere ingerita in un periodo di 24 ore o meno (un pasto) senza rischio apprezzabile per la salute del consumatore, in base a tutti i fatti conosciuti al tempo della valutazione".

D) Per la valutazione del rischio e per definire limiti delle varie biotossine è importante stabilire la quantità di alimento che può essere ingerita nelle 24 ore.

- Nel passato il calcolo dei limiti si è basato su un consumo giornaliero di 100 g di parte edibile (p.e.). Recenti indagini presso i consumatori europei hanno evidenziato che in un pasto i bivalvi ingeriti possono raggiungere anche i 380 g di p.e..

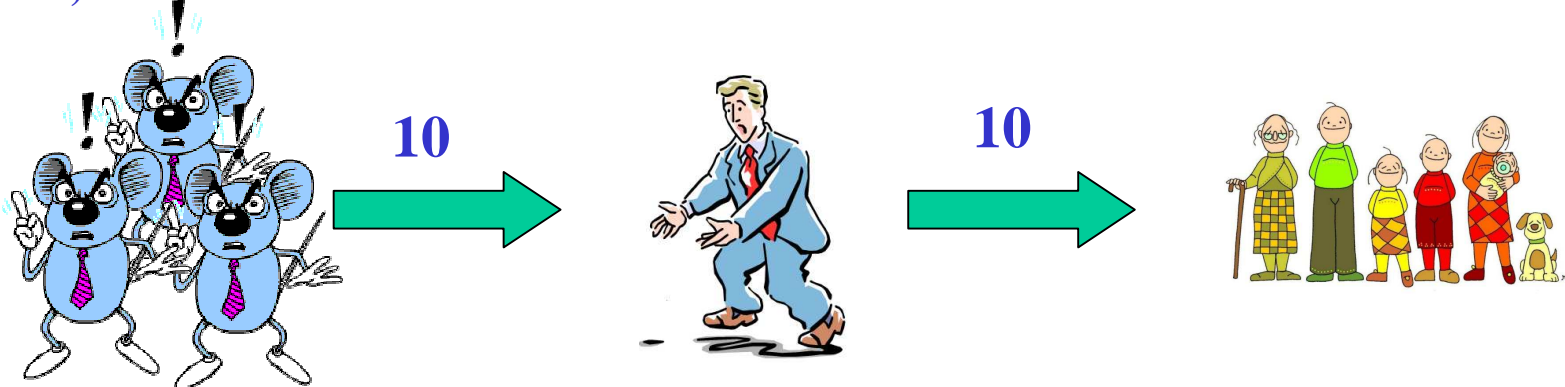
- Il 97,5% della popolazione, comunque, non va oltre il consumo, in 24 ore o in un pasto, di 250 g di p.e. di bivalvi.

L'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) ha proposto nel novembre 2007 di utilizzare come dose giornaliera, per il calcolo dei nuovi limiti, 400 g di parte edibile (molluschi bivalvi).

Altri elementi importanti per la valutazione del rischio

Nella valutazione del rischio è importante selezionare il fattore di incertezza che deve portare al calcolo dell'ARfD. In generale **un fattore d'incertezza** di 100 è usato se i dati sono ottenuti dalla sperimentazione animale:

- a) un fattore di **10** tiene conto dell'estrapolazione dall'animale all'essere umano;
- b) un altro fattore di **10** tiene conto della variabilità umana.



Per i dati ricavati dall'esperienza umana è utilizzato, generalmente, un fattore di 10 (tiene conto soltanto della variabilità umana).

Il tossicologo ha il compito di stabilire questi fattori che possono essere più alti o anche più bassi di quelli sopra citati. Questo dipende, tuttavia, dalla quantità di dati disponibili e se è stato impiegato il **LOAEL** (Lowest Observed Adverse Effect Level) o il **NOAEL** (No Observed Adverse Effect Level).

REGOLAMENTO (UE) N. 15/2011 DELLA COMMISSIONE del 10 gennaio 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda i metodi di analisi riconosciuti per la rilevazione delle biotossine marine nei molluschi bivalvi vivi

ALLEGATO

Nell'allegato III del regolamento (CE) n. 2074/2005, il capitolo III è sostituito dal testo seguente:

CAPITOLO III

METODI DI RILEVAZIONE DELLE TOSSINE LIPOFILICHE

(1) Il metodo LC-MS/MS del laboratorio UE di riferimento è il metodo di riferimento è il metodo per la rilevazione delle tossine marine di cui all'allegato III, sezione VII, capitolo V, parte 2, lettere c), d) ed e), del regolamento (CE) n. 853/2004. Tale metodo deve determinare almeno i seguenti composti:

A. Metodi chimico

- a) tossine del gruppo dell'acido okadaico: OA, DTX1, DTX2, DTX3 compresi i loro esteri;**
- b) tossine del gruppo delle pectenotossine: PTX1 e PTX2;**
- c) tossine del gruppo delle yessotossine: YTX, 45 OH YTX, Homo YTX e 45 OH Homo YTX**
- d) tossine del gruppo degli azaspiracidi: AZA1, AZA2 e AZA3.**

(2) L'equivalenza tossica complessiva è calcolata mediante i fattori di equivalenza tossica (TEF) raccomandati dall'EFSA.

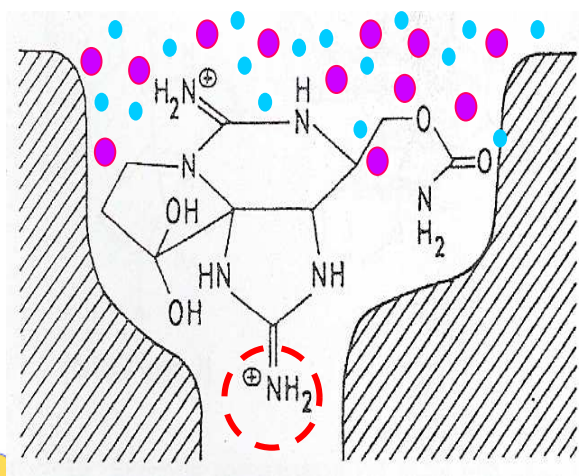
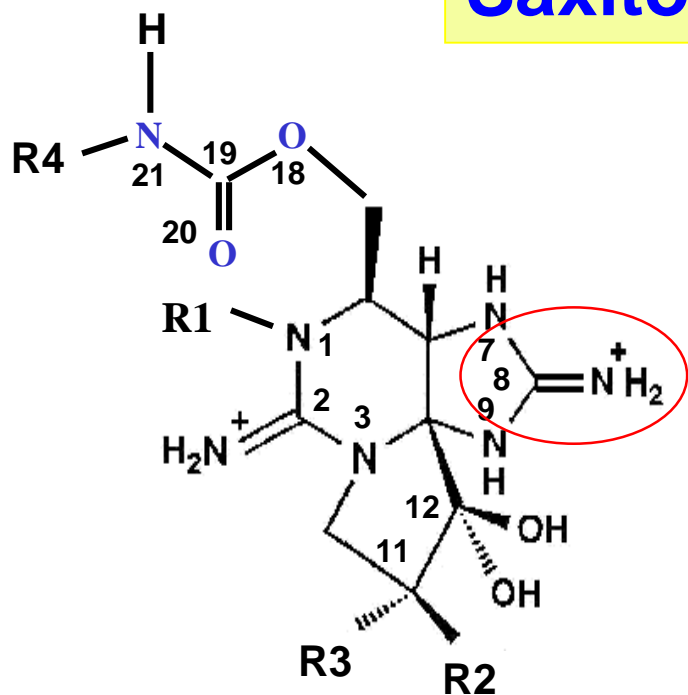
PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

La Paralytic Shellfish Poisoning è una delle sindromi più studiate e conosciute per le gravi conseguenze che produce nei consumatori di molluschi bivalvi. Le microalghe sono principalmente responsabili di questa sindrome ed appartengono quasi esclusivamente alle Dinoflagellate, ma è documentata anche una origine derivante da batteri simbiotici. I sintomi dell'avvelenamento sono di natura neurologica e nei casi più gravi si arriva alla paralisi respiratoria e alla morte.

La tossina, che causava sindrome da PSP, fu chiamata saxitossina (STX), nome derivato dalla specie del mollusco bivalve (*Saxidomus giganteus*) dal quale era estratta .

Come struttura di base le saxitossine hanno una molecola tetroidropurinica con due gruppi guanidinici; uno di questi è interessato al **blocco dei canali del Na⁺ della membrana cellulare**. I circa 20 costituenti PSP finora conosciuti si dividono in tre gruppi: carbamati, composti N-solfocarbamati e decarbamati. Complessivamente hanno proprietà chimiche simili a quelli della saxitossina, ma tossicità talvolta molto diverse.

Saxitossina e analoghi (STXs)



	R1	R2	R3	R4		T.R*
1	H	H	H	H	STX	1.000
2	H	H	H	SO ₃ ⁻	B1	0.064
3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	GTX2	0.359
4	H	OSO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻	C1	0.006
5	H	H	OSO ₃ ⁻	H	GTX3	0.638
6	H	H	OSO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	C2	0.096
7	OH	H	H	H	NEO	0.924
8	OH	H	H	SO ₃ ⁻	B2	0.064
9	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	GTX1	0.994
10	OH	OSO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻	C3	0.013
11	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	GTX4	0.726
12	OH	H	OSO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	C4	0.057

* Tossicità Relativa

Carica a pH 7.0

● = ++
● = +
● = 0

Valutazione del Rischio - PSP (STXs)

Distribuzione	Le STXs sono state trovata in microalghe e molluschi bivalvi in: Africa, Asia, Europa, Nord e Sud america, Oceania.
Assorbimento	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). In cani e gatti la STX ha un tempo di dimezzamento di 12-18 ore. La fonte principale di escrezione sono le urine. I dati sul metabolismo umano della STX sono molto scarsi.
Distribuzione	
Metabolismo	
Escrezione	
Tossicità in animali (topo)	La tossicità acuta (LD ₅₀) in topo: per via i.v. è di 2,4- 3,4 µg/kg p.c.; per i.p. 9,0 - 11,6 µg/kg p.c.; per os 260-263 µg/kg p.c..

Tossicità
umana
per via
orale

Effetto acuto dopo 5-30 minuti con formicolio delle labbra, paralisi facciale e nei casi più gravi paralisi degli arti, blocco del diaframma, paralisi respiratoria e morte. L'esposizione umana alla STX è stata stimata valutando una numerosa serie di intossicazione umane che hanno coinvolto decine di persone con età variabili dai 3 ai 72 anni. La valutazione di questi avvenimenti ha consentito di stimare i sintomi della PSP nelle persone in leggeri, moderati e gravi. Nella sintomatologia leggera è stata valutata una ingestione di 1,5 - 30 μg STX equi./Kg p.c. (peso corporeo). Per le persone coinvolte nei casi più gravi di intossicazione le tossine ingerite sono state calcolate da 10 a 300 μg STX equi./Kg p.c. Gli esperti, sulla base dei dati ricavati da 500 persone e a titolo provvisorio, hanno calcolato un LOAEL di 1,5 μg / kg p.c..

STX

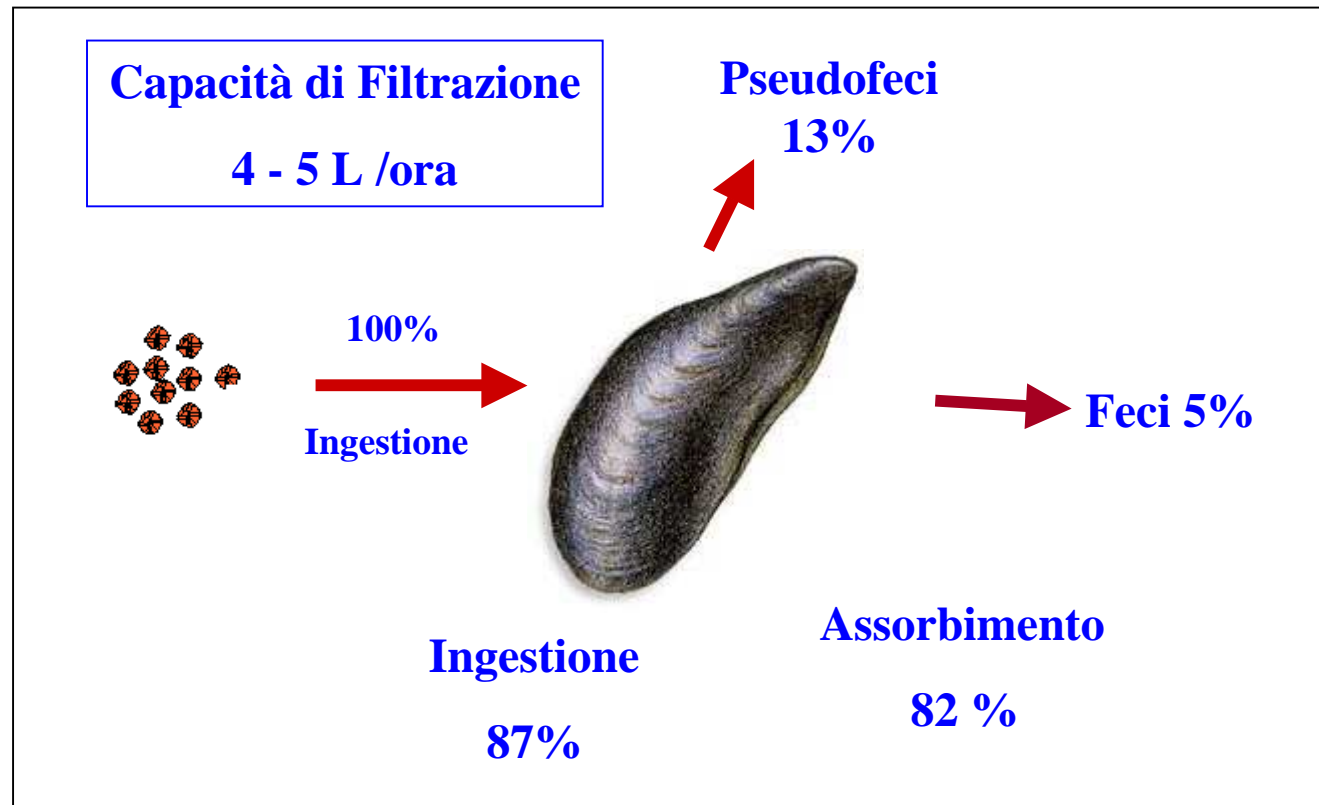
**Dose Acuta di
Riferimento
(ARfD)**

Sulla base del LOAEL di 1,5 µg STX eq. /kg p.c.,
utilizzando un **FI di 3**, l'ARfD è stata calcolata in
0,5 µg STX eq./Kg p.c. (30 µg/Persona)

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * Indicazione EFSA µg STX eq./Kg pe	Limite CODEX STAN 2008 µg STX eq./Kg pe	Limite Reg.853/CE µg STX eq./Kg pe
100	300	800	800
250	120		
400	75		

* Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sulla base delle indicazione EFSA 19 marzo 2009



**Durante una fioritura di alghe tossiche un Mitile può accumulare
9.000 μg di STX**

Venezuela 1977 : persone intossicate 256 con 10 casi mortali

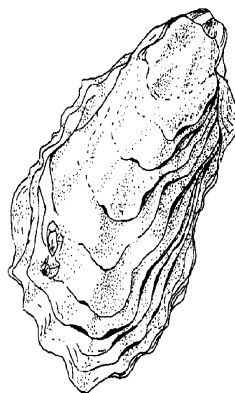
Guatemala 1987 : persone intossicate 187 con 26 casi mortali

Patagonia 2002: due pescatori morti in 4 ore per aver mangiato 7- 8 Mitili



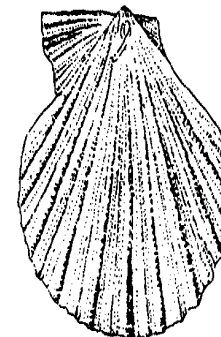
Mytilus edulis

20.000 μg STX/100g p.e.



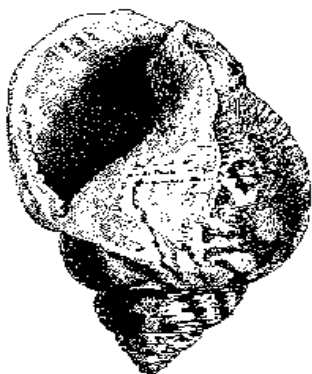
Crassostrea gigas

910 μg STX/100g p.e.



Chlamis

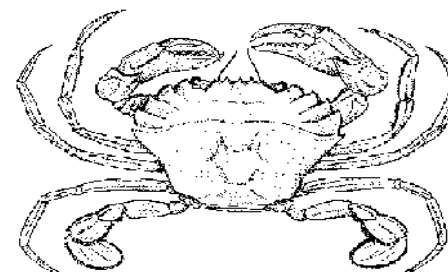
11.945 μg STX/100g p.e.



Buccinum undatum

Ghiandola digestiva 77.840 μg /Kg p.e.

Altri tessuti 400 μg /Kg p.e.



Zosimus aeneus

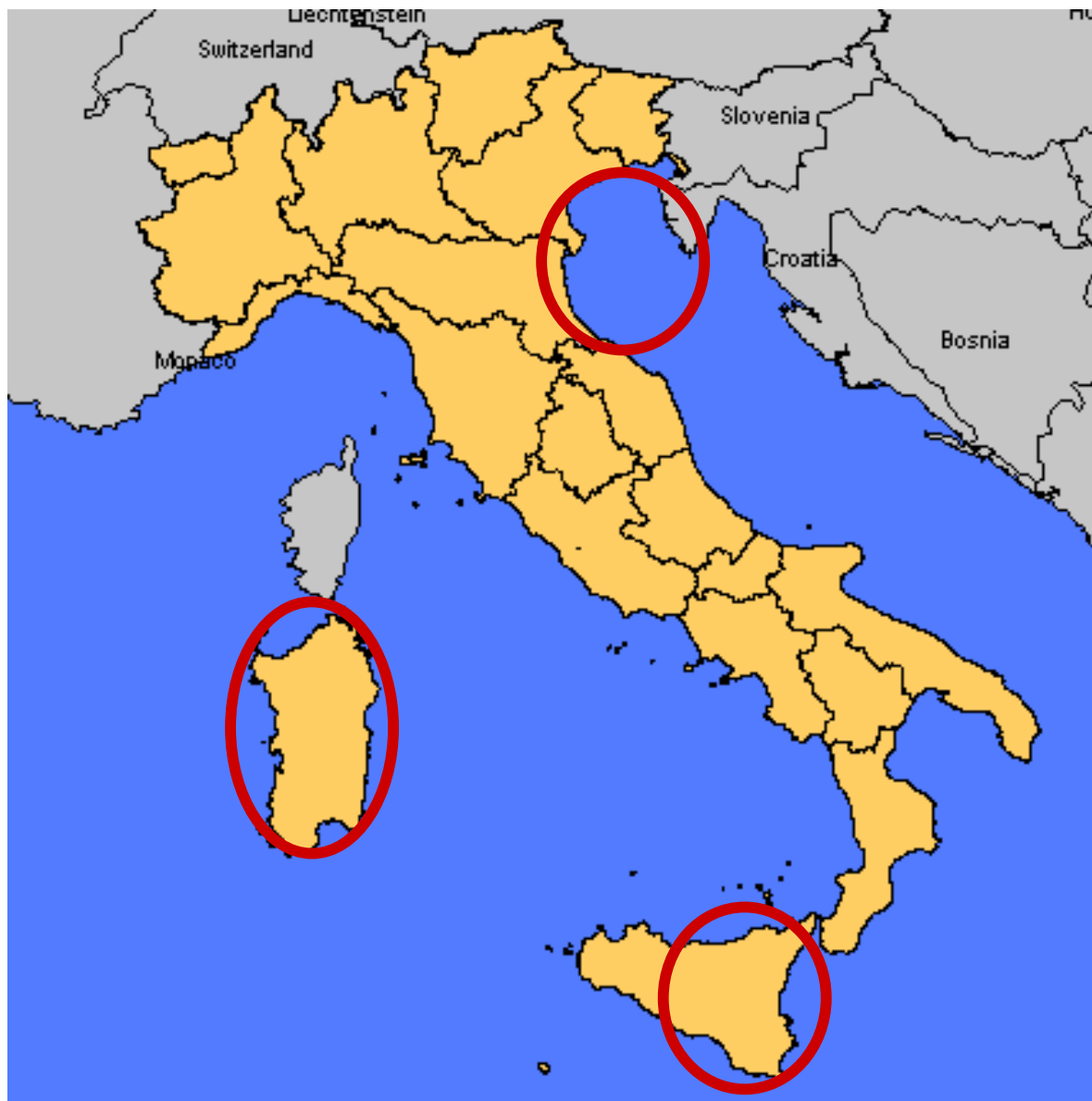
2.970 μg STX/g p.e.

PSP MESI POTENZIALMENTE A RISCHIO	
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	● ● ●
Maggio	● ● ● ●
Giugno	● ● ●
Luglio	● ●
Agosto	●
Settembre	●
Ottobre	● ●
Novembre	● ● ●
Dicembre	●

Capacità fisiologica di accumulo delle biotossine marine PSP

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	● ● ● ● ●
<i>Donax trunculus</i>	● ● ●
<i>Tapes philippinarum</i>	● ●
<i>Callista chione</i>	●
<i>Cardium sp.</i>	●
<i>Chamelea gallina</i>	●
<i>Chlamys sp.</i>	●
<i>Crassostrea gigas</i>	●
<i>Pecten jacobaeus</i>	●

PSP: aree ad alto rischio potenziale



ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)

Nel 1987 a Prince Edward Island, in Canada, si manifestarono 250 casi di intossicazione, di cui quattro mortali, dovuta alla ingestione di mitili tossici (*Mytilus edulis*) durante una fioritura di Diatomee (*Nitzschia pungens* Grunow forma *multiseries*). I sintomi della biointossicazione includevano:

- Nausea 77 %;
- Vomito 76 %;
- Crampi addominali 50 %;
- Diarrea 42 %;
- Mal di testa 43 %;
- Perdita della memoria 25 %.

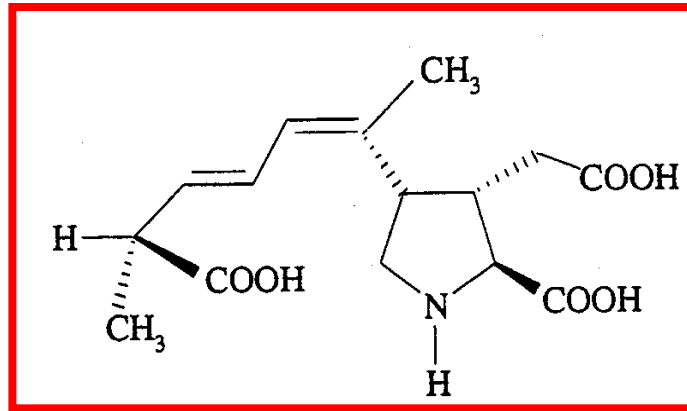
Nei casi più gravi:

Confusione e Disorientamento 100 %;
Mutismo 92 %;
Coma 75 %.

Per questa nuova tossina fu proposto il termine di **Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)**.

La biotossina presente nei bivalvi era l'acido domoico, un amminoacido tricarbossilico, un neuroeccitatore relativamente raro agonista del glutammato, che agisce sui siti della memoria (ippocampo).

Valutazione del rischio ASP (ADs)



Distribuzione

L'acido domoico è stato trovato in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud america, Oceania.

Assorbimento

Distribuzione

Metabolismo

Escrezione

La dose di AD assorbita è il 5-10% di quella ingerita. La massima penetrazione avviene attraverso il sangue. In condizioni normali la barriera emato-encefalica impedisce la penetrazione di AD nel cervello. 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.

Tossicità in animali

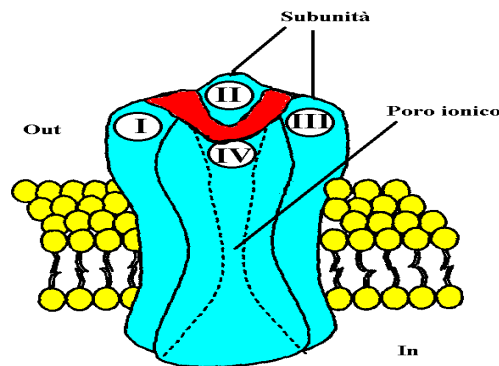
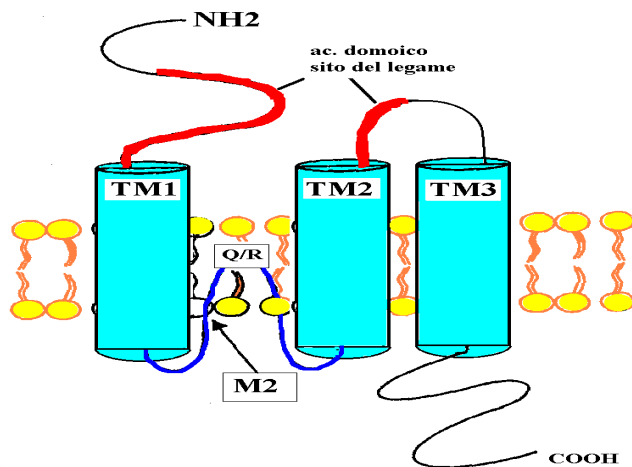
Dipende dalla specie e dall'età. Non sono osservati effetti di tossicità con dosi di AD < 0,5 mg/kg p.c.

ASP

Tossicità umana

Effetto acuto 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 0,9 mg/kg p.c..**

Recettori del Kainato



Nausea
Vomito
Crampi addominali

Mal di Testa
Perdita della memoria breve
Lesioni gravi ai neuroni
dell'ippocampo e coma



**Dose Acuta di
Riferimento
(ARfD)**

Al LOAEL di 0,9 mg AD/kg p.c. è stato applicato un **FI 3** per passare al NOAEL (0,3 mg AD/kg p.c.). Al NOAEL è stato applicato un FI **intraspecie di 10** che porta ad valore di 30 µg/kg p.c.

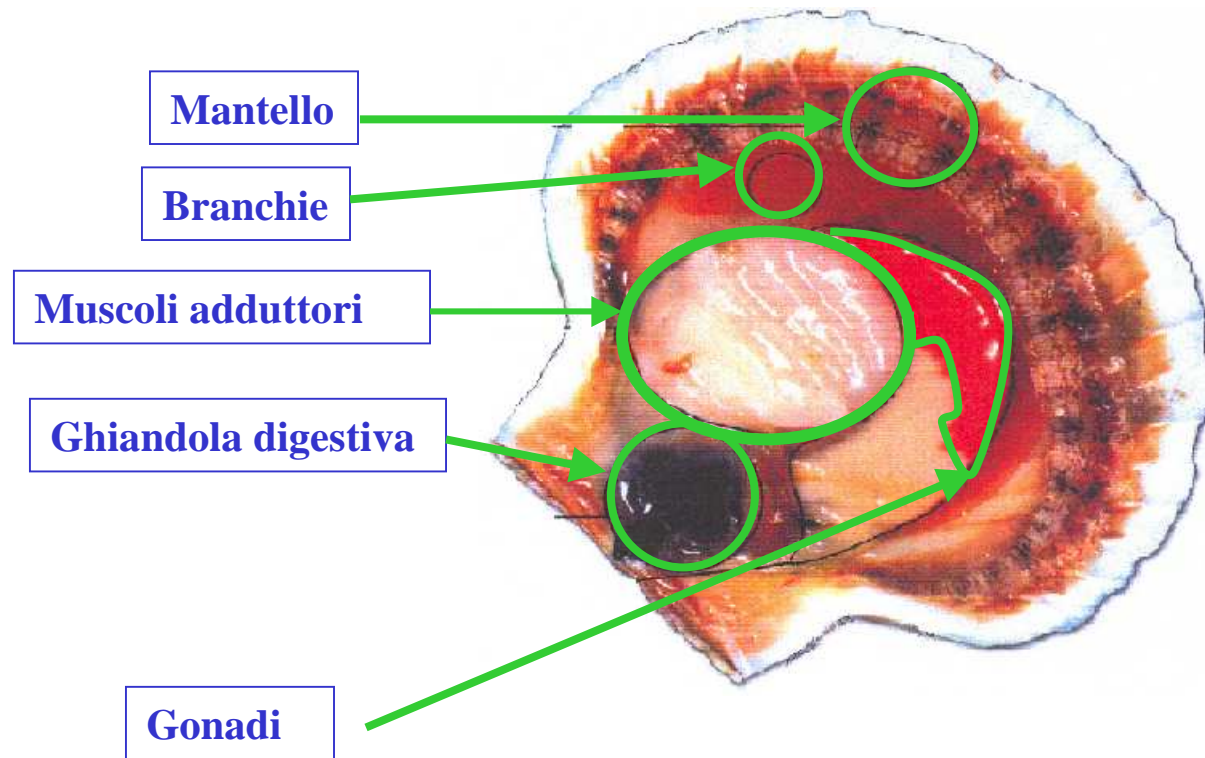
La ARfD è stata stabilita in **30 µg/Kg p.c. (1,8 mg/Persona di 60 kg).**

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * Indicazione EFSA mg AD/Kg pe	Limite CODEX STAN 2008 mg AD/Kg pe	Limite Reg.853/CE mg AD/Kg pe
100	18.0	20	20
250	7.2		
400	4.5		

* Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sulla base delle indicazione EFSA Luglio 2009

Pecten maximus

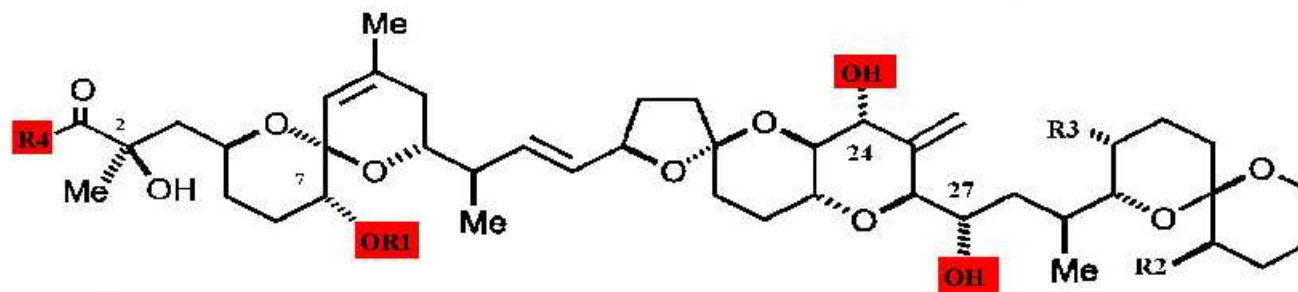


Distribuzione dell'acido domoico

- ghiandola digestiva 98%;
- muscoli 1 %
- gonadi 0,5 %
- altri 0,5%

TOSSINE LIPOFILICHE

1- Acido Okadaico e derivati



		R1	R2	R3	R4	R5	PM
Acido okadaico	(AO)	H	CH ₃	H	OH	-	804,46
Dinophysitossina 1	(DTX1)	H	CH ₃	CH ₃	OH	-	818,48
Dinophysitossina 2	(DTX2)	H	H	CH ₃	OH	-	804,46
Dinophysitossina 3	(DTX3)	Acile	CH ₃	CH ₃	OH	-	
7-0-acil-acido okadaico	(Acil AO)	Acile	CH ₃	H	OH	-	
7-0-acil-dinophysitossina 1	(AcilDTX1)	Acile	H	CH ₃	OH	-	
Dinophysitossina 4	(DTX4)	H	CH ₃	H	X	Y	
Dinophysitossina 5	(DTX5)	H	CH ₃	H	X	Z	
Diol Estere	(DiolOA)	H	CH ₃	H	X	OH	

Valutazione del Rischio Ac. okadaico e derivati (AOs)

Distribuzione

Le tossine (AOs) sono state trovate in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud america, Oceania.

Assorbimento Distribuzione

AOs sono rapidamente assorbite e distribuite in tutto il corpo:

nel contenuto intestinale > urine > feci > tessuti intestinali > polmone > fegato > stomaco > sangue.

Tossicità in animali (topo)

Per iniezione intraperitoneale (i.p.): 200 µg/kg AO; 160 µg/kg DTX1; 250 µg/kg DTX3

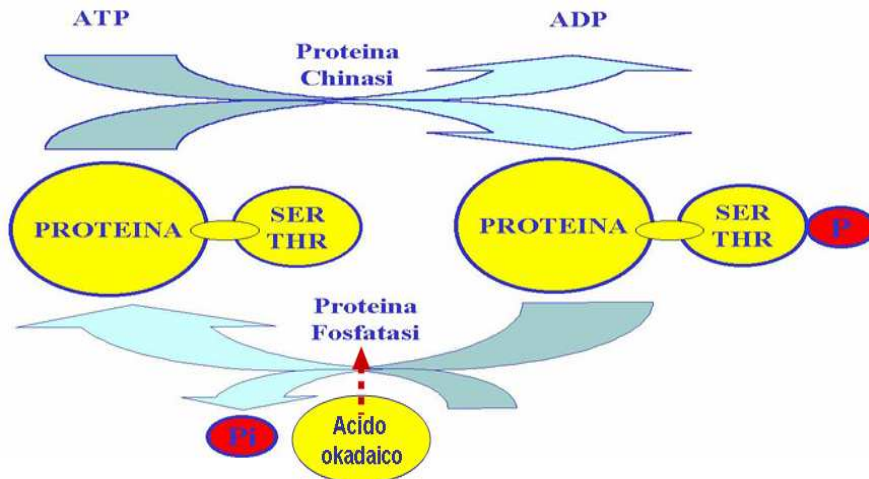
Per os la tossicità è inferiore di 3 – 6 volte rispetto a quella i.p..

Tossicità umana

Effetto acuto disturbi gastrointestinali, diarrea, nausea, vomito e dolori addominali.

LOAEL 0,8 $\mu\text{g/kg}$ peso corporeo (p.c.)
ovvero circa **50** μg di OA/per persona (60 kg).

Meccanismo d'azione
Potenti inibitori delle Proteine Fosfatasi PP2A e PP1



Mal di testa

Diarrea 92 %
Nausea 80 %
Vomito 79 %
Dolori addominali 53 %

**Dose Acuta di
Riferimento
(ARfD)**

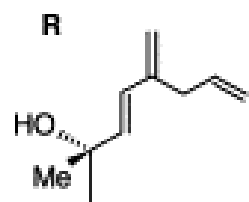
Sulla base del LOAEL di 0,8 µg/kg p.c. è stato applicato un **FI di 3** per estrapolare il **NOAEL** che ha portato a calcolare un **ARfD di 0,3 µg AO eq. /Kg p.c. (18 µg/Persona).**

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * Indicazioni EFSA µg AO eq./Kg pe	Limite CODEX STAN 2008 µg AO eq./Kg pe	Limite Reg.853/CE µg AO eq./Kg pe
100	180	160	160
250	72		
400	45		

* Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sulla base delle indicazioni EFSA giugno 2009

Yessotossina e analoghi



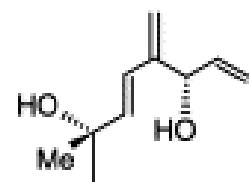
n

1

Yessotoxin (YTX, 1)

2

Homoyessotoxin (HomoYTX, 2)

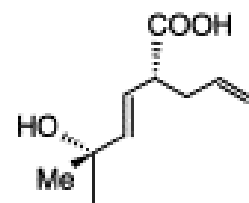


1

45-hydroxyessotoxin (45-OHYTX, 3)

2

45-hydroxyhomoyessotoxin (45-OHhomoYTX, 4)



1

Carboxyessotoxin (CarboxyYTX, 5)

2

Carboxyhomoyessotoxin (CarboxyhomoYTX, 6)



1

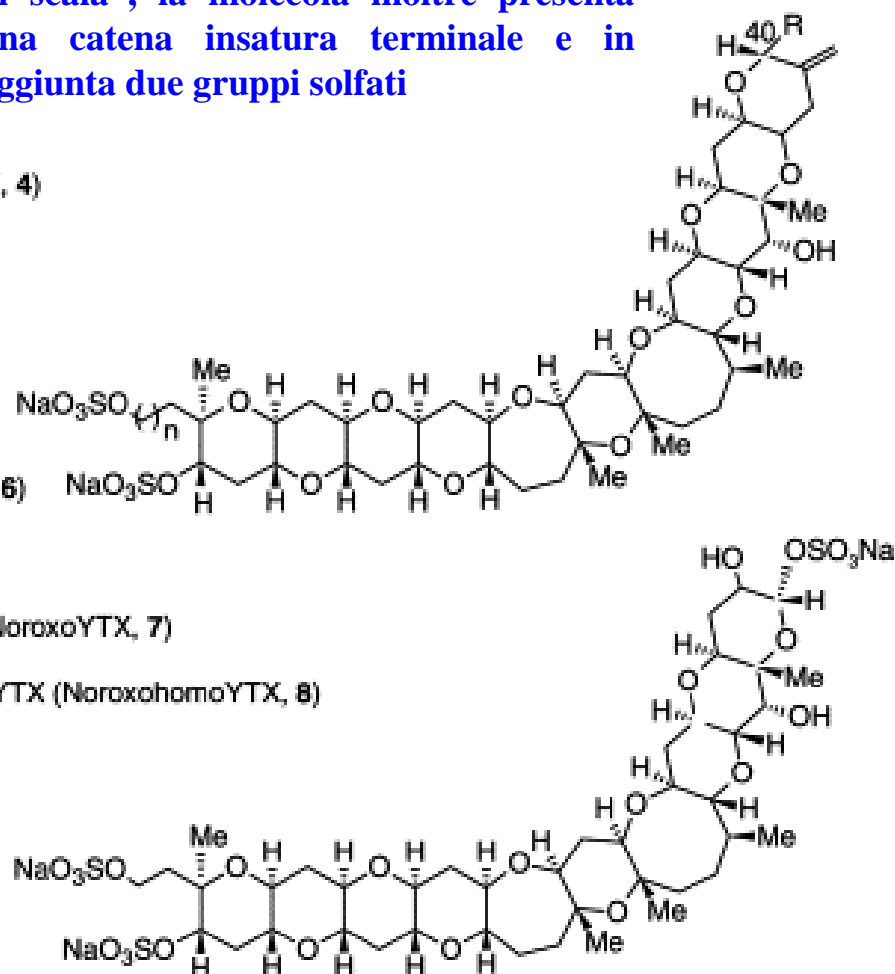
42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxoYTX (NoroxoYTX, 7)

2

42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxohomo YTX (NoroxohomoYTX, 8)

Adriatoxin (ATX, 9)

La yessotossina è un etere policiclico formato da una serie di 11 anelli contigui allineati in una struttura detta “a forma di scala”, la molecola inoltre presenta una catena insatura terminale e in aggiunta due gruppi solfati



Struttura Chimica

Tossina	Formula	Peso Molecolare	Tossicità mg/Kg Nel topo i.p.	Sorgente
YTX	$C_{55}H_{80}Na_2O_{21}S_2$	1186	0.1	Molluschi e Dinoflagellate
HydroxyYTX	$C_{55}H_{80}Na_2O_{22}S_2$	1202	0.5	Molluschi
DesulfoYTX	$C_{55}H_{81}NaO_{19}S$	1084	0.5	Molluschi
HomoYTX	$C_{56}H_{82}Na_2O_{21}S_2$	1200	0.1	Molluschi e Dinoflagellate
Hydroxy homoYTX	$C_{56}H_{82}Na_2O_{22}S_2$	1216	0.5	Molluschi
NorYTX	$C_{52}H_{76}Na_2O_{21}S_2$	1146	0.22	Molluschi e Dinoflagellate
CarboxyYTX	$C_{55}H_{80}Na_2O_{24}S_3$	1218	0.5	Molluschi
ATX	$C_{42}H_{63}Na_3O_{24}S_3$	1116	> 0.1	Molluschi

Valutazione del Rischio YTXs

Distribuzione

YTXs sono state trovata in microalghe e molluschi bivalvi in: Australia, Canada, Giappone, Inghilterra, Italia, 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

Non ci sono dati disponibili sul dettaglio del meccanismo o meccanismi dell'azione tossica delle YTXs. La YTX interviene sull'omeostasi di Ca^{2+} nella cellula, attiva le fosfodiesterasi (PDE) che controllona l'attività dei cAMP e cGMP.

Tossicità in animali (topo)

Per i.p. dei 9 analoghi della YTX, 7 mostrano una tossicità (LD_{50}) che varia dai 100 ai 750 $\mu\text{g/kg p.c.}$.

Per os la tossicità è notevolmente inferiore.

La somministrazione per os di 5 mg/kg p.c. per breve tempo non ha rilevato tossicità (NOAEL).

Tossicità umana

Non sono mai stati riportati casi di intossicazione.

**Dose Acuta di
Riferimento
(ARfD)**

**Sulla base del NOAEL di 5 mg/kg p.c., utilizzando
un **FI di 100** più un altro **FI di 2** .**

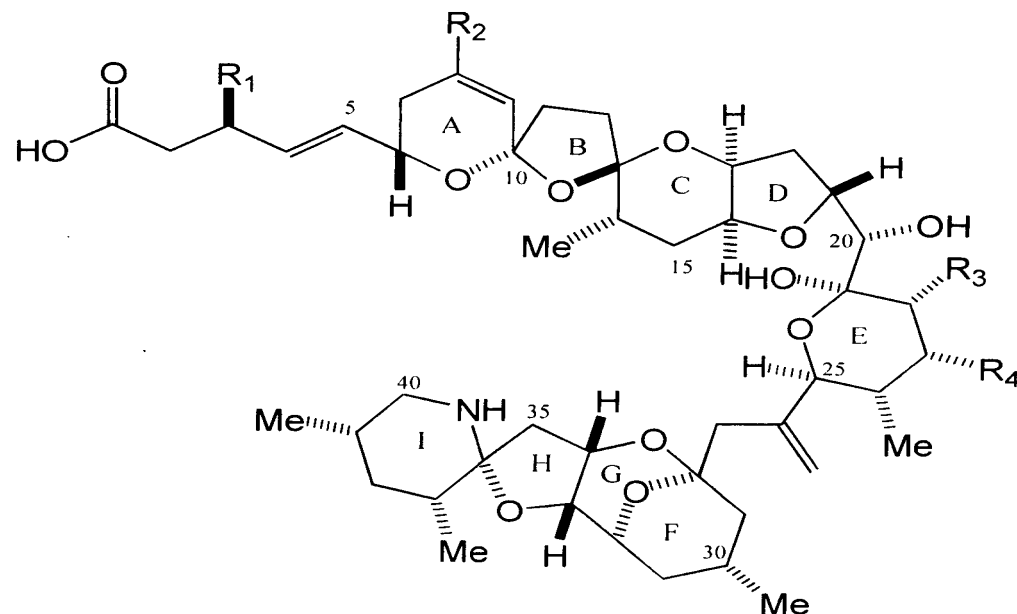
L'ARfD è stata calcolata in **25 µg YTXeq/Kg p.c.
(1,5 mg/Persona)**

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * Indicazioni EFSA mg YTX eq./Kg pe	Limite CODEX STAN 2008 mg YTX eq./Kg pe	Limite Reg.853/CE mg YTX eq./Kg pe
100	15		1
250	6		
400	3,75		

*** Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sulla base delle indicazioni EFSA 3 Febbraio 2009**

Struttura chimica Azaspiracido (AZA)



Tosina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Tossicità nel topo mg/kg i.p.
AZA	H	H	Me	H	0.20
AZA2	H	Me	Me	H	0.11
AZA3	H	H	H	H	1.14
AZA4	OH	H	H	H	0.47
AZA5	H	H	H	OH	1.00

Valutazione del Rischio AZAs

Distribuzione

Le AZAs sono state trovate in molluschi bivalvi: Irlanda, Norvegia e Inghilterra.

La microalga implicata è una Dinoflagellata.

Assorbimento

Distribuzione

Metabolismo

Escrezione

Non ci sono dati

Meccanismo d'azione

Non ci sono dati

Effetto acuto disturbi gastrointestinali.

Tossicità umana

L'AZA1 provoca gravi danni al:

fegato, pancreas, timo, tessuti linfoidei e tratto digestivo.

Dati EFSA indicano un **LOAEL di 113 µg/Persona** (60 kg), 1,9 µg di AZA1 equivalenti/Kg p.c.

**Dose Acuta di Riferimento
(ARfD)**

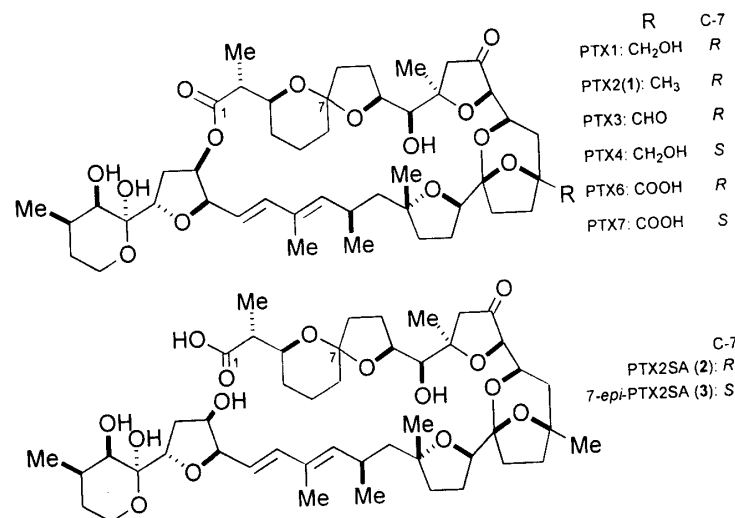
Gli esperti EFSA hanno estrapolato il NOAEL dal LOAEL applicando un FI di 3. Un altro FI di 3 è stato applicato al NOAEL portando ARfD di 0,2 µg/kg pc (12 µg/Persona)

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * Indicazioni EFSA µg AZA1 eq./Kg pe	Limite CODEX STAN 2008 µg AZA eq./Kg pe	Limite Reg.853/CE µg AZA eq./Kg pe
100	120	160	160
250	48		
400	30		

*** Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sulla base delle indicazioni EFSA giugno 2008**

Pectenotossine (PTXs)



Tossina

Massa molecolare

**Tossicità
(topo i.p.) µg/kg**

Effetto patologico

PTX1
PTX2
PTX3
PTX6

874
858
872
888

250
230
350
500

epatotossico
epatotossico
epatotossico
epatotossico

Tossicità umana

In Australia alcuni casi di intossicazione umana (disturbi gastrointestinali) sono stati inizialmente attribuiti a PTX 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 applicando un **FI di 3** per ottenere il NOAEL e su tale valore è stato applicato un ulteriore **FI di 100**. Pertanto l' **ARfD è stata calcolata in 0,8 µg PTX2 eq. /Kg p.c. (48 µg/Persona).**

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * Indicazioni EFSA µg PTX eq./Kg pe	Limite guida CODEX STAN 2008 µg PTX eq./Kg pe	Limite Reg.853/CE µg PTX eq./Kg pe
100	480		160
250	192		
400	120		

* Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sulla base delle indicazione EFSA giugno 2009

CODEX STAN 292 – 2008

STANDARD FOR LIVE AND RAW BIVALVE MOLLUSCS

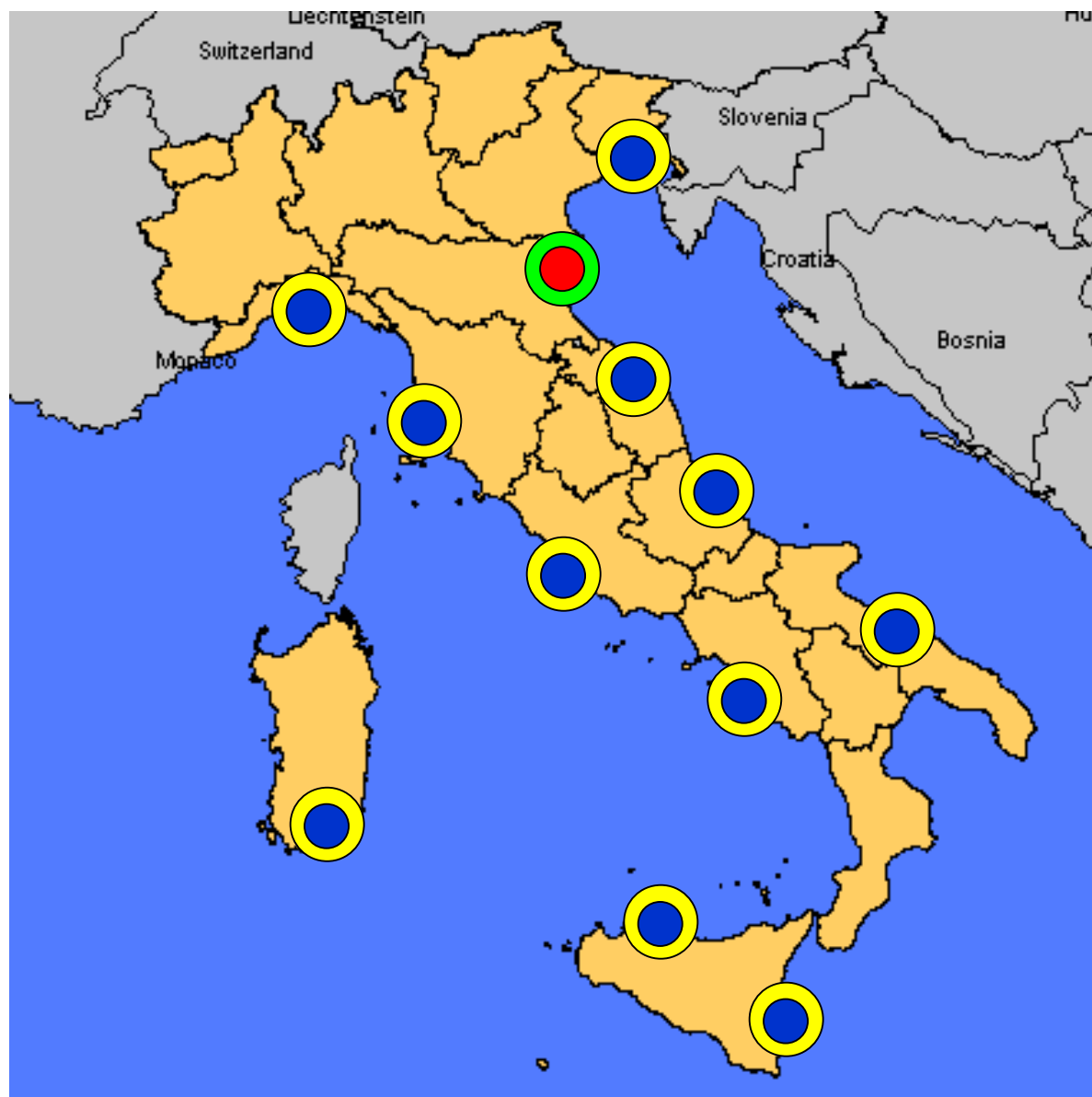
CODEX STAN 292-2008

Page 2 of 7

**I-5.2 The following provisions apply to the edible parts of live bivalve mollusc
(the whole part or any part intended to be eaten separately)**

Name of biotoxin in groups	Maximum level/Kg of mollusc flesh
Saxitoxin (STX) group	≤ 0.8 milligrams (2HCl) of saxitoxin equivalent
Okadaic acid (DSP) group	≤ 0.16 milligrams of okadaic equivalent
Domoic acid (DA) group	≤ 20 milligrams domoic acid
Brevetoxin (BTX) group	≤ 200 mouse units or equivalent
Azaspiracid (AZP) group	≤ 0.16 milligrams

Comparsa di nuove microalghe - Nuove tossine



Gruppo Imine Cicliche

- 1) Gimnodimine
- 2) Spirolidi
- 3) Pinnatossina
- 4) Prorocentrolidi
- 5) Spiro-procentrimine.

Distribuzione	TOSSINE trovata in microalghe e molluschi bivalvi in: Danimarca, Italia, Norvegia, Scozia, Nuova, Canada, Tunisia, nuova Zelanda.
Assorbimento,Distribuzione Metabolismo,Escrezione	Non ci sono dati.
Meccanismo d'azione Tossicità i topo	Le imine cicliche producono una rapida morte del topo per i.p. ma non ci sono dettagli sul meccanismo d'azione. Per os: gimnodimine e spirolidi sono molto meno tossici.
Tossicità umana	Si conosce un solo episodio (Canada), non dimostrato, di tossicità da spirolidi (disturbi gastrici e tachicardia). Episodi di tossicità in Giappone per pinnatossina erano recentemente attribuiti a <i>Vibrio</i> sp.

1- Gimnodimine

Le Gimnodimine sono fortemente tossiche al topo per iniezione intraperitoneale (fast-acting) in quanto bloccano la trasmissione neuromuscolare. Sono molto meno tossiche per somministrazione orale. Tramite alimentazione mediante sonda gastrica LD50 è stato calcolato in 755 µg/kg peso corporeo. L'alimentazione per via orale non ha registrato nessun effetto tossico alla concentrazione di 7500 µg/kg p.c..

Dose Acuta di
Riferimento
(ARfD)

Usando i dati di alimentazione per os ed applicando un fattore di sicurezza di 100, il ARfD è di 75 µg/kg p.c. (4,5 mg/Persona)

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di Parte Edibile	Limite Guida mg/kg p.e.	Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)
100	45	
250	18	
400	12	

2. Spirolidi

Le tossicità acute dello spirolide C, dello spirolide C desmetil e di 20-methyl spirolide G sono state determinate sia tramite l'alimentazione mediante sonda gastrica che attraverso la normale alimentazione. Questi composti sono 10-15 volte più tossiche, al topo, delle gimnodimine. Il NOAEL delle prove di alimentazione per os di questi composti è stato calcolato in 500 µg/kg p.c..

Dose Acuta di
Riferimento
(ARfD)

A causa dell' alta tossicità di queste sostanze è stato utilizzato un fattore di sicurezza di 300 per la valutazione del rischio. L'ARfD è quindi di 1,67 µg/kg p.c. ,

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di Parte Edibile	Limite Guida µg/kg p.e.	Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)
100	1000	
250	400	
400	250	

Conclusioni del 1° meeting del WG Tossicologi (DG- SANCO)
Cesenatico 24-25 Ottobre 2005



PALITOSSINA

Colonie di Palythoa & Zooantus

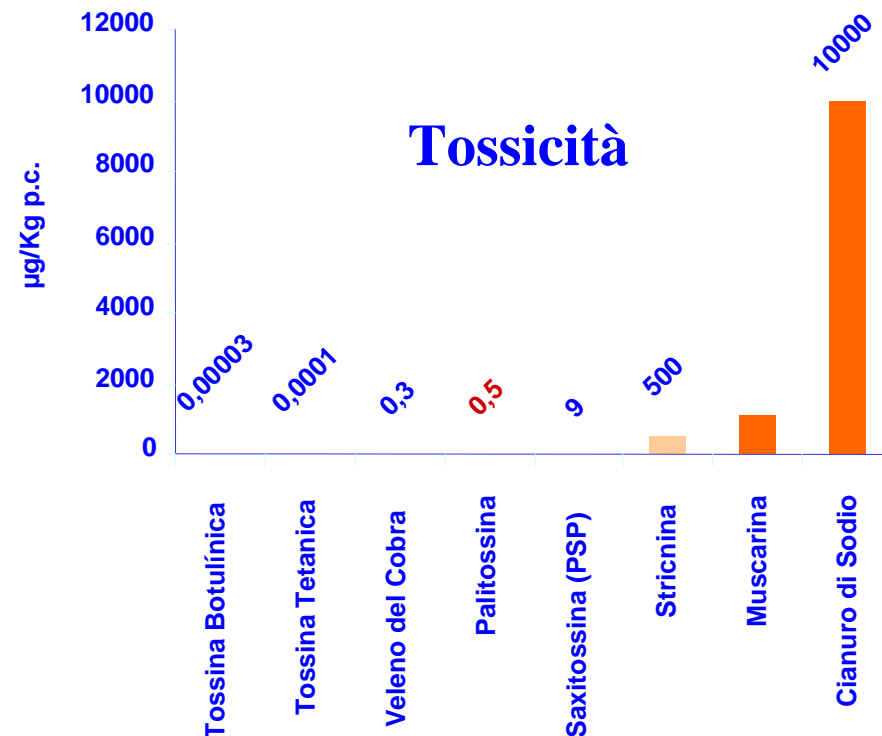
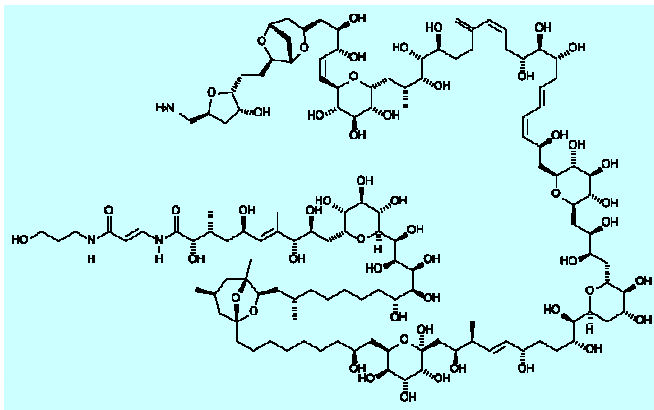
PALITOSSINE

Struttura chimica della Palitossina

Nel 1971 alle Hawaii è stato isolato per la prima volta un materiale tossico da un celenterato marino del genere *Palythoa*: per questo nuovo materiale tossico è stato coniato il nome di "Palitossina" (Moore & Scheuer, 1971). La palitossina ha un'area lipofila e idrofila, è una delle più potenti e letali tossine marine conosciute non proteiche, ha un elevato peso molecolare variabile da 2659 a 2680 e produce nella cellula una varietà d'effetti fisiologici e biochimici che si manifestano principalmente con un aumento della permeabilità cationica della membrana plasmatica.



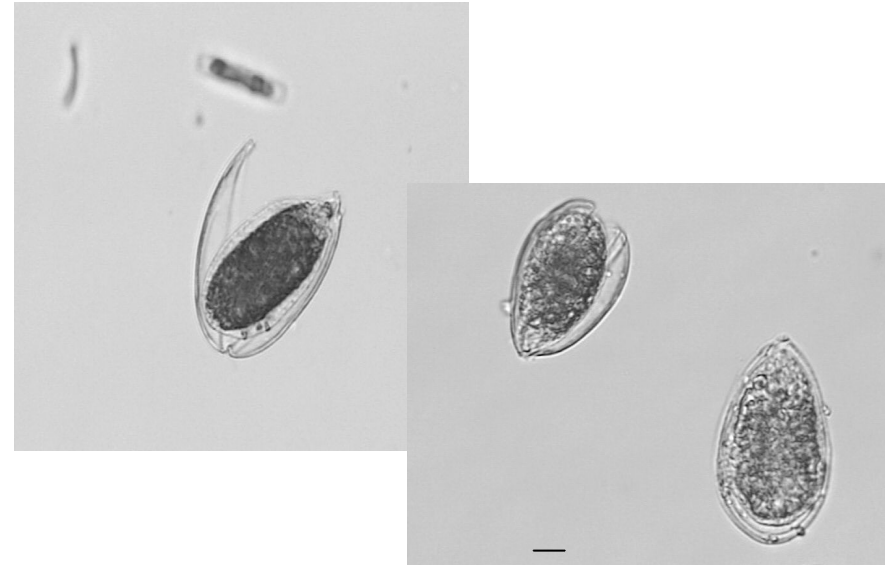
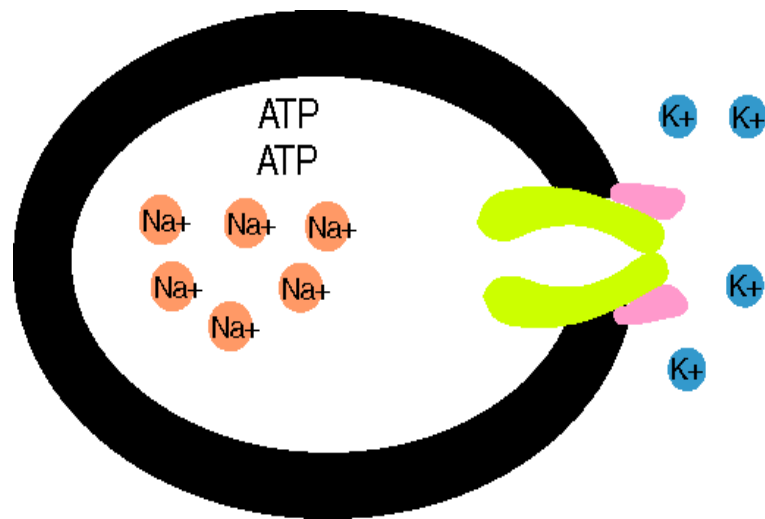
I diversi analoghi hanno mostrato un peso molecolare compreso tra 2659 e 2680 Da



Ostreopsis ovata Fukuyo 1981

Produce Palitossine

**Le Palitossine tossina disarticola la
Pompa Na^+/K^+ ATPasi**



**Lunghezza 47-55 μm
Larghezza 27-35 μm**

**Specie epifita, bentonica, ticoplanctonica
Teca molto sottile e delicata
Facile alla degradazione**

Ostreopsis ovata

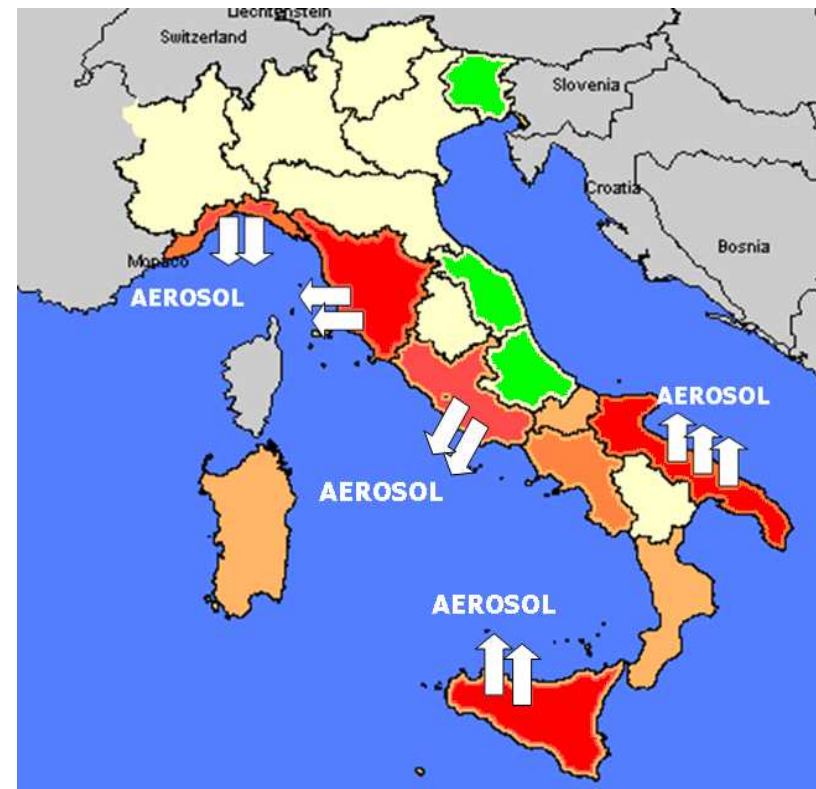


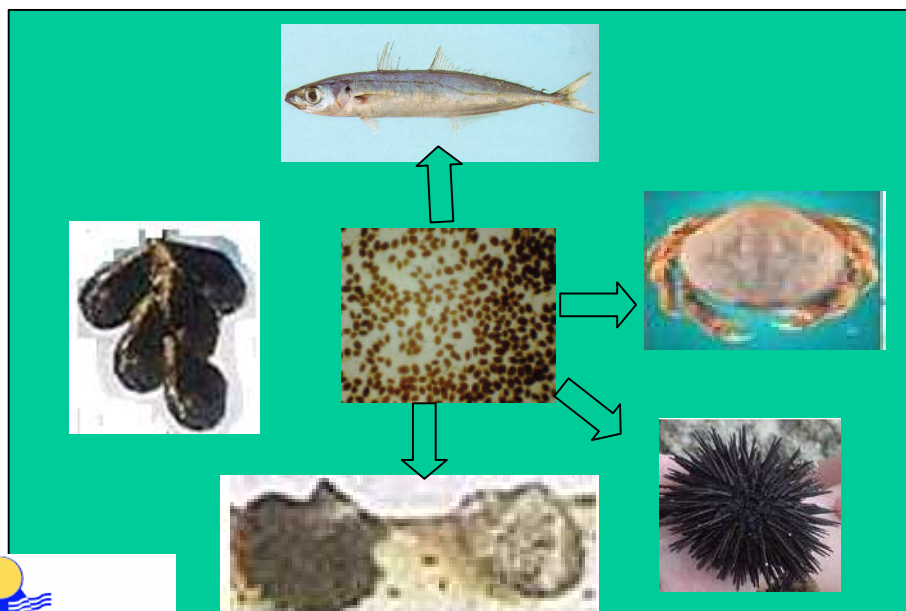
Fig. 1- Regioni in cui è stata segnalata *Ostreopsis* spp.:
 2005: Liguria – Toscana - Lazio – Campania - Calabria – Puglia – Molise – Sicilia – Sardegna;
 2006: Abruzzo - Marche – Friuli Venezia Giulia

↑ Regioni in cui sono stati segnalati disturbi respiratori nelle persone.

Diffusione di Palitossine



Per inalazione



Per OS



Caso di Genova 2005 Aspetti epidemiologici attribuiti a *Ostreopsis ovata* (palitossine?)

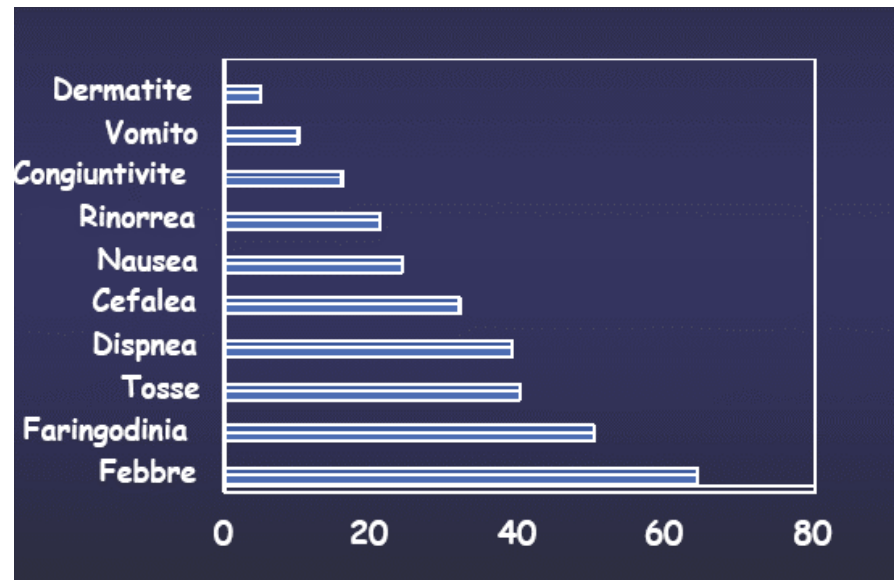
G. Icardi

Azienda Ospedaliera Universitaria "San Martino"

DiSSal Università degli Studi di Genova

a)	Febbre	64 %
b)	Faringodinia	50 %
c)	Tosse	40 %
d)	Dispnea	39 %
e)	Cefalea	32 %
f)	Nausea	24 %
g)	Rinorrea	21 %
h)	Congiuntivite	16 %
i)	Vomito	10 %
j)	Dermatite	5 %

Pazienti considerati 225





Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon



Short communication

A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury

Katrin Hoffmann^a, Maren Hermanns-Clausen^b, Claus Buhl^a, Markus W. Bächler^a, Peter Schemmer^a, Dietrich Mebs^c, Silke Kauferstein^{c,*}

^a Department of General Surgery, Ruprecht-Karls-University Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 110, D-69120 Heidelberg, Germany

^b Poisons Information Center VIZ-Freiburg, Freiburg University Hospital, Mathildenstr. 1, D-79106 Freiburg, Germany

^c Centre of Forensic Medicine, University of Frankfurt, Kennedyallee 104, D-60596 Frankfurt am Main, Germany



Un caso di palytossina per ferita delle dita con coralli (*Parazoanthus* sp.) durante la pulizia dell'acquario.

I sintomi clinici: gonfiore, parestesia e intorpidimento intorno alla ferita e al braccio, segni di intossicazione sistemica come vertigini, debolezza generale e mialgia, mialgia, irregolarità nella ECG e indicazioni di rhabdomiolisi. Le concentrazioni di PLTXs in *Parazoanthus* sp. erano estremamente elevate (tra il 2 e 3 mg di PLTX/ g).

Valutazione del Rischio Palitossina e Ostreocina D (PLTX-ODS)

Distribuzione	Le PLTXs sono trovata in microalghe, molluschi bivalvi, crostacei e pesci. Le aree di massima diffusione sono quelle tropicali e sub tropicali. Dal 1995 le PITXs sono state ritrovate anche nel Mediterraneo.
Assorbimento	
Distribuzione	Non è facilmente assorbita.
Metabolismo	Agisce sui canali della pompa Na^+/K^+ ATPase
Escrezione	
Tossicità in animali (topo)	<p>Per i.p. la PITX mostra un LD_{50} di $0,72 \mu\text{g/kg p.c.}$, mentre per os LD_{50} è di $510 \mu\text{g/kg p.c.}$.</p> <p>Palitossina e ostreocina D somministrate per via sub linguale alla concentrazione di circa $200 \mu\text{g/kg p.c.}$ provocano cambiamenti e lesioni in polmoni, nell'apparato gastro intestinale e reni.</p>
Tossicità umana	
Per via Orale	<p>Gli effetti tossici potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco.</p> <p>Sintomi: sapore metallico o amaro, nausea, ipersalivazione, vomito, dolori addominali, diarrea, paralisi degli arti inferiore, spasmi muscolari e difficoltà respiratoria.</p> <p>Casi mortali attribuiti a palitossine per consumo di pesci e crostacei.</p>

PITX (Palitossine)

**Dose Acuta di Riferimento
(ARfD)**

EFSA-CONTAM sulla base dei dati disponibili della sperimentazione animale ha ricavato un **LOAEL di 200 µg/Kg p.c.** A questo dato è stato applicato un **FI di 1000** che porta a una **ARfD di 0,2 µg PITX/OSD /kg p.c. (12 µg PITX+OSD/Persona)**

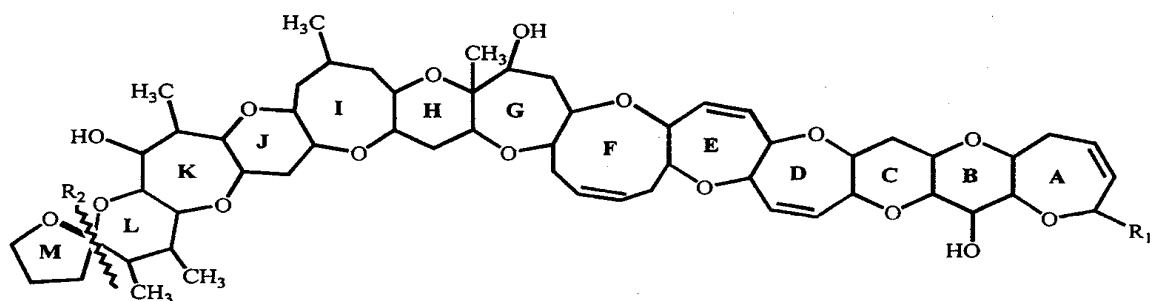
Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * CRLMB µg PITX/kg p.e.	Limite guida ** Indicazioni EFSA µg PITX+ ODS/kg p.e.	Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)
100	642	120	
250	256	58	
400	160	30	

•Calcolo dei limiti elaborati da Poletti sull'indicazione del CRLMB "CRL Working group on Toxicology Cesenatico, October 2005 "

** Calcolo dei limiti elaborati da R. Poletti sull'indicazione EFSA/CONTAM (Novembre 2009)

Ciguatera o CFP (Ciguatera Fish Poisoning)



P-Ciguatoxin-1
(P-CTX-1)

R1

-CH=CH-CH(OH)-CH₂-OH

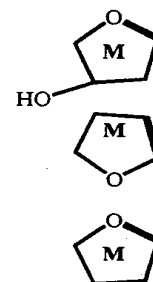
P-Ciguatoxin-2
(P-CTX-2)

-CH=CH-CH(OH)-CH₂-OH

P-Ciguatoxin-3
(P-CTX-3)

-CH=CH-CH(OH)-CH₂-OH

R2



Tossina	ip. Topo 20g LD50 µg/kg p.c.	UT	Tempo di morte
CTX1	0,25	5	37'- 24h
CTX2	2,30	9	53' – 100h
CTX3	0,90	18	60'- 26h
GTX-4B	4,00	80	-
MTX-1	0,05	1	72'- 72h

EPIDEMIOLOGIA

L'avvelenamento si manifesta attraverso il consumo di pesci **circa 400 specie possono essere potenzialmente tossiche**. Pesci che superano i 10 Kg possono contenere livelli di tossina pericolosi per la salute umana, quelli inferiore ai 2 kg raramente sono pericolosi.

Le CTXs si accumulano in tutti i tessuti del pesce, ma prevalentemente nel fegato e nelle viscere.

Altre tossine ritrovate nei pesci ciguatossici: ciguatossine, maitotossine (idrosolubile), Scaritossina.

Sono presenti talvolta nei pesci anche tossine quali: acido okadaico e palytossina

I casi di avvelenamento da CFP variano da 10.000 a 50.000 ogni anno e le popolazioni colpite sono quelle delle aree tropicali e sub tropicali.

In alcune isole del Pacifico e dei Caraibi il 12% della popolazione è colpita da CFP.

La malattia si manifesta in maniera evidente dopo la seconda volta che è stato consumato pesce tossico, la prima intossicazione da CFP è molto blanda ed il paziente, molte volte, non ricorre alle cure del medico.

Gli adulti, in particolare gli anziani, manifestano sintomi molto più gravi rispetto ai bambini.

I casi mortali sono molto rari e avvengono per gravi problemi respiratori e cardiovascolari.

Catena trofica

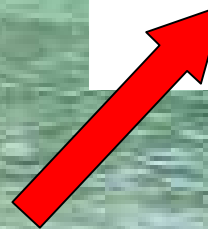
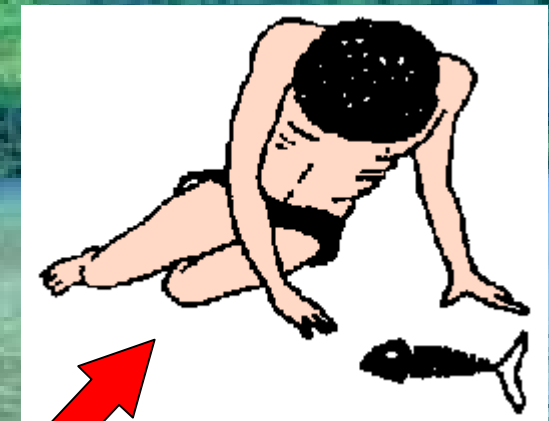
Coralli e macroalghe



Pesci erbivori

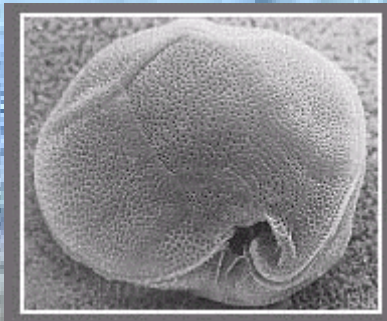


?



Pesci carnivori

Gambierduscus toxicus



Ciguatossine Analisi del rischio

Distribuzione

Le ciguatossine (CTXs) sono trovate in microalghe e in molte specie di pesci della zona tropicale e subtropicale.

Recentemente la microalga che produce le CTXs è stata ritrovata nel Mediterraneo e in alcuni pesci pescati in Israele è stata confermata la loro presenza.

Assorbimento

Distribuzione

Metabolismo

Escrezione

Rapido assorbimento e distribuzione in tutto il corpo. Le ciguatossine si accumulano nella parte lipofila della cellula.

Meccanismo d'azione

Le CTX si legano ai canali del Na^+ (α subunità - sito 5) aumentando il tempo di apertura del canale con depolarizzazione della membrana neuronale.

Tossicità umana Sintomi

I Sintomi sono di natura:

Neurologica: Parestesia della bocca e degli arti; Atassia; Mialgia; Eemicrania; Vertigini; Debolezza muscolare; L'inversione sensitiva di caldo e freddo; Tremore; Salivazione; ecc...

Gastrointestinale: Nausea; Diarrea; Vomito; Dolori addominali.

Cardiovascolare: Aritmia; Bradicardia; Ipotensione; Tachicardia.

L'inizio dei sintomi avviene 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.

CFP (Ciguatossine)

Dose Acuta di Riferimento (ARfD)

EFSA-CONTAM: considerando la scarsità dei dati tossicologici non ritiene 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 pe, si propone di applicare alla concentrazione più bassa (0,1 µg P-CTX-1 eq./Kg pe), 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 pe

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

Grammi di parte edibile	Limite guida * CRLMB µg PITXkg p.e.	Limite guida ** Indicazioni EFSA ng P-CTX-1 eq/Kg pe	Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)
500	40	10	

•Calcolo dei limiti elaborati da Poletti sull'indicazione del CRLMB "CRL Working group on Toxicology Cesenatico, October 2005 "

** Indicazione EFSA/CONTAM (Maggio 2010)



NATIONAL REFERENCE LABORATORY ON MARINE BIOTOXINS

(G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)

V.le A. Vespucci, 2 - 47042 - CESENATICO (FC) ITALY

Tel +39 0547 80278 Fax + 39 0547 75094

e – mail: infocrm@centroricerchemarine.it

<http://www.centroricerchemarine.it>

Grazie per l'attenzione