

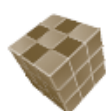


RAPPORTI ISTISAN 14|19

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Ostreopsis cf. ovata:
linee guida per la gestione delle fioriture
negli ambienti marino-costieri in relazione a
balneazione e altre attività ricreative

A cura di
E. Funari, M. Manganelli ed E. Testai



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

***Ostreopsis cf. ovata:*
linee guida per la gestione delle fioriture
negli ambienti marino-costieri in relazione a
balneazione e altre attività ricreative**

A cura di
Enzo Funari, Maura Manganelli ed Emanuela Testai
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
14/19

Istituto Superiore di Sanità

***Ostreopsis cf. ovata*: linee guida per la gestione delle fioriture negli ambienti marino costieri in relazione a balneazione e altre attività ricreative.**

A cura di Enzo Funari, Maura Manganelli ed Emanuela Testai

2014, iv, 118 p. Rapporti ISTISAN 14/19

Ostreopsis cf. ovata è un'alga marina bentonica, presente in estate dalla fine del secolo scorso lungo le coste di molte Regioni italiane, produttrice di tossine poco conosciute dal punto di vista tossicologico. Il presente rapporto aggiorna le linee guida "Gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis ovata* nelle coste italiane" (DM 30 marzo 2010). Nella prima parte sono riportate le informazioni disponibili su chimica, tossicologia, epidemiologia e diffusione in Italia, evidenziando le molte lacune conoscitive. Nella seconda parte, seguendo un approccio basato sulla valutazione del rischio, sono elaborate le linee guida per proteggere le persone dall'esposizione orale, cutanea e inalatoria (che finora ha presentato i maggiori problemi sanitari), anche tenendo conto delle condizioni meteo-marine, determinanti per la loro insorgenza. Vengono proposti un monitoraggio ambientale e sistemi di sorveglianza sanitaria e di comunicazione ai cittadini, corredati delle necessarie indicazioni tecniche per attuare quanto proposto.

Parole chiave: Balneazione; *Ostreopsis cf. ovata*; Tossine marine; Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

***Ostreopsis cf. ovata*: guidelines for the management of blooms in relation to bathing and other recreational activities in marine coastal waters.**

Edited by Enzo Funari, Maura Manganelli and Emanuela Testai

2014, iv, 118 p. Rapporti ISTISAN 14/19 (in Italian)

Ostreopsis cf. ovata is a benthic marine alga, blooming in summer along the coasts of many Italian Regions since the end of the last century. It produces toxins, still poorly known. This report provides the update of the Italian guidelines for the management of *Ostreopsis ovata* blooms along the Italian coasts (DM 30/3/2010). The first part summarizes the current scientific knowledge on chemical, toxicological, epidemiological aspects and on its diffusion, highlighting many scientific gaps. In the second part, a risk-based approach is developed, to protect people from oral, dermal and inhalation exposure (the one that so far caused major health problems), also taking into account the weather and sea conditions, crucial for their onset. The report provides guidelines to set up environmental monitoring activities, a health surveillance system, and a system of communication to the public, supplemented by the necessary technical annexes aimed at territorial authorities in charge.

Key words: Bathing water; Marine toxins; *Ostreopsis cf. ovata*; Risk assessment

Per informazioni su questo documento scrivere a: enzo.funari@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Funari E, Manganelli M, Testai E (Ed.). *Ostreopsis cf. ovata*: linee guida per la gestione delle fioriture negli ambienti marino costieri in relazione a balneazione e altre attività ricreative. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014. (Rapporti ISTISAN 14/19).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Introduzione.....	1
-------------------	---

PARTE A

Sintesi delle conoscenze disponibili

A1. Alghe tossiche e *Ostreopsis cf. ovata* nelle acque di balneazione

<i>Patrizia Ciminiello, Maura Manganelli, Antonella Penna, Cecilia Totti, Adriana Zingone</i>	5
A1.1. Cenni di ecologia di <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	7
A1.2. Diversità genetica e problematica dell'identificazione morfologica di <i>Ostreopsis</i>	7
Bibliografia	9

A2. Presenza di *Ostreopsis cf. ovata* e altre microalghe bentoniche potenzialmente tossiche nelle acque costiere italiane

<i>Rosella Bertolotto, Patrizia Borrello, Irene Di Girolamo, Manuela Ercolessi, Erika Magaletti, Anna Milandri, Antonella Penna, Marinella Pompei, Gabriela Scanu, Emanuela Spada, Cecilia Totti, Nicola Ungaro, Adriana Zingone</i>	13
Bibliografia	16

A3. Livelli ambientali delle palitossine

<i>Gioia Benedettini, Patrizia Ciminiello, Anna Milandri, Antonella Penna, Emanuela Spada</i>	21
A3.1. Rete trofica	21
A3.2. Acque marine.....	23
A3.3. Aerosol	23
Bibliografia	25

A4. Caratteristiche chimiche delle palitossine e fonti biogenetiche

<i>Patrizia Ciminiello, Antonella Penna</i>	28
Bibliografia	30

A5. Profilo tossicologico delle palitossine

<i>Marco Pelin, Silvio Sosa, Emanuela Testai, Aurelia Tubaro</i>	32
A5.1. Introduzione.....	32
A5.2. Effetti avversi associati a esposizione orale.....	33
A5.2.1. Casi registrati nell'uomo	33
A5.2.2. Dati tossicologici.....	33
A5.2.3. Meccanismo di azione della PLTX	35
A5.2.4. Valutazioni fatte da organismi internazionali.....	36
A5.3. Effetti avversi associati a esposizione inalatoria.....	38
A5.3.1. Casi registrati nell'uomo	38
A5.3.2. Dati tossicologici.....	38
A5.4. Effetti avversi associati a esposizione cutanea e/o oculare	39
A5.4.1. Casi registrati nell'uomo	39
A5.4.2. Dati tossicologici.....	39
A5.5. Conclusioni	40
Bibliografia	41

A6. Effetti osservati sulla salute umana	
<i>Marco Baldini, Paolo Durando, Silvio Sosa, Emanuela Testai, Aurelia Tubaro</i>	45
A6.1. Introduzione	45
A6.2. Effetti associati a esposizione inalatoria	46
A6.3. Effetti associati a esposizione cutanea e oculare	50
A6.4. Effetti associati a esposizione orale	51
A6.5. Conclusioni	52
Bibliografia	53
A7. Effetti su organismi marini	
<i>Anna Milandri, Francesco Regoli, Cecilia Totti, Adriana Zingone</i>	57
Bibliografia	59
A8. Carenze conoscitive, spunti per la ricerca, priorità	
<i>Rossella Barone, Patrizia Ciminiello, Erika Magaletti, Maura Manganelli, Antonella Penna, Rossella Pistocchi, Emanuela Testai, Cecilia Totti, Aurelia Tubaro, Adriana Zingone</i>	62
A8.1. Carenze conoscitive in ambito sanitario	63
A8.2. Carenze conoscitive in ambito ambientale	63
Bibliografia	64

PARTE B

Linee guida

B1. Razionale per la definizione delle linee guida e contesto internazionale	
<i>Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai</i>	67
B1.1. Aspetti sanitari	67
B1.1.1. Via orale	67
B1.1.2. Via cutanea	68
B1.1.3. Via inalatoria	69
B1.2. Contesto internazionale	69
Bibliografia	70
B2. Piano di sorveglianza	
<i>Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai</i>	72
B2.1. Monitoraggio ambientale di <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> nelle aree costiere	72
B2.2. Sorveglianza sanitaria	75
Bibliografia	77
Allegato al capitolo B2. Fasi del piano di sorveglianza e azioni da intraprendere nelle aree ad elevato e medio rischio di fioritura di <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	78
B3. Conferimento dei dati e reportistica	
<i>Patrizia Borrello, Liana Gramaccioni, Maura Manganelli</i>	79
B3.1. Stato dell'arte	79
B3.2. Flussi informativi	80
B3.3. Raccolta dei dati e reportistica	80
Bibliografia	81
Allegato al capitolo B3. Scheda per la raccolta dati su <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	82

B4. Informazione al pubblico	
<i>Enzo Funari</i>	84
B5. Conclusioni e raccomandazioni	
<i>Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai</i>	87

PARTE C

Indicazioni tecniche per campionamento, raccolta di dati sanitari e metodi di analisi

C1. Campionamento e analisi della densità cellulare di <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	
<i>Gioia Benedettini, Patrizia Borrello, Patrizia Ciminiello, Enzo Funari, Erika Magaletti, Maura Manganelli, Antonella Penna, Emanuela Spada, Cecilia Totti, Nicola Ungaro</i>	91
C1.1. Matrice acqua.....	91
C1.1.1. Campionamento e conservazione dei campioni	92
C1.1.2. Analisi della densità cellulare.....	92
C1.2. Matrice aerosol	93
C1.2.1. Campionamento di aerosol per analisi chimica.....	93
C1.2.2. Campionamento di Aerosol per analisi molecolare.....	93
C1.3. Matrice substrati bentonici.....	93
C1.3.1. Metodo classico.....	94
C1.3.2. Metodo della siringa.....	96
C1.3.3. Metodo della Falcon.....	96
Bibliografia	96
C2. Metodologia per la sorveglianza sanitaria	
<i>Paolo Durando, Emanuela Testai</i>	98
Allegato al capitolo C2. Scheda di raccolta dati per i casi di sospetta intossicazione da palitossine.....	100
C3. Metodi per la caratterizzazione chimica delle tossine	
<i>Patrizia Ciminiello</i>	104
C3.1. Estrazione dalle varie matrici.....	104
C3.1.1. Matrice algale.....	104
C3.1.2. Matrice alimentare.....	104
C3.1.3. Acqua di mare	104
C3.1.4. Aerosol marino.....	104
C3.2. Analisi chimica	105
C3.2.1. Strumento a triplo quadrupolo.....	105
C3.2.2. Strumento ad alta risoluzione	106
C3.2.3. Metodo con derivatizzazione.....	106
Bibliografia	106
C4. Metodi molecolari di identificazione e quantificazione di <i>Ostreopsis</i> spp.	
<i>Antonella Penna.</i>	108
C4.1. Campionamento	108
C4.2. Conservazione e trattamento dei campioni	108
C4.2.1. Acqua	108
C4.2.2. Macroalghe e altri substrati	108

C4.3. Analisi molecolare qualitativa di PCR.....	108
C4.4. Analisi molecolare quantitativa di qPCR.....	110
C4.5. Analisi molecolare di qPCR dell'aerosol marino.....	110
Bibliografia	111

C5. Test biologici e funzionali per il rilevamento delle pali tossine

<i>Anna Milandri, Marco Pelin, Rossella Pistocchi, Silvio Sosa, Aurelia Tubaro</i>	112
C5.1. Saggio di mortalità con <i>Artemia salina</i>	112
C5.2. Saggio emolitico	113
C5.3. <i>Mouse bioassay</i>	113
C5.4. Saggi di citotossicità	114
C5.5. Saggio di immunofluorescenza.....	114
C5.6. Saggio con polarizzazione di immunofluorescenza	115
C5.7. Saggi immunoenzimatici.....	115
C5.8. Biosensori	116
Bibliografia	116

INTRODUZIONE

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Ostreopsis cf. ovata è un'alga marina bentonica la cui presenza nelle zone tropicali e subtropicali è stata descritta da circa un secolo. Nel Mediterraneo *O. cf. ovata* è stata rinvenuta a partire dagli anni 1970, in Italia dal 1989. Con rare eccezioni, quasi tutte le regioni italiane lungo il litorale marino sono più o meno frequentemente interessate da fioriture di *O. cf. ovata*. Le fioriture si manifestano nella stagione estiva e raggiungono le densità maggiori tra luglio e ottobre nelle diverse aree geografiche.

L'inalazione di aerosol marino (o il contatto diretto), in concomitanza di fioriture di *O. cf. ovata* lungo alcune aree costiere e di condizioni meteo-marine favorevoli alla formazione di aerosol, è stata associata a una sindrome simil-influenzale nei bagnanti o in persone che stazionavano lungo il litorale, con segni e sintomi quali irritazione delle prime vie aeree, tosse, rinorrea, difficoltà respiratorie, dolori muscolari e articolari, irritazione a carico delle mucose oculari e della cute e febbre. Si è trattato di effetti risolti per lo più spontaneamente nelle 24-72 ore successive alla loro insorgenza e in meno di 12 ore a seguito di somministrazione di farmaci anti-infiammatori non steroidei. Situazioni analoghe si sono verificate in Francia e in altri paesi del Mediterraneo.

In molti casi, tuttavia, la presenza di elevate densità di quest'alga non ha dato luogo ad episodi di intossicazione, che si sono verificati soltanto in presenza di vento forte verso riva e mareggiate.

Sono stati anche segnalati casi di tossicità locale cutanea e oculare reversibili, associati ad attività di balneazione e ad esposizione ad aerosol marino in concomitanza di proliferazioni di *O. cf. ovata*. La numerosità dei casi segnalati è generalmente molto modesta rispetto al totale dei bagnanti, sia in Italia che in Francia dove la segnalazione è avvenuta solo in corrispondenza di densità elevate di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua.

L'ingestione di matrici contaminate dalle tossine prodotte da *O. cf. ovata* (gruppo delle palitossine) comporta rischi per la salute associati alle loro caratteristiche intrinseche di tossicità e al loro bioaccumulo nei molluschi marini eduli, nei crostacei e nei pesci, che hanno dato luogo ad avvelenamenti anche letali in regioni tropicali. Nel bacino del Mediterraneo non sono stati invece riportati effetti associati all'ingestione di prodotti ittici contaminati dalle tossine prodotte da *O. cf. ovata*, probabilmente in ragione del fatto che nel Mediterraneo, diversamente dalle aree tropicali, *O. cf. ovata* produce prevalentemente ovatossine e solo in tracce una putativa pali tossina (PLTX), la tossina principalmente responsabile dei casi di intossicazione descritti.

Non sono noti neanche casi di intossicazione a seguito di ingestione di acqua durante attività di balneazione in aree interessate da fioriture di *O. cf. ovata*.

Fioriture di quest'alga in diversi tratti del litorale marino italiano sono state associate a morie di molte specie di organismi acquatici, verosimilmente come conseguenza dell'effetto di molecole PLTX-simili.

Questa problematica si presenta dunque in modo assai complesso, con rilevanza di natura sanitaria, ambientale e anche economica. Non è facile valutare le conseguenze economiche causate dalle fioriture di *O. cf. ovata* per settori quali il turismo balneare, la pesca e l'acquacoltura. Un tentativo è stato fatto in Francia, stimando il potenziale impatto economico delle fioriture di *O. cf. ovata* nella regione di Provenza-Costa Azzurra (PACA), la cui economia è fortemente legata alla pesca, all'acquacoltura e soprattutto al turismo balneare. Sono stati

ipotizzati vari scenari, evidenziando che la perdita economica dovuta al ricorrere di eventi di fioritura, con divieti di balneazione e comunicazione allarmista dei media, potrebbe ammontare a centinaia di migliaia fino a decine di milioni di euro (Lemée *et al.*, 2012).

Le linee guida presentate in questo rapporto rappresentano un aggiornamento delle precedenti, redatte nel 2007 e pubblicate nell'Allegato C del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010), tenendo conto ovviamente delle conoscenze scientifiche che si sono rese disponibili e dell'esperienza maturata dall'applicazione delle linee guida precedenti. L'aggiornamento è stato possibile grazie all'esperienza maturata negli anni della loro applicazione e al contributo di un nutrito gruppo di esperti. L'attività di aggiornamento è stata basata sulle nuove informazioni disponibili nella letteratura scientifica e sulle valutazioni di organismi internazionali, in particolare della *European Food Safety Authority* (EFSA).

Il rapporto è organizzato in tre parti:

– *Parte A – Sintesi delle conoscenze disponibili*

Sintetizza le conoscenze scientifiche disponibili su quest'alga bentonica riguardanti l'ecologia, la genetica, la distribuzione, la presenza nel Mediterraneo e nei mari italiani. Riassume le informazioni disponibili riguardanti le caratteristiche chimiche e tossicologiche del gruppo delle palitossine, gli episodi di intossicazione umana, gli effetti su organismi acquatici. Questa parte viene conclusa evidenziando le carenze conoscitive che sarebbe quanto mai opportuno colmare.

– *Parte B – Linee guida*

Definisce le linee guida per gestire il rischio associato alle fioriture di *O. cf. ovata* nelle acque di balneazione. Queste linee guida sono finalizzate a tutelare la salute dei bagnanti e dei frequentatori delle spiagge e dei litorali rispetto alle possibili vie di esposizione (orale, cutanea, inalazione) tenendo conto anche delle condizioni meteo-marine, che sembrano fortemente influenzare l'insorgenza di episodi di rilevanza sanitaria. Propone la sorveglianza sanitaria e il monitoraggio ambientale nelle aree di maggiore criticità. Viene descritto il sistema di reportistica e conferimento dei dati della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio ambientale e vengono forniti i criteri e alcuni esempi per l'informazione al pubblico. Si è ritenuto utile confermare l'approccio metodologico delle linee guida precedenti, che prevedevano un piano di sorveglianza suddiviso in tre fasi, di routine, allerta ed emergenza. Queste fasi sono state tuttavia ampiamente riviste e ridefinite.

– *Parte C – Indicazioni tecniche per campionamento, raccolta di dati sanitari e metodi di analisi*

Questa parte comprende le informazioni tecniche rivolte alle strutture territoriali preposte alla sorveglianza delle fioriture di *O. cf. ovata*.

Bibliografia

Lemée R, Mangialajo L, Cohu S, Amzil Z, Blanfuné A, Chomerat N, Ganzin N, Gasparini S, Grossel H, Guidi-Guivard L, Hoareau L, Le Duff F, Marro S, Simon N, Nezan E, Pedrotti M-L, Sechet V, Soliveres O, Thibaut T. Interactions between scientists, managers and policy makers in the framework of the French MediOs project on *Ostreopsis* (2008-2010). *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):137-42.

Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.

PARTE A
Sintesi delle conoscenze disponibili

A1. ALGHE TOSSICHE E OSTREOPSIS CF. OVATA NELLE ACQUE DI BALNEAZIONE

Patrizia Ciminiello (a), Maura Manganelli (b), Antonella Penna (c)*,
Cecilia Totti (d), Adriana Zingone (e)*

(a) Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino

(d) Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

(e) Dipartimento di ecologia ed evoluzione del plancton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli

* antonella.penna@uniurb.it; adriana.zingone@szn.it

Le proliferazioni eccessive di microalghe (fioriture algali) in acque costiere, fino al raggiungimento di abbondanze elevate (valori nell'ordine di 10^4 cell/mL e oltre), sono un fenomeno noto da molto tempo. In relazione ai pigmenti presenti nelle microalghe, fioriture particolarmente intense possono causare colorazioni anomale di tratti di mare anche estesi, comunemente note come maree rosse (*red tides*) o più specificatamente maree brune, bianche o verdi. Questi fenomeni fanno parte dei cosiddetti *Harmful Algal Blooms* (HAB), termine che, più in generale, include tutti i casi in cui si riscontrano effetti nocivi per la salute dell'uomo, le attività economiche nella zona costiera e/o per l'ambiente, imputabili alla presenza di microalghe, indipendentemente dalla loro abbondanza, e molto spesso senza manifestazioni evidenti o colorazioni anomale (Zingone & Enevoldsen, 2000). Negli ultimi decenni gli HAB, sembrano essersi intensificati, sia in termini di frequenza temporale, sia per la maggiore diffusione geografica in gran parte delle aree del mondo (Anderson *et al.*, 2012; Zingone, 2010). Questo è stato spesso imputato all'aumento della pressione antropica nelle aree costiere in termini di apporti di nutrienti (sali di fosforo e azoto, silicati, vitamine) necessari per la crescita di questi organismi vegetali, anche se spesso questa relazione non è stata osservata (Anderson *et al.*, 2002; Zingone & Wyatt, 2005; Smayda, 2008). In altri casi, è stato evidenziato l'impatto di porti, moli e barriere che, ostacolando la circolazione costiera e il ricambio delle masse d'acqua, favoriscono l'accumulo di microalghe potenzialmente tossiche e non (Garcés *et al.*, 2000; Vila *et al.*, 2001). L'introduzione di specie aliene attraverso le acque di zavorra delle navi e l'importazione di molluschi destinati ad impianti di acquacoltura sono ulteriori fattori che possono contribuire all'espansione degli areali di distribuzione delle specie tossiche (Anderson *et al.*, 2012). Negli ultimi anni infine è stata messa in risalto anche una relazione delle proliferazioni algali con i fattori climatici, che possono determinare cambiamenti significativi nell'idrografia delle acque costiere nonché variazioni dell'areale geografico delle specie in questione (Hallegraeff, 2010). Inoltre, a causa delle interazioni sempre crescenti con le acque costiere e con le risorse che esse forniscono, soprattutto nei Paesi industrializzati, negli ultimi anni è molto aumentata l'attenzione sullo stato di salute dell'ambiente marino-costiero, attraverso piani di monitoraggio e controlli sistematici, che hanno portato ad evidenziare eventi di fioriture algali con frequenza maggiore rispetto al passato.

Le conseguenze delle fioriture algali possono essere di varia natura. In generale, le fioriture hanno un effetto benefico, dato che le alghe sono produttori primari e quindi producono ossigeno e sono alla base della catena alimentare. Tuttavia, in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche e idrodinamiche del corpo idrico, fioriture massive possono indurre, in alcuni casi (es. in regime di stratificazione estiva), marcate alterazioni ambientali, quali ad esempio

ipossia, anossia e sviluppo di idrogeno solforato a seguito della decomposizione delle cellule a fine fioritura, che possono determinare morie di organismi bentonici. Morie di pesci (banchi naturali o di allevamento) possono verificarsi anche a causa di tossine algali specifiche (ittiotossine) o di danni fisici causati da occlusione o ferite alle branchie, come nel caso di specie con spine silicee o che producono muco.

Alcune fioriture algali hanno rilevanza dal punto di vista sanitario, data la capacità di alcune microalghe di produrre tossine (*paralytic shellfish poisoning toxins*, *amnesic shellfish poisoning toxins*, alcune tossine liposolubili, ecc.), che possono accumularsi in molluschi, crostacei, pesci e in altri animali marini abitualmente consumati dall'uomo. Il rischio potenziale per la salute umana, associato alla presenza nella dieta di alimenti di origine marina contaminati da queste tossine, impone un'attenta valutazione da parte delle autorità sanitarie, nonché la messa in atto di procedure di controllo volte ad assicurare la sicurezza degli alimenti di origine marina.

L'impatto delle tossine di origine algale ha influenza anche sull'uso ricreativo delle zone costiere. Infatti, alcune tossine algali possono agire per contatto diretto causando dermatiti e congiuntiviti. Soprattutto in acque tropicali, sono stati segnalati casi di dermatiti, anche severe, in bagnanti che avevano avuto contatti con acque interessate da fioriture di cianobatteri marini (Osborne *et al.*, 2001). Inoltre l'aerosol marino può veicolare microalghe marine e/o tossine da esse prodotte, causando disturbi alle vie respiratorie e sintomi vari. A questo proposito l'esempio più studiato è quello delle *red tides* associate alla proliferazione di *Karenia brevis*, una dinoficea produttrice di brevetossine, nel Golfo del Messico (Fleming *et al.*, 2005). In alcuni tratti delle coste italiane e di altri paesi mediterranei sono stati riportati episodi analoghi attribuiti a fioriture della dinoficea bentonica *Ostreopsis* cf. *ovata* (vedi capitoli successivi). Non sono invece disponibili evidenze di patologie sistemiche associate all'ingestione involontaria di acqua interessata dalla presenza di alghe tossiche marine durante le attività di balneazione.

L'intensificazione del fenomeno delle proliferazioni algali e i relativi risvolti sanitari hanno indotto anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ad occuparsi di questa problematica nell'ambito delle *Guidelines for safe recreational water environments* del 2003 (WHO, 2003). Secondo l'OMS i dati disponibili suggeriscono che il rischio per la salute umana associato alla presenza di alghe tossiche marine durante attività ricreative è limitato a poche specie e aree geografiche. L'OMS ha ritenuto pertanto inappropriato raccomandare valori guida di carattere generale, suggerendo piuttosto di condurre adeguati piani di monitoraggio e programmi di sorveglianza nelle aree potenzialmente interessate, insieme ad attività di valutazione e gestione del rischio e di comunicazione ai cittadini. Queste linee guida rappresentano la base scientifica sulla quale è stata elaborata la nuova Direttiva europea relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione (Europa, 2006). Tale direttiva individua soltanto due parametri microbiologici, *Escherichia coli* ed enterococchi intestinali, per la classificazione della qualità delle acque di balneazione, non includendo dunque le alghe tossiche marine. Tuttavia, non trascura tale parametro, al quale dedica l'articolo 9, che recita:

“Qualora il profilo delle acque di balneazione mostri una tendenza alla proliferazione di macroalghe e/o fitoplancton marino, vengono svolte indagini per determinarne il grado di accettabilità e i rischi per la salute e vengono adottate misure di gestione adeguate, che includono l'informazione al pubblico”.

La presenza di microalghe planctoniche d'interesse sanitario nell'ambiente marino costiero da anni è soggetta ad attività di sorveglianza. La presenza e/o la fioritura di specie potenzialmente tossiche (*Alexandrium* spp., *Dinophysis* spp., *Pseudo-nitzschia* spp., *Fibrocapsa japonica*, ecc.) sono state ripetutamente segnalate lungo le coste italiane. Solo recentemente è stata riservata attenzione anche alle microalghe bentoniche che possono produrre tossine, e in particolare a *O. cf. ovata*, oggetto specifico di queste linee guida, *Prorocentrum lima*, *P.*

emarginatum, *Amphidinium* spp. Tuttavia, ad eccezione del caso di *O. cf. ovata* non ci sono evidenze di associazione tra esposizione in attività di balneazione ed effetti sanitari.

A1.1. Cenni di ecologia di *Ostreopsis cf. ovata*

O. cf. ovata è una specie bentonica che cresce su diversi substrati quali macroalghe, angiosperme marine, rocce, gusci di invertebrati e sedimenti mobili, e anche in colonna d'acqua (Fukuyo, 1981; Totti *et al.*, 2010). Le cellule di *Ostreopsis* aderiscono al substrato attraverso la formazione di filamenti (tricocisti) e sostanze mucillaginose, che nelle fasi avanzate della fioritura possono formare una ricopertura o pellicola brunastra (*mat*) molto fibrosa e ricca in carboidrati (Totti *et al.*, 2010; Honsell *et al.*, 2013). La mucillagine e la *mat* possono essere facilmente risospesi in colonna d'acqua, in caso di moto ondoso, di azioni meccaniche o di un idrodinamismo elevato dando origine a flocculi e talvolta a schiume superficiali. La concentrazione delle cellule nella colonna è dunque direttamente correlata all'abbondanza delle cellule sui substrati bentonici (Mangialajo *et al.*, 2008; Mangialajo *et al.*, 2011) e a fenomeni di idrodinamismo (Shears & Ross, 2009; Totti *et al.*, 2010). La relazione con l'idrodinamismo è più evidente durante la fase di intensa proliferazione, quando si sviluppa una *mat* ben visibile (Accoroni *et al.*, 2011), mentre non si osserva in presenza di basse densità cellulari (Richlen & Lobel, 2011).

Fino a circa 15 anni fa, le specie del genere *Ostreopsis* erano normalmente rinvenute in aree tropicali e subtropicali; successivamente sono diventate sempre più frequenti segnalazioni di *O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis* in aree temperate come la Nuova Zelanda, il Mar Mediterraneo e le coste giapponesi (Vila *et al.*, 2001, Shears & Ross, 2009, Sato *et al.*, 2011). *O. cf. ovata*, la specie più diffusa e abbondante in Mediterraneo (Battocchi *et al.*, 2010; Mangialajo *et al.*, 2011) produce delle potenti tossine ed è stata associata a importanti episodi di intossicazioni (vedi capitolo A6).

Diversi autori hanno riportato che le fioriture di *Ostreopsis* sarebbero favorite da elevati valori di temperatura, suggerendo che il riscaldamento globale potrebbe aver influenzato la recente espansione di questa microalga nel Mediterraneo (Hallegraeff, 2010; Granéli *et al.*, 2011). Tuttavia nelle diverse aree del Mediterraneo, il picco della fioritura si osserva in corrispondenza di valori di temperatura diversi, generalmente verso la fine di luglio nel Mediterraneo Nord-Occidentale, con temperatura dell'acqua intorno ai 26°C, in tarda estate nell'Adriatico settentrionale, con temperatura anche intorno ai 20-22°C (Mangialajo *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda le relazioni con i nutrienti, benché l'aumento delle fioriture di alghe potenzialmente tossiche sia stato messo in relazione con l'eutrofizzazione delle acque costiere (Glibert *et al.*, 2010), tale relazione con le fioriture di *Ostreopsis* non è stata chiaramente provata. Infatti, tali fioriture si verificano in tutto il mondo anche in aree oligotrofiche, con una netta tendenza a non interessare le aree maggiormente eutrofizzate. Il comportamento trofico di queste microalghe non è stato del tutto chiarito, ma non è escluso che esse possano assumere nutrienti predando altri organismi (Burkholder *et al.*, 2008).

A1.2. Diversità genetica e problematica dell'identificazione morfologica di *Ostreopsis*

Il genere *Ostreopsis* (Gonyaulacales, Dinophyceae) include nove specie distribuite principalmente nelle zone tropicali e sub-tropicali, di cui almeno tre (*O. cf. ovata*, *O. cf.*

siamensis e *O. lenticularis*) sono anche molto diffuse in aree temperate (Rhodes, 2011). *O. cf. siamensis* di aree Pacifiche (Usami *et al.*, 1995; Ukena *et al.*, 2002), *O. cf. ovata*, *O. lenticularis*, *O. heptagona*, *O. mascarenensis* e *O. labens* sono tossiche, sulla base dei risultati di test biologici (test di tossicità acuta su topo, di citotossicità e di emolisi) e sulla base della loro capacità di produrre composti palitossina-simili, mentre, *O. cf. siamensis* in aree mediterranee e atlantiche risulta non tossica (Paz *et al.*, 2011; Ciminiello *et al.*, 2012). Tuttavia, oggi è ampiamente dibattuto il concetto di specie e non è stato ancora chiarito quante specie siano incluse nel genere *Ostreopsis*. Infatti, la tassonomia di *Ostreopsis* spp. basata sui parametri morfologici è debole perché risulta ancora alquanto difficoltosa, se non impossibile, l'identificazione su base morfologica delle specie di *Ostreopsis* soprattutto in campioni misti. Questo è dovuto alla grande variabilità morfologica e morfometrica delle cellule sia di campioni ambientali sia di coltura, e al fatto che il range dimensionale e le caratteristiche morfometriche delle differenti specie di *Ostreopsis* sono spesso sovrapponibili (Totti *et al.*, 2010; Accoroni *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2011). Ormai è evidente che alcuni criteri classici usati per la descrizione tassonomica non sono più validi perché discrepanti e non idonei per la descrizione delle specie (Parsons *et al.*, 2012). In base alle conoscenze ottenute finora, risulta necessario una revisione del genere *Ostreopsis* per chiarirne la classificazione tassonomica e migliorare quindi la capacità di identificare le specie. Pertanto, è utilizzato il suffisso cf. (confronta) per i ceppi di *O. ovata* e *O. siamensis* che vengono identificati. A questo proposito, risulta appropriato l'approccio di analisi filogenetica o molecolare diagnostico di PCR basato sulle sequenze dei geni ribosomiali (ITS-5.8S e LSU), per distinguere le specie di *Ostreopsis*, e all'interno della specie, i vari cladi con differente distribuzione geografica (Casabianca *et al.*, 2013; Berdalet *et al.*, 2012; Perini *et al.*, 2011).

Le specie di *Ostreopsis* sono spesso simpatriche e specie tossiche e non tossiche possono coesistere nello stesso habitat. Quindi, risulta importante eseguire una corretta identificazione tassonomica di *Ostreopsis* a livello di specie per la gestione delle fioriture tossiche di questa microalga nella fascia costiera.

In Mar Mediterraneo le fioriture sono prevalentemente sostenute da *O. cf. ovata* che produce ovatossine e solo in tracce palitossina putativa (Ciminiello *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; ISPRA, 2011; ISPRA, 2012). Il termine putativa si riferisce al fatto che il composto, evidenziato mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) presenta lo stesso spettro di massa della palitossina standard; tuttavia, considerando la complessità della molecola, la possibilità che si tratti di un isomero strutturale non può essere esclusa. Al momento sono in corso ulteriori studi per acquisire informazioni strutturali più approfondite su tale tossina. In Italia, in base alle sequenze dei geni ribosomiali, *O. cf. ovata*, appartiene al clade Atlantico/Mediterraneo che è ben differenziato dal clade di *O. cf. ovata* dell'Indo-Pacifico (Penna *et al.*, 2005; 2010). In particolare, *O. cf. ovata* costituisce un complesso di specie o ribotipi di varia distribuzione geografica, da aree temperate e inter-tropicali, con variabilità della produzione di palitossine (Sato *et al.*, 2011; Ukida *et al.*, 2013).

L'origine di *Ostreopsis* in Mar Mediterraneo è controversa. La microalga può essere considerata endemica o introdotta da altre aree. Un'ipotesi è che *Ostreopsis*, già presente in Mediterraneo, potrebbe essere stata una specie rara, difficilmente campionata, e quindi non identificata fino al 1972 (Taylor, 1979). Solo recentemente dalla fine degli anni novanta del secolo scorso, *Ostreopsis* ha cominciato a produrre fioriture ad alta biomassa e invasive. Le ragioni di questo fenomeno sono ancora oggetto di studio (vedi sopra). Inoltre, nell'area Atlantica/Mediterranea, e in particolare in Mar Mediterraneo, *O. cf. ovata* costituisce una popolazione geneticamente ben rappresentata e omogenea (Penna *et al.*, 2005; 2010; Nascimento *et al.*, 2012). Queste evidenze supportano l'ipotesi di un'origine

atlantico/mediterranea della specie e del genere senza una chiara direzione di flusso genico (Penna *et al.*, 2010). Un'altra ipotesi recente sostiene che *O. cf. ovata* sia stata introdotta in Mar Mediterraneo dal Giappone per trasporto mediato in base al fatto che un numero, seppur basso, di isolati sono geneticamente identici ad isolati di *O. cf. ovata* del Mar Mediterraneo (Sato *et al.*, 2011). A oggi, l'origine geografica di *Ostreopsis* è soggetta a più interpretazioni, che in alcuni casi non sono ancora ben supportate e non sono conclusive. Pertanto, l'ipotesi che *Ostreopsis* sia stata introdotta va ulteriormente dimostrata da ricerche future.

O. cf. siamensis è un'altra specie presente nel Mar Mediterraneo, ma sembra non produrre fioriture tossiche ed è molto meno diffusa e abbondante. Infatti, dove è maggiormente presente, ad esempio lungo le coste spagnole, si ritrova a basse concentrazioni assieme ad *O. cf. ovata* (Battocchi *et al.*, 2010; Vila M. pers comm.). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che ceppi mediterranei e atlantici di *O. cf. siamensis* non producono tossine, ad eccezione di tracce di palitossina putativa (nell'ordine di sub-fentogrammi) nel solo ceppo mediterraneo (Ciminiello *et al.*, 2013). Gli isolati di *O. cf. siamensis* del Mar Mediterraneo ed Est Atlantico raggruppano in un clade filogenetico ben distinto da quello che include *O. cf. ovata* (Penna *et al.*, 2010; Laza Martinez *et al.*, 2011). Sebbene sia evidente un chiaro differenziamento genetico delle due specie (*O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis*), che si riflette anche nella produzione di palitossine (Ciminiello *et al.*, 2012), non è possibile distinguere le due specie su base morfologica.

In conclusione, nelle attività di monitoraggio si ritiene sufficiente la caratterizzazione morfologica assumendo che la specie nel Mediterraneo sia *O. cf. ovata*, previa conferma periodica dell'identificazione molecolare specie-specifica. Inoltre, per approfondimenti scientifici, data la complessità del genere *Ostreopsis*, è auspicabile l'utilizzo di un approccio combinato delle tecniche molecolari supportato da analisi morfologiche e chemotassonomiche per l'identificazione delle specie.

Bibliografia

- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Tartaglione L, Penna A, Totti C. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2512-9.
- Accoroni S, Colombo F, Pichierri S, Romagnoli T, Marini M, Battocchi C, Penna A, Totti C. Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie, Algologie*, 2012;33:191-8.
- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Ann Rev Mar Sci* 2012;4:143-76.
- Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, compositions, and consequences. *Estuaries* 2002;5:704-26.
- Battocchi C, Totti C, Vila M, Masò M, Capellacci S, Accoroni S, René A, Scardi M, Penna A. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Mar Pollut Bull* 60:1074-84.
- Berdalet E, Bravo I, Evans J, Fraga S, Kibler R, Kudela M, Larsen W, Penna A, Tester P, Vila M, Zingone A. Global ecology and oceanography of harmful algal blooms. In: Berdalet E, Tester P, Zingone A (Ed.). *GEOHAB core research project: HABs in benthic systems*. Paris and Newark: IOC-UNESCO, SCOR; 2012. (GEOHAB Report No. 9). p. 1-64

- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 2008;8:77-93.
- Casabianca S, Casabianca A, Riobò P, Franco JM, Vila M, Penna A. Quantification of the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR Assay in Marine Aerosol. *Environ Sci Technol* 2013;47:3788-95.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal Chem* 2006;78:6153-9.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. 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* 2008;19:111-20.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spectrom* 2010;24:2735-44.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Penna A. Unique toxin profile of a mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain: HR LC-MSn characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1243-52.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Yasumoto, T, Battocchi, C, Giacobbe MG, Amorim A, Penna A. Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography, and high resolution mass spectrometry. *Harmful Algae* 2013;23:9-27.
- Europa. Direttiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 febbraio 2006 relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 64/42, 4/3/2006.
- Fleming LE, Backer LC, Baden DG. Overview of aerosolized florida red tide toxins: exposures and effects. *Environ Health Persp* 2005;113(5):618-20.
- Fukuyo Y. Taxonomic study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1981;47:967-78.
- Garcés E, Masó M, Vila M, Camp J. Harmful algae events in the Mediterranean: are they increasing? *HAN* 2000;20:1-10.
- Glibert PM, Allen JI, Bouwman AF, Brown CW, Flynn KJ, Lewitus AJ, Madden CJ. Modeling of HABs and eutrophication status, advances, challenges. *J Mar Syst* 2010;83:262-75.
- Hallegraeff GM. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *J Phycol* 2010;46:220-35.
- Honsell G, Bonifacio A, De Bortoli M, Penna A, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Sosa S, Yasumoto T, Tubaro A. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLoS ONE* 2013;8(2):e57291.
- ISPRA. Giornata di studio. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane. Atti. Sintesi e contributi. Roma, 23 marzo 2011. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011.
- ISPRA. Giornata di studio. Presenza di fioriture algali di *Ostreopsis ovata* ed altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane. Atti. Roma, 28 marzo 2012. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012.

- Laza-Martinez A, Orive E, Miguel I. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *Eur J Phycol* 2011;46:45-65.
- Mangialajo L, Bertolotto R, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M, Grillo C, Lemée R, Melchiorre N, Moretto P, Povero P, Ruggieri N. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Mar Pollut Bull* 2008;56:1209-14.
- Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, Blanfuné A, Cabrini M, Cattaneo-Vietti R, Chavanon F, Chiantore M, Cohu S, Costa E, Fornasaro D, Grossel H, Marco-Miralles F, Masó M, Reñé A, Rossi AM, Sala MM, Thibaut T, Totti C, Vila M, Lemée R. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 2011;57:408-20.
- Nascimento SM, França JV, Gonçalves JEA, Ferreira CEL. *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean. *Mar Pollut Bull* 2012;64:1074-8.
- Osborne NJT, Webb PM, Shaw GR. The toxins of *Lingbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 2001;27:381-92.
- Parson M, Aligizaki K, Dechraoui Bottein MY, Fraga S, Morton SL, Penna A, Rhodes L. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae* 2012;14:107-29.
- Paz B, Riobò P, Franco JM. Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spectr* 2011;25:3627-39.
- Penna A, Vila M, Fraga S, Giacobbe MG, Andreoni F, Riobò P, Vernesi C. 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* 2005;41:212-25.
- Penna A, Fraga S, Battocchi C, Casabianca S, Riobò P, Giacobbe MG, Vernesi C. A phylogeography study of the toxic benthic genus *Ostreopsis* Schmidt. *J Biogeogr* 2010;37:830-41.
- Perini F, Casabianca A, Battocchi C, Accoroni S, Totti C, Penna A. New approach using the real-time pcr method for estimation of the toxic marine Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17699.
- Rhodes L. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 2011;57:400-7.
- Richlen ML, Lobel PS. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 2011;421:51-66.
- Sato S, Nishimura T, Uehara K, Sakanari H, Tawong W, Hariganeya N, Smith K, Rhodes L, Yasumoto T, Taira Y, Suda S, Yamaguchi H, Adachi M. Phylogeography of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan. *PLoS ONE* 2011;6:e27983.
- Shears NT, Ross PM. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 2009;8:916-25.
- Smayda TJ. Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae* 2008;8:140-51.
- Taylor FJR. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic Dinoflagellate Blooms*. New York: Elsevier;1979. p. 71-6.
- Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 2010;9:233-9.

- Uchida H, Taira Y, Yasumoto T. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spect* 2013;27:1999-2008.
- Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Fujita T, Naoki H, Yasumoto T. Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods. *Rap Comm Mass Spectr* 2002;16:2387-93.
- Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J Am Chem Soc* 1995;117:5389-90.
- Vidyarathna NK, Granéli E. Physiological responses of *Ostreopsis ovata* to changes in N and P availability and temperature increase. *Harmful Algae* 2013;21:54-63.
- Vila M, Camp J, Garcés E, Masó M, Delgado M. High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *J Plank Res* 2001;23:497-514.
- WHO. *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and freshwaters*. Geneva: World Health Organization; 2003.
- Zingone A, Enevoldsen HO. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast Manag* 2000;43:725-48.
- Zingone A, Wyatt T. Harmful algal blooms: keys to the understanding of the phytoplankton ecology. In: Robinson AR, Brink KH (Ed.). *The sea*. Harvard: Harvard University Press; 2005. p. 867-926.
- Zingone A. Harmful algal blooms in the Mediterranean Sea: a historical overview. In: Briand F (Ed.) *Phytoplankton responses to Mediterranean environmental changes*. Monaco: CIESM, 2010. p. 19-24.

A2. PRESENZA DI *OSTREOPSIS* CF. *OVATA* E ALTRE MICROALGHE BENTONICHE POTENZIALMENTE TOSSICHE NELLE ACQUE COSTIERE ITALIANE

Rosella Bertolotto (a), Patrizia Borrello (b)*, Irene Di Girolamo (c), Manuela Ercolessi (d), Erika Magaletti (e), Anna Milandri (f), Antonella Penna (g), Marinella Pompei (f), Gabriela Scanu (h), Emanuela Spada (b), Cecilia Totti (i), Nicola Ungaro (l), Adriana Zingone (m)

(a) Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Ligure, Genova

(b) Dipartimento Tutela Acque Interne e Marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma

(c) Direzione Generale per la Protezione della Natura e del Mare, Divisione VI - Tutela dell'Ambiente Marino e Costiero, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma

(d) Dipartimento Provinciale di Pesaro, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Ancona

(e) Dipartimento monitoraggio qualità ambientale, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma

(f) Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, Fondazione Centro Ricerche Marine, Cesenatico

(g) Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino

(h) Segreteria Tecnica del Ministro, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma

(i) Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

(l) Direzione Scientifica, Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale Puglia, Bari

(m) Dipartimento di ecologia ed evoluzione del plancton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli

*patrizia.borrello@isprambiente.it

In diversi tratti della costa italiana sono state segnalate ormai da molti anni fioriture di alcune specie di microalghe bentoniche, fra cui risultano particolarmente importanti quelle di *Ostreopsis* cf. *ovata*. Tra le specie del genere *Ostreopsis*, solo due sono state ad oggi riportate lungo le coste del Mediterraneo *O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis*; tra esse *O. cf. ovata* è stata probabilmente la prima ad essere rinvenuta in Mediterraneo nel 1972, sotto il nome di *Ostreopsis siamensis* che era l'unica specie nota a quel tempo (JFR Taylor, com. pers. in Zingone *et al.*, 2006; Zingone, 2010). *O. cf. ovata* è anche la specie a più ampia distribuzione, mentre il rilevamento di *O. cf. siamensis* è sporadico e limitato a poche aree, ad esempio in Sicilia (Penna *et al.*, 2010) e lungo la costa Catalana (Vila *et al.*, 2012). La presenza di *Ostreopsis* è stata riportata in Spagna, nelle coste catalane e andaluse e nelle isole Baleari (Vila *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2008; Battocchi *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2012), in Francia (Tichadou *et al.*, 2010; Cohu *et al.*, 2011; Sechet *et al.*, 2012), in Croazia (Pfannkuchen *et al.*, 2012), in Albania (Bushati *et al.*, 2010), in Grecia (Aligizaki & Nikolaidis, 2006), lungo le coste libanesi (Abboud-Abi Saab, 1989) e nord-africane (Turki, 2005; Turki *et al.*, 2006; Illoul *et al.*, 2012; Ismael & Halim, 2012).

La prima segnalazione in Italia di *O. cf. ovata* risale al 1989, quando la specie fu rinvenuta lungo le coste tirreniche laziali (A Zingone, com. pers. In Tognetto *et al.*, 1995). Dalla fine del secolo scorso sono poi state segnalate fioriture intense nel 1998 nelle acque della Toscana (Sansoni *et al.*, 2003; Simoni *et al.*, 2003; Simoni *et al.*, 2004), nel 2005 nelle acque costiere di Genova (Ciminiello *et al.*, 2006) e della Puglia (Ungaro *et al.*, 2005). Da allora questa microalga e i suoi bloom sono stati rilevati sempre più frequentemente, in un numero crescente di regioni costiere (Penna *et al.*, 2005; Bianco *et al.*, 2006; Barone & Prisinzano, 2006; Zingone *et al.*,

2006; Monti *et al.*, 2007; Totti *et al.*, 2007; 2010; Mangialajo *et al.*, 2008; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013; ISPRA, in corso di stampa).

La presenza di *O. cf. ovata* e altre microalghe bentoniche potenzialmente tossiche nelle acque costiere italiane è da anni soggetta ad attività di sorveglianza attraverso programmi di monitoraggio nazionali e regionali prevalentemente eseguiti dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA). In particolare, dal 2001 al 2009 sono state condotte dalle Regioni, in convenzione con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, attività di monitoraggio della qualità dell'ambiente marino-costiero in adempimento alla Legge 979/1982 (Italia, 1983) che includevano il rilevamento quali-quantitativo delle microalghe pelagiche e, dal 2008, anche di microalghe bentoniche quali *Ostreopsis* spp., *Prorocentrum lima* e *Coolia monotis*. Dal 2010, viene svolto dalle Regioni il monitoraggio delle microalghe potenzialmente tossiche nelle acque di balneazione, in ottemperanza all'Art. 3 del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010). Tali attività hanno contribuito alla conoscenza della distribuzione e della dinamica delle fioriture di *O. cf. ovata* e delle altre microalghe bentoniche potenzialmente tossiche eventualmente rilevate lungo le coste italiane.

Ulteriori normative vigenti che prevedono il rilevamento quali-quantitativo di microalghe pelagiche anche in acque marino-costiere sono il D.L.vo 152/2006 e s.m.i (Italia, 2006) e il Regolamento (CE) 854/2004 (Europa, 2004) nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi.

In aggiunta ai programmi istituzionali menzionati, molteplici studi condotti presso Università e Istituti di Ricerca italiani hanno ulteriormente contribuito negli ultimi anni alla conoscenza della ecologia e distribuzione di *O. cf. ovata* e di altre microalghe tossiche nei mari italiani.

Sulla base dei dati di monitoraggio e degli studi finora condotti dalle ARPA e dalle università e istituti/enti di ricerca, la presenza di *O. cf. ovata* è stata riscontrata nel periodo estivo o estivo-autunnale in tutte le regioni costiere ad eccezione di Veneto, Emilia Romagna e Molise (Figura 1) (ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013).

Nel mare Adriatico, a partire dal 2006, due aree – una nelle Marche (Ancona-Passetto) (Totti *et al.*, 2010; Perini *et al.*, 2011; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a) e una in Puglia (a nord di Bari) (Ungaro *et al.*, 2010; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013) – sono interessate ogni anno, in estate, da fioriture intense (fino a milioni di cellule per litro e/o per grammo di macroalga) tanto da essere identificate come aree *hot spot*. Dal 2007 al 2011 si assiste ad una estensione spaziale e temporale delle segnalazioni facendo registrare un trend positivo con una lieve inflessione nel 2012 (Tabella A2.1). In particolare, nel 2007 la microalga è stata segnalata in 8 regioni sulle 12 indagate, nel 2008 in 9 su 11, nel 2009 in 10 su 15, nel 2010, 2011 e 2012 in 10 su 14 e infine nel 2013 in 11 regioni su 14 monitorate.

Nei mari italiani il picco della fioritura si osserva spesso in mesi diversi e in corrispondenza di valori di temperatura diversi. Per esempio, nel Mar Ligure, Mar Tirreno e Mar Ionio i massimi di abbondanza si registrano nel periodo fine luglio-agosto in corrispondenza di temperature di 24-26°C, con sporadici picchi rilevati ad ottobre in Campania (Tognetto *et al.*, 1995; Sansoni *et al.*, 2003; Simoni *et al.*, 2004; Abbate *et al.*, 2007; Mangialajo *et al.*, 2008; Caroppo *et al.*, 2009; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013; Zingone, 2010).

Nell'Adriatico meridionale le massime concentrazioni si registrano tra agosto e settembre (Di Turi *et al.*, 2003; Ungaro *et al.*, 2005; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013), mentre nell'Adriatico settentrionale tipicamente tra settembre e ottobre, quando i valori di temperatura sono anche inferiori a 20°C (Monti *et al.*, 2007; Totti *et al.*, 2010; Accoroni *et al.*, 2011; Accoroni *et al.*, 2012; Mangialajo *et al.*, 2011; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013).

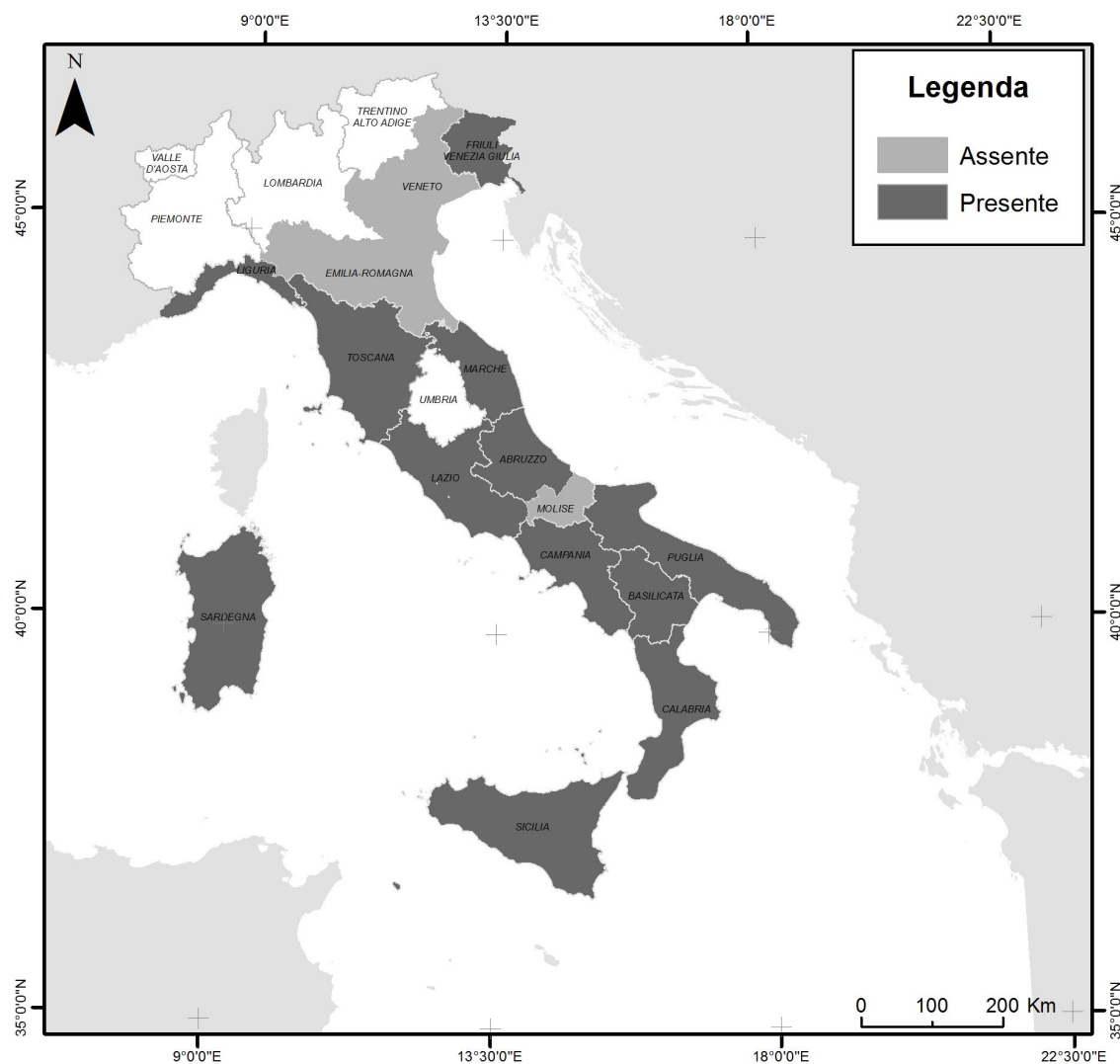


Figura 1. Regioni costiere italiane interessate dalla presenza di *O. cf. ovata* dal 2007 al 2013

Tabella A2.1. Presenza e trend di *O. cf. ovata* nelle acque costiere italiane dal 2007 al 2013

Anno	Regioni monitorate	Siti campionamento n.	Siti positivi		Siti con abbondanze ≥ 10000 cell /L	
			n.	%	n.	%
2007	12	384	150	39,06	23	32,86
2008	12	444	178	39,91	74	52,9
2009	15	415	161	40,24	44	24,85
2010	14	325	157	48,31	42	33,33
2011	14	245	139	56,73	36	30
2012	14	228	127	55,70	38	29,69
2013	14	226	121	53,54	42	40

I dati di monitoraggio raccolti in questi anni non mettono in evidenza una relazione delle fioriture con lo stato trofico, e le concentrazioni dei nutrienti registrate durante le fioriture non risultano differenti dai valori riscontrati normalmente nella colonna d'acqua (Abita *et al.*, 2013; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013).

Diversi studi considerano l'idrodinamismo come uno dei principali fattori che influenzano l'andamento delle fioriture. Siti protetti e poco profondi, quali baie semichiusate, zone retrostanti barriere frangiflutti ecc., presentano tipicamente abbondanze più elevate che siti esposti al moto ondoso (Sansoni *et al.*, 2003; Barone & Prisinzano 2006; Totti *et al.*, 2010, ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013). Le abbondanze delle dinofitofite bentoniche, sono particolarmente influenzate dall'azione delle onde in quanto queste microalghe, a differenza delle diatomee, sono solo debolmente associate con il substrato e possono essere facilmente risospese in colonna d'acqua. La relazione con l'idrodinamismo è più marcata durante la fase avanzata della fioritura, in presenza di una *mat* sviluppata (Accoroni *et al.*, 2012). In alcune aree, la relazione con un basso idrodinamismo non è evidente, anche in casi in cui le concentrazioni sono elevate, ma non si formano *mat*.

O. cf. ovata è spesso presente insieme ad altre dinofitofite bentoniche potenzialmente tossiche che tuttavia non raggiungono mai abbondanze molto elevate, quali *Prorocentrum lima* che produce acido okadaico e *Amphidinium carterae* che produce emolisine; la presenza di queste microalghe non ha finora mostrato un impatto diretto sulla balneazione.

Informazioni più dettagliate sulla presenza e abbondanza delle fioriture di *O. cf. ovata* lungo le coste italiane sono contenute nei documenti dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA, 2010; ISPRA, 2011a; ISPRA, 2012a; ISPRA, 2013); lo stesso Istituto pubblica annualmente gli atti delle giornate di studio e confronto sul tema specifico (ISPRA, 2011b; ISPRA, 2012b), in cui vengono riportati gli ultimi aggiornamenti sullo stato delle conoscenze relativamente ad abbondanza, biologia, ecologia, genetica, distribuzione spazio-temporale e tossicità di *O. cf. ovata* nelle acque costiere italiane.

Bibliografia

- Abbate M, Bordone A, Cerrati G, Lisca A, Peirano A. Variabilità della distribuzione e densità di *Ostreopsis ovata* nel golfo della Spezia. *Biologia Marina Mediterranea* 2007;14(2):286-7.
- Abita A, Aiello P, Buscaglia VM, Granata A. Le fioriture di *Ostreopsis cf. ovata* sulla fascia costiera della città di Palermo. In: *Qualità dell'ambiente urbano. IX Rapporto. Edizione 2013. Focus su acque e ambiente urbano*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2013. (ISPRA, Stato dell'Ambiente 46/13). p. 323-5.
- Abboud-Abi Saab M. Les dinoflagellés des eaux cotières libanaises - Espèces rares ou nouvelles du phytoplancton marin. *Lebanese Science Bulletin* 1989;5:5-16.
- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Tartaglione L, Penna A, Totti C. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* 2011;62:2512-9.
- Accoroni S, Colombo F, Pichierri S, Romagnoli T, Marini M, Battocchi C, Penna A, Totti C. Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):191-8.
- Aligizaki K, Nikolaidis G. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (*Dinophyceae*) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 2006;5:717-30.
- Barone R, Prisinzano A. Peculiarità comportamentale del dinoflagellato *Ostreopsis ovata* Fukuyo (*Dinophyceae*): la strategia del ragno. *Il Naturalista Siciliano* 2006;30:401-18.

- Barone R. Behavioural trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: the spider's strategy. *Harmful Algae News* 2007;33:1-3.
- Battocchi C, Totti C, Vila M, Masò M, Capellacci S, Accoroni S, René A, Scardi M, Penna A. 2010. Monitoring of toxic microalga *Ostreopsis* (Dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR based assay combined with light microscopy method. *Marine Pollution Bulletin* 2010;60:1074-84.
- Bianco I, Congestri R, Sangiorgi V, Albertano P, Zaottini E. Fioriture di microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste laziali. *Biologia Marina Mediterranea* 2006;13:947-50.
- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 2008;8(1):77-93.
- Bushati M, Koni E, Miho A, Bregaj M. Temporal distribution of potentially toxic algae (dinoflagellates and diatoms) in butrinti lagoon. *Natura Montenegrina* 2010;9(3):307-19.
- Caroppo C, Uva J, Prato E, Biandolino F. Messa a punto di test biologici con crostacei per la valutazione della tossicità di *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae). *Biologia Marina Mediterranea* 2009;16(1):380-1.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 2006;78:6153-9.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Penna A. Unique toxin profile of a mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* Strain: HR LC-MSn characterization of Ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chemical Research in Toxicology* 2012;25:1243-52.
- Cohu S, Thibaut T, Mangialajo L, Labat JP, Passafiume O, Blanfuné A, Simon N, Cottalorda JM, Lemée R. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 2011;62(12):2681-91.
- Di Turi L, Lo Capito S, Marzano MC, Pastorelli AC, Pompei M, Rositani L, Ungaro N. Sulla presenza di *Ostreopsidiaceae* (Dinophyceae) lungo il litorale Barese. *Biologia Marina Mediterranea* 2003;10(2):675-8.
- Europa. Regolamento (CE) 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 139, del 30 aprile 2004.
- Faust MA. Mixotrophy in tropical benthic dinoflagellates. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Watt T (Ed.). *Harmful Microalgae. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO* 1998. Paris, France, pp. 390-3
- Glibert PM, Allen JI, Bouwman AF, Brown CW, Flynn KJ, Lewitus AJ, Madden CJ. Modeling of HABs and eutrophication status, advances, challenges. *Journal of Marine Systems* 2010;83:262-75.
- Granéli E, Vidyarthna NK, Funari E, Cumaratunga PRT, Scenati R. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae* 2011;10:165-72.
- Hallegraeff GM. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology* 2010;46:220-35.
- Illoul H, Hernández FR, Vila M, Adjas N, Younes AA, Bournissa M, Koroghli A, Marouf N, Rabia S, Ameer FLK. The genus *Ostreopsis* along the Algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode. *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):209-16.

- Ismael A, Halim Y. Potentially harmful *Ostreopsis* spp. in the coastal waters of Alexandria – Egypt. *Mediterranean Marine Science* 2012;13:208-12.
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA, Rapporti 127/2010).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011a. (ISPRA, Rapporti 148/2011).
- ISPRA. *Giornata di studio. Fioriture algali di Ostreopsis ovata lungo le coste italiane. Atti. Sintesi e contributi. Roma, 23 marzo 2011*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011b.
- ISPRA. *Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane: monitoraggio 2011*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012a. (ISPRA, Rapporti 173/2012).
- ISPRA. *Giornata di studio. Presenza di fioriture algali di Ostreopsis ovata ed altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane. Atti. Roma, 28 marzo 2012*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012b.
- ISPRA. *Monitoraggio e sorveglianza delle fioriture di Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane. Anno 2012*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2013. (ISPRA, Rapporti 188/2013).
- ISPRA. *Giornate di Studio, 6ª edizione. Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate. Emergenza Ambiente: l'Ecotossicologia come strumento di gestione. La ricerca, il controllo delle Agenzie, il mondo dei privati. Atti. Livorno, 11-13 novembre 2014*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (in corso di stampa).
- Italia. Legge 31 dicembre 1982, n. 979. Disposizioni per la difesa del mare. *Gazzetta Ufficiale - Suppl. Ordinario* n.16 del 18 gennaio 1983.
- Italia. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - *Supplemento Ordinario* n. 96.
- Mangialajo L, Bertolotto R, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M, Grillo C, Lemee R, Melchiorre N, Moretto P, Povero P, Ruggieri N. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 2008;56:1209-14.
- Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, Blanfuné A, Cabrini M, Cattaneo-Vietti R, Chavanon F, Chiantore M, Cohu S, Costa E, Fornasaro D, Grossel H, Marco-Miralles F, Masó M, Reñé A, Rossi AM, Sala MM, Thibaut T, Totti C, Vila M, Lemée R. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 2011;57:408-20.
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.
- Monti M, Minocci M, Beran A, Iveša L. First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2007;54:598-601.
- Paz B, Riobó P, Franco, JM. Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2011;25:3627-39.
- Penna A, Vila M, Fraga S, Giacobbe MG, Andreoni F, Riobó P, Vernesi C. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences. *Journal of Phycology*. 2005;41:212-25.

- Penna A, Fraga S, Battocchi C, Casabianca S, Giacobbe MG, Riobò P, Vernesi C. A phylogeographical study of the toxic benthic genus *Ostreopsis* Schmidt. *Journal of Biogeography* 2010;37:830-41.
- Perini F, Casabianca A, Battocchi C, Accoroni S, Totti C, Penna A, New Approach Using the Real-Time PCR Method for Estimation of the Toxic Marine Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in Marine Environment. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17699.
- Pfannkuchen M, Godrijan J, Marić Pfannkuchen D, Iveša L, Kružić P, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Godrijan M. Toxin-producing *Ostreopsis* cf. *ovata* are likely to bloom undetected along coastal areas. *Environmental Science & Technology* 2012;46:5574-82.
- Rhodes L. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 2011;57:400-7.
- Richlen ML, Lobel PS. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 2011;421:51-66.
- Sato S, Nishimura T, Uehara K, Sakanari H, Tawong W, Hariganeya N, Smith K, Rhodes L, Yasumoto T, Yaira Y, Suda S, Yamaguchi H, Adachi M. Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific Coast, with special reference to a novel clade from Japan. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e27983.
- Sansoni G, Borghini B, Camici G, Cassoti M, Righini P, Rustighi C. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia ambientale* 2003;17(1):17-23.
- Shears NT, Ross PM. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*: an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 2009; 8:916-25.
- Sechet V, Sibat M, Chomérat N, Nézan E, Grossel H, Lehebel-Peron JB, Jauffrais T, Ganzin N, Marco-Miralles F, Lemée R, Amzil Z. *Ostreopsis* cf. *ovata* in the French Mediterranean coast: molecular characterisation and toxin profile. *Cryptogamie, Algologie* 2012;33:(2):89-98.
- Simoni F, Gaddi A, Di Paolo C, Lepri L. Harmful epiphytic dinoflagellate on Tyrrhenian Sea reef. *Harmful Algae News* 2003;24:13-4.
- Simoni F, Di Paolo C, Gori L, Lepri L. Further investigation on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, on the macroalgae of artificial and natural reefs in the Northern Tyrrhenian Sea. *Harmful Algae News* 2004;26:5-7.
- Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grossel H, Lemée R, Kantin R, Lasalle JL, Drouet G, Rambaud L, Malfait P, de Haro L. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical toxicology* (Philadelphia, Pa.) 2010;48(8):839-44.
- Tognetto L, Bellato S, Moro I, Andreoli C. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Botanica Marina* 1995;38:291-5.
- Totti C, Cucchiari E, Romagnoli T, Penna A. Bloom of *Ostreopsis ovata* in the Conero Riviera (NW Adriatic Sea). *Harmful Algae News* 2007;33:12-3.
- Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 2010;9:233-9.
- Turki S. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the gulf of Tunis. *Cahiers de Biologie Marine* 2005;46:29-34.
- Turki S, Harzallah A, Sammari C. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the lake of Bizerte and the gulf of Gabes. *Cahiers de Biologie Marine* 2006;47:253-9.
- Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Fujita T, Naoki H, Yasumoto T. Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation

- tandem mass spectrometric methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002;16:2387-93.
- Ungaro N, Marano G, Pastorelli AM, Marzano MC., Pompei M. Presenza di Ostreopsidaceae nel basso Adriatico. Roma, Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 112-15.
- Ungaro N, Assennato G, Blonda M, Cudillo B, Petruzzelli R, Mariani M, Pastorelli AM, Aliquò MR., D'angela A, Aiello C, Ranieri S. Occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* along the apulian coastal areas (Southern Italy) and relationship with anthropogenic pollution. *Fresenius Environmental Bulletin* 2010;19(9):1813-21.
- Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of the American Chemical Society* 1995;117:5389-90.
- Vila M, Garcés E, Masó M. Potentially toxic epiphytic dinoflagellates assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 2001;26:51-60.
- Vila M, Masó M, Sampedro N, Illoul H, Arin L, Garcés E, Giacobbe MG., Alvarez J, Camp J. The genus *Ostreopsis* in the recreational waters along the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): are they the origin of human respiratory difficulties? In: *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae* 2008. Copenhagen (Denmark), September 4-8, 2006. p. 334-6.
- Vila M, Arin L, Battocchi C, Bravo I, Fraga S, Penna A, Reñé A, Riobó P, Rodriguez F, Sala MM, Camp J, De Torres M, Franco JM. Management of *Ostreopsis* blooms in recreational waters along the Catalan coast (NW Mediterranean Sea): cooperation between a research project and a monitoring program. *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):143-52.
- Zingone A, Siano R, Sarno D. Microalghe potenzialmente tossiche nelle acque costiere della Campania. Roma, Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 98-111.
- Zingone A, Siano R, D'Alelio D, Sarno D. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 2006;5:321-37.
- Zingone A. Harmful algal blooms in the Mediterranean Sea: an historical overview. In: Briand F (Ed.). *Phytoplankton responses to Mediterranean environmental changes*. Monaco: CIESM; 2010. p.19-24.

A3. LIVELLI AMBIENTALI DELLE PALITOSSINE

Gioia Benedettini (a), Patrizia Ciminiello (b)*, Anna Milandri (c), Antonella Penna (d), Emanuela Spada (e)

(a) Area Vasta Costa, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, Livorno

(b) Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

(c) Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, Fondazione Centro Ricerche Marine, Cesenatico

(d) Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino

(e) Dipartimento Tutela Acque Interne e Marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma

* ciminiel@unina.it

A3.1. Rete trofica

Il tentativo di riassumere gli episodi di contaminazione di organismi marini da palitossina e analoghi risulta abbastanza arduo: sia perché questo tipo di analisi non viene applicata sistematicamente in tutti i programmi di monitoraggio e pertanto le segnalazioni della presenza di palitossine (PLTX) negli alimenti di origine marina si basano su contributi scientifici isolati con il rischio di una sottostima degli eventi; sia perché i metodi di analisi fin qui utilizzati sono i più disparati e differiscono sulla variabile misurata (tossina/tossicità), sulla natura dei composti identificati (differenti analoghi della palitossina) e sulla sensibilità.

In estratti algali ottenuti da *Ostreopsis* cf. *ovata* raccolta sul campo in diverse aree costiere del Tirreno e dell'Adriatico è stata dimostrata mediante analisi chimica in LC-MS/MS (*Liquid chromatography-tandem Mass Spectrometry*) e in cromatografia liquida ad alta risoluzione (*Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*, LC-HRMS) la presenza di palitossina putativa (con un max. di p-PLTX 2,0 pg/cell) e ovatossina-a (OVTX-a, max. 64,0 pg/cell) (Accoroni *et al.*, 2011; Honsell *et al.*, 2011). Per quanto riguarda la palitossina, il termine putativa si riferisce al fatto che il picco evidenziato all'LC-MS presenta lo stesso spettro di massa della palitossina standard; tuttavia, considerando la complessità della molecola, la possibilità che si tratti di un isomero strutturale non può essere esclusa. Recentemente è stato accertato che in effetti la palitossina putativa è un isomero strutturale della palitossina stessa ed è stata rinominata palitossina isobarica (García-Altares *et al.* 2014). Più recentemente in Adriatico sia su estratti di cellule dal campo che di colture sono state individuate oltre ad OVTX-a, altre ovatossine (OVTX-b, OVTX-c, OVTX-d/e, OVTX-f) (Ciminiello *et al.*, 2012).

La palitossina è stata isolata per la prima volta nel 1971 da alcuni zoantidi marini appartenenti al genere *Palythoa* (Moore & Scheuer, 1971). Successivamente questi zoantidi sono stati identificati come appartenenti alla specie *Palythoa toxica* (Walsh & Bowers, 1971).

La palitossina è stata trovata in seguito anche in altri zoantidi, come *P. tuberculosa*, (Uemura *et al.*, 1985), *P. mammilosa* e *P. caribaeorum* (Gleibs *et al.*, 1995). La palitossina e i suoi analoghi sono stati ritrovati in policheti (*Hermodice carunculata*); in una stella marina (*Acanthaster planci*) che si nutre d'invertebrati del genere *Palythoa* (Gleibs *et al.*, 1995; Gleibs & Mebs, 1999); in crostacei decapodi quali *Lophozozymus pictor*, *Demania alcalai* (Yasumoto *et al.*, 1986; Alcalá *et al.*, 1988), *Demania reynaudii* nelle Filippine (Alcalá *et al.*, 1988) e in *Lophozozymus pictor* a Singapore (Lau *et al.*, 1993; Lau *et al.*, 1995a, 1995b). La tossina era distribuita nelle branchie 1,8-160 µg/g, visceri 2,0-100 µg/g, carapace 1,6-20 µg/g e nella parte edibile delle chele 0,2-4,0 µg/g.

Per quanto riguarda la fauna ittica, PLTX sono state trovate in pesci tetrodonti (*Alutera scripta*, Hashimoto *et al.*, 1969; *Sphoeroides spengleri* dei Caraibi, Mebs, 1998; *Tetraodon* sp. di acque dolci del Bangladesh, Taniyama *et al.*, 2001); nei pesci pappagallo *Ypsiscarus ovifrons* (Noguchi *et al.*, 1987) e *Scarusovifrons* (Taniyama *et al.*, 2003) in Giappone; in un pesce della famiglia dei balistidi, *Melichtys vidua*, pescato in Micronesia, che mostrava nel filetto concentrazioni di palitossina molto basse (0,003 µg/g), e nei visceri concentrazioni più elevate (0,31 µg/g) (Fukui *et al.*, 1987). PLTX sono state ritrovate anche in *Decapterus macrosoma*, una specie di sgombero diffuso soprattutto nelle Filippine (Kodama *et al.*, 1989) e in *Herklotsichthys quadrimaculatus*, una specie di sardina distribuita soprattutto in Madagascar (Onuma *et al.*, 1999). In pesci farfalla *Chaetodon capistratus* e *C. sedentarius* dell'area caraibica (Colombia), è stata rilevata presenza di PLTX in tutti gli organi analizzati (pelle, muscolo, intestino, branchie fegato) e persino nelle uova, con la concentrazione massima (127 µg PLTX/g) nell'intestino, seguito da tessuto muscolare (71 µg PLTX/g) e uova (42 µg PLTX/g) (Gleibs & Mebs, 1999). Nello stesso studio è stata dimostrata contaminazione da PLTX in altre 9 specie del genere *Chaetodon* dell'area del Pacifico, pesci che si alimentano direttamente di *Palythoa* o di piccoli vermi e crostacei che vivono sotto le colonie di *Palythoa*. Le concentrazioni erano comunque più basse rispetto ai pesci farfalla, con una distribuzione crescente da tessuto muscolare, a fegato, a intestino (Gleibs & Mebs, 1999). In numerose specie di pesci erbivori e carnivori delle barriere coralline delle Hawaii, Big Island (Wachi *et al.*, 2000) e Hawaii, Oahu (Wachi & Hokama, 2001) è stata rilevata la presenza di diversi principi tossici, inclusi analoghi della palitossina, sia nell'intestino sia nel tessuto muscolare. In Giappone in seguito al consumo di filetto, visceri e/o fegato bolliti di una cernia del genere *Epinephelus* si sono registrati 11 casi di intossicazione (Taniyama *et al.*, 2002).

Accumulo di PLTX è stato riportato anche in mitili e/o ricci di mare d'Almeria, in Spagna nel 2003 (L. Botana, com. pers.), in Grecia nel 2005 (Aligizaki *et al.*, 2008), in Francia nel periodo 2007-2009 (Amzil *et al.*, 2012) e in Italia dal 2007 ad oggi (ORSA, 2011; ISPRA, 2010; ISPRA 2011, Aligizaki *et al.*, 2011; Milandri *et al.*, 2012).

In particolare, in Grecia, durante l'estate e l'autunno del 2004, 2005 e 2006 in molluschi (mitili, vongole, cozze pelose) raccolti da diverse aree costiere del Nord Egeo interessate dalla presenza di *Ostreopsis* sono state rilevate concentrazioni di PLTX comprese fra 33,3 µg p-PLTX/kg di tessuto e 96,8 µg p-PLTX/kg di tessuto (Aligizaki *et al.*, 2008). La contaminazione dei bivalvi cominciava già 1-2 settimane dal primo rilevamento di *Ostreopsis* nelle acque e terminava almeno 2-3 settimane dopo la loro scomparsa (Aligizaki *et al.*, 2009).

Successivamente, tossicità da PLTX è stata riscontrata anche in Italia e in Francia in molluschi di banchi naturali e/o di allevamenti vicini ad aree interessate da bloom di *Ostreopsis* o posti intenzionalmente in tali aree (EFSA, 2009; ORSA, 2011; Amzil 2012).

In Italia, analisi chimiche eseguite in LC-MS/MS hanno evidenziato la presenza di analoghi della palitossina in organismi raccolti sia da aree costiere del Tirreno che dell'Adriatico interessate dalla presenza di *O. cf. ovata*.

In particolare, dai risultati di un accurato piano di monitoraggio promosso dalla Regione Campania dal 2007 ad oggi, è stato evidenziato che le ovatossine si accumulano in mitili e ricci di mare raccolti in prossimità dei siti interessati da proliferazione di *O. cf. ovata*. Le concentrazioni di PLTX negli organismi eduli sono state determinate mediante analisi qualitative con metodica LC-HRMS. In molti casi, il contenuto di PLTX totali è risultato in quantità di molto superiori ai limiti di tollerabilità per le PLTX (30 µg/kg) proposto dalla European Food Safety Authority (EFSA), raggiungendo un picco massimo di 600 µg/kg (ORSA Campania, 2007-2010). Nell'estate 2010 oltre ai mitili e ai ricci di mare, campioni di cefali prelevati nella zona di Sorrento per la prima volta hanno fornito un esito positivo al saggio biologico sul topo. L'analisi LC-HRMS eseguita sulla parte edibile e sulle viscere ha indicato la presenza di PLTX esclusivamente in queste ultime, con un contenuto di PLTX totali pari a 24

µg/kg di tessuto. Inoltre, nell'estate 2012, un campione di salpa raccolto in località La Tonnarella (Sorrento) è risultato contenere 88 µg/kg di PLTX totali.

Nei mesi di luglio e agosto 2008, durante un bloom di *O. cf. ovata* che ha interessato la costa di Marina di Massa, è stato registrato un accumulo di PLTX lungo la catena alimentare (mitili, ricci di mare, piccoli polpi). Le analisi chimiche (LC-MS/MS) e i saggi emolitici (HNA) condotti sugli organismi sofferenti raccolti dalle aree interessate hanno confermato che tutti i campioni erano contaminati da PLTX. In accordo con le analisi LC-MS/MS, più specifiche, è stato possibile evidenziare che l'OVTX-a era il composto dominante, con concentrazioni massime di 164 µg/kg nei ricci di mare e di 228 µg/kg di polpa edibile nei mitili. La contaminazione più importante è stata rilevata nei polpi spiaggiati, con 971 µg/kg di OVTX-a e 115 µg/kg di p-PLTX (Milandri *et al.*, comm. pers. in Aligizaki *et al.*, 2011; Milandri *et al.*, 2012).

Nel 2009 in mitili prelevati a Portonovo (Ancona) nel mese di settembre, in concomitanza alla presenza nelle acque di *O. cf. ovata*, sono state rilevate in LC-MS/MS concentrazioni di OVTX-a pari a 91 µg/kg di parte edibile (p.e.). La presenza di PLTX (123 µg/kg di p.e.) è stata confermata anche dal saggio emolitico (ISPRA, 2010).

Durante una fioritura nel 2009, in quattro siti costieri fra Nizza e Villefranche sur Mer, è stato analizzato il contenuto in PLTX e OVTX-a (come somma) in vari organismi, a diversi stadi della fioritura. Nel granchio *Eriphia verrucosa* è stata trovata una concentrazione di 58,6 µg/kg di polpa (LC-MS/MS); nel tratto digestivo di cefali e di salpe sono state trovate le concentrazioni più elevate (fino a 359,1 µg/kg nel cefalo e 191,2 µg/kg nella salpa, LC-MS/MS) (Biré *et al.*, 2013).

A3.2. Acque marine

Non esistono al momento studi effettuati sul campo sulla presenza delle PLTX nell'acqua di mare. La produzione di PLTX da parte di *O. cf. ovata* in coltura è molto variabile ed è compresa in un range molto ampio che va dai 10 ai 200 pg/cell. Studi preliminari effettuati su colture cellulari, hanno dimostrato che il rilascio di PLTX nelle acque di coltura è del 24-26% rispetto al contenuto tossico totale, percentuale relativamente bassa rispetto a quella osservata per altre specie algali tossiche (es. *Protoceratium reticulatum* rilascia le yessotossine nel mezzo in misura anche superiore al 60%). Non è stato tuttavia ancora accertato se le tossine vengono rilasciate attivamente nel mezzo o in seguito a morte cellulare. Studi sono tuttora in corso per determinare la presenza di PLTX nelle acque di mare naturali.

A3.3. Aerosol

Lungo le coste mediterranee in questi ultimi anni, sono stati riportati fenomeni di intossicazione per inalazione o per contatto dermico in persone che frequentavano spiagge o litorali durante intense fioriture di *O. cf. ovata*. Questi eventi di intossicazione sono stati attribuiti alla palitossina e ai suoi analoghi prodotti da questa microalga (Tichadou *et al.*, 2010). È stato ipotizzato che composti della palitossina aerosolizzati, cellule e/o frammenti cellulari di *Ostreopsis* possano essere responsabili o essere associati ai sintomi respiratori in persone che frequentano spiagge o litorali costieri (Mangialajo *et al.*, 2011). Non ci sono ancora studi in vitro che abbiano fornito una chiara spiegazione delle cause dirette delle sindromi respiratorie delle fioriture di *Ostreopsis* (Tubaro *et al.*, 2011). Finora gli studi sulla complessa matrice di aerosol sono stati impediti fondamentalmente dalle difficoltà di campionamento dell'aerosol marino e dalla mancanza di metodiche altamente sensibili per la rivelazione di *Ostreopsis* o delle tossine da loro prodotte nell'aerosol.

Solo molto recentemente è stato sviluppato e validato un metodo molecolare di PCR quantitativa (qPCR) per la quantificazione di *O.cf. ovata* nella matrice dell'aerosol marino lungo le coste catalane (Spagna) nel Mediterraneo nord ovest (Casabianca *et al.*, 2013). La novità di questo metodo molecolare di qPCR, basato sul metodo sviluppato precedentemente (Perini *et al.*, 2011), è la determinazione e quantificazione specie-specifica delle cellule di *Ostreopsis* nella matrice complessa dell'aerosol marino potenzialmente contaminato da palitossina e analoghi. La sensibilità analitica del metodo di qPCR ha permesso la quantificazione di cellule tossiche di *O. cf. ovata* in un range di $1\text{-}10^2$ cellule totali su filtro durante la fioritura estiva che raggiungeva livelli di abbondanze di 7×10^4 e $7,6\times 10^5$ cell/g fw su macroalghe e tra $3,5\times 10^3$ e $1,1\times 10^5$ cell/L in acqua di mare (Casabianca *et al.*, 2012). Tuttavia, durante l'evento di fioritura del 2010 lungo le coste catalane (Spagna), le determinazioni chimico-analitiche e bio-analitiche del contenuto di PLTX in aerosol sono risultate negative probabilmente a causa del limite del livello di sensibilità dei metodi utilizzati.

Uno studio sulla presenza di biotossine algali nell'aerosol marino è stato condotto da ARPACAL in un'area situata a Nord di Bari, località Giovinazzo, esposta ad intensa criticità per fioriture algali (*hot spot*). Il campionamento è stato effettuato tra settembre e novembre 2009 (quattro prelievi totali) mediante un campionatore portatile per bioaerosol AIRCUBE COM2 con associato sistema di captazione in vetro borosilicato e un campionatore per microinquinanti AIRFLOW PUF con membrana filtrante in fibra di quarzo e fiala in schiuma poliuretanicata purificata (PUF). I risultati dell'analisi chimica mediante LCMS, hanno evidenziato presenza di una yessotossina-like nei campioni di aerosol raccolti, mentre non sono stati riscontrati livelli quantificabili di PLTX (ISPRA, 2010; ISPRA, 2011; Ventrice *et al.*, 2010).

Uno studio analogo è stato condotto da ARPA Toscana nell'ambito di un monitoraggio in piccola scala condotto nell'estate 2009 a Marina di Massa e nell'estate 2010 a Marina di Pisa (ISPRA, 2010; ISPRA, 2011). I campioni di aerosol raccolti sono stati analizzati per la presenza di cellule di *Ostreopsis* mediante saggi molecolari (PCR e qPCR) presso l'Università di Urbino e per la presenza di PLTX mediante LC-HRMS presso l'Università di Napoli Federico II. Le analisi effettuate, oltre a confermare la presenza di cellule di *Ostreopsis* negli estratti del 2009 (Perini *et al.*, 2011), hanno dimostrato per la prima volta, la presenza di PLTX nei campioni di aerosol raccolti nell'estate 2010 (Figura 1).

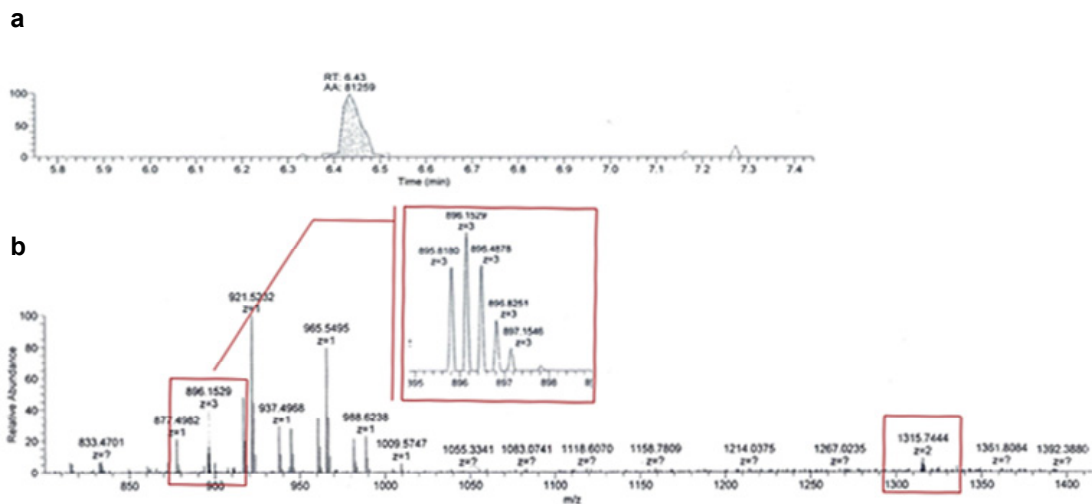


Figura 1. Cromatogramma estratto di ioni bicarica e tricarica (*Extracted Ion Chromatogram*, XIC) dell'ovatossina-a in un campione di aerosol raccolto nell'agosto 2010 lungo le coste toscane (a) e lo spettro di massa ad alta risoluzione (HRMS) associato (b)

La determinazione quali-quantitativa delle tossine è stata effettuata mediante tecniche LC-MS ad alta risoluzione (Ciminiello *et al.*, 2014). Date le condizioni meteo-marine stabili e sfavorevoli a un'intensa formazione di aerosol durante il periodo di monitoraggio, le concentrazioni di PLTX nell'aerosol sono risultate molto basse (2,4 pg di ovatoossine/litro d'aria) e contestualmente non sono stati registrati sintomi respiratori nell'uomo. Questo ritrovamento, tuttavia, rappresenta il primo indizio che le tossine prodotte da *O. cf. ovata*, così come le cellule stesse, possono essere accumulate nell'aerosol e costituisce il primo passo verso la definizione di una relazione causa-effetto tra le proliferazioni di *Ostreopsis* e gli effetti tossici osservati sulle vie respiratorie nell'uomo.

Ulteriori studi sulla presenza di *Ostreopsis* e delle PLTX nella matrice aerosol durante i periodi di fioriture associati a studi sulla tossicità inalatoria delle PLTX sono necessari al fine di confermare una correlazione tra sintomatologie respiratorie e tossicità dell'aerosol marino costiero.

Bibliografia

- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Tartaglione L, Penna A, Totti C. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2512-9.
- Alcala AC, Alcala LC, Garth JC, Yasumura D, Yasumoto T. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 1988;26:105-7.
- Aligizaki K, Katikou P, Nikolaidis G, Panou A. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 2008;51:418-27.
- Aligizaki K, Katikou P, Nikolaidis G. Toxic benthic dinoflagellates spreading and potential risk in the Mediterranean Sea, *Atti del 7th International Conference in Molluscan Shellfish Safety*. Nantes, Francia, 14-19 June 2009.
- Aligizaki K, Katikou P, Milandri A, Diogene J. Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* 2011;57(3):390-9.
- Amzil Z, Sibat M, Chomerat N, Grossel H, Marco-Miralles F, Lemee R, Nezan E, Sechet V. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the French Mediterranean coast. *Marine Drugs* 2012;10:477-96.
- Biré R, Trotereau S, Lemée R, Delpont C, Chabot B, Aumond Y, Krys S. Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009. *Harmful Algae* 2013;28:10-22.
- Casabianca S, Casabianca A, Riobò P, Franco JM, Vila M, Penna A. Quantification of the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR Assay in Marine Aerosol. *Environ Sci Technol* 2013;47:3788-95.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Penna A. Unique Toxin Profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* Strain: HR LC-MSⁿ Characterization of Ovatoxin-f, a New Palytoxin Congener. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1243-52.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C, Casabianca S, Penna A. First Finding of *Ostreopsis cf. ovata* Toxins in Marine Aerosols. *Environ Sci Technol* 2014;48(6):3532-40.
- EFSA. Marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 2009;7(12):1393:1-38.

- Fukui M, Murata M, Inoue A, Gawel M, Yasumoto T. Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*. *Toxicon* 1987;25:1121-4.
- García-Altare M, Tartaglione L, Dell'Aversano C, Carnicer O, de la Iglesia P, Forino M, Diogène J, Ciminiello P. The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-High Resolution MSn. *Anal Bioanal Chem* 2014 (in corso di stampa).
- Gleibs S, Mebs D, Werdning B. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon* 1995;33(11):1531-7.
- Gleibs S, Mebs D. Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* 1999;37(11):1521-7.
- Hashimoto Y, Fusetani N, Kimura S. Aluterin: a toxin of filefish, *Alutera scripta*, probably originating from a zoantharian, *Palythoa tuberculosa*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1969;35:1086-93.
- Honsell G, De Bortoli M, Boscolo S, Dell'Aversano C, Batocchi C, Fontanile G, Penna A, Berti F, Sosa S, Yasumoto T, Ciminiello P, Poli M, Tubaro A. Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environ Sci Technol* 2011;46:7051-9.
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA, Rapporti 127/2010).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011. (ISPRA, Rapporti 148/2011).
- Kodama AM, Hokama Y, Yasumoto T, Fukui M, Manea SJ, Sutherland N. Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrerosoma* (mackerel). *Toxicon* 1989;27(9):1051-3.
- Lau CO, Khoo HE, Yuen R, Wan M, Tan CH. Isolation of a novel fluorescent toxin from the coral reef crab, *Lophozozymus pictor*. *Toxicon* 1993;31(10):1341-5.
- Lau CO, Tan CH, Khoo HE, Yuen R, Lewis RJ, Corpuz GP, Bignami GS. *Lophozozymus pictor* toxin: a fluorescent structural isomer of palytoxin. *Toxicon* 1995;33(10):1373-7.
- Lau CO, Tan CH, Li QT, Ng FH, Yuen R, Khoo HE. Bioactivity and mechanism of action of *Lophozozymus pictor* toxin. *Toxicon* 1995;33(7):901-8.
- Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, Blanfuné A, Cabrini M, Cattaneo-Vietti R, Chavanon F, Chiantore M, Cohu S, Costa E, Fornasaro D, Grossel H, Marco-Miralles F, Masó M, Reñé A, Rossi AM, Montserrat Sala M, Thibaut T, Totti C, Vila M, Lemée R. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 2011;57:408-20.
- Mebs D. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon* 1998;36:1519-22.
- Milandri A, Ceredi A, Riccardi E, Gasperetti L, Susini F, Casotti M, Faiman L, Pigozzi S. Impact of *Ostreopsis ovata* on marine benthic communities: accumulation of palytoxins in mussels, sea urchins and octopuses from Italy. In: Pagou P, Hallegraeff G (Ed.). *Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae*. Hersonis-Creta, Grecia, 1-5 novembre 2010 International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 2012. p. 23-25.
- Moore RE, Scheuer PJ. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 1971;172:495-8.
- Noguchi T, Hwang DF, Arakawa O, Daigo K, Sato S, Ozaki H, Kawai N, Ito M, Hashimoto K. Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK (Ed.). *Progress in venom and toxin research: proceedings of the first Asia-Pacific Congress on Animal*,

- Plant and Microbial Toxins*. Singapore: Faculty of Medicine, National University of Singapore; 1987. p. 325-35.
- Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumoto T. Identification of putative palytoxin as the cause of cluetoxtism. *Toxicon* 1999;37(1):55-65.
- ORSA. *Report sulla presenza di Ostreopsis ovata lungo il litorale costiero campano: monitoraggio 2007-2010*. Napoli: Osservatorio Regionale Sicurezza Alimentare Campania, 2011. (ORSA Rapporto 148/2011). Disponibile all'indirizzo: <http://www.orsacampania.it/wp-content/uploads/2011/07/Report-Ostreopsis-avata-2007-2010.pdf>; ultima consultazione 19/11/2014.
- Perini F, Casabianca A, Battocchi C, Accoroni S, Totti C, Penna A. New approach using the real-time pcr method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17699.
- Suzuki T, Watanabe R, Matsushima R, Ishihara K, Uchida H, Kikutsugi S, Harada T, Nagai H, Adachi M, Yasumoto T, Murata M. LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus oviifrons* causing human poisoning in Japan. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 2013;30(8):1358-64.
- Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 2001;39(5):725-7.
- Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *Journal of Natural Toxins* 2002;11(4):277-82.
- Taniyama S, Arakawa O, Terada M, Nishio S, Takatani T, Mahmud Y, Noguchi T. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oviifrons*. *Toxicon* 2003;42(1):29-33.
- Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grossel H, Lemée R, Kantin R, Lasalle JL, Drouet G, Rambaud L, Malfait P, Haro LD. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin Toxicol* 2010;48:839-44.
- Tubaro A, Durando P, Del Favero G, Ansaldi F, Icardi G, Deeds JR, Sosa S. Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 2011;57:478-95.
- Uemura D, Hirata Y, Iwashita T, Naoki H. Studies on palytoxins. *Tetrahedron* 1985;41:1007-17.
- Ventrice D, Vizza E, Sacco I, Visalli V, Stefanizzi F, Oliverio S, Borrello P, Spada E, Diano A, Cellini E. Studio sulla presenza di biotossine algali nell'aerosol marino. *Atti della Quarta edizione Giornate di Studio: "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche e in ambienti acquatici"*. Livorno, 20-22 Ottobre 2010
- Wachi KM, Hokama Y, Haga LS, Shiraka A, Takenaka WE, Bignami GS, Levine L. Evidence for palytoxin as one of the sheep erythrocyte lytic factors in crude extracts of ciguateric and non-ciguateric reef fish tissue. *J Nat Toxins* 2000;9:139-46.
- Wachi KM, Hokama Y. Diversity of marine biotoxins in the nearshore ocean area: presence of a palytoxin-like entity at Barbers Point Harbor. Oahu. *J Nat Toxins* 2001;10:317-33.
- Walsh GE, Bowers RL. A review of Hawaiian zoanthids with descriptions of three new species. *Zool J Linn Soc* 1971;50:161-80.
- Yasumoto T, Yasumura D, Ohizumi Y, Takahashi M, Alcalá AC, Alcalá LC Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agricultural and Biological Chemistry* 1986;50(1):163-7.

A4. CARATTERISTICHE CHIMICHE DELLE PALITOSSINE E FONTI BIOGENETICHE

Patrizia Ciminiello (a)*, Antonella Penna (b)

(a) Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

(b) Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino

* ciminiel@unina.it

La palitossina fu isolata per la prima volta nel 1971 alle Hawaii, dal celenterato marino *Palythoa toxica*, dal quale deriva il suo nome (Moore & Scheuer, 1971). Successivamente, la palitossina e alcuni suoi analoghi strutturali furono isolati da altre specie di zoantidi del genere *Palythoa* e *Zoanthus* (Figura 1).

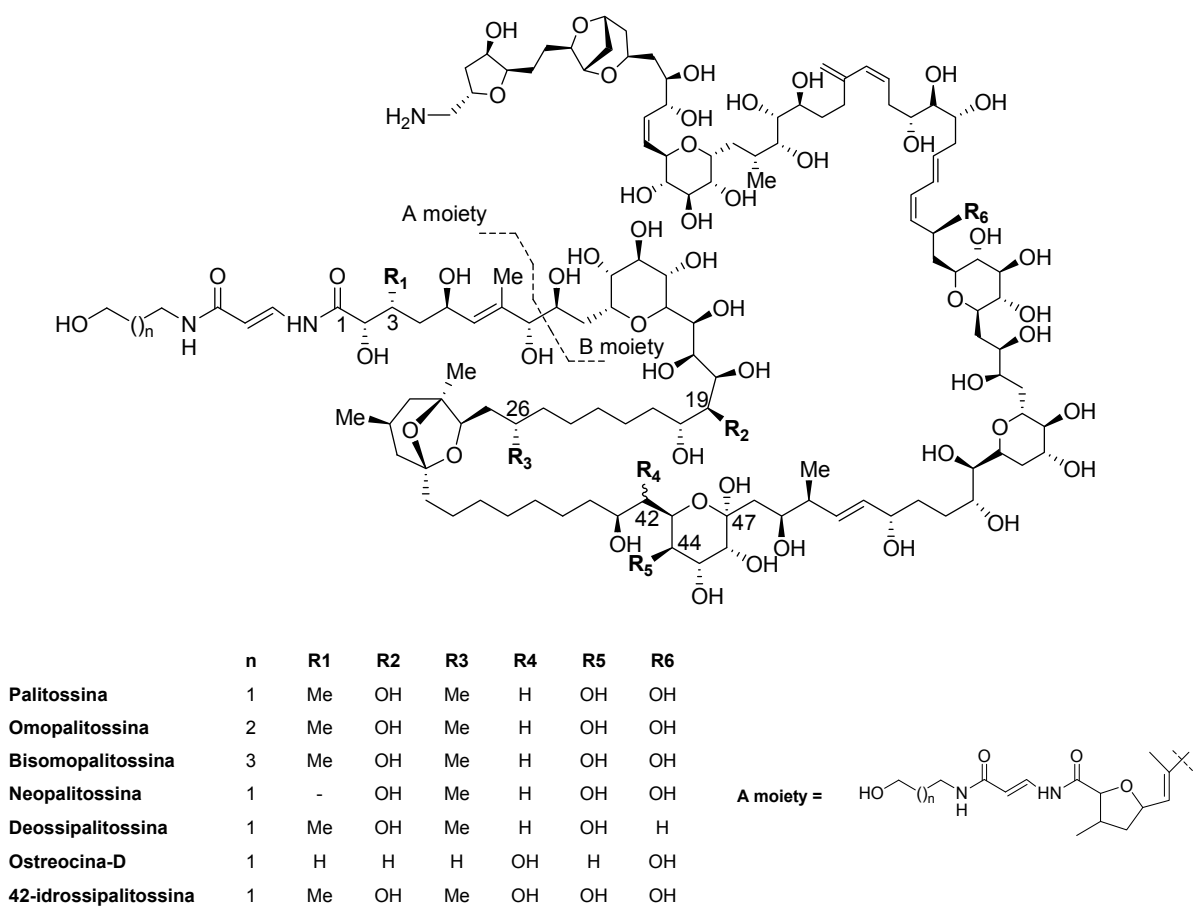


Figura 1. Struttura chimica della palitossina e di alcuni suoi analoghi

I diversi analoghi hanno mostrato un peso molecolare compreso tra 2659 e 2680 Da (Tan & Lau, 2000). Da un punto di vista strutturale, la palitossina è una macromolecola idrosolubile caratterizzata da una lunga catena alchilica parzialmente insatura contenente gruppi ossidrilici, eteri ciclici, 2 gruppi ammidici e un gruppo amminico terminale. (Moore *et al.*, 1981). A causa della complessità strutturale, dei bassi livelli cui esercita la tossicità e dell'elevato numero di modificazioni che essa può subire nell'ambiente e nell'organismo ospite, la palitossina è molto difficile da rilevare strumentalmente.

Composti palitossino-simili sono prodotti anche da dinoficee bentoniche appartenenti al genere *Ostreopsis*, anche se non si può escludere un coinvolgimento di altri organismi, compresi i batteri simbiotici.

È stato provato che ceppi giapponesi di *O. siamensis* producono l'ostreocina-D (Ukena *et al.*, 2001) (Figura 1), che è stata isolata e determinata strutturalmente mediante NMR (Nuclear Magnetic Resonance) e FAB-MS/MS (Fast Atom Bombardment-tandem Mass Spectrometry). Tuttavia, analisi LC-MS (Liquid chromatography-Mass Spectrometry) effettuate su ceppi mediterranei e atlantici di *O. siamensis* non hanno rivelato la presenza né di ostreocina-D, né di palitossine, ad eccezione di tracce (nell'ordine di sub-femtogrammi) di palitossina putativa nel solo ceppo Mediterraneo (Ciminiello *et al.*, 2013). *O. mascarenensis* produce le mascarenotossine (Lenoir *et al.*, 2004), di cui invece sono noti solo il peso molecolare e piccoli dettagli strutturali. Mercado *et al.* (1994) hanno osservato la produzione di ostreotossina-1 e ostreotossina-3, da parte di *O. lenticularis* isolata dalle acque caraibiche.

Dagli studi chimici effettuati mediante LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem Mass Spectrometry) e LC-HRMS (Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry) sui ceppi mediterranei di *O. cf. ovata* è emerso che la microalga produce solo piccolissime quantità di palitossina putativa (Ciminiello *et al.*, 2006) e quantità maggiori di una serie di composti palitossino-simili, denominati ovatossine (OVTX) (Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; Ciminiello *et al.*, 2012a; Rossi *et al.*, 2010). Nella maggior parte dei ceppi di *O. cf. ovata* analizzati, l'OVTX-a (Figura 2) rappresenta il componente principale del profilo tossico della microalga, rappresentando fino all'89% del totale, seguita dall'OVTX-b, -d+e, -c e palitossina putativa, elencate in ordine decrescente di concentrazione. Recentemente, ceppi adriatici di *O. cf. ovata* hanno mostrato possedere profili tossici peculiari: un ceppo isolato a Numana (Marche) non produce OVTX-b e -c (Ciminiello *et al.*, 2012a), mentre un ceppo di Portonovo (Marche) è risultato produrre, oltre a tutte le altre ovatossine, un nuovo componente, mai riscontrato in tutti gli altri ceppi di *O. cf. ovata* mediterranei analizzati, l'OVTX-f, che rappresenta il componente principale (≈50%) del suo contenuto tossico totale (Ciminiello *et al.*, 2012a).

L'OVTX-a è stata recentemente isolata e la sua struttura determinata mediante esperimenti NMR e LC-MS a multiplo stadio (LC-MSⁿ) ad alta risoluzione (Ciminiello *et al.* 2012b; Ciminiello *et al.*, 2012c) (Figura 2).

Studi sono tuttora in corso per determinare la struttura dei componenti minori del profilo tossico di *O. cf. ovata* di cui sono noti i pesi molecolari e alcune caratteristiche strutturali evincibili dai pattern di frammentazione negli spettri MSn.

Per quanto riguarda il profilo tossico di *Ostreopsis* spp., la produzione di palitossine sembra essere non solo specie-specifica, ma anche variabile da un ceppo all'altro, sia per le popolazioni naturali, che per quelle mantenute in coltura (Pistocchi *et al.*, 2011). Inoltre, ceppi provenienti da macroaree geografiche diverse possono presentare un profilo tossico diverso, sia in termini qualitativi, che quantitativi. Studi condotti su popolazioni di *O. cf. ovata* raccolte in diverse aree del Mediterraneo hanno evidenziato una maggiore produttività, in termini di pg di palitossine/cell, per quelle provenienti dal Mediterraneo nord occidentale (Genova e Villefranche) (Ciminiello P., Dell'Aversano C., Penna A., com. pers.).

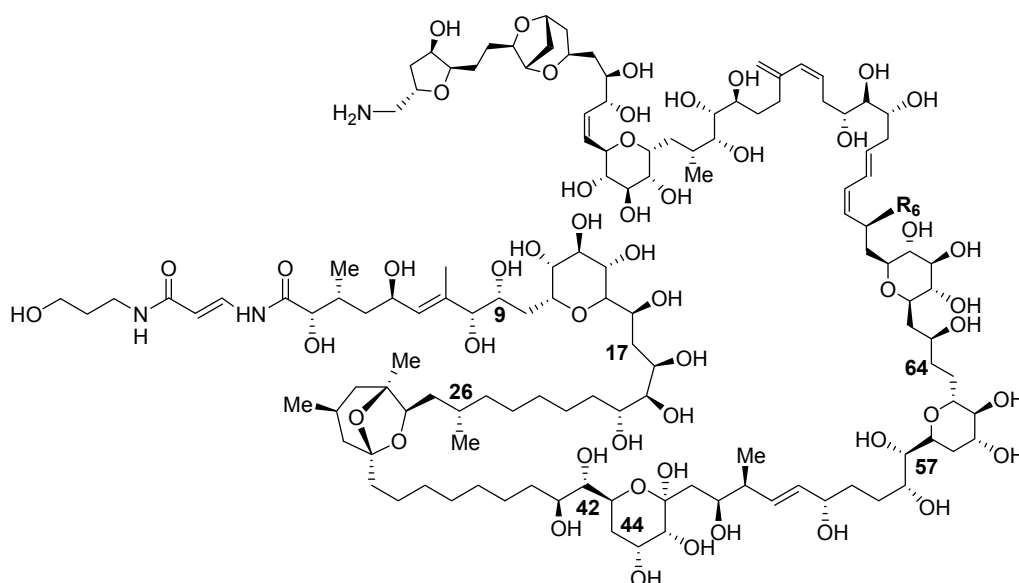


Figura 2. Struttura chimica della OVTX-a

Nell'ambito di questo studio sono stati individuati 4 profili tossici tipo. Il primo, più diffuso, presente in circa l'80% dei ceppi analizzati, è caratterizzato da OVTX-a come componente principale ($\approx 55\%$ del totale), seguito, in ordine decrescente di concentrazione, da OVTX-b, OVTX-d + -e, OVTX-c e palitossina putativa. Il secondo, che è rappresentato in circa il 20% dei ceppi analizzati, contiene anch'esso come componente principale OVTX-a ($\approx 80\%$) seguita da OVTX-d + -e e palitossina putativa, ma manca di OVTX-b e -c. Il terzo profilo è stato ritrovato finora solo in un ceppo di Ancona e contiene OVTX-f ($\approx 50\%$) seguita da tutte le altre. Infine, il quarto profilo è stato ritrovato solo in un ceppo di Villefranche sur mer e contiene solo OVTX-b (componente principale, $\approx 80\%$) e -c.

Bibliografia

- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. The Genoa 2005 outbreak. determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry method. *Analytical Chemistry* 2006;78:6153-9.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. 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* 2008;19:111-20.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R. Complex palitoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high resolution LC-MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:2735-44.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Battocchi C, Penna A. The unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain. HR LC-MSⁿ characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chemical Research in Toxicology* 2012a;25:1243-52.

- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L. High resolution LC-MSⁿ fragmentation pattern of palytoxin as template to gain new insights into ovatoxin-a structure. The key role of calcium in MS behavior of palytoxins. *J Am Soc Mass Spectrom* 2012b;23:952-63.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pezzolesi L, Pistocchi R, Vanucci S. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *J Am Chem Soc* 2012c;134:1869-75.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Yasumoto T, Battocchi C, Giacobbe M, Amorim A, Penna A. Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography, and high resolution mass spectrometry. *Harmful Algae* 2013; 23:19-27.
- Lenoir S, Ten-Hage L, Turquet J, Quod JP, Bernard C, Hennion MC. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *J Phycol* 2004;40:1042-51.
- Mercado JA, Viera M, Escalona de Motta G, Tosteson TR, Gonzalez I, Silva W. An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacologic action of *Ostreopsis lenticularis* extracts. *Toxicon* 1994;32:256.
- Moore RE, Scheuer PJ. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 1971;172:495-8.
- Moore RE, Bartolini G. Structure of Palytoxin. *J Am Chem Soc* 1981;103:2491-4.
- Pistocchi R, Pezzolesi L, Guerrini F, Vanucci S, Dell'Aversano C, Fattorusso E. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon* 2011;57:421-8.
- Rossi R, Castellano V, Scalco E, Serpe L, Zingone A, Soprano V. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 2010;56:1381-7.
- Tan CH, Lau CO. Chemistry and detection of palytoxin. In: Botana LM (Ed.) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 533-48.
- Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Naoki H, Fujita T, Kan Y, Yasumoto T. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci Biotech Bioch* 2001;65:2585-8.

A5. PROFILO TOSSICOLOGICO DELLE PALITOSSINE

Marco Pelin (a), Silvio Sosa (a), Emanuela Testai (b)*, Aurelia Tubaro (a)

(a) Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Trieste

(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*emanuela.testai@iss.it

A5.1. Introduzione

Dalla prima segnalazione della presenza di *Ostreopsis* risalente al 1994 lungo le coste della regione Lazio (Tognetto *et al.*, 1995), il rilevamento di *Ostreopsis* spp., principalmente *Ostreopsis* cf. *ovata*, è stata registrata più volte lungo le coste italiane (Brescianini *et al.*, 2006; Mangialajo *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2007; Honsell *et al.*, 2011).

La preoccupazione sanitaria per la crescente distribuzione di *Ostreopsis* è motivata dalla sua potenziale tossicità, essendo la microalga capace di produrre biotossine marine denominate genericamente palitossine (PLTX), una famiglia di composti che comprende circa una ventina di analoghi strutturali. Il composto di riferimento è la PLTX individuata in coralli del genere *Palythoa* (*P. toxica* e *P. tuberculosa*); tra gli analoghi strutturali sono inclusi la 42-OH-PLTX (individuata nel corallo *P. toxica*), l'ostreocina-D (Ost-D, individuata in *Ostreopsis siamensis*) e il gruppo delle ovatossine (OVTX) (individuate in *O. cf. ovata*).

Dai dati raccolti finora, nel bacino del Mediterraneo *O. cf. ovata* sembra produrre quasi esclusivamente ovatossine, con una maggior percentuale di OVTX-a, mentre la PLTX viene prodotta solo in tracce (Ciminiello *et al.*, 2012; 2013); inoltre, il clade mediterraneo di *O. cf. siamensis* non sembra produrre Ost-D (Ciminiello *et al.*, 2013). Sulla base di queste considerazioni si può affermare che, nell'area mediterranea la maggiore attenzione va posta soprattutto alla presenza di OVTX.

L'uomo può essere esposto alle PLTX attraverso tre principali vie di esposizione (Tubaro *et al.*, 2011a):

1. *via orale*
attraverso l'ingestione di prodotti ittici contaminati o l'ingestione di acqua marina durante attività ricreative;
2. *via inalatoria*
attraverso l'inalazione di aerosol contenente eventuali frammenti di *Ostreopsis* e/o composti PLTX-simili durante attività ricreative e/o professionali;
3. *via cutanea e/o oculare*
attraverso contatto diretto con acque contaminate da composti palitossino-simili.

Di conseguenza, i potenziali rischi per la salute umana associati all'esposizione alle PLTX e simili riguardano non solo i consumatori di prodotti ittici contaminati, ma anche altre categorie quali bagnanti, persone che svolgono altre attività ricreative o lavorative in prossimità della spiaggia, operatori dei settori della pesca e acquacoltura, addetti e hobbisti coinvolti nella pulizia di acquari e personale di laboratorio coinvolto nella coltivazione delle microalghe e/o nell'analisi di matrici contaminate (esposizione inalatoria, cutanea e/o oculare alle tossine). Di seguito sarà brevemente descritto il profilo tossicologico del gruppo delle PLTX (comprendente sia la palitossina che i composti PLTX-simili) relativamente alle tre vie di esposizione, tutte rilevanti per l'uso ricreativo delle acque e per l'attività di balneazione.

A5.2. Effetti avversi associati a esposizione orale

A5.2.1. Casi registrati nell'uomo

Casi di intossicazioni umane accertate, anche letali, si sono verificati in zone tropicali e subtropicali, in seguito al consumo di pesci e crostacei contaminati (Noguchi *et al.*, 1987; Alcalá *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2002). La sintomatologia è inizialmente caratterizzata da disturbi gastrointestinali, tra cui nausea, vomito e diarrea (Alcalá *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999), spesso seguiti da mialgia, spasmi muscolari, problemi respiratori e aritmia, accompagnati da un aumento dei livelli sierici di creatin fosfochinasi (CPK), quale indice di un danno muscolare (Noguchi *et al.*, 1987; Taniyama *et al.*, 2002). In alcuni casi letali, si erano manifestati anche convulsioni e delirio (Alcalá *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999).

Altri episodi di intossicazione sono stati attribuiti alle PLTX solo in base alla sintomatologia e/o alle specie di organismi marini consumati, senza una conferma sperimentale del coinvolgimento delle PLTX mediante l'analisi della presenza della tossina nei residui dei prodotti alimentari consumati (Alcalá & Halstead, 1970; Gonzales & Alcalá, 1977; Tan & Lee, 1988; Ichida *et al.*, 1988; Kodama *et al.*, 1989; Tabata *et al.*, 1989; Fusetani *et al.*, 1985; Okano *et al.*, 1998; Yoshimine *et al.*, 2001; Mahmud *et al.*, 2000; Taniyama *et al.*, 2001, 2003). Maggiori dettagli sono riportati nel capitolo A6.

A5.2.2. Dati tossicologici

Nonostante i molti *case report* (Tubaro *et al.*, 2011a) relativi a intossicazioni umane dopo esposizione a sostanze PLTX-simili, la mancanza o la scarsa affidabilità nella quantificazione dei livelli di esposizione non ha permesso di definire una dose (o un intervallo di dosi) senza effetto per l'uomo. Quindi per caratterizzare il rischio tossicologico ascrivibile alla PLTX, e ai suoi analoghi, sono stati condotti studi *in vivo* di tossicità acuta e a breve termine su modelli animali e studi *in vitro* per evidenziare il meccanismo di azione.

Vari studi di tossicità acuta sono stati eseguiti negli anni '70 del secolo scorso, utilizzando un'ampia varietà di specie animali per esposizione orale e parenterale. Purtroppo, alcuni studi sono stati condotti prima della completa delucidazione strutturale della PLTX, con estratti (semi)purificati di *Palythoa*, in cui alla PLTX veniva assegnato un peso molecolare di 3300 Da, mentre il suo reale peso molecolare è 2680 Da. La procedura di estrazione non era inoltre tale da assicurare un livello costante di tossina, dal momento che lotti differenti di estratto davano risultati diversi (Deeds & Schwartz, 2010). Pertanto, questi dati devono essere considerati con cautela dal punto di vista tossicologico.

In generale, i dati suggeriscono che la PLTX è molto più potente in seguito a somministrazione parenterale rispetto a quella orale: i valori di DL_{50} (dose letale per il 50% degli animali trattati) sono risultati da 10 a circa 10^4 volte più bassi a seconda della via (intravenosa, intraperitoneale, sottocutanea) e della specie animale rispetto all'esposizione orale. Ciò suggerisce una minore biodisponibilità della tossina a seguito di ingestione e una dipendenza marcata dalla via di esposizione. La DL_{50} dopo 24 h per la PLTX nel topo trattato per via intraperitoneale (come avviene nel Mouse Bio-Assay, MBA), utilizzato come metodo ufficiale per verificare la presenza di biotossine algali di tipo lipofilo in prodotti ittici, è stata stimata in un range da 0,295 µg/kg peso corporeo (pc) (Riobó *et al.*, 2008) a 0,72 µg/kg pc (Munday, 2006), valori circa 3 ordini di grandezza più bassi rispetto al valore ottenibile dopo somministrazione orale, come descritto di seguito, che esprime quindi una maggiore tossicità.

Gli studi che descrivono gli effetti orali della PLTX nei roditori sono in numero limitato. Il primo studio è stato eseguito da Vick e Wiles (1990) usando estratti di *P. vestitus* (con una PLTX non totalmente purificata e avente un peso molecolare di 3300 Da): non è stato riscontrato alcun effetto in ratti trattati con dosi fino a 40 µg/kg di pc. Molti anni più tardi, Munday e collaboratori, utilizzando un protocollo standardizzato e accettato a livello della *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD Test No. 425) (OECD, 2008) per la tossicità acuta, hanno stimato una DL₅₀ per la PLTX pari a 510 µg/kg pc nel topo (Munday *et al.*, 2008). La morte si registrava generalmente entro le prime 24 ore dopo la somministrazione. Questo risultato è stato confermato, ampliando il numero degli *end-point* misurati da Sosa e collaboratori (2009), che hanno calcolato una DL₅₀ pari a 767 µg/kg pc (intervallo di confidenza 95%: 549-1.039 µg/kg pc). In questo studio, animali trattati con dosi superiori a 600 µg/kg pc presentavano *scratching*, dispnea, difficoltà motorie e paralisi degli arti posteriori. Analisi ematochimiche hanno dimostrato aumenti dose-dipendenti dei livelli plasmatici di lattato deidrogenasi (LDH), creatin fosfochinasi (CPK), aspartato aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT). L'analisi istologica ha rilevato infiammazione della mucosa gastrica coerente con le proprietà irritanti della PLTX, mentre al microscopio elettronico sono state evidenziate alterazioni ultrastrutturali a livello dei mitocondri e delle strutture contrattili delle cellule muscolari scheletriche e cardiache (Sosa *et al.*, 2009). Lo studio indica un possibile NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) acuto intorno a 300 µg/kg pc. Analogamente, Ito e Yasumoto (2009) hanno descritto erosione e accumulo di liquidi nello stomaco dopo somministrazione orale di 500 µg/kg pc di PLTX; a 200 µg/kg pc (la dose più bassa somministrata) gli stessi effetti erano leggeri e transienti, ma comunque osservabili, per cui gli autori hanno identificato questa dose come il LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*).

Gli studi di tossicità acuta disponibili su analoghi della PLTX sono ancora più scarsi e finora effettuati solo su Ost-D (Ito & Yasumoto, 2009) e 42-OH-PLTX (Tubaro *et al.*, 2011b). La Ost-D ha una DL₅₀ a seguito di somministrazione intraperitoneale di 0,75 µg/kg pc (Usami *et al.*, 1995), quindi paragonabile alla PLTX per la stessa via di esposizione. Dopo somministrazione orale mostra effetti simili a quelli osservati per la PLTX, solo leggermente meno gravi a parità di dose: 2 ore dopo la somministrazione a topi della tossina alle dosi di 200 e 500 µg/kg pc sono stati osservati erosione dello stomaco dose-dipendente e danni a intestino tenue, polmoni e reni (Ito & Yasumoto, 2009). Questo fa ragionevolmente ipotizzare che PLTX e Ost-D abbiano in comune gli stessi organi bersaglio ma che gli effetti tossici di quest'ultima siano più lievi di quelli indotti dalla PLTX.

Analogamente, studi di tossicità acuta orale (gavaggio) sulla 42-OH-PLTX hanno evidenziato una sintomatologia e una DL₅₀ (650 µg/kg; intervallo di confidenza 95%: 384-1.018 µg/kg) simili a quelle riscontrate con la PLTX, come anche un aumento dei livelli ematici di LDH, CPK, AST, ALT, e ioni K⁺, che suggeriscono un effetto della tossina a livello del muscolo scheletrico e/o cardiaco (Tubaro *et al.*, 2011b).

L'identificazione del muscolo scheletrico e cardiaco come bersaglio degli effetti tossici della PLTX e dei suoi analoghi è in accordo con i *case reports* di intossicazione umana, che, nella maggioranza dei casi, descrivono una mialgia diffusa tra i sintomi distintivi. Tali effetti sembrano essere reversibili poiché negli animali sopravvissuti al trattamento non sono state osservate alterazioni a 14 giorni dalla somministrazione della tossina (Tubaro *et al.*, 2011b).

Studi di somministrazione ripetuta per tempi limitati (esposizione subacuta) meriterebbero particolare considerazione perché meglio mimano la possibile esposizione umana sia attraverso la catena alimentare che durante attività ricreative e di balneazione, assumendo una durata di qualche giorno per la presenza di una fioritura micro-algale. Sfortunatamente, tali studi sono molto rari. Somministrazioni sublinguali ripetute di PLTX (fino a 3 giorni di trattamento con

dosaggio cumulativo vero-similmente di 495 µg/kg pc) e Ost-D (fino a 5 giorni di trattamento con dosaggio cumulativo verosimilmente di 1.000 µg/kg pc) hanno causato congestione polmonare e distruzione alveolare accompagnate da ulcere allo stomaco e erosione dell'intestino. Nonostante l'incertezza della reale dose somministrata, gli effetti si sono mostrati più gravi nei topi trattati con PLTX rispetto a quelli trattati con Ost-D (Ito & Yasumoto, 2009).

Recentemente, è stato condotto uno studio di tossicità ripetuta, trattando gruppi di sei/otto topi femmine (di cui 3 utilizzati come gruppo satellite per verificare la reversibilità degli effetti) una volta al giorno per 7 giorni con quattro dosi di PLTX (3, 30, 90 o 180 µg/kg pc/die) *per os* (via *gavage*). Il trattamento ha causato effetti letali e/o tossicità a dosi ≥ 30 µg/kg pc/die a partire dal 3° giorno e in alcuni casi il decesso si è verificato durante i 14 giorni di *recovery period* in assenza di trattamento, indicando che gli effetti non sono totalmente reversibili. Alterazioni macroscopiche a livello gastrointestinale (ulcere gastriche e accumulo di fluido intestinale) sono stati osservati nei topi morti durante il periodo di trattamento. Inoltre, l'analisi istologica ha evidenziato grave infiammazione, localmente associata a necrosi, a livello polmonare, così come iper-eosinofilia e separazione delle fibre nel miocardio. Dai dati ottenuti è stato possibile calcolare un NOAEL "provvisorio" pari a 3 µg/kg pc/die (Del Favero *et al.*, 2013), indicando una relazione dose risposta piuttosto ripida. La provvisorietà del NOAEL è legata al numero di animali utilizzati per gruppo e alla elevata variabilità interindividuale notata negli animali (alcuni topi nei vari gruppi di trattamento sono sembrati resistenti all'azione della tossina). Per questo motivo i dati dovranno essere confermati per la derivazione del NOAEL, ma costituiscono una solida base di partenza per studi ulteriori e per una più accurata valutazione del rischio da somministrazioni ripetute.

A5.2.3. Meccanismo di azione della PLTX

Il target molecolare delle PLTX è la Na^+/K^+ -ATPasi, enzima coinvolto nel controllo del potenziale di membrana. L'enzima ha due siti di legame per la PLTX con affinità molto elevata ($\text{Km}_1=25$ pM e $\text{Km}_2=1,5$ nM). L'effetto primario (dovuto al legame con il sito a maggiore affinità) è l'aumento della permeabilità agli ioni, con l'enzima che si trasforma in un canale cationico aspecifico con conseguente depolarizzazione della membrana; a concentrazioni più alte (con legame al secondo sito) si può registrare inibizione dell'enzima con lo stesso effetto primario di indurre uno squilibrio ionico in vari tipi di cellule (Habermann, 1989; Wu, 2009; Rossini & Bigiani, 2011).

L'aumento di sodio intracellulare a seguito dell'alterazione della Na^+/K^+ -ATPasi provoca inoltre una cascata di eventi secondari, tra cui l'aumento del trasporto sodio-dipendente degli ioni calcio da parte degli scambiatori $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Kockskämper *et al.*, 2004; Vale *et al.*, 2006) o degli ioni H^+ con diminuzione del pH intracellulare (Monroe & Tashjan, 1996).

Anche gli effetti tossici osservati a carico delle cellule eccitabili sono ascrivibili all'interazione delle PLTX con la Na^+/K^+ -ATPasi. Ciò è supportato dagli studi *in vitro*, a livello delle cellule muscolari scheletriche di topo, in cui la PLTX induce un aumento transitorio della concentrazione intracellulare di ioni Ca^{2+} , seguito da un aumento più duraturo che sembra essere mediato da canali ionici attivati dallo stiramento meccanico (Del Favero *et al.*, 2012, 2014). A livello dei cardiomiociti, già a concentrazioni nanomolari, è stata invece evidenziata una rapida e progressiva depolarizzazione della membrana, seguita da un arresto irreversibile dei potenziali d'azione e dell'attività contrattile, sempre riconducibili ad uno squilibrio ionico, conseguente all'interazione con la Na^+/K^+ -ATPasi (Kockskämper *et al.*, 2004; Del Favero *et al.*, 2012).

La vasocostrizione potrebbe essere una delle cause di morte, come end-point apicale della cascata di eventi scatenata dallo squilibrio dell'omeostasi ionica, registrate nel modello animale (Wiles *et al.*, 1974; Vick & Wiles, 1990; Ito *et al.*, 1982; Habermann, 1989; Tosteson, 2000).

A5.2.4. Valutazioni fatte da organismi internazionali

Nel 2004 la *Food and Agriculture Organization* (FAO) delle Nazioni Unite a Roma ha pubblicato un documento dedicato alle biotossine marine (FAO, 2004) nel quale sono stati revisionati i dati tossicologici relativi a diverse tossine, con l'intento di derivare una *Acute Reference Dose* (ARfD) o dose acuta di riferimento, utilizzata per stabilire valori limite di ingestione della sostanza che non causino effetti apprezzabili alla salute di un consumatore di prodotti potenzialmente contaminati in 24 ore o comunque in tempi ravvicinati (FAO, 2004). Come è riportato nella Tabella A5.1, all'epoca non fu possibile definire una ARfD per la PLTX a causa della limitatezza del database.

Tabella A5.1. Valori usati dalla FAO per derivare la dose acuta di riferimento (ARfD) di alcune tossine algali e tenori massimi delle tossine attualmente regolamentate

Tossine	LOAEL ⁽¹⁾ NOAEL ⁽²⁾ (µg/kg pc)	Fattore sicurezza	ARfD "provvisoria" µg/kg (dose adulto)*	Tenore massimo in base al consumo di polpa di molluschi (mg/kg PM)			Tenore massimo** (mg/kg PM) UE
				100 g	250 g	380 g	
Azspiracidi	0,4 ⁽¹⁾	10 (U)	0,04 (2,4 µg)	0,024	0,0096	0,0063	0,16
Brevetossine	ND	ND	ND		ND		ND
Immine cicliche	ND	ND	ND		ND		ND
Acido domoico	1000 ⁽¹⁾	10 (U)	100 (6000 µg)	60	24	16	20
Acido okadaico	1 ⁽¹⁾	3 (U)	0,33 (20 µg) ¹	0,2	0,08	0,05	0,16
Pectenotossine	ND	ND	ND		ND		0,16
Saxitossine	2 ⁽¹⁾	3 (U)	0,7 (42 µg)	0,42	0,17	0,11	0,8
Yessotossine	5000 ⁽²⁾	100 (A)	50 µg/kg (3000 µg)	30	12	8	1

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

U: dati umani; **A:** dati animali; **pc:** peso corporeo; **PM:** peso polpa di molluschi; **UE:** Unione Europea; **ND:** non disponibile.

* Persona con 60 kg di peso corporeo;

** Livelli massimi di tossine marine nei molluschi bivalvi come stabilito sul territorio (Europa, 2004).

Anche la *European Food Safety Authority* (EFSA) ha considerato i possibili effetti avversi associati al consumo di cibi contaminati da biotossine marine identificando un limite di contaminazione per salvaguardare i consumatori (Tabella A5.2). Il panel *Contaminants in the Food Chain* (CONTAM) ha adottato una *opinion* nel 2009 (EFSA, 2009) su PLTX e suoi analoghi, nella quale ha concluso che i dati sull'uomo non sono sufficienti a definire quantitativamente un livello senza effetto a seguito di esposizione orale: il parere è stato quindi basato sui dati sperimentali su modelli animali disponibili al 2009.

Il valore di ARfD è stato quindi derivato prendendo come punto di partenza (PoD, *Point of Departure*) il LOAEL di circa 200 µg/kg pc, la dose più bassa testata nello studio di tossicità acuta per somministrazione orale (Ito & Yasumoto, 2009), alla quale erano visibili effetti avversi. Non era stato quindi possibile identificare un NOAEL.

Tabella A5.2. Tenori massimi delle tossine attualmente regolamentate, dose acuta di riferimento definita dall'EFSA e corrispondente concentrazione nei molluschi

Tossine	Tenore massimo* (mg/kg PM) UE	ARfD	Dose corrispondente per un adulto di 60 kg	Tenore massimo nei molluschi per non superare la ARfD, consumando 400 g PM
Azaspiracidi	0,16	0,2 µg AZA1 eq/kg pc	12 µg AZA1 eq/persona	30 µg AZA1 eq/kg PM
Acido domoico	20	30 µg AD ^(a) /kg pc	1,8 mg AD ^(a) /persona	4,5 mg AD ^(a) /kg PM
Acido okadaico	0,16	0,3 µg AO eq/kg pc	18 µg AO eq/persona	45 µg AO eq/kg PM
Pectenotossine	0,16	0,8 µg PTX2 eq/kg pc	48 µg PTX2 eq/persona	120 µg PTX2 eq/kg PM
Saxitossine	0,8	0,5 µg STX eq/kg pc	30 µg STX eq/persona	75 µg STX eq/kg PM
Yessotossine	1	25 µg YTX eq/kg pc	1,5 mg YTX eq/persona	3,75 mg YTX eq/kg PM
Palitossine	NR	0,2 µg PLTX ^(b) /kg pc	12 µg PLTX ^(b) /kg pc	30 µg PLTX ^(b) /kg PM

AZA1: azaspiracido 1; **AD:** acido domoico; **AO:** acido okadaico; **PTX2:** pectenotossina2; **STX:** saxitossina; **YTX:** yessotossina; **PM:** polpa di molluschi; **eq:** equivalenti; **pc:** peso corporeo; **NR:** non regolamentata.

^(a) somma di acido domoico e acido epi-domoico; ^(b) somma di palitossina e ostreocina-D;

* Livelli massimi di tossine marine nei molluschi bivalvi come stabilito sul territorio (Europa, 2004).

D'altra parte fino a quel momento non erano state saggiate dosi più basse, e nello stesso studio gli autori hanno utilizzato dosi minori per trattamenti ripetuti a tre giorni per via sublinguale.

Proprio per l'insolita via di somministrazione (che potrebbe includere anche un trasporto attraverso la mucosa buccale) e per l'uso di un LOAEL come *Point of Departure* (PoD), il Panel CONTAM ha applicato un aggiuntivo fattore di incertezza di 10 al valore di default di 100 (per tener conto delle differenze inter e intra-specifiche), ottenendo una ARfD orale di 0,2 µg/kg pc, applicabile alla somma di PLTX e Ost-D.

Su questa base, la concentrazione massima di PLTX e suoi analoghi in prodotti ittici non può superare i 30 µg/kg di parte edibile, per un adulto di 60kg di peso che consumi una porzione da 400g, considerata una stima adeguata per proteggere i forti consumatori in Europa dai rischi acuti associati ad esposizione a biotossine marine (EFSA, 2010).

Ovviamente la ARfD non può essere applicata a vie di esposizione diverse da quella orale, data la dipendenza della tossicità dalla via di esposizione e l'assenza di dati cinetici di biodisponibilità, che permettano una estrapolazione, sulla base di una dose interna.

I nuovi dati disponibili relativi a un NOAEL orale, per quanto provvisorio, relativo a somministrazioni ripetute per tempi limitati (7 giorni) potrebbero costituire una base per rivedere i valori di riferimento a seguito di scenari di esposizione diversi da quello acuto.

A5.3. Effetti avversi associati a esposizione inalatoria

A5.3.1. Casi registrati nell'uomo

Episodi di esposizione per via inalatoria ad aerosol marino in presenza di proliferazioni di *O. cf. ovata* sono stati riportati più volte lungo le coste del Mediterraneo, sia in Italia sia in altri Paesi. Tali esposizioni sono state associate a fenomeni d'irritazione a carico delle vie aeree, delle mucose oculari e della cute, oltre che a effetti sistemici quali febbre oltre i 38°C, neutrofilia, e nausea e vomito. Il caso più rilevante si è verificato nell'estate del 2005 sulle coste liguri nell'area di Genova (Durando *et al.*, 2007). Effetti analoghi, spesso accompagnati da aumentati livelli ematici di CPK, sono stati evidenziati anche in seguito all'inalazione di vapori liberati dagli acquari contenenti coralli del genere *Palythoa* (Sud *et al.*, 2013, Wieringa *et al.* 2014). Maggiori dettagli sono riportati nel capitolo A6.

A5.3.2. Dati tossicologici

Benché nelle zone a clima temperato i maggiori problemi finora riscontrati sembrano essere attribuiti agli effetti dovuti all'esposizione inalatoria di composti PLTX-simili, ad oggi non esistono dati sperimentali relativi agli effetti della PLTX sull'apparato respiratorio a seguito di esposizione per via inalatoria. Anche se non completamente rappresentativo di tale via di esposizione, ma considerabile come un 'caso peggiore', in uno studio nel topo la PLTX (1-10 µg/kg pc) o la Ost-D (1-13 µg/kg) sono state somministrate per instillazione intra-tracheale. Gli effetti osservati entro due ore dalla somministrazione sono: emorragie estese a livello alveolare ed edema polmonare, tossicità gastro-intestinale e atrofia dei glomeruli renali con letalità a dosi apparenti di 2 µg di PLTX/kg pc. Gli stessi sintomi erano presenti anche alla dose sub-letale di 1 µg/kg. Nel caso della Ost-D analoga sintomatologia era descritta a 11 µg di Ost-D/kg pc (Ito & Yasumoto, 2009).

Dati disponibili sul ratto in uno studio che utilizzava PLTX semipurificata (PM 3300 Da) indicano una DL₅₀ di 0,36 µg/kg pc per istillazione intra-tracheale (Wiles *et al.*, 1974), mentre uno studio più recente indica dati di circa 10 volte più elevati: 5-7,5 µg/kg pc (Ito & Yasumoto, 2009). Nello stesso studio è riportato che alla dose sub-letale di 1 µg/kg pc gli effetti patologici osservati sono simili a quelli osservati nel topo a parità di dose.

Uno studio *in vitro* su cellule epiteliali bronchiali umane, sia tumorali che non tumorali, ha invece evidenziato che la PLTX è in grado di esercitare un effetto citotossico, nei confronti di cellule tumorali e non. Poiché l'effetto della tossina è stato evidenziato anche nei confronti di una linea di cellule bronchiali resistenti all'ouabaina, noto inibitore della Na⁺/K⁺-ATPasi a cui si lega la PLTX, è stato ipotizzato che il sito di legame della PLTX alla pompa di membrana sia diverso da quello dell'ouabaina (Bonnard *et al.*, 1988).

Per quanto riguarda i casi umani, una relazione causa-effetto tra lo stato di malessere e la presenza di PLTX o analoghi dovuta a fioriture di *Ostreopsis* non è stata definitivamente stabilita, ed è emerso da tutti i casi segnalati che il numero di cellule presenti nel corpo idrico non è di per sé diagnostico di un possibile 'outbreak'. Cionondimeno il ripetersi di episodi con sintomatologia paragonabile lungo le coste Europee e la similitudine con quanto registrato nel Golfo del Messico a seguito di fioriture di *Karenia brevis* (produttrice di brevetossine) (Pierce *et al.*, 2005; Kirkpatrick *et al.*, 2010) stabilisce un nesso tra i due fenomeni. Importanti ritrovamenti a supporto di un possibile nesso causale tra fioriture ed effetti avversi sono la identificazione nell'aerosol marino di cellule tossiche di *O. cf. ovata* lungo la costa catalana (Casabianca *et al.*, 2013) (e non solo di detriti cellulari che potrebbero aver causato irritazione

alle prime vie respiratorie per attrito meccanico) e la determinazione quantitativa di composti PLTX-simili lungo le coste italiane (Ciminiello *et al.*, 2014). In conclusione, sebbene ci siano evidenze di una potenziale tossicità inalatoria della PLTX e dei suoi analoghi, al momento non è possibile fornire alcuna conclusione relativamente alla valutazione quantitativa di rischio per la popolazione esposta per assenza di dati.

A5.4. Effetti avversi associati a esposizione cutanea e/o oculare

A5.4.1. Casi registrati nell'uomo

Sono disponibili casi aneddotici (*case report*) in letteratura scientifica, relativi ad effetti irritativi e infiammatori a carico delle mucose oculari e della cute a seguito del contatto con acqua marina contenente cellule di *O. ovata* o con acqua di acquari contenente coralli del genere *Palythoa* o *Zoanthus*, ma anche per contatto diretto con i coralli stessi (Deeds & Schwartz, 2010; Tubaro *et al.*, 2011a). In questi ultimi casi sono stati diagnosticati anche effetti sistemici, tra cui mialgia, un sintomo specifico della attività delle PLTX.

La comparsa di lacrimazione e dermatite è stata segnalata anche a seguito di attività di balneazione ed esposizione ad aerosol marino in concomitanza di proliferazioni di *O. cf. ovata* (Gallitelli *et al.*, 2005; Durando *et al.*, 2007; Barroso García *et al.*, 2008; Kermarec *et al.*, 2008; Tichadou *et al.*, 2010). Maggiori dettagli sono riportati nel capitolo A6.

A5.4.2. Dati tossicologici

Uno studio sul topo ha evidenziato l'azione irritante della PLTX a livello cutaneo, con una ID₅₀ (dose che induce eritema nel 50% degli animali, dopo 24 ore) pari a 0,02 µg/padiglione auricolare (Fujiki *et al.*, 1986). Considerando il meccanismo alla base dell'azione pro-infiammatoria a livello cutaneo, è stato osservato che la PLTX è in grado di stimolare il metabolismo dell'acido arachidonico in cellule epidermiche di topo, inducendo rilascio di prostaglandina E₂ (Aizu *et al.*, 1990). Questi risultati hanno indotto ad ipotizzare che la tossina potesse essere un promotore tumorale, per la correlazione tra il metabolismo dell'acido arachidonico e la promozione tumorale. È stato perciò promosso uno studio sul *signalling* intracellulare coinvolto in questo fenomeno che, in cellule epidermiche, avviene principalmente attraverso l'attivazione della cascata delle MAP-chinasi (Wattenberg, 2007). La PLTX, infatti, è stata definita un promotore tumorale con un meccanismo diverso da quello del 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) poiché, diversamente da quest'ultimo, non attiva la proteina chinasi C (PKC) e non determina un aumento dell'ornitina decarbossilasi (ODC) (Fujiki *et al.*, 1986).

Al fine di caratterizzare gli effetti della PLTX a livello cutaneo, solo recentemente sono stati condotti studi *in vitro* impiegando cheratinociti cutanei umani spontaneamente immortalizzati (cellule HaCaT). È stato dimostrato che la tossina è in grado di legarsi alle cellule dopo brevissimi tempi di esposizione (10 min) con una costante di affinità pari a 3×10^{-10} M (Pelin *et al.*, 2013a). A questa elevata affinità di legame consegue una elevata citotossicità, mediata principalmente dall'ingente accumulo di Na⁺ nel citosol, dovuto all'interazione della tossina con il suo principale bersaglio molecolare, ossia la Na⁺/K⁺-ATPasi di membrana. È stato, infatti, osservato che la PLTX è in grado di ridurre l'attività mitocondriale, la vitalità cellulare e l'integrità della membrana plasmatica, con valori di EC₅₀ (*Effective Concentration*:

concentrazione in grado di ridurre tali parametri del 50%) nell'ordine del pico/nanomolare (6×10^{-11} M, 5×10^{-10} M e 2×10^{-8} M, rispettivamente). Sulla base di questi valori è stato ipotizzato un danno mitocondriale quale primo evento conseguente all'interazione della PLTX con la Na^+/K^+ -ATPasi, che a sua volta condurrebbe ad uno stress ossidativo (Pelin *et al.*, 2011). Infatti, l'aumento intracellulare di ioni Na^+ determina anche un aumento di ioni H^+ con alterazione del pH. Tale evento determina un accumulo di anione superossido attraverso l'inversione della catena di trasporto di elettroni mitocondriale (Pelin *et al.*, 2013b). È interessante sottolineare che i danni mitocondriali e la relativa cascata di eventi intracellulari dimostrati nelle cellule HaCaT si sono verificati a concentrazioni di tossina inferiori a quelle riscontrate nei mezzi di coltura di *Ostreopsis*. Infatti, le concentrazioni di PLTX liberate da colture di *O. cf. ovata* ($6,13 \times 10^{-6}$ g/L di PLTX e $6,12 \times 10^{-5}$ g/L di ova-a) sono uno-due ordini di grandezza superiori al valore di EC_{50} che riduce l'attività mitocondriale (6×10^{-11} M, pari a $1,63 \times 10^{-7}$ g/L) (Pelin *et al.*, 2011).

A livello di macrofagi umani, inoltre, è stato evidenziato che la PLTX e un estratto di *O. cf. ovata* sono in grado di stimolare la trascrizione di geni che codificano per alcune proteine pro-infiammatorie, quali la cicloossigenasi-2, il fattore di necrosi tumorale- α e l'interleuchina-8 (Crinelli *et al.*, 2012). Pertanto, è possibile una correlazione tra gli effetti osservati *in vitro* e i problemi dermatologici rilevati durante le proliferazioni di *O. cf. ovata* nell'area mediterranea.

A5.5. Conclusioni

In accordo con quanto concluso dall'EFSA, i dati disponibili sulla specie umana non sono sufficienti a definire quantitativamente un valore di contaminazione che corrisponda ad una 'dose senza effetto' a seguito di esposizione attraverso le tre vie sopra descritte: il parere è stato quindi basato sui dati sperimentali ottenuti in modelli animali. D'altro canto il profilo tossicologico del gruppo delle PLTX mostra ancora molti livelli di incertezza, per tutte e tre le vie di esposizione (orale, cutanea e inalatoria) rilevanti per l'uso ricreativo delle acque e per l'attività di balneazione. Infatti nonostante il meccanismo di azione e il bersaglio molecolare della PLTX siano relativamente ben definiti, e compatibili a spiegare la comparsa e l'evoluzione dei sintomi nei casi di intossicazione umana, non è chiaro se il quadro sia, del tutto o solo in parte, condiviso dai composti PLTX-simili, sui quali le informazioni tossicologiche sono molto scarse o nulle. È da sottolineare che nulla si sa sul profilo tossicologico delle ovatossine, principali tossine del gruppo presenti nel bacino del Mediterraneo, per cui vengono generalmente trattate come PLTX-equivalenti. La maggior parte degli studi sugli animali sono indirizzati (con poche eccezioni) alla identificazione di effetti acuti, generalmente letali, non molto utili alla definizione di livelli senza effetto. Inoltre le somministrazioni si limitano alla via orale e alle vie parenterali: in totale assenza di informazioni sulla tossicocinetica e biodisponibilità della PLTX e dei suoi analoghi è impensabile poter procedere ad estrapolazioni tra vie di esposizioni diverse per derivare valori di riferimento a seguito di contatto e/o inalazione. La caratterizzazione tossicologica del gruppo delle PLTX è uno dei principali settori in cui si identificano le carenze conoscitive e necessita pertanto di un considerevole sviluppo di nuovi studi *in vitro* e *in vivo*, atti alla valutazione dei rischi per la salute attraverso la definizione di valori di riferimento. Nonostante le incertezze legate alla scarsa disponibilità di dati tossicologici l'EFSA ha comunque derivato una ARfD orale di $0,2 \mu\text{g}/\text{kg pc}$.

Bibliografia

- Aizu E, Yamamoto S, Nakadate T, Kato R. Differential effects of various skin tumor-promoting agents on prostaglandin E₂ release from primary cultures of mouse epidermal cells. *Eur J Pharmacol* 1990;182:19-28.
- Alcala AC, Halstead BW. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania* sp. in the Philippines. *J Toxicol Clin Toxicol* 1970;3:609-11.
- Alcala CC, Alcala LC, Garth JS, Yasumura D, Yasumoto T. Human fatality due to the ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 1988;26:105-7.
- Barroso García P, Rueda de la Puerta P, Parrón Carreño T, Marín Martínez P, Guillén Enríquez J. Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas. *Gac Sanit* 2008;22:578-84.
- Brescianini C, Grillo C, Melchiorre N, Bertolotto R, Ferrari A, Vivaldi B, Icardi G, Gramaccioni L, Funari E, Scardala S. *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Euro Surveill* 2006;11(36):3040.
- Casabianca S, Casabianca A, Riobò P, Franco JM, Vila M, Penna A. Quantification of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR assay in marine aerosol. *Environ Sci Technol* 2013;47:3788-95.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pezzolesi L, Pistocchi R, Vanucci S. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *J Am Chem Soc* 2012;134:1869-75.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Yasumoto T, Battocchi C, Giacobbe M, Amorim A, Penna A. Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Harmful Algae* 2013;23:19–27.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C, Casabianca S, Penna A. First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols. *Environ Sci Technol* 2014;48:3532-40.
- Crinelli R, Carloni E, Giacomini E, Penna A, Dominici S, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Magnani M. Palytoxin and an *Ostreopsis* toxin extract increase the levels of mRNAs encoding inflammation-related proteins in human macrophages via p38 MAPK and NF- κ B. *PlosOne* 2012;7: e38139.
- Deeds JD, Schwartz M. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* 2010;56:150-62.
- Del Favero G, Florio C, Codan B, Sosa S, Poli M, Sbaizero O, Molgó J, Tubaro A, Lorenzon P. The stretch activated channel blocker Gd³⁺ reduces palytoxin toxicity in primary cultures of skeletal muscle cells. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1912-20.
- Del Favero G, Beltramo D, Sciancalepore M, Lorenzon P, Coslovich T, Poli M, Testai E, Sosa S, Tubaro A. Toxicity of palytoxin after repeated oral exposure in mice and *in vitro* effects on cardiomyocytes. *Toxicon* 2013;75:3-15.
- Del Favero G, Sosa S, Poli M, Tubaro A, Sbaizero O, Lorenzon P. *In vivo* and *in vitro* effects of 42-hydroxy-palytoxin on mouse skeletal muscle: structural and functional impairment. *Toxicol Lett* 2014;225:285-93.
- Durando P, Ansaldi F, Oreste P, Moscatelli P, Marensi L, Grillo C, Gasparini R, Icardi G. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005-2006, in northwest Italy. *Euro Surveill* 2007;12(23).
- EFSA. Marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 2009;7(12):1393:1-38.

- EFSA. Guidance document: Standard sample description for food and feed. *EFSA J* 2010;8(1):1457.
- Europa. Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* n. L 139/55, del 30 aprile 2004.
- FAO. *Marine biotoxins*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. (FAO Food And Nutrition Paper 80). Disponibile all'indirizzo: <http://Www.Fao.Org/Docrep/007/Y5486e/Y5486e00.HTM>; ultima consultazione 6/11/14.
- Fujiki H, Suganuma M, Nakayasu M, Hakii H, Horiuchi T, Takayama S, Sugimura T. Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1986;7:707-10.
- Fusetani N, Sato S, Hashimoto K. Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish (*Ypsiscarus ovifrons*) which is probably responsible for parrotfish liver poisoning. *Toxicon* 1985;23:105-12.
- Gabrielson EW, Kuppusamy P, Povey AC, Zweier JL, Harris CC. Measurement of neutrophil activation and epidermal cell toxicity by palytoxin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 1992;13:1671-4.
- Gallitelli M, Ungaro N, Addante LM, Procacci V, Gentiloni N, Sabbà C. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA* 2005;293:2599-600.
- Gonzales RB, Alcalá AC. Fatalities from crab poisoning on Negros Island, Philippines. *Toxicon* 1977;15:169-70.
- Habermann E. Palytoxin acts through Na^+, K^+ -ATPase. *Toxicon* 1989;27:1175-87.
- Hoffmann K, Hermanns-Clausen M, Buhl C, Buchler MW, Schemmer P, Mebs D, Kauferstein S. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through skin injury. *Toxicon* 2008;51:1535-7.
- Honsell G, De Bortoli M, Boscolo S, Dell'Aversano C, Battocchi C, Fontanive G, et al. Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environ Sci Technol* 2011;45:7051-9.
- Ichida S, Tawada E, Watanebe Y, Minami S, Horiba M. Two cases of rhabdomyolysis induced by parrotfish liver poisoning. *Kidney & Dialysis (Japan)* 1988;25:541-4.
- Ito E, Yasumoto T. Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon* 2009;54:244-51.
- Kermarec F, Dor F, Armengaud A, Charlet F, Kantin R, Sauzade D, de Haro L. Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Env Risques Santé* 2008;7:357-63.
- Kirkpatrick B, Pierce R, Cheng YS, Henry MS, Blum P, Osborn S, Nierenberg K, Pederson BA, Fleming LE, Reich A, Naar J, Kirkpatrick G, Backer LC, Baden D. Inland transport of aerosolized Florida red tide toxins. *Harmful Algae* 2010;9:186-9.
- Kockskämper J, Ahmmed GU, Zima AV, Sheehan KA, Glitsch HG, Blatter LA. Palytoxin disrupts excitation-contraction coupling through interactions with P-type ion pumps. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:527-38.
- Kodama AM, Hokama Y, Yasumoto T, Fukui M, Manea SJ, Sutherland N. Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (mackerel). *Toxicon* 1989;27:1051-3.
- Mahmud Y, Arakawa O, Noguchi T. An epidemic survey on the freshwater puffer poisoning in Bangladesh. *J Nat Toxins* 2000;9:319-26.
- Mangialajo L, Bertolotto R, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M, Grillo C, Lemee R, Melchiorre N, Moretto P, Povero P, Ruggirei N. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Mar Pollut Bull* 2008;56:1209-14.

- Monti M, Minocci M, Beran A, Ivesa L. First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull* 2007;54:598–601.
- Munday R. Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: a review. *Afr J Mar Sci* 2006;28:447-9.
- Munday R. Occurrence and toxicology of palytoxin. In: Botana LM (Ed.). *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 693–713.
- Noguchi T, Hwang D-F, Arakawa O, Daigo K, Sato S, Ozaki H, Kawai N, Ito M, Hashimoto K. Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK (Ed.). *Progress in Venom and Toxin Research: Proceedings of the first Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*. Singapore: Faculty of Medicine, National University of Singapore; 1987. p. 325-35.
- OECD. *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects*. Paris: OECD Publishing; 2008. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en; ultima consultazione 13/11/14.
- Okano H, Masuoka H, Kamei S, Seko T, Koyabu S, Tsuneoka K, Tamai T, Ueda K, Nakazawa S, Sugawa M, Suzuki H, Watanabe M, Yatani R, Nakano T. Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Int Med* 1998;37:330-3.
- Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumoto T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 1999;37:55-65.
- Pelin M, Zanette C, De Bortoli M, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Florio C. Effects of the marine toxin palytoxin on human skin keratinocytes: role of ionic imbalance. *Toxicology* 2011;282:30-8.
- Pelin M, Boscolo S, Poli M, Sosa S, Tubaro A, Florio C. Characterization of palytoxin binding to HaCaT cells using a monoclonal anti-palytoxin antibody. *Mar Drugs* 2013a;11:584-98.
- Pelin M, Ponti C, Sosa S, Gibellini D, Florio C, Tubaro A. Oxidative stress induced by palytoxin in human keratinocytes is mediated by a H^+ -dependent mitochondrial pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013b;266:1-8.
- Pierce RH, Henry MS, Blum PC, Hamel SL, Kirkpatrick B, Cheng YS, Zhou Y, Irvin CM, Naar J, Weidner A, Fleming LE, Backer LC, Baden DG. Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins. *Harmful Algae* 2005;4:965–72.
- Riobó P, Paz B, Franco JM, Vazquez JA, Murado MA, Cacho E. Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2639-47.
- Rossini GP, Bigiani A. Palytoxin action on the Na^+, K^+ -ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. *Toxicon* 2011;57:429-39.
- Sosa S, Del Favero G, De Bortoli M, Vita F, Soranzo MR, Beltramo D, Ardizzone M, Tubaro A. Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicol Lett* 2009;191:253–9.
- Sud P, Su MK, Greller HA, Majlesi N, Gupta A. Case series: inhaled coral vapor – toxicity in a tank. *J Med Toxicol* 2013;9:282-6.
- Tabata H, Nanjo K, Kokuoka H, Machida K, Miyamura K. Two cases of fish poisoning caused by ingesting parrot fish. *Int Med* 1989;64:974-7.
- Tan CTT, Lee EJD. A fatal case of crab toxin (*Lophozozimus pictor*) poisoning. *Asia Pacific J Pharmacol* 1988;3:7-9.
- Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 2001;39:725-7.

- Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguki T. Occurrence of a food poisoning incident by PLTX from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J Nat Toxins* 2002;11:277-82.
- Taniyama S, Arakawa O, Terada M, Nishio S, Takatani T, Mahmud Y, Noguchi T. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 2003;42:29-33.
- Taylor FJR. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate Blooms*. New York: Elsevier; 1979. p. 71-6.
- Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grossel H, Lemée R, Kantin R, Lasalle JL, Drouet G, Rambaud L, Malfait P, de Haro L. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol. (Phila)* 2010;48:839-44.
- Tognetto L, Bellato S, Moro I, Andreoli C. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Bot Mar* 1995;38:291-5.
- Tubaro A, Durando P, Del Favero G, Ansaldi F, Icardi G, Deeds JR, Sosa, S. Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 2011a;57:478-95.
- Tubaro A, Del Favero G, Beltramo D, Ardizzone M, Forino M, De Bortoli M, Pelin M, Poli M, Bignami G, Ciminiello P, Sosa S. Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-Hydroxy-palytoxin. *Toxicon* 2011b;57:755-63.
- Ungaro N, Pastorelli AM, Blonda M, Assennato G. Il monitoraggio di sorveglianza delle fioriture di *Ostreopsis ovata* nei mari pugliesi; approccio metodologico e risultati nella stagione estiva 2007. *Biol Mar Mediterr* 2008;15:62-4.
- Usami M, Satake M, Ishida S. Palytoxin analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J Am Chem Soc* 1995;117:5389-90.
- Vick JA, Wiles JS. Pharmacological and toxicological studies of palytoxin. In: Hall S, Strichartz G (Ed.). *Marine Toxins, Origin, Structure and Molecular Pharmacology*. Washington DC: American Chemical Society; 1990. p. 241-54.
- Wiles JS, Vick JA, Christensen MK. Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon* 1974;12:427-33.
- Wieringa A, Bertholee D, Ter Horst P, van den Brand I, Haringman J, Ciminiello P. Respiratory impairment in four patients associated with exposure to palytoxin containing coral. *Clin Toxicol* 2014;52:150-1.
- Wattenberg EV. Palytoxin: exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C24-32.
- Wu CH. Palytoxin: membrane mechanism of action. *Toxicon* 2009;54:1183-9.
- Yoshimine K, Orita S, Okada S, Sonoda K, Kubota K, Yonezawa T. Two cases of parrotfish poisoning with rhabdomyolysis. *J Jap Soc Int Med* 2001;90:1339-41.

A6. EFFETTI OSSERVATI SULLA SALUTE UMANA

Marco Baldini (a), Paolo Durando (b), Silvio Sosa (c), Emanuela Testai (d)*, Aurelia Tubaro (c)
 (a) Osservatorio Epidemiologico Ambientale, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Ancona
 (b) Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova, Genova
 (c) Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Trieste
 (d) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
 *emanuela.testai@iss.it

A6.1. Introduzione

Sono stati riportati in letteratura una serie di *case report* e di casi aneddotici che descrivono effetti avversi sulla salute umana attribuiti al gruppo delle palitossine (PLTX) e/o ad alcuni analoghi strutturali, a seguito di esposizioni attraverso varie vie (Tubaro *et al.*, 2011). I segni e sintomi registrati indicano l'insorgenza di effetti locali al sito di contatto, generalmente riconducibili a reazioni di carattere irritativo e infiammatorio, ai quali in alcuni casi si aggiunge una sintomatologia sistemica.

Gli scenari espositivi più rilevanti associati ad attività ricreative prevedono un contatto diretto durante la balneazione, attraverso la cute e le mucose, con le tossine disciolte in acqua e/o con le specie algali produttrici. Alcune segnalazioni di effetti avversi su addetti e hobbisti coinvolti nella pulizia di acquari e il ritrovamento di livelli non trascurabili di PLTX in coralli da acquario (Deeds *et al.*, 2011) indicano che anche tali categorie sono da considerarsi a rischio. L'altro scenario da considerare prevede l'inalazione di aerosol di acqua marina durante fioriture di *Ostreopsis* spp., prodotto a seguito di movimenti forzati dell'acqua marina per specifiche attività (es. nel caso di attività sportive in acque contaminate) e/o in concomitanza di condizioni meteorologiche favorevoli (es. vento forte e mareggiate). Quest'ultima via di esposizione coinvolge quindi non solo i 'bagnanti' propriamente detti ma anche soggetti che sostano in prossimità della spiaggia e/o sul lungomare (Durando *et al.*, 2007; Deeds & Schartz, 2010; Tichadou *et al.*, 2010; Tubaro *et al.*, 2011).

A queste vie di esposizione si aggiunge quella orale, associata sia all'ingestione involontaria di acqua durante attività ricreative (es. durante il nuoto) che al consumo di prodotti ittici contaminati. Le PLTX possono, infatti, accumularsi nei molluschi marini eduli, nei crostacei e nei pesci: sindromi di avvelenamento talvolta letali, note col nome di clupeotossismo, sono state descritte in regioni tropicali anche se spesso l'identificazione della tossina è risultata incompleta o mancante e, in questi casi, l'attribuzione dell'avvelenamento all'ingestione di PLTX (relazione causa-effetto) è stata fatta sulla base del quadro clinico, dell'anamnesi e dell'ingestione di alimenti di origine marina (Tubaro *et al.*, 2011).

Nonostante alcuni prodotti ittici, quali sardine, acciughe e granchi, parte integrante della dieta mediterranea, possano accumulare PLTX in alte concentrazioni e rappresentino quindi l'anello della catena alimentare attraverso cui l'uomo è potenzialmente esposto, finora non sono stati riportati nel bacino del Mediterraneo effetti associati all'ingestione di prodotti ittici contaminati dalle tossine prodotte da *Ostreopsis* cf. *ovata*.

Considerando le possibili vie di esposizione, i soggetti a maggior rischio di sviluppare una sintomatologia clinica sono i nuotatori che entrano in contatto diretto sia con le cellule di *Ostreopsis* adese a macroalghe (cellule epifite) o rilasciate in acqua (cellule planctoniche), che

con la tossina disciolta. Anche la pratica dello snorkeling o delle immersioni subacquee, e l'uso di boccagli o regolatori, potrebbe promuovere la formazione di aerosol contaminato da alghe unicellulari in grado di essere inalato in profondità nelle vie aeree. Questo meccanismo potrebbe spiegare perché alcuni subacquei possano presentare manifestazioni sia a livello sistemico che locale. Analogamente, sintomi respiratori, oltre che cutanei, sono stati descritti anche in frequentatori di spiagge per esposizione a spruzzi di acqua di mare.

I potenziali rischi per la salute umana associati all'esposizione alla PLTX e composti analoghi riguardano anche altre categorie, quali bagnanti, persone che svolgono altre attività ricreative o lavorative in prossimità della spiaggia, operatori dei settori della pesca e acquacoltura, addetti e hobbisti coinvolti nella pulizia di acquari e personale di laboratorio coinvolto nella coltivazione delle microalghe e/o nell'analisi di matrici contaminate, oltre ai consumatori di prodotti ittici contaminati.

A6.2. Effetti associati a esposizione inalatoria

La colonizzazione dei litorali costieri mediterranei da parte di *Ostreopsis* spp. è stata accompagnata dalla segnalazione di comparsa dei primi casi isolati di disturbi respiratori attribuiti all'inalazione di aerosol marino potenzialmente contaminato. Ne sono esempi i casi registrati in Italia a Bari (Gallitelli *et al.*, 2005), in provincia di La Spezia e sul litorale apuano a levante del porto di Marina di Carrara, ma anche sulla costa catalana, vicino Barcellona, nel 2004 (Riobo *et al.*, 2013). Dal punto di vista sanitario, il caso più rilevante, che ha richiamato fortemente l'attenzione della comunità scientifica, delle istituzioni, della popolazione e della stampa, si è verificato nel 2005, quando in Liguria si registrarono oltre 200 casi di sindrome febbrile-respiratoria in soggetti che avevano frequentato le spiagge e il litorale in prossimità della città di Genova, con accesso al Pronto Soccorso degli ospedali cittadini. Circa il 20% di questi pazienti richiese una breve ospedalizzazione (1-3 giorni) (Brescianini *et al.*, 2006; Durando *et al.*, 2007).

I sintomi segnalati (Tabelle A6.1 e 6.2), caratterizzati principalmente da febbre, faringodinia¹, tosse e dispnea² variabilmente associati, registrarono un picco in concomitanza con un'abbondante fioritura di *O. cf. ovata* nel tratto di costa interessato e terminarono con il declino della fioritura stessa. La contemporaneità degli eventi portò ad ipotizzare che la sintomatologia potesse essere attribuita all'inalazione di aerosol marino contaminato da frammenti di cellule algali e/o dalla tossina prodotta da *O. cf. ovata* (Durando *et al.*, 2007). In tutti i campioni di fitoplancton prelevati fu identificata una tossina PLTX-simile (Ciminiello *et al.*, 2006). Solo successivamente, mediante l'analisi di una coltura di *O. cf. ovata* prelevata nelle acque del litorale genovese nel 2006, in coincidenza di un episodio analogo, di proporzioni minori e gestito adeguatamente dalle istituzioni al fine di minimizzare il rischio di esposizione, grazie all'esperienza maturata durante l'emergenza dell'anno precedente, la tossina fu caratterizzata come ovatossina-a. Tale tossina, che finora appare essere l'analogo dominante nel bacino del Mediterraneo, è strutturalmente simile alla PLTX da cui differisce solo per l'assenza di tre ossidrili nelle posizioni 17, 44 e 64 e per la presenza di un ossidrile in posizione 42 (Ciminiello *et al.*, 2008, 2012).

¹ Dolorabilità aspecifica della faringe, non caratterizzata da un'inflammatione e un'infezione clinicamente riconoscibili.

² Difficoltà nella respirazione

Tabella A6.1. Sintomi clinici rilevati in 228 pazienti ricorsi alle unità di Pronto Soccorso di Genova e La Spezia nell'estate 2005 e 2006

Sintomi clinici	2005		2006	
	n.	%	n.	%
Febbre	133	63,6	6	31,6
Faringodinia	105	50,2	7	36,8
Tosse	84	40,2	14	73,7
Dispnea	81	38,8	7	36,8
Cefalea	66	31,6	2	10,5
Nausea	50	23,9	3	15,8
Rinorrea	44	21,1	5	26,3
Lacrimazione	33	15,8	1	5,3
Vomito	21	10	1	5,3
Dermatite	10	4,8	0	0
Totale	209		19	

Tabella A6.2. Associazioni più frequenti di sintomi in 228 pazienti ricorsi alle unità di Pronto Soccorso di Genova e La Spezia nell'estate 2005 e 2006

Pazienti con associazione di:	2005		2006	
	n.	%	n.	%
2 sintomi	80	38,3	18	94,7
Febbre e faringodinia	17	8,1		
Febbre e dispnea	7	3,4		
Febbre e cefalea	7	3,4		
Febbre e tosse			5	26,3
Tosse e dispnea			3	15,8
Faringodinia e dispnea			2	10,5
Altre associazioni	49	23,4	8	42,1
3 sintomi	47	22,5	1	5,3
Febbre, tosse e faringodinia	6	2,9		
Febbre, tosse e dispnea	6	2,9	1	5,3
Altre associazioni	35	16,7	0	0
4 sintomi	38	18,2	0	0
Febbre, tosse, dispnea e cefalea	5	2,4		
Febbre, faringodinia, cefalea e nausea	5	2,4		
Altre associazioni	28	13,4		
5 sintomi	24	11,5	0	0
Febbre, tosse, faringodinia, dispnea e rinorrea	6	2,9		
Altre associazioni	18	8,6		
Più di 5 sintomi	20	9,6	0	0
Febbre, tosse, faringodinia, dispnea, cefalea e nausea	5	2,4		
Febbre, tosse, faringodinia, dispnea, lacrimazione e nausea	5	2,4		
Altre associazioni	10	4,8		
Totale	209		19	

Più recentemente è stata dimostrata nell'aerosol marino la presenza sia di cellule tossiche di *O. cf. ovata* lungo la costa catalana (Casabianca *et al.*, 2013), sia di composti PLTX-simili lungo le coste italiane (Ciminiello *et al.*, 2014), che rende l'ipotesi di associazione altamente

plausibile. Tuttavia, non sono ancora chiari i fattori che influenzano la composizione e la dinamica dell'aerosol marino, né è stato stabilito un chiaro nesso causale tra tali ritrovamenti ed effetti sulla salute umana, tale da spiegare il meccanismo patogenetico della sindrome febbrile-respiratoria descritta e la relazione dose-risposta.

Da allora, quadri sindromici associati alla presenza di *O. cf. ovata* e quindi alla possibile esposizione per via inalatoria a PLTX (o suoi analoghi) da parte dei frequentatori delle spiagge sono stati segnalati in Spagna, Francia, Croazia, Tunisia, Grecia e Algeria (Barroso Garcia *et al.*, 2008; Shears & Ross, 2009; Tichadou *et al.*, 2010), oltre che in diverse regioni delle coste italiane. Infatti, con l'eccezione di Basilicata, Emilia Romagna, Molise e Veneto, tutte le altre regioni sono state negli ultimi 6 anni più o meno frequentemente interessate da fioriture di *O. cf. ovata* (ISPRA, 2010, 2011, 2012). I casi più frequenti si sono verificati nella riviera ligure, apuana, quella del Conero nelle Marche, lungo le coste pugliesi e del Friuli-Venezia Giulia (in particolare il golfo di Trieste) e il litorale di Palermo (Sansoni *et al.*, 2003; Gallitelli *et al.*, 2004, 2005; Zingone *et al.*, 2006; Totti *et al.*, 2007; Monti *et al.*, 2007; Honsell *et al.*, 2011; Bianco *et al.*, 2006; Ungaro *et al.*, 2008).

Segnalazioni di effetti avversi per la salute umana associabili ad inalazione di aerosol marino (o al contatto diretto) sono riportate in concomitanza di fioriture di *O. cf. ovata* lungo le aree marino costiere in Puglia (2007, 2008, 2011), Marche (2008, 2009) e Sicilia (2011) (ISPRA, 2010; ISPRA 2011; ISPRA, 2012), generalmente durante il periodo estivo, il più rilevante per le attività ricreative e di balneazione lungo la costa.

Nel 2010 e nel 2012, sebbene in alcune aree, inclusi gli *hot spot* dei litorali di Marche e Puglia, siano state registrate fioriture algali con alte concentrazioni di *O. cf. ovata*, non sono stati segnalati casi di intossicazione umana (ISPRA, 2010; ISPRA 2011; ISPRA, 2012). Dall'analisi dei dati risulta che non c'è una diretta relazione tra la comparsa (e la relativa segnalazione dei sintomi) e l'entità della fioritura (Tabella A6.3), probabilmente a causa delle diverse concentrazioni di tossine prodotte dalle microalghe delle diverse zone e nei diversi periodi. Comunque, dai dati disponibili sia in Italia che in Francia, risulta come i casi siano stati riportati solo in presenza di oltre 30.000 cell/L in colonna d'acqua e di contemporanee condizioni meteorologiche favorevoli alla formazione di aerosol (forte vento e mareggiate).

Tabella A6.3. *O. cf. ovata*: concentrazione di in acqua e segnalazione di effetti sulla salute umana in alcuni *hot spot* per le fioriture

Regione	Anno	Concentrazione (cell/L)	Intossicazione umana
Puglia	2007	36400 (colonna); 1.7 milioni (fondo)	Sì (80 casi)
	2008	5 milioni	Sì*
	2009	7.5 milioni	No*
	2010	4.6 milioni	No
	2011	1 milione	Sì
Marche	2007	641.000	No
	2008	5 milioni	Sì*
	2009	3.9 milioni	Sì*
	2010	7 milioni	No*
Liguria	2010	10.2 milioni	No*

(*) Adozione di misure per la tutela della salute

La mancata relazione tra densità di *O. cf. ovata* e insorgenza di effetti sulla salute può essere ricondotta al ruolo fondamentale che è rivestito dalle condizioni meteorologiche favorevoli al

rilascio in colonna d'acqua dell'alga e alla successiva aerosolizzazione e dispersione di cellule/detriti e tossine (es. vento e idrodinamismo sostenuto, mareggiate di particolare entità), condizioni dalle quali dipende l'esposizione della popolazione. L'applicazione delle precedenti Linee Guida del 2007, che proponevano in concomitanza con elevate densità cellulari, l'adozione di misure per la tutela della salute (es. divieto di balneazione, informazione al pubblico, pulizia della battigia), potrebbe aver comunque contribuito a prevenire effetti sulla salute anche in presenza di elevate densità.

Segnalazioni analoghe sono state descritte in Francia nel periodo 2006-2009 (Tichadou *et al.*, 2010). In tutti i casi sono stati descritti sintomi di natura simil-influenzale, quali irritazione delle prime vie aeree, tosse, rinorrea, difficoltà respiratorie, dolori muscolari e articolari, sintomi congiuntivali e febbre, che si sono risolti, per lo più spontaneamente nelle 24-72 ore successive alla loro insorgenza e/o in meno di 12 ore a seguito di somministrazione di farmaci antiinfiammatori non steroidei.

Episodi simili a quelli sopra descritti sono riportati di frequente anche in altre aree del mondo, ad esempio, in Florida (Stati Uniti), dove però gli effetti sulla salute sono da attribuire ad esposizione per via inalatoria ad aerosol contaminato da fioriture della dinoficea *Karenia brevis*, produttrice di brevetossine, strutturalmente molto diverse dalle PLTX prodotte da *Ostreopsis*.

Nelle aree interessate dalle fioriture di *Karenia brevis*, l'identificazione dell'associazione tra esposizione ad aerosol e disturbi respiratori è stata condotta attraverso apposite indagini che hanno previsto campionamenti di controllo anche nelle zone adiacenti. Da tali studi è risultato che solo nei campioni ambientali di aerosol marino prelevati nelle zone interessate da fioriture, e non di altre zone limitrofe, erano presenti brevetossine (Cheng *et al.*, 2005), oltre a detriti cellulari e batteri con diametro medio delle particelle inalate (MMAD) tale da permettere il deposito nelle vie aeree superiori e, quindi, compatibile con un possibile quadro irritativo delle mucose delle vie respiratorie. Ciò sarebbe alla base del fatto che esclusivamente i soggetti che avevano stazionato nelle zone della fioritura presentavano sintomi respiratori mentre non presentavano tali sintomi soggetti esposti ad aerosol in zone adiacenti non interessate dalla proliferazione di *K. brevis*. Sintomi e segni respiratori con maggiore frequenza e intensità, erano inoltre presenti negli individui più sensibili, affetti da patologie respiratorie preesistenti (es. gli asmatici) (Fleming *et al.*, 2005). Il quadro sintomatico con irritazione delle mucose delle vie respiratorie è compatibile con il profilo di tossicità inalatoria descritto nei roditori con il sistema immunitario come possibile bersaglio di tossicità sistemica (Benson *et al.*, 2005).

Disturbi respiratori, spesso accompagnati da aumentati livelli ematici di creatin-fosfochinasi (CPK), accanto a sintomi sistemici quali vertigini, astenia e mialgie, sono stati riportati anche in seguito all'inalazione di vapori liberati dagli acquari contenenti coralli del genere *Palythoa* (Sud *et al.*, 2013). In un caso specifico accaduto in Virginia (USA) nel 2007, un soggetto ha inalato vapore proveniente dalla bollitura in acqua dolce di una roccia di acquario nel tentativo di rimuovere una colonia di zoantidi che la aveva colonizzata (Deeds & Schwartz, 2010). Pur interrompendo il processo per cattivo odore, il soggetto ha accusato rinorrea e tosse, difficoltà respiratorie nonostante l'auto-somministrazione di un anti-istaminico, e dolori toracici, sintomatologia che ha determinato la necessità di accesso in ospedale. La terapia con antiinfiammatori corticosteroidi è stata continuata fino alla scomparsa dei sintomi di natura respiratoria a carico delle basse vie aeree (1 mese). I campioni di zoantidi dell'acquario analizzati hanno mostrato livelli di PLTX tra 300 e 600 µg di equivalenti di PLTX/g (PLTXeq/g) (a seconda del metodo utilizzato, rispettivamente, test di emolisi e analisi cromatografica).

Un caso analogo è avvenuto in Olanda nel 2011, dove un'intera famiglia (genitori e due figli), durante la pulizia del loro acquario domestico con acqua bollente hanno accusato una

serie di disturbi respiratori in seguito ad inalazione dei vapori sprigionati. Il tempo di esposizione dei 4 pazienti variava dai 10 ai 20 min. Il test del sangue arterioso rivelava ipossia con livelli simili in tutti i pazienti. Tutti mostravano leucocitosi. Ulteriori parametri del sangue erano nella norma, ad eccezione di un'elevata creatin-chinasi (paziente 1) ed elevati neutrofili e CRP (pazienti 3 e 4). I pazienti sono stati trattati con ossigeno-terapia e dosaggi standard di paracetamolo e diclofenac. I test di laboratorio si sono normalizzati entro 36 ore, così come i segni fisici, ad eccezione della dispnea in 2 dei pazienti, che è persistita per oltre 3 mesi. Un frammento di corallo prelevato direttamente dal loro acquario è stato analizzato mediante LCMS per la ricerca di PLTX. Il corallo conteneva alti livelli di PLTX and 42-idrossipalitossina (rispettivamente 509 µg e 23 µg per 0,5 g peso umido di corallo) (Wieringa *et al.*, 2014).

A6.3. Effetti associati a esposizione cutanea e oculare

I dati epidemiologici relativi alle intossicazioni da PLTX e analoghi in seguito ad esposizione cutanea e/o oculare sono limitati e probabilmente sottostimati, poiché la sintomatologia, spesso non grave se paragonata alle altre vie di esposizione, nella maggior parte dei casi non richiede l'intervento di un'autorità sanitaria. Tuttavia, sono disponibili casi aneddotici (*case report*) in letteratura scientifica, relativi ad effetti irritativi e infiammatori a livello cutaneo e/o oculare a seguito del contatto con acque e/o coralli contaminati con PLTX. In particolare, tali effetti sono stati associati al contatto con l'acqua marina contenente cellule di *Ostreopsis*, con l'acqua di acquari contenenti coralli del genere *Palythoa* o *Zoanthus* e/o mediante il contatto cutaneo direttamente con i coralli.

Varie segnalazioni di tossicità a carico delle mucose oculari e della cute sono comparse in letteratura sia a seguito di attività di balneazione che dopo esposizione ad aerosol marino in concomitanza a proliferazioni di *O. cf. ovata* (Gallitelli *et al.*, 2005; Durando *et al.*, 2007; Barroso García *et al.*, 2008; Kermarec *et al.*, 2008; Tichadou *et al.*, 2010). Segni e sintomi riconducibili a irritazione delle mucose oculari sono stati segnalati in seguito ad esposizione ad aerosol marino (Gallitelli *et al.*, 2005; Durando *et al.*, 2007), mentre le dermatiti rappresentavano circa il 5% degli effetti osservati nella più ampia casistica disponibile, quella genovese (Durando *et al.*, 2007). Dermatiti eritematose sono state osservate anche in pazienti esposti ad aerosol marino durante le proliferazioni di *Ostreopsis* lungo le coste pugliesi nel 2003 e 2004 (Gallitelli, com. pers.). Sia in Italia che in Francia casi del genere finora sono stati segnalati solo in corrispondenza di oltre 30.000 cell/L in colonna d'acqua (ISPRA, 2010, 2011, 2012; Tichadou *et al.*, 2010). Gli effetti topici sono reversibili in tempi brevi e i casi segnalati sono generalmente molto limitati rispetto alla popolazione bagnante potenzialmente esposta.

A settembre 2008, alcuni pescatori attivi lungo le coste pugliesi svilupparono dermatiti: nonostante non siano state effettuate analisi per determinare la presenza di PLTX o suoi analoghi, fu possibile rinvenire un numero elevato di cellule di *Ostreopsis* spp. ($>100 \times 10^6$ cell/L) nell'acqua di risulta delle reti maneggiate dagli stessi pescatori (Tubaro *et al.*, 2011).

Altre segnalazioni di tossicità cutanea e/o sistemica in seguito alla manipolazione a mani nude di coralli del genere *Palythoa*, *Zoanthus* e *Parazoanthus* sono state riportate negli ultimi anni, spesso associate alla successiva quantificazione di composti PLTX-simili nei coralli (Deeds & Schwartz, 2010; Tubaro *et al.*, 2011). Sono state inoltre riportate segnalazioni di cherato-congiuntivi in seguito a contatto con coralli di acquari domestici (Moshirfar *et al.*, 2010).

Uno dei primi casi di tossicità da esposizione cutanea risale ai primi anni '60, durante la raccolta di *P. toxica* alle Hawaii da parte di alcuni ricercatori (Moore *et al.*, 1982). A seguito di piccole abrasioni alle mani e ai piedi durante la raccolta, un soggetto aveva manifestato

vertigini, nausea, cefalea e malessere generale. Recentemente, è stato documentato che, a seguito della manutenzione di un acquario domestico contenente acqua marina e un corallo del genere *Parazoanthus* contenente PLTX, un paziente che si era procurato alcune ferite cutanee durante la pulizia aveva manifestato irritazione cutanea, gonfiore, parestesia e intorpidimento in prossimità delle lesioni. Successivamente erano stati registrati anche sintomi sistemici, tra cui vertigini, debolezza, mialgia e alterazioni elettrocardiografiche, alcuni dei quali persistenti anche dopo due giorni (Hoffmann *et al.*, 2008). La presenza delle ferite ha sicuramente comportato un maggiore assorbimento e conseguentemente biodisponibilità, in grado di produrre effetti sistemici.

Un caso analogo si è verificato, stavolta in assenza di ferite visibili sulla pelle: i segni di tossicità cutanea (edema, eritema e prurito), persistenti per diversi giorni, erano associati alla percezione di sapore metallico e parestesia periorale. In base ai sintomi, gli effetti sono stati attribuiti alla PLTX, senza però alcuna conferma del suo coinvolgimento mediante analisi che ne rilevassero l'effettiva presenza nell'acquario, e dovendo ipotizzare un significativo assorbimento cutaneo della tossina (Nordt *et al.*, 2011). Un altro caso di tossicità da contatto cutaneo con coralli ha coinvolto un uomo in Georgia che ha manifestato dolore al torace, debolezza, intorpidimento al braccio sinistro, e dopo il ricovero tachicardia (116 battiti/minuto), ipertensione arteriosa (184/96 mmHg) ed elevati livelli ematici di creatinfosfochinasi (CPK) indicativi di un danno muscolare. Lungo la costa mediterranea francese e monegasca, attraverso un programma di sorveglianza (2006-2009), sono stati rilevati casi di effetti avversi a seguito dell'esposizione cutanea all'acqua marina, in concomitanza di proliferazioni di *Ostreopsis*. Nel 2006, nel corso di una proliferazione algale (25.000-900.000 cell/L), cinque sommozzatori hanno manifestato irritazione alle labbra, alla lingua, alla gola, nonché febbre e/o diarrea. Ulteriori casi di effetti avversi attribuibili al contatto diretto con l'acqua marina contenente *Ostreopsis* sono stati riportati in quest'area, con sintomi variabili, tra cui dermatite, prurito, congiuntivite, lacrimazione, rinorrea e irritazioni orali. Tuttavia, l'irritazione cutanea era il sintomo più frequente e potrebbe essere l'unico a manifestarsi anche a basse concentrazioni di *Ostreopsis* nell'acqua di mare (Tichadou *et al.*, 2010).

A6.4. Effetti associati a esposizione orale

L'esposizione orale a tossine prodotte da *O. cf. ovata* può verificarsi per ingestione accidentale di acqua contaminata durante attività ricreative (*worst case* 100 mL), ma anche per il consumo di prodotti ittici contaminati, a seguito della capacità di *O. cf. ovata* di produrre tossine del gruppo delle PLTX che possono essere accumulate in molluschi e altri prodotti ittici abitualmente consumati dall'uomo (*vedi* capitolo A3). Non sono noti casi di intossicazione a seguito di ingestione di acqua durante attività di balneazione in tratti di mare interessati da fioriture di *O. cf. ovata* e nel bacino del Mediterraneo nemmeno a seguito di consumo di prodotti ittici.

Considerando il profilo tossicologico delle tossine coinvolte (*vedi* capitolo A5) e l'incertezza legata agli effetti degli analoghi della PLTX, l'assenza di segnalazioni non deve portare ad una sotto-valutazione del problema, che deve comunque essere monitorato. È, infatti, noto che in altre aree geografiche sono stati riportati effetti anche gravi dovuti ad ingestione di PLTX.

Casi di intossicazioni umane accertate, anche letali, si sono verificati in zone tropicali e subtropicali, in seguito al consumo di pesci e crostacei contaminati (Noguchi *et al.*, 1987; Alcalá *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2002). La sintomatologia era inizialmente caratterizzata da disturbi gastrointestinali, tra cui nausea, vomito e diarrea (Alcalá *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999), spesso seguiti da mialgia, spasmi muscolari, problemi

respiratori e aritmia, accompagnati da un aumento dei livelli sierici di CPK, quale indice di un danno muscolare (Noguchi *et al.*, 1987; Taniyama *et al.*, 2002). Nei casi letali, si erano manifestati anche convulsioni e delirio (Alcala *et al.*, 1988; Onuma *et al.*, 1999). La gravità dell'avvelenamento potrebbe essere legata alle proprietà vasocostrittrici delle PLTX che, nel giro di poche ore, possono condurre a quadri clinici caratterizzati da rabdomiolisi (gravi danni al muscolo scheletrico) e miocardite: la necrosi dei miociti porta ad una cascata di eventi tra cui una alterazione dell'omeostasi del calcio, iperattività di enzimi proteolitici, generazione di radicali liberi e forte incremento dei livelli plasmatici di potassio, fosfati e mioglobina. L'eccesso di mioglobina precipita nel filtrato glomerulare con ostruzione dei tubuli renali, che porta a insufficienza renale, spesso causa di letalità (Deeds & Schwartz, 2010).

Maggiori dettagli sui *case report* e la tempistica nella comparsa dei sintomi sono riportati in Deeds & Schwartz (2010) e in Tubaro *et al.* (2011).

La presenza di tossine del gruppo delle PLTX nei resti dei cibi consumati è stata in questi casi accertata qualitativamente con metodi analitici o semi-quantitativamente (con il Mouse BioAssay e con i test di emolisi). La numerosità dei casi è troppo limitata, la variabilità molto alta e le misure poco affidabili dal punto di vista quantitativo per poter definire una chiara relazione dose-risposta e conseguentemente dei livelli senza effetto.

Altri episodi di intossicazione sono stati attribuiti alle PLTX solo in base alla sintomatologia e/o alle specie di organismi marini consumati, senza una conferma sperimentale del coinvolgimento delle PLTX mediante l'analisi della presenza delle stesse nei residui dei prodotti alimentari consumati (Alcala & Halstead, 1970; Gonzales & Alcala, 1977; Fusetani *et al.*, 1985; Ichida *et al.*, 1988; Tan & Lee, 1988; Kodama *et al.*, 1989; Tabata *et al.*, 1989; Okano *et al.*, 1998; Mahmud *et al.*, 2000; Taniyama *et al.*, 2001, 2003; Yoshimine *et al.*, 2001).

A6.5. Conclusioni

Le attività di balneazione in presenza di fioriture di *O. cf. ovata* possono indurre effetti avversi nella popolazione attraverso tre vie di esposizione: cutanea, inalatoria e orale. Agli scenari espositivi relativi all'uso ricreativo delle acque che includono anche i pescatori amatoriali, soprattutto quando coinvolgono la raccolta di molluschi e ricci di mare, si aggiungono le esposizioni professionali (bagnini, operatori turistici, pescatori, operatori coinvolti in attività di monitoraggio marino costiero, ricercatori che maneggino campioni contenenti *O. cf. ovata* e/o le tossine prodotte). Più recentemente è stata evidenziata anche la possibilità di rischi per la salute connessi alla manipolazione di coralli da acquario. Resta inoltre per la popolazione generale, e non solo per le categorie sopra elencate, la possibilità di essere esposti attraverso il consumo di prodotti ittici contaminati, anche se finora nel bacino del Mediterraneo non sono stati riportati casi di intossicazioni di natura alimentare.

Sono stati invece segnalati effetti avversi per la salute umana a seguito di inalazione/contatto diretto, caratterizzati da sindrome simil-influenzale e da sintomi irritativi a carico delle mucose oculari e della cute, spesso accompagnati da aumentati livelli ematici di CPK, accanto a segni e sintomi sistemici comuni a tutte le vie di esposizione, tra cui malessere generale, vertigini, astenia, mialgia, alterazioni cardiache e difficoltà respiratorie, alcuni dei quali sembrano poter essere associati ad un coinvolgimento della muscolatura scheletrica e/o cardiaca. L'analisi dei sintomi registrati a seguito di intossicazione da PLTX e suoi analoghi ha permesso di dare una definizione di 'caso', che può essere utilizzata dalle strutture sanitarie in occasione di sospetti 'episodi epidemici'. Si sottolinea l'importanza di prevedere un'accurata e completa descrizione di futuri casi di sindrome da esposizione ad alga *Ostreopsis*, basata sia su una standardizzata diagnosi clinico-epidemiologica sia sull'identificazione della/e tossina/e coinvolta/e, al fine di

disporre di ulteriori informazioni utili per la descrizione dei meccanismi patogenetici. A questo scopo è stata predisposta una scheda, presentata nell'Allegato al capitolo C2 di queste linee guida, per la sorveglianza in ambito sanitario degli effetti associati ad esposizione ad *O. cf. ovata* e alle relative tossine.

È tuttavia da notare che spesso: 1) l'identificazione delle tossine è incompleta o mancante; 2) l'attribuzione della causa dell'intossicazione alla PLTX e/o ai suoi analoghi è stata fatta solo in base al quadro clinico; 3) non c'è una chiara relazione tra la densità cellulare e la comparsa di effetti sulla salute; e 4) non si conoscono ancora i fattori che influenzano la composizione e la dinamica dell'aerosol marino. Dai dati disponibili quindi non sempre è possibile ricavare una chiara relazione causa-effetto e, anche nei casi in cui lo sia, definire una relazione dose-effetto. Al momento non è quindi possibile identificare valori di riferimento (*health based reference values*) solidi al punto da poter essere usati per la valutazione quantitativa dei rischi per la salute della popolazione. Si può però far riferimento a soglie 'empiriche' che facciano riferimento all'esperienza maturata nel corso delle attività di monitoraggio sia in Italia che in Francia: gli effetti topici sono stati segnalati solo per densità in colonna d'acqua superiori a 30.000 cell/L. A densità analoghe di microalghe sono stati riportati effetti locali a carico di cute e mucose ocularie ed effetti respiratori, ma solo in presenza di condizioni meteorologiche favorevoli alla formazione di aerosol.

Relativamente alla esposizione orale, l'impossibilità di utilizzare i dati sull'uomo per quantificare la dose-effetto è stata ribadita anche dall'EFSA che ha derivato il valore di riferimento (ARfD) da usare per stabilire limiti di contaminazione nei prodotti ittici dagli studi tossicologici disponibili (i dettagli sull'approccio EFSA sono riportati nel capitolo A5).

Bibliografia

- Alcala AC, Halstead BW. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania* sp. in the Philippines. *J Toxicol Clin Toxicol* 1970;3:609-11.
- Alcala CC, Alcala LC, Garth JS, Yasumura D, Yasumoto T. Human fatality due to the ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 1988;26:105-7.
- Amzil Z, Sibat M, Chomerat N, Grossel H, Marco-Miralles F, Lemee R, Nezan E, Sechet V. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the French Mediterranean coast. *Mar Drugs* 2012;10:477-96.
- Barroso García P, Rueda de la Puerta P, Parrón Carreño T, Marín Martínez P, Guillén Enríquez J. Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas. *Gac Sanit* 2008;22:578-84.
- Benson JM, Hahn FF, March TH, McDonald JD, Gomez AP, Sopori MJ, Bourdelais AJ, Naar J, Zaias J, Bossart GD, Baden D. Inhalation toxicity of brevetoxin 3 in rats exposed for twenty-two days. *Environ Health Perspect* 2005;113:626-31.
- Bianco I, Congestri R, Sangiorgi V, Albertano P, Zaottini E. Fioriture di microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste laziali. *Biol Mar Mediterr* 2006;13:947-50.
- Brescianini C, Grillo C, Melchiorre N, Bertolotto R, Ferrari A, Vivaldi B, Icardi G, Gramaccioni L, Funari E, Scardala S. *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Euro Surveill* 2006;11:E060907.3.
- Casabianca S, Casabianca A, Riobò P, Franco JM, Vila M, Penna A. Quantification of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR assay in marine aerosol. *Environ Sci Technol* 2013;47:3788-95.

- Cheng YS, Zhou Y, Irvin CM, Pierce RH, Naar J, Backer LC, Fleming LE, Kirkpatrick B, Baden DG. Characterization of marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins. *Environ Health Perspect* 2005;113:638-43.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L. Stereochemical studies on ovatoxin-a. *Chemistry* 2012;18:16836-43.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C, Casabianca S, Penna A. First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols. *Environ Sci Technol* 2014;48:3532-40.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal Chem* 2006;78:6153-9.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. 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* 2008;19:111-20.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L. LC-MS of palytoxin and its analogues: state of the art and future perspectives. *Toxicon* 2011;57:376-89.
- Deeds JD, Schwartz M. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* 2010;56:150-62.
- Deeds JR, Handy SM, White KD, Reimer JD. Palytoxin found in *Palythoa* sp. zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) sold in the home aquarium trade. *PLoSOne* 2011;6:e18235.
- Del Favero G, Sosa S, Pelin M, D'Orlando E, Florio C, Lorenzon P, Poli M, Tubaro A. Sanitary problems related to the presence of *Ostreopsis* spp. in the Mediterranean Sea: a multidisciplinary scientific approach. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48:407-14.
- Durando P, Ansaldi F, Oreste P, Moscatelli P, Marensi L, Grillo C, Gasparini R, Icardi G. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005-2006, in northwest Italy. *Euro Surveill* 2007;12:E070607.1.
- Fleming LE, Kirkpatrick B, Backer LC, Bean JA, Wanner A, Dalpra D, Tamer R, Zaias J, Cheng YS, Pierce R, Naar J, Abraham W, Clark R, Zhou Y, Henry MS, Johnson D, Van De Bogart G, Bossart GD, Harrington M, Baden DG. Initial evaluation of the effects of aerosolized Florida red tide toxins (brevetoxins) in persons with asthma. *Environ Health Perspect* 2005;113:650-7.
- Fusetani N, Sato S, Hashimoto K. Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish (*Ypsiscarus ovicephalus*) which is probably responsible for parrotfish liver poisoning. *Toxicon* 1985;23:105-12.
- Gallitelli M, Addante LM, Procacci V, Staiano C, Poletti R, Ungano N, Mazzone M, Gentiloni Silveri N, Sabba C. Toxic Algal Blooms and Public Health Risks. In: *Annali Italiani di Medicina* 105° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Interna. Palermo: 23-26 ottobre 2004.
- Gallitelli M, Ungaro N, Addante LM, Procacci V, Gentiloni N, Sabbà C. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA* 2005;293:2599-600.
- Gonzales RB, Alcalá AC. Fatalities from crab poisoning on Negros Island, Philippines. *Toxicon* 1977;15:169-70.
- Hoffmann K, Hermanns-Clausen M, Buhl C, Buchler MW, Schemmer P, Mebs D, Kauferstein S. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through skin injury. *Toxicon* 2008;51:1535-7.
- Honsell G, De Bortoli M, Boscolo S, Dell'Aversano C, Battocchi C, Fontanive G, Penna A., Berti F, Sosa S, Yasumoto T, Ciminiello P, Poli M, Tubaro A. Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environ Sci Technol* 2011;45:7051-9.

- Ichida S, Tawada E, Watanebe Y, Minami S, Horiba M. Two cases of rhabdomyolysis induced by parrotfish liver poisoning. *Kidney & Dialysis (Japan)* 1988;25:541-4.
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA, Rapporti 127/2010).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011. (ISPRA, Rapporti 148/2011).
- ISPRA. *Monitoraggio e sorveglianza delle fioriture di Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane. Anno 2012*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2013. (ISPRA, Rapporti 188/2013).
- ISPRA. *Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane: monitoraggio 2011*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. (ISPRA, Rapporti 173/2012).
- Kermarec F, Dor F, Armengaud A, Charlet F, Kantin R, Sauzade D, de Haro L. Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Env Risques Santé* 2008;7:357-63.
- Kodama AM, Hokama Y, Yasumoto T, Fukui M, Manea SJ, Sutherland N. Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (mackerel). *Toxicon* 1989;27:1051-3.
- Mahmud Y, Arakawa O, Noguchi T. An epidemic survey on the freshwater puffer poisoning in Bangladesh. *J Nat Toxins* 2000;9:319-26.
- Monti M, Minocci M, Beran A, Ivesa L. First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull* 2007;54:598-601.
- Moore RE, Helfrich P, Patterson GML. The deadly seaweed of Hana. *Oceanus* 1982;25:54-63.
- Moshirfar M, Khalifa YM, Espandar L, Mifflin MD. Aquarium coral keratoconjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 2010;128:1360-2.
- Noguchi T, Hwang D-F, Arakawa O, Daigo K, Sato S, Ozaki H, Kawai N, Ito M, Hashimoto K. Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK (Ed.). *Progress in venom and toxin research: proceedings of the first Asia-Pacific congress on animal, plant and microbial toxins*. Singapore: Faculty of Medicine, National University of Singapore; 1987. p. 325-35.
- Nordt SP, Wu J, Zahller S, Clark RF, Cantrell FL. Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral. *J Emerg Med* 2011;40:397-9.
- Okano H, Masuoka H, Kamei S, Seko T, Koyabu S, Tsuneoka K, Tamai T, Ueda K, Nakazawa S, Sugawa M, Suzuki H, Watanabe M, Yatani R, Nakano T. Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Int Med* 1998;37:330-3.
- Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumoto T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 1999;37:55-65.
- Riobó P, Franco JM, Bravo I, Fraga S, Ramilo I, Rial P, Rodriguez F, Sala MM, Vila M. Determination of palytoxins in samples from *Ostreopsis* outbreaks in Llanerres (NW Mediterranean Coast). In: Pagou KA, Hallegraeff GM (Ed.). *Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae, International Society for the Study of Harmful algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco*; 2013. p. 32-4.
- Sansoni G, Borghini B, Camici G, Casotti M, Righini P, Rustighi C. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biol Amb* 2003;17:17-23.

- Shears NT, Ross PM. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 2009;8:916-25.
- Sud P, Su MK, Greller HA, Majlesi N, Gupta A. Case series: inhaled coral vapor – toxicity in a tank. *J Med Toxicol* 2013;9:282-6.
- Tabata H, Nanjo K, Kokuoka H, Machida K, Miyamura K. Two cases of fish poisoning caused by ingesting parrot fish. *Int Med* 1989;64: 974-7.
- Tan CTT, Lee EJD. A fatal case of crab toxin (*Lophozozimus pictor*) poisoning. *Asia Pacific J Pharmacol* 1988;3:7-9.
- Taniyama S, Arakawa O, Terada M, Nishio S, Takatani T, Mahmud Y, Noguchi T. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 2003;42:29-33.
- Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 2001;39:725-7.
- Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Occurrence of a food poisoning incident by PLTX from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J Nat Toxins* 2002;11:277-82.
- Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grossel H, Lemée R, Kantin R, Lasalle JL, Drouet G, Rambaud L, Malfait P, de Haro L. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin Toxicol (Phila)* 2010;48:839-44.
- Totti C, Cucchiari E, Romagnoli T, Penna A. Bloom of *Ostreopsis ovata* on the Conero riviera (NW Adriatic Sea). *Harmful Algae News* 2007;33:12–3.
- Tubaro A, Durando P, Del Favero G, Ansaldi F, Icardi G, Deeds JR, Sosa S. Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 2011;57:478-95.
- Ungaro N, Pastorelli AM, Blonda M, Assennato G. Surveillance monitoring of *Ostreopsis ovata* blooms in the Apulian seas: methodological approach and results from the summer season 2007. *Biol Mar Mediterr* 2008;15:62-4.
- Wieringa A, Bertholee D, Ter Horst P, van den Brand I, Haringman J, Ciminiello P. Respiratory impairment in four patients associated with exposure to palytoxin containing coral. *Clin Toxicol* 2014;52:150-1.
- Yoshimine K, Orita S, Okada S, Sonoda K, Kubota K, Yonezawa T. Two cases of parrotfish poisoning with rhabdomyolysis. *J Jap Soc Int Med* 2001;90:1339-41.
- Zingone A, Siano R, D'Alelio D, Sarno D. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 2006;5:321-37.

A7. EFFETTI SU ORGANISMI MARINI

Anna Milandri (a), Francesco Regoli (b)*, Cecilia Totti (b), Adriana Zingone (c)

(a) Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, Cesenatico

(b) Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

(c) Dipartimento di ecologia ed evoluzione del plancton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli

*f.regoli@univpm.it

Dal punto di vista ambientale le fioriture di *Ostreopsis* spp., oltre a determinare un evidente deterioramento della qualità delle acque, sono talvolta associate a danni e morie di organismi marini. Questi ultimi effetti sono stati riportati per la prima volta lungo le coste della Toscana, in concomitanza delle prime fioriture massive segnalate per i mari Italiani negli anni 1998, 2000 e 2001 (Sansoni *et al.*, 2003). In particolare nel 1998, in specchi d'acqua a scarso ricambio per la presenza di barriere artificiali parallele e perpendicolari alla costa, fu osservata la presenza di una pellicola gelatinosa brunastra che ricopriva i substrati sommersi, nonché schiume superficiali, opalescenza delle acque e segni di anossia/ipossia sui fondali. In occasione di tali fenomeni, le concentrazioni di *Ostreopsis* cf. *ovata* in acqua variavano da circa 3×10^3 a 50×10^4 cell/L, ma all'interno della pellicola riscontrata sul substrato si raggiungevano valori da 250 milioni a 3 miliardi cell/L di materiale. I danni maggiori vennero riscontrati a carico dei popolamenti dei piani mesolitorale e infralitorale. Nel piano mesolitorale, le popolazioni di *Patella* sp., *Monodonta turbinata*, *Actinia equina* apparivano ridotte e in alcuni siti addirittura scomparse. In esemplari di *Mytilus galloprovincialis* di banchi naturali si osservava inoltre l'allentamento del bisso e, in alcuni casi, la morte di una parte consistente della popolazione, come testimoniato dalla presenza di un numero elevato di gusci vuoti di bivalvi sul fondale. Estese morie interessarono anche banchi di denti di cane (Cirripedi Balanidi), le cui spoglie in decomposizione contribuivano all'opalescenza delle acque. Nel piano infralitorale, numerosi ricci di mare (*Paracentrotus lividus*) furono rinvenuti morti, mentre molti individui sopravvissuti presentavano una più o meno accentuata perdita degli aculei. Le stelle di mare (*Coscinasterias tenuispina*) mostravano un'anomala postura delle braccia, rivolte verso il dorso, e vari gradi di perdita delle braccia stesse (Sansoni *et al.*, 2003). Inoltre, in alcune occasioni furono ritrovati spiaggiati anche numerosi polpi (*Octopus vulgaris*) (Rustighi & Casotti, 2005; ISPRA, 2010; ISPRA, 2011; ISPRA, 2012).

Anche in Puglia, in concomitanza con fioriture di *O. cf. ovata*, nel corso degli anni sono stati ritrovati numerosi animali agonizzanti o morti: saraghi sparaglioni (*Diplodus annularis*), seppie (*Sepia officinalis*), ricci (*Paracentrotus lividus*) e cefalopodi (*Octopus vulgaris*). Il tessuto muscolare dei saraghi, osservato al microscopio, mostrava sia segni di arrossamento dovuti a fenomeni di congestione, con la tendenza a staccarsi facilmente dalle strutture ossee. Le alterazioni patologiche più caratteristiche evidenziate dagli esami anatomo-istopatologici effettuati sulle seppie e sui saraghi erano invece alterazioni delle branchie con edema a livello delle lamelle, discontinuità dell'epitelio e accentuata permeabilità capillare; modificazione dell'epidermide e del derma; alterazione delle miofibrille del miocardio; alterazione della mucosa gastrica e intestinale; epatociti interessati da degenerazione vacuolare (Casavola *et al.*, 2005).

Effetti negativi su organismi marini sono stati rilevati anche nella Riviera del Conero (Accoroni *et al.*, 2011), ove le fioriture di *O. cf. ovata* raggiungono ogni anno abbondanze molto elevate (10^6 cell/g fw, *fresh weight*). Durante il picco della fioritura sono state osservate morie non solo di ricci (*Paracentrotus lividus*), patelle (*Patella patella*) e mitili (*Mytilus*

galloprovincialis), ma anche di diverse specie di macroalghe con sensibile riduzione della copertura macrofittica ed evidente sbiancamento dei talli (Accoroni *et al.*, 2012). Fenomeni simili, con rarefazione e/o scomparsa delle alghe epifittate da *O. cf. ovata* sono stati riportati anche in Sardegna e Toscana (ISPRA, 2010; ISPRA, 2012).

Episodi di mortalità di animali nel corso di fioriture di specie del genere *Ostreopsis* sono stati riscontrati anche in altre aree del mondo e hanno interessato soprattutto diverse specie di ricci: lungo le coste brasiliane, nel 1998 durante un bloom di *O. cf. ovata* sono state riportate estese morie del riccio *Echinometra lucunter* e lungo le coste nord orientali della Nuova Zelanda nel 2004, nel corso di estese fioriture di *O. siamensis*, (con concentrazioni di $1,4 \times 10^6$ cell/g fw), è stato registrato un declino del 56-60% della popolazione locale del riccio *Evechinus chloroticus* (Shears & Ross, 2009). Nonostante questi documentati episodi di tossicità e morie di organismi durante alcune fioriture di *Ostreopsis*, la comparsa di fenomeni di tossicità durante i bloom algali non è generalizzabile, ma piuttosto si verifica con intensità molto variabile negli anni e nei diversi siti geografici, senza una chiara spiegazione.

A questo proposito, gli effetti patologici osservati in numerosi animali negli studi sopra citati sembrano essere in contraddizione con osservazioni dirette su materiale naturale raccolto durante fioriture ad esempio nel Golfo di Napoli, che mostrano come piccoli invertebrati (crostacei, nematodi, policheti, ecc.) convivano con fioriture di *Ostreopsis*, in assenza di formazione di quantità di muco eccessive, senza mostrare danni apparenti (Zingone, dati non pubblicati). Alcuni animali bentonici, fra cui i mitili e i ricci, possono accumulare alte dosi di tossine senza mostrare fenomeni di tossicità acuta, così come dimostrato in diversi studi su animali raccolti nelle aree e nei periodi caratterizzati da fioriture di *O. cf. ovata* (Aligizaki *et al.*, 2011). Esperimenti di laboratorio condotti su mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e ricci (*Paracentrotus lividus*) hanno dimostrato un effetto variabile dell'esposizione ad *Ostreopsis* su questi animali, che possono alternativamente accumulare tossine e mostrare sintomi patologici, inclusa la morte, in relazione alle concentrazioni e alle modalità di esposizione alla microalga. In particolare i ricci possono nutrirsi di macroalghe epifittate da *O. cf. ovata* senza danni apparenti, ma subiscono danni notevoli se esposti a colture delle microalghe in questione (Zingone *et al.*, 2012).

A tutt'oggi, nonostante gli effetti di mortalità e le alterazioni osservate in numerosi organismi marini, non sono ancora chiari i meccanismi di azione delle tossine di *O. cf. ovata*, e la loro possibile modulazione da parte di fattori quali la temperatura, l'ossigeno disciolto o la fase della fioritura. Gli effetti negativi di *Ostreopsis* sugli animali possono derivare sia dall'ingestione delle microalghe (Faimali *et al.*, 2012), sia dal contatto diretto con le branchie o con il corpo (Gorbi *et al.*, 2013); sembra inoltre che tali effetti siano amplificati dalla formazione di muco e da un comportamento peculiare di queste microalghe, che in alcuni casi sono state osservate adese in gran numero sul corpo di piccoli animali, quali nematodi e crostacei (Barone & Prisinzano, 2006). Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che la rete di muco prodotta da *Ostreopsis*, consistente di un intreccio di tricocisti e mucocisti prodotte dalle cellule (Honsell *et al.*, 2013), potrebbe agire come una ragnatela, permettendo alle microalghe di imbrigliare animali di dimensioni molto maggiori delle proprie (Barone, 2007). L'ipotesi di un comportamento alimentare mixotrofo da parte di *Ostreopsis* non ha trovato conferma (Faust & Morton, 1995; Faust *et al.*, 1996; Escalera *et al.*, 2014).

Negli anni recenti le osservazioni di campo sono state affiancate da studi in laboratorio, che hanno permesso di evidenziare la comparsa di diverse tipologie di alterazioni negli animali testati. Uno screening ecotossicologico condotto sulla spigola (*Dicentrarchus labrax*) e su crostacei (*Artemia salina*, *Tigriopus fulvus*, *Amphibalanus amphitrite*) ha evidenziato che la tossicità di *O. cf. ovata* è associata alla presenza di cellule algali vive e che tale effetto è amplificato dalla temperatura (Faimali *et al.*, 2012). L'animale più sensibile alla presenza di *O.*

ovata è risultata essere *A. salina*, con una mortalità del 100% in presenza di concentrazioni della microalga inferiori a 10.000 cell/L. Nel caso di stadi giovanili di spigola, effetti simili si sono riscontrati solo con concentrazioni della microalga 100 volte superiori.

Studi sperimentali hanno dimostrato che la tossicità di *Ostreopsis* si esercita anche sugli embrioni dei ricci di mare (*Paracentrotus lividus*), che mostrano difetti nello sviluppo a partire da concentrazioni nell'ordine di $4,2 \times 10^4$ cell/L, con il 100% degli embrioni deformi a concentrazioni di $3,4 \times 10^5$ cell/L (Pagliara & Caroppo, 2012). Esperimenti analoghi condotti su larve e giovanili del riccio hanno dimostrato che i giovanili sono più sensibili alla tossina delle larve, e che queste mostrano mortalità significative solo ad altissime concentrazioni (40.000 cell/L) della microalga tossica (Privitera *et al.*, 2012).

Il polichete *Dinophilus gyrociliatus* esposto a cellule di *O. cf. ovata* prelevate nella fase iniziale della fioritura ha evidenziato una mortalità elevata e dose-dipendente, mentre effetti trascurabili sono stati osservati esponendo gli organismi a cellule algali prelevate durante la fase finale della fioritura (Simonini *et al.*, 2011).

Tali risultati confermano che il profilo tossicologico di *O. cf. ovata* può variare in funzione del ceppo, della popolazione o del periodo, causando effetti diversi sugli organismi, non sempre facilmente prevedibili in funzione della semplice densità algale nell'acqua. A questo proposito, l'utilizzo di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) come organismi bioindicatori prelevati durante le varie fasi di una fioritura, ha dimostrato l'utilità di un approccio basato sull'analisi di risposte molecolari e cellulari per evidenziare i primi segnali di un'esposizione a *O. cf. ovata* (Gorbi *et al.*, 2012). La modulazione di risposte come la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, le difese immunitarie, i sistemi lisosomiali rappresentano alcuni esempi di importanti sistemi cellulari che rispondono in maniera precoce e sensibile alla presenza dell'alga, anche in assenza di fenomeni di tossicità acuta nei mitili esposti. La comparsa di queste alterazioni a livello cellulare è stata osservata anche in condizioni di laboratorio, suggerendo che gli effetti di *O. cf. ovata* possono variare, in funzione dell'intensità, del periodo e della durata dell'esposizione, da una debole attivazione delle prime risposte del sistema immunitario fino alla comparsa di fenomeni di tossicità cellulare più integrata, con possibili ripercussioni anche sullo stato di salute e di vitalità degli organismi (Gorbi *et al.*, 2012, 2013). In questo senso, ulteriori indagini sull'attivazione dei biomarker molecolari e cellulari, oltre a chiarire meglio i meccanismi di azione delle tossine, potranno servire a pianificare un monitoraggio appropriato per la definizione del rischio ecologico associato alle fioriture di *O. cf. ovata*.

Bibliografia

- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2512-9.
- Accoroni S, Colombo F, Pichierri S, Romagnoli T, Marini M, Battocchi C, Penna A, Totti C. Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie Algol* 2012;33:191-8.
- Aligizaki K, Katikou P, Milandri A, Diogène J. Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* 2011;57:390-9.
- Barone R. Behavioural trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: the spider's strategy. *HAN* 2007;33:1-3.
- Barone R, Prisinzano A. Peculiarità comportamentale del dinoflagellato *Ostreopsis ovata* Fukuyo (Dinophyceae): la strategia del ragno. *Il Naturalista Siciliano* 2006;4:401-18.

- Casavola N, Troncone A, Rizzi E, Favale MG, Bello G. Microalghe marine tossiche nella provincia di Bari: danni ambientali, ittiofaunistici, evidenze epidemiologiche. In: Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, Bruno M (Ed.). *Diffusione delle fioriture algali tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 92-7.
- Escalera L, Benvenuto G, Scalco E, Zingone A, Montresor M. Ultrastructural features of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Protist* 2014;165:260-74.
- Faimali M, Giussani V, Piazza V, Garaventa F, Corrà C, Asnaghi V, Privitera D, Gallus L, Cattaneo-Vietti R, Mangialajo L, Chiantore M. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Mar Environ Res* 2012;76:97-107.
- Faust MA, Morton S. Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *J Phycol* 1995;31:456-63.
- Faust MA, Morton SL, Quod JP. Further study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J Phycol* 1996;32:1053-65.
- Gorbi S, Bocchetti R, Binelli A, Bacchiocchi S, Orletti R, Nanetti L, Raffaelli F, Vignini A, Accoroni S, Totti C, Regoli F. Biological effects of palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* cf. *ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 2012;89:623-32.
- Gorbi S, Avio G, Benedetti M, Totti C, Accoroni S, Pichierri S, Bacchiocchi S, Orletti R, Graziosi T, Regoli F. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immun* 2013;35:941-50.
- Honsell G, Bonifacio A, De Bortoli M, Penna A, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Sosa S, Yasumoto T, Tubaro A. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLoS ONE* 2013;8:e57291.
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009*. Roma: Istituto per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA Rapporti 127/2010).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010*. Roma: Istituto per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA Rapporti 148/2011).
- ISPRA. *Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane: monitoraggio 2011*. Roma: Istituto per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. (ISPRA Rapporti 173/2012).
- Pagliara P, Caroppo C. Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon* 2012;60:1203-14.
- Privitera D, Giussani V, Isola G, Faimali M, Piazza V, Garaventa F, Asnaghi V, Cantamessa E, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M. Toxic effects of *Ostreopsis ovata* on larvae and juveniles of *Paracentrotus lividus*. *Harmful Algae* 2012;18:16-23.
- Rustighi C, Casotti M. Fioriture tossiche di *Ostreopsis* cf. *ovata* sul litorale apuano. In: Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, Bruno M (Ed.). *Diffusione delle fioriture algali tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 118-22.
- Sansoni G, Borghini B, Camici G, Casotti M, Righini P, Rustighi C. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Animale* 2003;17:17-23.
- Simonini R, Orlandi M, Abbate M. Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates? Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Mar Environ Res* 2011;72:230-3.

- Shears NT, Ross PM. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 2009;8:916-25.
- Zingone A, Sardo A, Rossi R, Soprano V, Ciminiello P, Fattorusso E, Cirino, P. Il duplice effetto di *Ostreopsis ovata* su mitili e ricci di mare: accumulo di tossine ed aspetti patologici. In: Spada E, Borrello P (Ed.). *Giornata di studio. Presenza di fioriture algali di Ostreopsis ovata ed altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane. Atti. Roma, 28 marzo 2012*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. p. 33-6.

A8. CARENZE CONOSCITIVE, SPUNTI PER LA RICERCA, PRIORITÀ

Rossella Barone (a), Patrizia Ciminiello (b), Erika Magaletti (c)*, Maura Manganelli (d), Antonella Penna (e), Rossella Pistocchi (f), Emanuela Testai (d)*, Cecilia Totti (g), Aurelia Tubaro (h), Adriana Zingone (i)

(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo, Palermo*

(b) *Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli*

(c) *Dipartimento Monitoraggio qualità ambientale, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

(d) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino*

(f) *Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Bologna, Bologna*

(g) *Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

(h) *Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Trieste*

(i) *Dipartimento di ecologia ed evoluzione del plancton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli*

* *erika.magaletti@isprambiente.it, emanuela.testai@iss.it*

Come illustrato nei precedenti capitoli, in questi ultimi anni le conoscenze su distribuzione, ecologia e genetica di *Ostreopsis* cf. *ovata*, come pure sui livelli di produzione e profilo tossicologico delle tossine prodotte, si sono ampliate. Tuttavia diversi aspetti restano ancora da chiarire per poter prevedere e gestire adeguatamente il fenomeno delle fioriture, mitigandone i possibili effetti sulla salute umana, sugli ecosistemi costieri e non ultimo sulle attività economiche.

Ad esempio, al momento disponiamo di una mappa abbastanza dettagliata della distribuzione di *O. cf. ovata* lungo le coste italiane grazie alle attività svolte a partire dalla adozione della precedente versione delle linee guida (Ministero della Salute, 2010), e sono state identificate alcune delle caratteristiche dei tratti di costa e/o delle condizioni climatiche in cui più frequentemente si verificano le fioriture. Tuttavia, non abbiamo ancora un quadro completo dei fattori ambientali che favoriscono le fioriture e che modulano la produzione di tossine; l'identità tassonomica della microalga e la caratterizzazione completa delle tossine prodotte non sono ancora del tutto definite; l'impatto delle fioriture sulla salute umana e sull'intero ecosistema costiero è solo parzialmente conosciuto.

Relativamente alla salute umana, anche se è stata recentemente dimostrata nell'aerosol marino la presenza sia di cellule tossiche di *O. cf. ovata* lungo la costa catalana sia di composti palitossina-simili lungo le coste toscane, non si conoscono ancora i fattori che influenzano la composizione e la dinamica dell'aerosol marino, né è stato stabilito un chiaro nesso causale tra tali ritrovamenti nell'aerosol marino ed effetti sulla salute umana. Non è quindi ancora possibile, anche se i recenti dati lo rendono molto plausibile, definire quale sia l'agente eziologico dei disturbi respiratori riscontrati in bagnanti e frequentatori di spiagge, né si conosce la relazione dose-risposta. Inoltre, nonostante sia stata dimostrata la presenza di livelli non trascurabili (e in alcuni casi più elevati rispetto ai limiti di contaminazione raccomandati dalla *European Food Safety Authority*, EFSA) di ovatossine e altre sostanze palitossina-simili prodotte da *O. cf. ovata* in mitili, echinodermi e pesci, non è noto l'effettivo rischio sanitario posto dal consumo di prodotti ittici contaminati nel Mediterraneo, essenzialmente a causa dei limiti conoscitivi circa il profilo tossicologico delle tossine prodotte durante le fioriture di *O. cf.*

ovata lungo il litorale italiano. Non è noto quale sia il profilo cinetico di accumulo nei prodotti ittici e quindi quale sia la fase in cui la raccolta o l'attività di pesca possano porre i rischi maggiori. Non è infine chiaro il rischio sanitario dovuto ad effetti locali al sito di contatto o ad effetti sistemici successivi ad assorbimento cutaneo in seguito ad attività di balneazione o ricreativa in genere, mancando informazioni che permettano di stabilire una chiara relazione dose effetto (es. la concentrazione di tossina disciolta in acqua durante le fioriture e il suo rapporto relativo con il contenuto intracellulare; una sorveglianza sindromica efficace che raccolga segnalazioni anche di casi non ospedalizzati, ecc.). Queste carenze conoscitive impediscono la definizione completa dei possibili scenari di esposizione e conseguentemente dei gruppi di popolazione più esposti, limitando la possibilità di condurre un'adeguata valutazione del rischio.

A8.1. Carenze conoscitive in ambito sanitario

L'acquisizione di nuovi dati dovrebbe prevedere un piano nazionale di ricerche multidisciplinari che permettano la raccolta di dati sul campo utili anche alla valutazione e gestione degli aspetti sanitari correlati alle fioriture di *O. cf. ovata*. I principali aspetti su cui acquisire nuove conoscenze sono riassunti di seguito:

- isolamento e caratterizzazione chimica delle varie tossine prodotte da *O. cf. ovata* presenti in diverse matrici ambientali e biologiche (biomassa algale e *mat*, acqua, aerosol, organismi acquatici, compresi gli eduli);
- caratterizzazione della presenza di *O. cf. ovata* e delle tossine con tecniche molecolari e chimiche nell'aerosol marino e nelle acque;
- creazione di un database nazionale dei dati di sorveglianza sanitaria da incrociare con i dati di monitoraggio sulle fioriture (come indicato nella reportistica illustrata nel capitolo B4 di questo rapporto);
- caratterizzazione del profilo tossicologico delle tossine prodotte sui litorali italiani (principalmente ovatossine) attraverso le vie di esposizione principali (orale, inalatoria e cutanea) non limitandosi alla tossicità acuta, ma considerando effetti dovuti ad esposizione a dosi ripetute per brevi periodi (tossicità sub-acuta/subcronica), per simulare le reali condizioni di esposizione umana, con definizione di valori limite nelle varie matrici e per i diversi scenari di esposizione;
- caratterizzazione del meccanismo di azione organo-specifico/patogenetico delle tossine e delle possibili interazioni tossicologiche con altre tossine e/o contaminanti frequentemente riscontrati nei prodotti ittici eduli;
- caratterizzazione della tossicocinetica e del bioaccumulo delle tossine in organismi acquatici eduli che vivono nelle aree interessate da fioriture di *O. cf. ovata*;
- caratterizzazione del profilo genetico di popolazioni di *O. cf. ovata* di differenti siti costieri e identificazione di potenziali marker genetici di tossicità.

A8.2. Carenze conoscitive in ambito ambientale

Essendo l'apparente aumento delle fioriture di *Ostreopsis* un problema sentito in tutto il Mediterraneo nonché in molte altre aree extraeuropee (es. coste brasiliane, giapponesi, sud-est asiatico, Nuova Zelanda e Australia), le eventuali ricerche potrebbero collegarsi ad iniziative

internazionali, quali la recente formazione del *Core Research Project BHAB (Benthic Harmful Algal Blooms in ecosystems)* nell'ambito del programma internazionale GEOHAB (*Global Oceanography and Ecology of Harmful Algal Blooms*) patrocinato dal *Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR)* e dall'*Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC)* dell'UNESCO (*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*). Il rapporto del primo meeting del gruppo contiene una sintesi delle recenti acquisizioni e un elenco dettagliato delle priorità di ricerca che attengono principalmente al campo dell'ecologia delle specie del genere *Ostreopsis* (Berdalet *et al.*, 2012):

- creazione di un database nazionale dei dati di monitoraggio e delle conoscenze acquisite sulle fioriture seguendo metodologie e espressione dei risultati armonizzati. Ciò permetterebbe analisi statistiche adeguate per la successiva elaborazione di modelli predittivi finalizzati alla anticipazione delle fioriture. A questo scopo sarebbe opportuno raccogliere e mantenere serie temporali di dati in siti chiave, che permettano di seguire le variazioni a lungo termine delle fioriture e della loro tossicità in relazione alla variabilità inter-annuale nei parametri ambientali. Questo permetterebbe anche di incrementare le conoscenze sui fattori ambientali (morfologia della costa, l'esposizione a correnti, l'idrodinamismo e i tempi di residenza dell'acqua) e meteorologici associati alla comparsa di fioriture e all'accumulo e/o trasporto di *Ostreopsis* spp. in differenti aree costiere;
- messa a punto di metodi per il monitoraggio rapido delle PLTX in siti costieri considerati *hot spot* per le fioriture;
- analisi dei processi fisici che portano all'aerosolizzazione delle tossine;
- studi sull'eventuale impatto delle fioriture sullo stato di specie chiave e/o di interesse commerciale;
- studio del ruolo di altri organismi co-presenti (es. macroalghe, diatomee, altre dinoflagellate, batteri) che potrebbero esercitare un effetto allelopatico su *O. cf. ovata*, influenzare le diverse fasi della fioritura, (inizio, sviluppo e terminazione del *bloom*), regolare la produzione e il rilascio di tossine nell'ambiente o produrre essi stessi tossine;
- individuazione di fattori ecofisiologici (es. formazione e germinazione di cisti, mixotrofia) che regolano la crescita di *O. cf. ovata* e l'espressione dei geni coinvolti nella produzione di palitossine e/o eventuali altre tossine.

Bibliografia

- Berdalet E, Tester P, Zingone A (Ed.). *GEOHAB Core Research Project: HABs in benthic systems*. Paris and Newark: IOC-UNESCO, SCOR; 2012. (GEOHAB Report No. 9).
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.

PARTE B
Linee guida

B1. RAZIONALE PER LA DEFINIZIONE DELLE LINEE GUIDA E CONTESTO INTERNAZIONALE

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

B1.1. Aspetti sanitari

Sulla base di quanto esposto nella Parte A del presente rapporto relativamente alle caratteristiche che accompagnano la comparsa di fioriture, alla segnalazione di effetti avversi sull'uomo sia in Italia che in altri Paesi del Mediterraneo, in parallelo alle informazioni disponibili sul profilo tossicologico delle tossine prodotte da *Ostreopsis cf. ovata*, è possibile trarre alcune conclusioni relativamente agli aspetti sanitari.

Tali conclusioni sono state utilizzate per definire le situazioni di routine, allerta ed emergenza e per costruire una griglia di attività da intraprendere in ciascuna fase, comprese le misure di gestione. I dati disponibili, raccolti anche grazie all'attività messa in atto a seguito delle precedenti linee guida (Ministero della Salute, 2010), non permettono di stabilire consolidate relazioni dose-effetto, per cui le soglie hanno un valore empirico e necessiteranno di essere aggiornate una volta che altri dati si renderanno disponibili. La migliore comprensione del fenomeno ha permesso nella stesura delle presenti linee guida di definire in modo più chiaro quali dati siano necessari per una migliore caratterizzazione del rischio associato alla esposizione alle tossine prodotte da *O. cf. ovata*.

Le vie di esposizione per l'uomo sono tre: orale, cutanea e inalatoria; di seguito verranno analizzate separatamente, anche se è ovviamente possibile che uno stesso individuo possa essere contemporaneamente esposto attraverso tutte e tre le vie durante l'attività di balneazione (es. nuotando).

B1.1.1. Via orale

Nonostante un non trascurabile livello di incertezza legata alla scarsa disponibilità di dati epidemiologici quantitativi con identificazione di una relazione dose-effetto (non essendo possibile quantificare l'esposizione nei casi di intossicazione umana riportati in letteratura), sulla base di dati tossicologici su specie animali, la *European Food Safety Authority* (EFSA) ha derivato una ARfD (*Acute Reference Dose*) orale di 0,2 µg/kg pc, applicabile alla somma di palitossine (PLTX) e ostreocina-D (ost-D). Non ci sono dati tossicologici relativi al gruppo delle ovatossine, che sono le tossine principalmente rilevate nel bacino del Mediterraneo, per cui al momento l'unico approccio possibile è quello di esprimere i dati in PLTX equivalenti (PLTXeq), assumendo un livello simile di tossicità. Questo significa che un individuo del peso di 60 kg può ingerire una dose 'acuta' di 12 µg senza conseguenze significative per la salute.

Su questa base, la concentrazione massima di PLTX (e suoi analoghi) in prodotti ittici non può superare i 30 µg/kg di parte edibile, per un adulto di 60 kg di peso che consumi una porzione da 400 g, considerata dall'EFSA una stima adeguata per proteggere i forti consumatori dai rischi associati ad esposizione acuta a biotossine marine. Dati che mostrino un superamento di questi valori indicano la necessità di prendere le iniziative più opportune per evitare il consumo di prodotti ittici locali provenienti sia dalla pesca professionale che amatoriale.

Ovviamente sarebbe più adeguato un riferimento ad un livello di esposizione protettivo per periodi più lunghi, per simulare esposizioni ripetute.

Non sono disponibili valutazioni del rischio associato ad ingestione involontaria o accidentale di acqua durante la balneazione, che tuttavia può essere stimato sulla base della valutazione dell'EFSA tenendo conto del contenuto intracellulare di PLTXeq.

I pochi dati disponibili in letteratura su campioni ambientali di *O. cf. ovata* in Liguria (Ciminiello *et al.*, 2008) e in Adriatico (Conero e Golfo di Trieste) (Accoroni *et al.*, 2011; Honsell *et al.*, 2011) e nei rapporti dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) su campioni dei monitoraggi provenienti dalla Sicilia (ISPRA, 2012), da Trieste (ISPRA, 2011) e dalla Puglia (ISPRA, 2009) indicano una notevole variabilità nelle quantità totali di PLTXeq/cell, che sono comprese fra 0,01 e 75 pg/cell. L'incertezza aumenta se si considerano ceppi isolati dall'Adriatico e dal Tirreno, nei quali sono state misurate concentrazioni di PLTXeq totali fra 20 e 130 pg/cell (Pistocchi *et al.*, 2012). Meno variabile sembra il contributo percentuale di ogni tossina, in quanto l'ovatossina-a (OVTX-a) rappresenta sempre la componente maggiore, fra il 50 e il 60%, seguita dall'OVTX-b e OVTX-d/e (rispettivamente fra 14 e 30% e fra 2-30%). La palitossina putativa è presente con contenuti fino al 2%. I soli due studi di laboratorio disponibili sulla frazione extracellulare hanno riportato percentuali rispetto al totale fra il 7 e il 16% in fase di crescita esponenziale e fra il 13 e il 27% in fase tardo esponenziale (Guerrini *et al.*, 2010; Pezzolesi *et al.*, 2012).

Sulla base della valutazione dell'EFSA, la soglia di sicurezza rispetto all'esposizione acuta per una persona di 60 kg di peso è di 12 µg PLTXeq. Dunque, nel caso peggiore (vale a dire con il massimo contenuto di tossina per cellula identificato sul campo e considerando trascurabile la frazione disciolta in acqua), ingerendo 100 mL di acqua, questi dovrebbero contenere 160.000 cellule (1.600.000 cell/L di *O. cf. ovata*). Lo stesso calcolo fatto per un bambino di 10 kg, che non dovrebbe ingerire una dose superiore a 2 µg PLTXeq, corrisponde ad una densità di circa 30.000 cellule in 100 mL (300.000 cell/L). Resta incerta la condizione di senescenza della fioritura in cui, in presenza di un numero basso di cellule, la percentuale di tossina disciolta potrebbe essere elevata (anche se l'effetto diluizione non dovrebbe permettere il raggiungimento di concentrazioni molto alte).

Ovviamente la presenza di materiale denso in superficie rappresenta una situazione di elevato rischio.

Sulla base di queste considerazioni, la balneazione dovrebbe essere sconsigliata o vietata al superamento di una densità di 300.000 cell/L e ovviamente in caso di presenza di materiale denso in superficie. Tuttavia, in via cautelativa è preferibile abbassare questa soglia a 100.000 cell/L in ragione dei possibili aumenti di densità in tempi relativamente brevi, del tipo di rischio e tenendo conto di una percentuale di tossina extracellulare stimata empiricamente al 30% (il numero di cellule da considerare si abbasserebbe a 1.100.000 cell/L per un adulto e a 200.000 cell/L per un bambino). La soglia di 100.000 cell/L corrisponde alla soglia di allerta in vigore in Francia dal 2009 (Lemée *et al.*, 2012).

B1.1.2. Via cutanea

I dati tossicologici (su animali e *in vitro*) indicano che la PLTX è irritante per la cute. La comparsa di fenomeni irritativi e infiammatori a carico delle mucose oculari e della cute (es. congiuntiviti e dermatiti) è stata segnalata a seguito di attività di balneazione ed esposizione ad aerosol marino in concomitanza di proliferazioni di *O. cf. ovata* (Gallitelli *et al.*, 2005; Durando *et al.*, 2007; Barroso García *et al.*, 2008; Kermarec *et al.*, 2008; Tichadou *et al.*, 2010). Questi effetti topici sono risultati reversibili in tempi brevi nei pochi casi segnalati rispetto al totale dei bagnanti nei report clinico-epidemiologici disponibili. Sembra quindi di poter concludere che

l'incidenza sia ragionevolmente bassa, anche considerando la possibile sottostima, derivante dal fatto che molti casi lievi potrebbero non essere stati segnalati perché risolti con interventi di automedicazione. Sia in Italia che in Francia casi del genere finora sono stati segnalati solo in corrispondenza di più di 30.000 cell/L in colonna d'acqua. Per proteggere dagli effetti cutanei sembra dunque sufficiente sconsigliare la balneazione per livelli superiori a 30.000 cell/L in colonna d'acqua, valore che in Francia viene utilizzato come soglia empirica di attenzione dal 2009 (Lemée *et al.*, 2012).

Nei report nei quali sono riportati casi di congiuntivite e dermatite, non è stato possibile definire la precisa via di esposizione associata a questi quadri clinici (contatto con l'acqua durante la balneazione o esposizione al solo aerosol o contatto con il substrato).

Inoltre non sono disponibili dati relativi alla concentrazione di tossina disciolta nelle acque di balneazione e nell'aerosol per determinare una relazione dose/effetto.

I dati disponibili relativi ad incidenti occorsi durante il prelievo dei campioni sul substrato bentonico (Honsell *et al.*, 2011) a persone che maneggiavano coralli di acquari, soprattutto in concomitanza a ferite sulle mani, con effetti sistemici rilevanti, suggeriscono la necessità di segnalare possibili rischi per esposizione cutanea a pescatori professionisti e a pescatori amatoriali di molluschi bivalvi. La rilevanza di questo problema è stata evidenziata anche da un'indagine condotta dall'ARPA Puglia, nel 2009 (ISPRA, 2010) che ha riscontrato nelle acque di colatura delle reti utilizzate dalla piccola pesca locale (reti fisse di tipo "Tremaglio") concentrazioni molto elevate (112.000.000 cell/L) di *O. cf. ovata*.

B1.1.3. Via inalatoria

Sulla base delle osservazioni sui casi di intossicazione umana riportate finora, sembra che i casi si siano verificati alla presenza di oltre 30.000 cell/L in colonna d'acqua e contemporanee condizioni meteo-marine favorevoli alla formazione di aerosol (forte vento e mareggiate).

A queste densità e condizioni meteo-marine è opportuno sconsigliare o vietare la balneazione e l'accesso alla spiaggia e alle zone limitrofe (es. lungomare per il tratto di estensione della fioritura).

B1.2. Contesto internazionale

Oltre la valutazione dell'EFSA per quanto riguarda i livelli di PLTXeq nei bivalvi (30 µg di palitossina e dell'analogo ostreocina-D per kg) (EFSA, 2009), attualmente non sono disponibili linee guida, valori soglia, standard in ambito dell'Unione Europea (UE), dell'Organizzazione Mondiale della Sanità o di altri organismi internazionali.

A livello di Stati Membri dell'UE, l'Italia ha adottato nel 2007 e pubblicato nel DM 30 marzo del 2010 le linee guida per la gestione delle fioriture di *O. cf. ovata* (Ministero della Salute, 2010).

La Francia dal 2007 ha applicato un approccio "empirico" basato sulle concentrazioni di *Ostreopsis* in colonna d'acqua, con una soglia di attenzione di 4.000 cell/L e di allerta di 30.000 cell/L. Dopo l'esperienza maturata durante due stagioni balneari, con moltissime segnalazioni di superamenti di queste soglie non associati ad effetti sanitari, dal 2009 i rispettivi valori sono stati aumentati a 30.000 cell/L e 100.000 cell/L, tenendo conto delle condizioni meteo-marine favorevoli alla formazione di aerosol o spruzzi (Lemée *et al.*, 2012). È stata data molta importanza alla prevenzione di esposizioni pericolose attraverso un'adeguata informazione al pubblico e restrizioni temporanee alla balneazione. Nei siti interessati da fioriture di *O. cf. ovata*

sono stati osservati superamenti dei valori limite in frutti di mare che hanno imposto il divieto del consumo di questi prodotti. Molto risalto viene dato al ruolo delle strutture locali che sono nella posizione migliore per gestire questo problema, analogamente a quello delle meduse, e prevedere ed evitare esposizioni dannose all'acqua, all'aerosol e a spruzzi.

La sorveglianza sanitaria è organizzata su due livelli. Appartengono al primo livello centri e scuole di immersione, personale addetto alla sorveglianza e al campionamento, farmacie lungo il litorale. Da questo livello vengono inviate segnalazioni di casi sospetti ad un centro di riferimento. Al secondo livello appartengono servizi di pronto soccorso e le altre strutture sanitarie presenti nel territorio.

I casi sospetti sono persone a diretto contatto (nuoto, immersioni) o vicino al mare (frequenza spiaggia o al mare, pesca, vela, kayak, immersioni), che hanno presentato 2-6 ore dopo il contatto con acqua di mare o spruzzo almeno due dei sintomi associabili ad esposizione diretta o indiretta ad *O. cf. ovata*.

Una struttura sanitaria locale è incaricata di verificare, confermare e fornire la descrizione clinica dei casi sospetti se si tratta di almeno due casi segnalati, lo stesso giorno dalla stessa spiaggia, con sindromi respiratorie febbrili e/o irritazioni cutanee. In caso di conferma vengono avviati test rapidi per controllare la presenza o l'assenza di *Ostreopsis* nel sito di balneazione.

Gli attori di primo e secondo livello vengono ovviamente informati sulla problematica delle fioriture di *O. cf. ovata* e sulle procedure per la segnalazione e la prevenzione del rischio, con apposito materiale informativo. Infine, i medici della zona sono a conoscenza dal 2009 della problematica essendo stati informati tramite un Bollettino Medico Regionale.

Bibliografia

- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Tartaglione L, Penna A, Totti C. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar Pollut Bull* 2011;62(11):2512-9.
- Barroso García P, Rueda de la Puerta P, Parrón Carreño T, Marín Martínez P, Guillén Enríquez J. Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas. *Gac Sanit* 2008;22:578-84.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. 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* 2008;19(1):111-20.
- Durando P, Ansaldi F, Oreste P, Moscatelli P, Marensi L, Grillo C, Gasparini R, Icardi G. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two years syndromic surveillance, 2005-2006, in Northwest Italy. *Euro Surveill* 2007;12(23).
- EFSA. Marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 2009;7(12):1393:1-38.
- Gallitelli M, Ungaro N, Addante LM, Procacci V, Gentiloni N, Sabbà C. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA* 2005;293:2599-600.
- Guerrini F, Pezzolesi L, Feller A, Riccardi M, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Pistocchi R. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 2010;55(2-3):211-20.
- Honsell G, Bonifacio A, De Bortoli M, Penna A, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Sosa S, Yasumoto T, Tubaro A. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A multidisciplinary approach. *PLoS ONE* 2013;8(2):e57291.

- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA, Rapporti 127/2010).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011. (ISPRA, Rapporti 148/2011).
- ISPRA. *Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane: monitoraggio 2011*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. (ISPRA, Rapporti 173/2012).
- Kermarec F, Dor F, Armengaud A, Charlet F, Kantin R, Sauzade D, de Haro L. Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Env Risques Santé* 2008;7:357-63.
- Lemée R, Mangialajo L, Cohu S, Amzil Z, Blanfuné A, Chomerat N, Ganzin N, Gasparini S, Grossel H, Guidi-Guivard L, Hoareau L, Le Duff F, Marro S, Simon N, Nezan E, Pedrotti M-L, Sechet V, Soliveres O, Thibaut T. Interactions between scientists, managers and policy makers in the framework of the French MediOs project on *Ostreopsis* (2008-2010). *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):137-42.
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.
- Pezzolesi L, Guerrini F, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Pistocchi R. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Wat Res* 2012;46(1):82-92.
- Pistocchi R, Guerrini F, Pezzolesi L, Riccardi M, Vanucci S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Fattorusso E, Tartaglione L, Milandri A, Pompei M, Cangini M, Pigozzi S, Riccardi E. Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic Sea—15 years of studies on cultured species. *Mar Drugs* 2012;10:140-62.
- Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grossel H, Lemée R, Kantin R, Lasalle JL, Drouet G, Rambaud L, Malfait P, de Haro L. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin Toxicol (Phila)* 2010;48:839-44.

B2. PIANO DI SORVEGLIANZA

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le attività di sorveglianza vanno svolte durante la stagione balneare e comprendono il monitoraggio di *Ostreopsis cf. ovata* nelle acque di balneazione e la sorveglianza sanitaria nelle aree costiere. Queste attività hanno l'obiettivo di prevenire danni alla salute associabili a *O. cf. ovata* dei frequentatori delle spiagge e dei litorali e di ridurre al minimo l'insorgenza di sintomi dovuti al contatto con acqua interessata da fioriture. Queste attività devono pertanto permettere di identificare precocemente la presenza di *O. cf. ovata* nell'ambiente marino e i casi umani sospetti correlabili all'esposizione a questa alga. Le autorità sanitarie dovranno essere tempestivamente informate in modo da promuovere le misure di gestione più adeguate. Le attività di sorveglianza sono svolte da vari attori istituzionali, che ovviamente dovrebbero trovare le migliori forme di collaborazione.

B2.1. Monitoraggio ambientale di *Ostreopsis cf. ovata* nelle aree costiere

Gli effetti avversi sopra riassunti sono dovuti alle diverse modalità di esposizione alle tossine del gruppo palitossine (PLTX); di conseguenza le attività di monitoraggio ambientale dovrebbero essere condotte in modo da valutare direttamente (analisi delle tossine) o indirettamente (conta delle densità di *O. cf. ovata*) queste esposizioni. Ovviamente vanno controllate le matrici di interesse sanitario: l'acqua che può essere ingerita e con la quale si è a contatto durante la balneazione e l'aerosol. In alcuni casi è possibile il contatto diretto con il substrato interessato da fioriture. Poiché le concentrazioni di *Ostreopsis* possono essere variabili a causa di correnti e condizioni idrodinamiche (Lemée *et al.*, 2012; ISPRA, 2013), il prelievo del campione dovrebbe essere per quanto possibile rappresentativo della colonna d'acqua nell'area di balneazione (vedi capitolo C1). È inoltre utile disporre di dati e informazioni complementari riguardanti l'osservazione visiva e la presenza di *O. cf. ovata* sui fondali (estensione delle fioriture e tratti di litorale interessati).

L'osservazione visiva potrebbe riguardare:

- presenza in superficie di schiuma, acqua leggermente torbida, sospensioni di consistenza gelatinosa;
- presenza sotto la superficie di fiocchi sospesi, brunastri;
- presenza sul fondale di una pellicola marrone membranosa che avvolge le rocce, le macroalghe e tutto ciò che è sul fondo;
- segni di sofferenza in alcuni organismi marini;
- sensazione di un gusto metallico dell'acqua in caso di ingestione accidentale.

Queste informazioni dovrebbero essere segnalate alle sezioni territoriali ARPA oltre che dal personale impegnato nei prelievi dell'acqua, dai bagnini, dalle scuole di immersione, dai frequentatori del litorale.

Il monitoraggio va effettuato nelle aree nelle quali si sono verificate frequenti, intense ed estese fioriture di *O. cf. ovata* (aree a rischio elevato), o in cui, sulla base delle loro

caratteristiche sia possibile ipotizzare che si possano verificare (aree a rischio medio). Le aree a rischio medio vengono selezionate in relazione alle loro caratteristiche geomorfologiche (insenature, presenza di frangiflutti, tipo di fondale e profondità,) e fisiche (temperatura dell'acqua, idrodinamismo, vento). In effetti l'esperienza finora maturata indica che siti protetti e poco profondi quali baie semichiusate, insenature, zone retrostanti barriere frangiflutti, sono maggiormente a rischio e presentano tipicamente abbondanze più elevate che siti esposti al moto ondoso, a causa dello scarso idrodinamismo.

Le aree costiere a rischio elevato e a rischio medio e i rispettivi punti di campionamento in buona parte sono già stati individuati e monitorati dalle singole Regioni sia a seguito dell'applicazione delle precedenti linee guida del 2007 e della Legge 979/1982 (Italia, 1983), che ai sensi del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010) e dei protocolli operativi dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) (ISPRA, 2013).

Ad ogni modo la definizione di tali punti dovrebbe essere basata sulla maggiore probabilità di presenza di densità elevate di *O. cf. ovata* e della maggiore frequentazione da parte dei bagnanti.

Tuttavia la diffusione di *O. cf. ovata* sembra essere un fenomeno dinamico in espansione, pertanto non si può escludere che ulteriori aree possano essere nel futuro interessate da frequenti fioriture e debbano quindi essere soggette ad attività di sorveglianza. La lista delle aree a rischio medio/alto dovrebbe essere quindi aggiornata ogni anno, sulla base dei dati pregressi e delle nuove aree individuate a seguito di segnalazioni o ispezioni visive da parte del personale tecnico che effettua il monitoraggio di balneazione. Le aree che non rispondono a queste caratteristiche sono considerate a basso rischio e pertanto non soggette ad attività di monitoraggio di routine.

La frequenza del monitoraggio è modulata in base alla fase e al profilo di rischio della zona interessata:

– **Fase di routine**

Questa va svolta da giugno a settembre con una frequenza quindicinale ed è intensificata in caso di presenza di fioritura. Questa fase è propedeutica alla preparazione delle fasi successive. Sono comprese in questa fase le seguenti situazioni:

- 1) densità cellulare in colonna d'acqua ≤ 10.000 cell/L indipendentemente dalle condizioni meteo-marine;
- 2) densità cellulare in colonna d'acqua 10.000-30.000 cell/L in concomitanza di condizioni meteorologiche sfavorevoli alla fioritura per un prolungato periodo (7-10 giorni).

Valutazione e prevenzione del rischio per la salute umana

I rischi sanitari in queste condizioni sono trascurabili e non ci sono azioni da intraprendere. Nel caso in cui ci fossero segnalazioni di possibili effetti si dovranno prendere le necessarie misure di prevenzione sanitaria e avviare le attività previste nella fase di allerta.

– **Fase di allerta**

Si verifica in due condizioni:

- 1) densità di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua 10.000-30.000 cell/L e condizioni meteo-marine favorevoli ad uno sviluppo della fioritura per un prolungato periodo (7-10 giorni).
- 2) densità di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua 30.000-100.000 cell/L, e condizioni meteorologiche sfavorevoli alla formazione di aerosol e/o spruzzi d'acqua sulla spiaggia (forti venti e mareggiate).

Valutazione e prevenzione del rischio per la salute umana

In queste condizioni è possibile che si verifichino effetti irritativi a carico della cute e delle mucose oculari nei bagnanti, comunque a bassa incidenza e reversibili entro poche

ore: pertanto è opportuno che la popolazione sia informata. Non si ritiene invece che queste densità possano dar luogo ad effetti sistemici associati ad ingestione involontaria o accidentale di acqua durante le attività di balneazione.

Dovrebbe essere anche fornita adeguata informazione ai pescatori professionali e amatoriali circa i rischi associati con l'esposizione cutanea (es. manipolazione delle reti e raccolta di molluschi soprattutto in presenza di ferite) e con il consumo di prodotti ittici raccolti nell'area interessata dalla fioritura.

Potrebbero essere sconsigliate attività ricreative che danno luogo a formazione di aerosol nelle aree delimitate (moto d'acqua, sci nautico, windsurf, canottaggio, ecc.).

Attività da svolgere

- definire l'estensione dell'area interessata dalla fioritura
- attivare il piano di sorveglianza sanitaria
- intensificare la frequenza delle osservazioni e il monitoraggio delle tossine totali e disciolte in acqua
- determinare le tossine nei prodotti ittici
- informare le autorità sanitarie per le opportune misure di gestione.

Misure di gestione

Il Sindaco, in quanto autorità sanitaria locale, a seguito delle informazioni ricevute da Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) e Azienda Sanitaria Locale (ASL), comunica al Ministero della Salute e al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare le misure di gestione messe in atto in questa fase per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose (segnaletica, bollettini, sistemi informativi locali, opuscoli, ordinanze).

– Fase di emergenza

Corrisponde a tre situazioni:

- 1) densità di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua >30.000 cell/L in condizioni meteorologiche favorevoli alla formazione di aerosol e spruzzi (venti forti da mare e mareggiate).
- 2) densità di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua >100.000 cell/L, indipendentemente dalle condizioni meteorologiche.
- 3) presenza in superficie di materiale denso derivante da fioriture di *O. cf. ovata*.

Ovviamente si è in fase di emergenza anche nelle situazioni nelle quali sono stati segnalati e confermati casi di effetti sanitari associabili ad esposizione ad *O. cf. ovata*.

Valutazione e prevenzione del rischio per la salute umana

Le condizioni di cui al punto 1 possono dar luogo a quadri clinici non gravi (dermatiti, congiuntiviti, disturbi alle alte vie respiratorie, come descritto nel capitolo A6) a carico di persone che frequentano le spiagge e i tratti di litorale interessati. Le autorità sanitarie locali sono tenute a prendere le opportune misure di prevenzione.

Nelle condizioni di cui al punto 2 e 3, il rischio di insorgenza di quadri clinici a carattere sistemico derivanti da ingestione involontaria o accidentale di acqua può essere significativo, pertanto si ritiene necessario vietare la balneazione.

Le misure di divieto dovrebbero essere estese anche alle altre attività ricreative praticate nell'area delimitata.

Attività da svolgere

Oltre alle attività previste nella fase di allerta sarebbe opportuno procedere alla quantificazione delle PLTXeq nell'aerosol.

Misure di gestione

Il Sindaco, in quanto autorità sanitaria locale, a seguito delle informazioni ricevute da ARPA o ASL, comunica al Ministero della Salute e al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare le misure di gestione messe in atto in questa fase per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose, compresi eventuali divieti temporanei di frequentazione dell'arenile e di balneazione.

Nelle fasi di allerta e di emergenza l'informazione al pubblico è fornita attraverso i diversi portali istituzionali nazionali e locali (Ministero della Salute, Regioni, ASL, Comuni), i bollettini, la segnaletica, la cartellonistica sulla spiaggia (vedi capitolo B4).

B2.2. Sorveglianza sanitaria

Sulla base delle informazioni acquisite nel bacino del Mediterraneo, solo raramente la presenza di fioriture ed elevate densità di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua è stata associata ad insorgenza di effetti avversi per la salute umana. Inoltre i casi clinici descritti non sono mai risultati rilevanti, la sintomatologia riportata è risultata reversibile con risoluzione completa entro poche ore dal fatto acuto. Queste considerazioni dovrebbero dunque condurre alla conclusione che la predisposizione di un sistema di notifica non è sufficientemente motivato. Tuttavia, nel bacino del Mediterraneo i casi segnalati hanno riguardato centinaia di persone e quando si sono verificati in forma epidemica hanno comportato l'affollamento delle strutture sanitarie (guardia medica, pronto soccorso) con la possibilità di disservizi presso le strutture sanitarie interessate. Le linee guida presentate di seguito hanno lo scopo di fornire i principali elementi per prevenire situazioni in grado di determinare episodi rilevanti per la sanità pubblica.

In questo paragrafo vengono formulati alcuni suggerimenti, schematizzati nella Figura 1, per predisporre un'attività di sorveglianza sanitaria appropriatamente commisurata al problema in questione.

Sulla falsariga dell'esperienza francese sopra descritta, si potrebbe promuovere un sistema integrato di sorveglianza degli eventi sanitari associati a *O. cf. ovata*, coinvolgendo da un lato gli operatori che, per la loro attività lavorativa, sono a contatto con un grande numero di bagnanti e frequentatori di spiagge e litorali, come i bagnini, i pescatori, le scuole di nuoto e immersione, i farmacisti, il personale addetto ai campionamenti dell'acqua, dall'altro i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL, i medici di medicina generale e pediatri di famiglia, i farmacisti sul territorio nonché il personale sanitario dei Pronto soccorsi degli ospedali. Nelle zone dove si verificano fioriture di *O. cf. ovata* gli operatori dei settori sopra elencati dovrebbero essere informati prima della stagione balneare con apposito materiale (es. opuscoli, brochure, siti web) o attraverso incontri. In questo modo potrebbero essere messi nelle condizioni di riconoscere alcuni dei sintomi specifici in soggetti che abbiano avuto contatto diretto con l'acqua (nuoto, tuffi), o abbiano sostato nelle immediate vicinanze del mare (presenza in spiaggia o sul litorale), praticato pesca, vela, kayak, immersioni, ecc. (vedi capitolo C2).

Questo sistema di sorveglianza e informazione potrebbe essere esteso anche ad altri fattori di rischio presenti in acque di balneazione costiere (es. meduse, altri organismi acquatici, insetti) e agli incidenti di varia natura. Per raccogliere queste informazioni sarebbe auspicabile elaborare una apposita scheda.

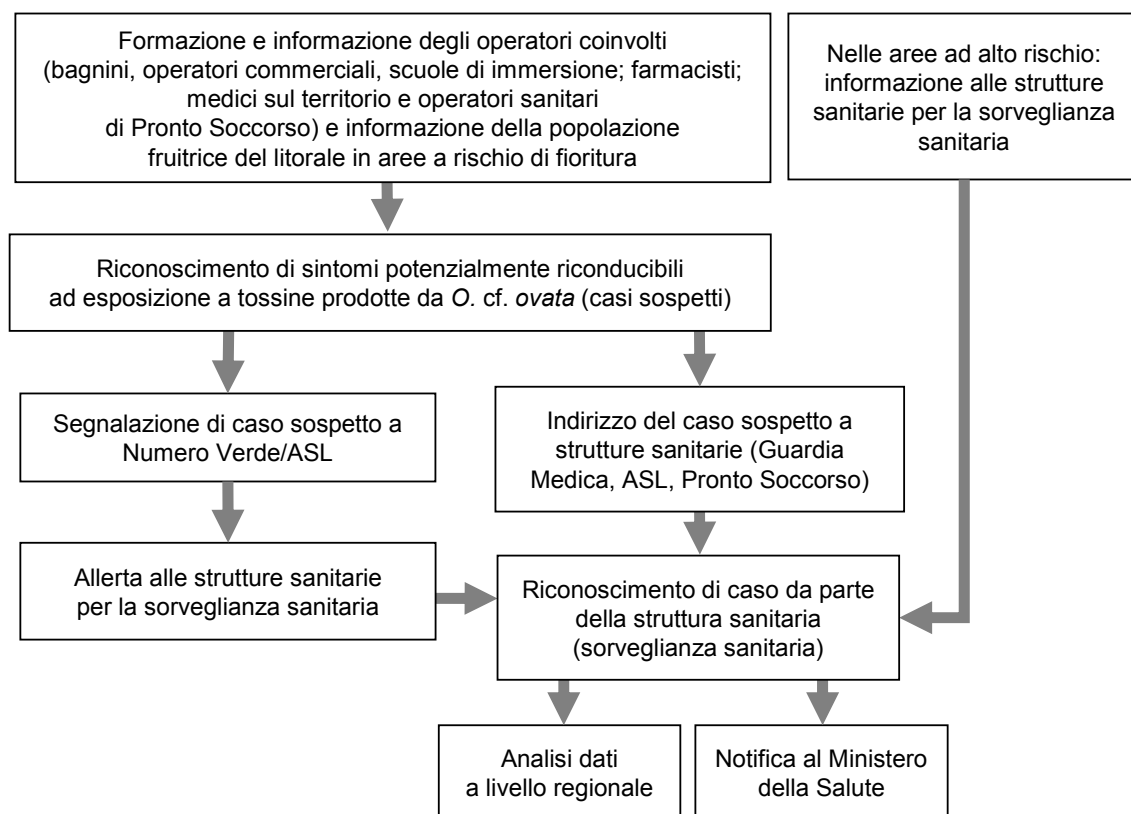


Figura 1. Schema di un possibile flusso di attività per la sorveglianza sanitaria a livello locale

Una volta individuati i possibili casi sospetti gli operatori dovrebbero:

- a) segnalarli ad uno specifico numero verde (o qualsiasi altra forma sia considerata adeguata a livello locale) messo a disposizione dalla ASL;
- b) suggerire eventualmente di ricorrere ad assistenza medica (medici di medicina generale, pediatri di famiglia, struttura sanitaria più vicina).

Ovviamente l'autorità sanitaria che riceve segnalazioni di casi sospetti dovrà fare le opportune verifiche, confermare i casi e descriverli da un punto di vista clinico-epidemiologico. In caso di conferma dovrebbe richiedere accertamenti rapidi sulla presenza di *O. cf. ovata* nel sito di balneazione interessato o sospetto. L'autorità sanitaria potrà quindi valutare l'opportunità di attivare una sorveglianza sanitaria, promuovere azioni di informazione e prevenzione nei confronti del pubblico, e richiedere l'intensificazione delle attività di monitoraggio clinico-epidemiologico e ambientale. L'utilità di queste segnalazioni e del successivo riconoscimento di 'caso' è indubbia in quanto permetterebbe da un lato di prevenire l'insorgere di episodi epidemici e di esposizioni potenzialmente più pericolose; dall'altro una migliore individuazione di aree critiche non ancora segnalate.

È infine opportuno che queste segnalazioni e i casi accertati vengano raccolti ed elaborati a livello regionale e nazionale.

Inoltre nelle aree nelle quali si sono già verificati episodi epidemici di casi riconducibili ad esposizione ad aerosol si consiglia di predisporre/implementare un sistema di sorveglianza sanitaria dedicato. La struttura sanitaria coinvolta dovrebbe utilizzare le indicazioni del Capitolo C2, dove sono riportate le definizioni di 'caso' per le varie vie di esposizione e le indicazioni

che possono essere utilizzate dai medici per la raccolta e la successiva elaborazione dei dati. Nel Capitolo C2 sono suggeriti anche i campioni biologici da prelevare, alcune analisi ematocliniche da effettuare e indicazioni per la diagnosi e il trattamento dei pazienti.

Le strutture sanitarie dovrebbero segnalare gli accessi e i ricoveri corrispondenti alla definizione di caso ad un centro coordinatore su base regionale, responsabile dell'analisi e dell'elaborazione dei dati che notificherà al Ministero della Salute.

Allegato al capitolo si riporta lo schema riassuntivo delle fasi della sorveglianza e delle azioni da intraprendere nelle aree a rischio di fioritura.

Bibliografia

- Italia. Legge 31 dicembre 1982, n. 979. Disposizioni per la difesa del mare. *Gazzetta Ufficiale - Suppl. Ordinario* n.16 del 18 gennaio 1983.
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.
- ISPRA. *Monitoraggio e sorveglianza delle fioriture di Ostreopsis cf. ovata lungo le coste italiane. Anno 2012*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2013. (ISPRA, Rapporti 188/2013).
- Lemée R, Mangialajo L, Cohu S, Amzil Z, Blanfuné A, Chomerat N, Ganzin N, Gasparini S, Grossel H, Guidi-Guivard L, Hoareau L, Le Duff F, Marro S, Simon N, Nezan E, Pedrotti M-L, Sechet V, Soliveres O, Thibaut T. Interactions between scientists, managers and policy makers in the framework of the French MediOs project on *Ostreopsis* (2008-2010). *Cryptogamie, Algologie*, 2012;33(2):137-42.

Allegato al capitolo B2

**Fasi del piano di sorveglianza e azioni da intraprendere
nelle aree ad elevato e medio rischio di fioritura di *Ostreopsis cf. ovata***

Fasi del piano *	Livelli di rischio sanitario	Attività previste	Misure di gestione
FASE DI ROUTINE			
1. Densità in colonna d'acqua ≤10.000 cell/L Indipendentemente da condizioni meteorologiche	Trascurabile	• Osservazioni e/o monitoraggio di routine mensile	Nessuna
2. Densità in colonna d'acqua 10.000-30.000 cell/L Periodo prolungato con sufficiente idrodinamismo e temperature molto inferiori a quelle di fioritura**			
FASE DI ALLERTA			
1. Densità in colonna d'acqua 10.000-30.000 cell/L Periodo prolungato con scarso idrodinamismo e temperature ottimali di fioritura**	Trascurabile	• Intensificazione monitoraggio • Valutazione estensione dell'area interessata • Sorveglianza sanitaria • Osservazione stato di salute degli organismi acquatici eduli	Il Sindaco comunica a Ministero della Salute e Ministero dell'Ambiente le misure per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose
2. Densità in colonna d'acqua 30.000-100.000 cell/L Condizioni meteo sfavorevoli a formazione di aerosol e spruzzi	Contatto e inalazione: possibili sintomi e/o segni locali e sistemici lievi	• Analisi chimica di tossine in prodotti ittici e acqua • Informazioni ad autorità sanitarie	
FASE DI EMERGENZA			
1. Densità in colonna d'acqua >30.000 cell/L Condizioni meteo-marine favorevoli alla formazione di aerosol e spruzzi d'acqua	Contatto: possibili sintomi e/o segni locali. Inalazione: possibili sintomi e/o segni locali, disturbi respiratori, effetti sistemici	• Attività svolte in Fase di allerta • Analisi tossine in aerosol • Pulizia battigia in caso di mareggiata	Il Sindaco comunica a Ministero della Salute e Ministero dell'Ambiente le misure per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose, indicando le misure di prevenzione adottate e le eventuali azioni intraprese (cartellonistica, bollettini, segnaletica, pubblicazioni sui portali nazionali e regionali; eventuali ordinanze sindacali di divieto)
2. Densità in colonna d'acqua >100.000 cell/L indipendentemente dalle condizioni meteorologiche	Ingestione: possibili sintomi e/o segni locali da contatto; rischio di effetti sistemici		
3. Presenza di materiale denso in superficie			
4. Segnalazioni di tipo sanitario associabili all'esposizione durante la fioritura			

* definite in base al numero di cellule di *O. cf. ovata* e delle condizioni ambientali e meteorologiche

** le temperature variano a seconda della regione interessata

B3. CONFERIMENTO DEI DATI E REPORTISTICA

Patrizia Borrello (a)*, Liana Gramaccioni (b)*, Maura Manganelli (c)

(a) *Dipartimento Tutela Acque Interne e Marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

(b) *DG Prevenzione Sanitaria, Ministero della Salute*

(c) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

* *patrizia.borrello@isprambiente.it; l.gramaccioni@sanita.it*

B3.1. Stato dell'arte

Il profilo ambientale delle acque di balneazione all'Allegato E del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010) (Direttiva 2006/7/CE e DL.vo 116/2008) (Europa, 2006; Italia, 2008), istituito e aggiornato dalle Regioni, prevede nella Sezione 4.5 la "Valutazione del potenziale di proliferazione di macroalghe e/o fitoplancton e/o specie potenzialmente tossiche" e quindi degli eventi di fioritura della microalga bentonica *Ostreopsis cf. ovata*.

A tale finalità nella suddetta sezione vengono segnalati, per l'informazione al cittadino, gli eventi pregressi di fioritura e gli eventuali effetti tossici rilevati sui bagnanti e sull'ecosistema acquatico oltre che le principali misure di gestione adottate (es. divieti, programma di sorveglianza e monitoraggio, ecc.).

I profili ambientali delle acque di balneazione sono consultabili oltre che sui siti regionali anche nel Portale Acque del Ministero della Salute.

Per quanto riguarda i dati di abbondanza di *O. cf. ovata* risultanti dai programmi di monitoraggio nazionali e regionali (vedi capitolo A2) attuati dalle Regioni per il tramite delle Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA), questi vengono pubblicati periodicamente, sotto forma di bollettini, sui siti delle stesse Agenzie. Tali dati sono stati raccolti a livello nazionale, a partire dal 2007, dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici (APAT, dal 2008 trasformata in Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, ISPRA), nell'ambito della linea di attività APAT/ARPA "Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane" in ottemperanza alla Direttiva Programma Alghe Tossiche GAB/2006/6741/B01 del Ministro dell'Ambiente (APAT, 2007) mediante caricamento sul sito dedicato e pubblicati nei rapporti dell'ISPRA.

Le stesse informazioni (e quelle derivanti dai monitoraggi futuri) sono state (e saranno) utilizzate per le finalità della Direttiva quadro europea sulla strategia marina 2008/56/CE (nota come MSFD, *Marine Strategy Framework Directive*) (Europa, 2008) recepita a livello nazionale con DL.vo 190/2010 (Italia, 2010a). In particolare, i dati esistenti sulla presenza e fioriture di *O. cf. ovata* lungo le coste italiane sono stati utilizzati per la valutazione dello stato iniziale dell'ambiente marino ai sensi dell'art. 8 del DL.vo 190/2010 e sono contenuti in un report previsto all'art. 19(3) della MSFD. L'art. 19(3) prescrive che gli Stati Membri mettano a disposizione della Commissione Europea e dell'Agenzia Europea dell'Ambiente gli strati informativi e documentali sui quali si basa la valutazione iniziale, la definizione del buono stato ambientale e dei traguardi ambientali di cui agli art. 8, 9 e 10. Secondo il percorso proposto dall'Agenzia Europea dell'Ambiente e approvato dalla Commissione Europea, gli stati membri predispongono e pubblicano un catalogo di dati, metadati e documenti a supporto del Report previsto dalla Direttiva di cui agli art. 8, 9 e 10. Per l'Italia, ISPRA ha il compito di garantire

tale meccanismo di reporting alla Commissione Europea. Nel report della MSFD i dati su *O. cf. ovata* sono stati forniti come dataset cartografico, dataset analitico e documenti testuali.

La MSFD inoltre, si integra con la Direttiva INSPIRE (*Infrastructure for Spatial Information in the European Community*) (Direttiva 2007/2/CE recepita con DL.vo 27 gennaio 2010 n. 32) (Europa, 2007; Italia, 2010b) che istituisce un'infrastruttura per l'informazione territoriale nella Comunità europea.

B3.2. Flussi informativi

Alla luce delle nuove linee guida i dati dovranno essere conferiti al Ministero della Salute attraverso il Portale Acque e ad ISPRA attraverso il Sistema Informativo Nazionale per la Tutela delle Acque Italiane (SINTAI), sulla base di quanto previsto dalle norme vigenti, secondo la modulistica allegata al capitolo. I referenti del monitoraggio ambientale delle ARPA e delle Regioni accreditati potranno accedere al Portale Acque del Ministero della Salute (<http://www.portaleacque.salute.gov.it/>) e al SINTAI di ISPRA <http://www.sintai.sinanet.apat.it> e trasmettere la scheda debitamente compilata.

Il Portale Acque riceverà inoltre le schede sanitarie con i casi associabili ad esposizione a *O. cf. ovata* secondo la modulistica descritta nel capitolo C2. Questa scheda dovrà essere trasmessa entro le 24 ore successive l'evento o inviata al seguente indirizzo di posta elettronica DGprevenzione@sanita.it.

Annualmente verrà elaborato e pubblicato dall'Istituto Superiore di Sanità un report nazionale nel quale saranno analizzati i dati con particolare attenzione agli aspetti sanitari. ISPRA continuerà ad elaborare e pubblicare i report nazionali sull'andamento delle fioriture, gli eventuali impatti sull'ambiente e sugli organismi bentonici.

B3.3. Raccolta dei dati e reportistica

È stata elaborata una scheda (in allegato al capitolo) per il conferimento dei dati al Portale Acque del Ministero della Salute e a ISPRA per il monitoraggio delle fioriture di *O. cf. ovata* nelle acque di balneazione selezionate. La scheda si riferisce alle singole acque di balneazione definite con codice ID.

La scheda è divisa in due parti, una relativa ai dati da raccogliere durante il campionamento e una con i parametri da analizzare in laboratorio; contiene tutte le informazioni necessarie per la conoscenza del fenomeno e per la gestione dello stesso.

Alcuni parametri possono essere misurati con sonde multiparametriche e sono richiesti solo se l'unità preposta al campionamento ne possiede una.

La determinazione dei nutrienti, da effettuare in laboratorio, è facoltativa, così come la ricerca delle palitossine negli organismi acquatici, anche in funzione della strumentazione a disposizione del laboratorio che effettua le analisi.

I dati saranno analizzati a livello regionale e nazionale:

- *Sintesi a livello regionale o interregionale*

È una sintesi descrittiva stagionale preparata dalle Regioni, che include: spiagge interessate da fioriture di *O. cf. ovata*, livelli di tossine nell'acqua e negli organismi, trend, misure di gestione, informazione al pubblico ed eventuali casi sanitari.

– *Sintesi per il territorio nazionale*

Annualmente sarà elaborato dall'ISS un Report nazionale con l'analisi dei dati e particolare attenzione agli aspetti sanitari. Il Report dovrà offrire un quadro d'insieme con l'evidenziazione delle situazioni di maggiore criticità, i trend, le azioni di recupero intraprese e da intraprendere, le raccomandazioni.

ISPRA continuerà ad elaborare e pubblicare i report nazionali sull'andamento delle fioriture, gli eventuali impatti ambientali e sugli organismi bentonici.

Bibliografia

- APAT. *Direttiva programma alghe tossiche. Protocolli operativi. Linea di attività: Fioriture algali di Ostreopsis ovata lungo le coste italiane*. Roma: Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici; 2007. Disponibile al sito <http://www.isprambiente.gov.it/files/alghe-tossiche/protocolli-operativi-direttiva-alghe-tossiche.pdf>; ultima consultazione 13/11/14.
- Europa. Direttiva 2006/7/Ce del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 febbraio 2006 relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE Europa. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L64/37, del 4 marzo 2006.
- Europa. Direttiva 2008/56/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 giugno 2008 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino (direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L164/19, del 25 giugno 2008.
- Europa. Direttiva 2007/2/ce del Parlamento europeo e del Consiglio del 14 marzo 2007 che istituisce un'infrastruttura per l'informazione territoriale nella Comunità europea (Inspire). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L108/1, del 25 aprile 2007.
- Italia. Decreto Legislativo 30 maggio 2008, n. 116. Attuazione della direttiva 2006/7/CE relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e abrogazione della direttiva 76/160/CEE. *Gazzetta Ufficiale* n. 155, del 4 luglio 2008.
- Italia. Decreto Legislativo 13 ottobre 2010, n.190. Attuazione della direttiva 2008/56/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino. *Gazzetta Ufficiale* n. 270, del 18 novembre 2010a.
- Italia. Decreto Legislativo 27 gennaio 2010 , n. 32. Attuazione della direttiva 2007/2/CE, che istituisce un'infrastruttura per l'informazione territoriale nella Comunità europea (INSPIRE). *Gazzetta Ufficiale – Serie generale* n. 56, del 9 marzo 2010b. *Supplemento ordinario* n. 47/L
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.

Allegato al capitolo B3

Scheda per la raccolta dati su *Ostreopsis cf. ovata*

(da compilare e trasmettere agli uffici competenti)

Data |_|_|||_|_|||_|_| ora |_|_|||_|_|
 (giorno, mese, anno) (ora, minuti)

Area di balneazione		ID	Coordinate geografiche	Regione, provincia, comune
Punto di monitoraggio		Coordinate geografiche	Profondità	Distanza dalla costa
		Tipo di fondale		
Condizioni meteo-climatiche				
Idrodinamismo	☐ assente	☐ moderato	☐ forte	
Forza del vento	☐ assente	☐ moderato	☐ forte	
Direzione del vento	☐ verso terra	☐ verso mare	☐ altro	
Condizioni metereologiche	☐ pioggia	☐ nuvoloso	☐ soleggiato	
Condizioni meteo-marine degli ultimi 5 giorni				
Note (<i>morie di organismi acquatici, altre osservazioni</i>)				
.....				
.....				
.....				
.....				
Fioritura				
Presenza di materiale visibile di (schiume marrone-rossastro, flocculi, patina)		☐ no ☐ sì		
Collocazione del materiale		☐ fondo ☐ colonna ☐ superficie		
Litorale interessato:		estensione (in metri)		
		area ☐ di balneazione		
		☐ non adibita alla balneazione		
Campionamento				
Temperatura	☐ colonna d'acqua	☐ materiale visibile		
	acqua __ _ _ , __ °C	e aria __ _ _ , __ °C		
Dati facoltativi (se disponibile sonda multiparametrica)	Salinità (psu)	__ _ _	pH	__ _ _ , __
	OD*	__ _ _ , __	OD%	__ _ _ , __
	Chl a	__ _ _ , __	PAR	__ _ _ , __
	PercPar	__ _ _ , __	RefPAR	__ _ _ , __

RISULTATI delle analisi di laboratorio

	ACQUA					SUBSTRATO BENTONICO	
	colonna cell/L	fondo	colonna	materiale visibile cell/L superficie		alga cell/g fw	substrato duro cell/cm ²
Densità					Densità		

Se fase di ALLERTA o EMERGENZA *determinare:*

PLTX* µg/L					PLTX* pg/cell		
.....							
.....							
.....							
.....							
.....							

* indicare la variante

PARTE FACOLTATIVASe fase di ALLERTA o EMERGENZA *determinare le PLTX negli organismi acquatici*

PLTX* µg/g	Organismo**					
.....						
.....						
.....						
.....						
.....						

* indicare la variante

** indicare l'organismo scelto e la parte analizzata

Concentrazione di nutrienti (µg/L)

NO ₂	NO ₃	PO ₄	PTot	NTot

B4. INFORMAZIONE AL PUBBLICO

Enzo Funari

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le acque di balneazione interessate da fioriture di *Ostreopsis* cf. *ovata* sono soggette ad una forte variabilità temporale e spaziale. Le densità e le zone interessate possono essere poi soggette a cambiamenti anche repentini, difficili da seguire con le attività di monitoraggio (problemi con la frequenza delle osservazioni e dei campionamenti e tempi relativamente lunghi delle diverse analisi). Non si può certo pretendere un monitoraggio che segua in tempo reale questa variabilità e permetta di prendere decisioni giorno per giorno o addirittura per frazioni di tempo inferiori. In conclusione, le attività di monitoraggio da sole non possono essere considerate sufficienti per la gestione di queste problematiche. Ad esempio per quanto riguarda la qualità microbiologica, le attività di monitoraggio condotte con una frequenza media di un campionamento al mese non sono certo in grado di intercettare eventuali eventi di contaminazione che si possono verificare in condizioni circoscritte (eventi di contaminazione di breve durata). Quindi la protezione della salute dei bagnanti non è assicurata semplicemente con lo svolgimento delle attività di monitoraggio. Gli eventi di breve durata vengono previsti e comunicati ai cittadini allo scopo di prevenire esposizioni inaccettabili. La comunicazione ai cittadini è obbligatoria in queste occasioni, secondo la direttiva europea e il decreto nazionale di recepimento. La comunicazione ai cittadini rappresenta dunque in questo caso il vero strumento di tutela della loro salute.

Un approccio analogo è necessario anche per evitare esposizioni pericolose nel caso delle fioriture di *O. cf. ovata*. Molti Paesi lo utilizzano in problemi analoghi come strumento di gestione e prevenzione del rischio. In gran parte del nostro paese l'informazione al cittadino non rappresenta una tradizione consolidata soprattutto per il timore di allarmare e allontanare i frequentatori delle spiagge, con ripercussioni economiche rilevanti a livello locale. Ma questo ritardo deve essere superato perché la prevenzione da effetti dannosi alla salute dei frequentatori delle spiagge deve ovviamente occupare una posizione di priorità nella gestione di un'area di balneazione. Certo è necessario trovare un equilibrio in modo che il rispetto di questa priorità non penalizzi inutilmente le attività turistiche, gli interessi economici e il benessere psico-fisico derivante dalla fruizione di queste risorse.

L'informazione al pubblico dovrebbe essere fornita a:

– *Livello centrale*

Il Portale Acque del Ministero della Salute fornisce le seguenti informazioni:

- caratteristiche generali su *O. cf. ovata*
- sintesi della situazione nazionale: dati della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio
- sintesi delle linee guida: organizzazione del monitoraggio e della sorveglianza sanitaria
- informazioni di carattere sanitario per prevenire esposizioni pericolose
- link al sito dell'ISS per scaricare il presente rapporto con le linee guida complete
- link al sito ISPRA per scaricare i Rapporti annuali sull'andamento nazionale delle fioriture, gli eventuali impatti sull'ambiente marino e sugli organismi bentonici.

– *Livello regionale*

Le informazioni da fornire al pubblico dovrebbero essere rese disponibili attraverso la stampa, i siti web o qualsiasi altro strumento considerato idoneo.

Oltre alle informazioni fornite dal Portale Acque del Ministero della Salute, dovrebbero comprendere:

- sintesi della situazione regionale: dati della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio
- organizzazione del monitoraggio e della sorveglianza sanitaria nella Regione;
- strutture territoriali preposte alla sorveglianza e contatti per informazioni e segnalazioni (numeri telefonici e indirizzi web)

L'Autorità competente a livello centrale e regionale dovrebbe predisporre un piano di comunicazione del rischio per informare gli stakeholder e la popolazione interessata ancor prima che si presentino situazioni di allerta o emergenza. È auspicabile che venga promosso un sistema di comunicazione ai cittadini che faciliti lo scambio di informazioni, con aspetti di feedback (la comunicazione fra utenti e autorità competente potrebbe avvenire anche tramite uso di social network, come Facebook e Twitter o di specifiche applicazioni), incoraggiando anche la partecipazione nelle attività di sorveglianza (es. segnalazioni di presenza di fioriture, di casi sospetti, di perturbazione ambientale, compresa la formazione di schiume pigmentate e le morie di organismi marini).

L'attività di comunicazione dovrebbe essere fornita ai sindaci, alle altre istituzioni, e alle categorie di:

1. operatori turistici, albergatori, commercianti, pescatori e tutti coloro che hanno dal mare o da altri bacini idrici una fonte di reddito o attività;
2. cittadini, turisti e tutti coloro che utilizzano il mare a livello ricreativo;
3. istituzioni nazionali, locali, strutture tecniche di riferimento;
4. associazioni ambientaliste;
5. stampa (quotidiani, siti web, radio, tv), al fine di assicurare che la divulgazione delle informazioni avvenga in modo corretto, anche attraverso conferenze stampa all'inizio della stagione balneare.

Per quanto riguarda la prima categoria, la comunicazione dovrebbe articolarsi nelle seguenti azioni:

- a) realizzazione di una serie di incontri per divulgare informazioni di base di biologia marina sulle alghe tossiche marine e le possibili conseguenze sanitarie ad esse associate.
- b) illustrazione del lavoro svolto dalle Autorità competenti (sorveglianza, valutazione e prevenzione del rischio, divulgazione dell'informazione) a tutela della salute umana;
- c) presentazione e discussione del piano operativo nei casi di allerta ed emergenza;
- d) presentazione e verifica annuale del lavoro svolto durante i periodi critici in termini di efficienza ed efficacia.

Il coinvolgimento dei portatori d'interesse economico dovrebbe permettere di rendere più efficienti le attività di prevenzione e il successo di eventuali piani di emergenza, come descritto in dettaglio nel capitolo C2.

– *Livello locale*

La comunicazione al cittadino, in particolare ai bagnanti, dovrebbe prevedere le seguenti azioni:

- a) realizzazione di un depliant sulla caratterizzazione del pericolo e riferimenti telefonici che il cittadino/turista può utilizzare all'occorrenza (facilmente accessibile al pubblico);
- b) facilitazione dell'accesso a siti web dove sono raccolti i dati di monitoraggio del periodo balneare e le azioni svolte dalle Autorità competenti in tempo reale;

- c) istituzione di un numero verde per rispondere a quesiti posti dai cittadini/turisti. Questo numero potrebbe essere attivo durante il periodo estivo e fare capo ad uno o più esperti del settore.

Dovrebbe essere predisposta una cartellonistica per le spiagge interessate dalle fioriture di *O. cf. ovata* con una sintesi della problematica, i siti web da consultare per approfondimenti e segnalazioni e le informazioni previste nelle fasi di allerta e di emergenza.

Di seguito viene riportato un esempio di informazione al pubblico tramite cartellonistica che potrebbe essere arricchito di immagini esplicative ed eventualmente tradotto in altre lingue, sulla base delle frequentazioni.

Esempio di informazione al pubblico

Ostreopsis cf. ovata è un'alga microscopica unicellulare presente in Italia in molte acque costiere con fondali a prevalente natura rocciosa.

La sua proliferazione è legata essenzialmente a fattori climatici e idrodinamici quali:

- condizioni meteo-marine stabili (alta pressione atmosferica);
- moto ondoso ridotto (presenza di scogliere naturali o artificiali);
- temperatura dell'acqua relativamente elevata.

I segni caratteristici del fenomeno di fioritura osservabili a occhio nudo sono:

- formazione sott'acqua di una pellicola brunastra dall'aspetto membranoso e gelatinoso sugli scogli e su tutto ciò che si trova sul fondo;
- presenza di aggregati brunastri (fiocchi e/o filamenti) di consistenza gelatinosa in sospensione; in superficie tali aggregati possono talvolta presentarsi sotto forma di schiume di color bruno-rossiccio;
- talvolta opalescenza dell'acqua.

Durante la fioritura, si possono verificare disturbi respiratori e irritazioni oculari e cutanee sia per esposizione ad aerosol (in condizioni di forte vento dal mare o di moto ondoso forte) contenente l'alga o suoi frammenti, che per contatto diretto con le acque di balneazione.

Nei casi verificatisi, gli effetti riportati non sono stati mai gravi e hanno mostrato di essere reversibili per lo più entro poche ore. Non sono stati invece riportati casi di intossicazione associati a consumo di prodotti ittici o ingestione di acque interessate da fioriture di *O. cf. ovata*.

Questo problema è seguito con attenzione da enti e organi istituzionali preposti, attraverso specifici piani di monitoraggio e sorveglianza sanitaria.

Per ulteriori informazioni rivolgersi a
negli orari e consultare anche le pagine.....

Poiché la collaborazione di tutti è preziosa per il più completo e tempestivo intervento, si chiede a chi, frequentando aree di balneazione, manifesti i sintomi sopra descritti di segnalarli al Tel. (o SMS) n. e-mail

Il Sindaco

.....

B5. CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Ostreopsis cf. *ovata* produce tossine molto potenti quali la palitossina e suoi analoghi. In aree tropicali e subtropicali queste tossine sono state ritenute responsabili di effetti gravi, anche di decessi di persone che avevano consumato prodotti ittici da esse contaminati.

Nel bacino del Mediterraneo, *O. cf. ovata* è stata riportata in molti tratti della costa di paesi europei e africani. A seguito di fioriture, in concomitanza di condizioni meteorologiche favorevoli, la formazione di aerosol contenente l'alga o suoi frammenti ha causato disturbi respiratori e irritazioni oculari e cutanee in centinaia di persone. Irritazioni cutanee e oculari sono state riportate anche per contatto diretto con le acque di balneazione. Gli effetti riportati non sono stati mai gravi e hanno mostrato di essere reversibili per lo più entro poche ore.

Non sono stati invece mai riportati casi di intossicazione associati a consumo di prodotti ittici o ingestione di acque interessate da fioriture di *O. cf. ovata*, a differenza di altre aree dove invece l'ingestione di questa tossina è stata associata ad effetti gravi, anche a decessi in alcuni casi. Probabilmente questa differenza è dovuta ad un profilo di produzione di palitossina e suoi analoghi diverso (tossine qualitativamente diverse anche per profilo tossicologico e/o rapporti quantitativamente diversi tra i vari analoghi). In Mediterraneo, *O. cf. ovata* produce in effetti soprattutto ovatossina e in piccole percentuali palitossina putativa, come riportato negli studi disponibili. Tuttavia queste tossine hanno causato gravi danni a molte specie acquatiche lungo la costa italiana, anche in forma di estese morie. In organismi spiaggiati sono stati rilevati livelli di PLTXeq molto superiori a quelli definiti dalla *European Food Safety Authority* (EFSA) come limiti di sicurezza per la protezione da effetti acuti a seguito di ingestione. Valori superiori ai limiti dell'EFSA, anche per la sola palitossina, sono stati riportati in organismi eduli che avrebbero potuto essere consumati dall'uomo. In riferimento alla valutazione del rischio dell'EFSA, merita di essere sottolineato il fatto che certamente questa valutazione rappresenta un primo importante passo per la gestione del problema, ma i dati di tossicità acuta disponibili riguardavano soltanto la palitossina e l'ostreocina-D mentre i dati di monitoraggio mostrano che la principale tossina riscontrata nelle cellule di *O. cf. ovata* e negli organismi acquatici è l'ovatossina, per la quale non sono disponibili dati tossicologici. Infine, la valutazione EFSA non può essere utilizzata per situazioni di esposizione ripetuta (es. il comune consumo di prodotti ittici ripetuto per diversi giorni).

La raccomandazione dell'EFSA ovviamente deve essere tenuta in considerazione dalle strutture italiane preposte al controllo della qualità dei molluschi bivalvi in zone di acquacoltura. Ma il potenziale rischio riguarda anche organismi naturali eduli regolarmente raccolti durante la pesca sportiva o la pesca professionale (es. ricci di mare, molluschi, crostacei, pesci). Al momento non sono disponibili basi scientifiche tali da poter pianificare un monitoraggio per la costa italiana interessata da fioriture di *O. cf. ovata*. Tuttavia questo rischio deve essere adeguatamente valutato per orientare le attività di monitoraggio per il prossimo futuro.

La problematica posta dalle fioriture di *O. cf. ovata* nelle aree costiere desta dunque preoccupazione per le possibili implicazioni sanitarie, soprattutto a causa della limitatissima base scientifica disponibile. Il Ministero del lavoro e della salute francese su questi aspetti ha finanziato recentemente due progetti di ricerca.

In relazione alla situazione nazionale, si ritiene che nelle aree con maggiore criticità per estensione e intensità delle fioriture di *O. cf. ovata* dovrebbero essere condotte le attività di

sorveglianza sanitaria e monitoraggio ambientale al fine di prevenire esposizioni pericolose dei bagnanti e dei consumatori di prodotti ittici provenienti dalla pesca professionale e amatoriale. In queste aree è anche necessario che la popolazione sia adeguatamente informata.

Sono poi raccomandate le seguenti attività di approfondimento scientifico:

- Caratterizzazione del profilo delle tossine del gruppo delle palitossine nelle biomasse algali di *O. cf. ovata* e negli organismi acquatici eduli nelle diverse aree del litorale italiano in modo da rilevare eventuali differenze.
- Studi di identificazione della tossicità acuta e sub-acuta/subcronica sui vari analoghi delle ovatossine, per simulare le condizioni di esposizione umana, definire valori limite nelle varie matrici e per i diversi scenari di esposizione.
- Caratterizzazione del meccanismo di azione dei vari analoghi e delle possibili interazioni tossicologiche con altre tossine e/o contaminanti frequentemente riscontrati nei prodotti ittici eduli.
- Studi di tossicocinetica, bioaccumulo delle tossine in organismi acquatici eduli di aree interessate da fioriture di *O. cf. ovata*, inclusi i tempi di detossificazione.
- Caratterizzazione del profilo genetico di popolazioni di *O. cf. ovata* di differenti siti costieri e identificazione di potenziali marker genetici di tossicità.
- Studi di degradazione delle tossine del gruppo della palitossina nell'ambiente acquatico e di termolabilità.
- Messa a punto di test semplici e rapidi per la determinazione delle tossine del gruppo della palitossina nelle varie matrici.

PARTE C
Indicazioni tecniche
per campionamento, raccolta di dati sanitari
e metodi di analisi

Norme di sicurezza

Gli operatori tecnici durante tutte le fasi di raccolta e manipolazione del materiale dovrebbero adottare i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) previsti dalle procedure di sicurezza (es. indossare sempre DPI adeguati per proteggersi dal contatto cutaneo, specialmente in presenza di ferite; utilizzare dispositivi a filtro per la protezione da aerosol quando necessario).

C1. CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLA DENSITÀ CELLULARE DI *OSTREOPSIS* CF. *OVATA*

Gioia Benedettini (a), Patrizia Borrello (b), Patrizia Ciminiello (c), Enzo Funari (d), Erika Magaletti (b), Maura Manganelli (d)*, Antonella Penna (e), Emanuela Spada (b), Cecilia Totti (f)*, Nicola Ungaro (g)

(a) *Area Vasta Costa, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, Livorno*

(b) *Dipartimento Tutela Acque Interne e Marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

(c) *Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli*

(d) *Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino*

(f) *Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

(g) *Direzione Scientifica, Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale Puglia, Bari*

*maura.manganelli@iss.it; c.totti@univpm.it

Il presente capitolo aggiorna l'Allegato C del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010) e fornisce indicazioni tecniche per il campionamento delle acque di balneazione interessate da fioriture di *Ostreopsis* cf. *ovata*.

Le attività di monitoraggio sono finalizzate a individuare le situazioni che possono dar luogo ad esposizioni potenzialmente rischiose per la salute di bagnanti e frequentatori delle spiagge alle tossine prodotte da *O. cf. ovata*, che come è noto possono verificarsi per via cutanea, inalatoria e orale. Per questa ragione, nelle fasi di routine e di allerta il monitoraggio deve essere basato su campioni prelevati nella colonna d'acqua (rappresentativi del rischio di esposizione cutanea e orale). Nella fase di emergenza sarebbe auspicabile anche il campionamento e l'analisi dell'aerosol.

Il campionamento del substrato bentonico viene effettuato contestualmente a quello della colonna d'acqua in acque di balneazione con fondale poco profondo dove è possibile il contatto diretto. Dove questo non è possibile (oltre 2 metri di profondità), il campionamento è discrezionale. Il campionamento dei substrati bentonici, dove queste microalghe primariamente vivono, fornisce informazioni sulla consistenza della fioritura e quindi sullo stock di cellule che potenzialmente possono passare in colonna d'acqua e nell'aerosol in seguito ad idrodinamismo e all'azione dei bagnanti. Queste informazioni insieme alle altre disponibili (vedi paragrafo B2.1) possono essere utilizzate per valutare l'estensione della fioritura e il tratto di litorale interessato.

Le attività di campionamento dovrebbero essere effettuate da giugno a settembre, con cadenza quindicinale, eventualmente ampliando o riducendo la durata sulla base dell'andamento della fioritura nelle rispettive regioni (es. nell'Adriatico settentrionale è opportuno campionare da luglio a ottobre). La frequenza andrebbe intensificata fino a 5-7 giorni durante la fioritura.

C1.1. Matrice acqua

I siti di campionamento corrispondono in generale a quelli della rete di monitoraggio delle acque di balneazione e sono selezionati sulla base dei criteri riportati nel paragrafo B2.1.

C1.1.1. Campionamento e conservazione dei campioni

Prelevare un campione di acqua di 250-500 mL per effettuare l'analisi dell'abbondanza cellulare in colonna d'acqua. Prelevare volumi maggiori se si intendono effettuare anche analisi chimiche per misurare la concentrazione di tossine o isolamenti di cellule.

Il prelievo dei campioni di acqua per l'identificazione e la conta di *Ostreopsis* può essere effettuato per immersione del recipiente, che viene aperto alla profondità desiderata, riempito e richiuso. Fino ad 1 m di profondità del sito di campionamento, è sufficiente un prelievo a circa 50 cm dalla superficie; per profondità maggiori aggiungere anche un prelievo a circa 1 m dalla superficie (facendo attenzione di essere sempre ad almeno 20 cm dal fondo). I due campioni saranno miscelati in un unico contenitore per ottenere un campione rappresentativo della colonna d'acqua, dal quale prelevare subcampioni per le varie analisi.

Il prelievo va effettuato prima del campionamento dei substrati bentonici per evitare una sovrastima della densità in acqua causata da rilascio accidentale delle cellule dal substrato.

Nel caso di osservazione di materiale in superficie (fiocchi, schiume superficiali), tale materiale dovrà essere campionato per verificare l'eventuale presenza di cellule di *O. cf. ovata*. Il tipo di prelievo effettuato (colonna d'acqua o materiale in superficie) va indicato nella scheda allegata al capitolo B3.

I campioni destinati all'analisi delle microalghe vanno fissati con soluzione di Lugol (0,5-1 mL di soluzione ogni 250 mL di campione). In alternativa, nel caso si intendano effettuare analisi in epifluorescenza e/o al microscopio elettronico a scansione (*Scanning Electron Microscope*, SEM), può essere usata formaldeide neutralizzata a una concentrazione finale assoluta dello 0,8% (far riferimento alle prescrizioni previste nel DL.vo 81/2008, Titolo IX, Capo II "Protezione da agenti cancerogeni e mutageni") (Italia, 2008).

Tutti i campioni raccolti vanno conservati al buio e a temperatura ambiente fino al trasferimento in laboratorio.

I campioni destinati alle analisi chimiche dovranno essere conservati a -20°C senza aggiungere fissativo.

I campioni destinati all'isolamento di microalghe per l'allestimento di colture dovranno essere conservati a temperatura ambiente (per 2-3 giorni al massimo) senza aggiunta di fissativo.

C1.1.2. Analisi della densità cellulare

I campioni d'acqua non richiedono ulteriori trattamenti e possono essere analizzati direttamente al microscopio. Per una corretta identificazione delle *Ostreopsidaceae* occorre effettuare la determinazione delle misure cellulari e l'analisi morfologica delle placche tecali, in microscopia ad epifluorescenza previa colorazione con fluorocromo (*Calcofluor White/Fluorescent brightener*) e/o in SEM (Steidinger & Tangen, 1997).

L'analisi dei campioni può essere eseguita seguendo il metodo Utermöhl (Zingone *et al.*, 2010) comunemente utilizzato per le analisi del fitoplancton che prevede la sedimentazione di un volume noto di campione in un sistema cilindro/camera di sedimentazione. Il conteggio va effettuato ad almeno 200 ingrandimenti sull'intera camera di sedimentazione, o su mezza camera o, in caso di elevate abbondanze cellulari, su 2-4 transetti o su n campi casuali.

La scelta del volume di campione da sedimentare (1-100 mL) e della porzione di camera da osservare variano con le abbondanze cellulari e/o con la quantità di materiale risospeso presenti nel campione, al fine di contare un numero di cellule significativo (*nota*: nel caso di fioritura il conteggio può considerarsi significativo se si contano almeno 150-200 cellule). Nel periodo pre-comparsa, può anche accadere che si contino da zero a poche cellule sull'intera camera. L'abbondanza cellulare di *O. cf. ovata* va espressa in cell/L.

C1.2. Matrice aerosol

Si fa presente che non si richiede lo svolgimento di routine di questa attività. I metodi di seguito descritti possono tuttavia rappresentare un utile riferimento per coloro che intendono approfondire questi aspetti (Ciminiello *et al.*, 2014).

C1.2.1. Campionamento di aerosol per analisi chimica

Per il campionamento di aerosol marino da sottoporre ad analisi chimica utilizzare il campionatore SAS PCR (*Surface Air System - PCR: pathogenic micro-organisms air sampler*) (PBI International). Si tratta di un campionatore portatile (alimentato a batteria), con sistema di cattura in fluido mediante impatto ricircolante. L'aria aspirata dallo strumento e il fluido di raccolta (acqua di mare sintetica) confluiscono congiuntamente attraverso un condotto a spirale e sono convogliati in un recipiente di raccolta, dove il liquido è mantenuto in costante ricircolazione per prolungare il contatto liquido/bioaerosol favorendo così il trasferimento delle tossine e/o frammenti algali dall'aerosol al fluido di raccolta. Il set di campionamento (costituito dal recipiente di raccolta, spirale di cattura, testata di campionamento e fluido) è sterile ed è a "circuito chiuso". Per ottenere la massima possibilità di cattura, effettuare il campionamento alla velocità di aspirazione di 30 L/min localizzando il campionatore liquido alla distanza di 10 m dalla riva orientato verso il mare. Il periodo di campionamento deve essere compreso tra 1,5-6 ore. I dettagli per la conduzione dell'analisi chimica sono descritti nel capitolo C3.

C1.2.2. Campionamento di Aerosol per analisi molecolare

Per il campionamento del bioaerosol da sottoporre ad analisi molecolari per la ricerca di *Ostreopsis cf. ovata* utilizzare il campionatore portatile AirCube COM2 della Analitica Instrument. Il campionatore ha un orifizio di aspirazione collegato ad un tubo al silicone lungo 15 cm alla cui estremità è inserito un apposito porta filtri. Utilizzare filtri in fibra di vetro e di quarzo di porosità 0,45 µm. Per ottenere la massima possibilità di cattura, effettuare il campionamento alla velocità di aspirazione di 30 L/min localizzando il campionatore liquido alla distanza di 10 m dalla riva orientato verso il mare. Il periodo di campionamento deve essere compreso tra 1,5-6 ore. I dettagli per la conduzione dell'analisi molecolare sono descritti nel capitolo C4.

C1.3. Matrice substrati bentonici

Nei Quaderni ISPRA "Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp.: protocolli operativi" (ISPRA, 2012), consultabili sul sito www.isprambiente.gov.it, sono riportate le modalità per il campionamento e l'analisi secondo tre protocolli differenti. In questa sede viene riportato il metodo classico e una breve sintesi degli altri metodi. Per tutto quanto non specificato si rimanda al sopracitato documento in ottemperanza all'art. 3 del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010).

C1.3.1. Metodo classico

Il metodo classico per lo studio delle dinofitiche bentoniche (Andersen & Throndsen, 2004; Totti *et al.*, 2004) è utilizzato dalla maggior parte dei ricercatori in tutto il mondo e si basa sul prelievo del substrato (es. macroalghe, angiosperme marine, sabbia, rocce, ecc.) per la quantificazione delle abbondanze delle microalghe su una porzione nota di substrato (in termini di peso e/o di superficie).

C1.3.1.1. Campionamento

Macroalghe

Prelevare possibilmente 3 repliche (distribuite entro 10 m di distanza) della stessa specie macroalgale. Ricoprire la macroalga con un sacchetto di plastica, tagliare una porzione di tallo mediante un bisturi o una spatola e chiudere prontamente il sacchetto sott'acqua per ridurre la perdita di cellule. Sarà sufficiente raccogliere una piccola porzione di tallo (circa 5-10 g). In alternativa tagliare una porzione di tallo riponendola in un barattolo con aggiunta di acqua di mare filtrata (0,22-0,45 µm) o con acqua raccolta nello stesso sito del campionamento.

Altri substrati

Raccogliere organismi bentonici che possano fungere da substrato (es. mitili) o piccole parti rocciose avvolgendoli delicatamente con un sacchetto che va prontamente richiuso. Durante il campionamento è importante evitare di toccare la superficie del substrato al fine di evitare la perdita di cellule.

C1.3.1.2. Conservazione dei campioni

Appena possibile trasferire i campioni di substrato (macroalghe, organismi bentonici, rocce) in barattoli assieme all'acqua di raccolta e/o ad acqua di mare filtrata. Tutti i campioni raccolti vanno conservati al buio e a temperatura ambiente fino al trasferimento in laboratorio. Il fissativo andrebbe aggiunto al campione d'acqua finale ottenuto dopo il trattamento per il distacco delle microalghe, che andrebbe effettuato entro le 6-8 ore dal campionamento. Se non è possibile rispettare tali tempi, è opportuno fissare il campione con formaldeide neutralizzata a una concentrazione finale assoluta del 2%. Si consiglia tuttavia di effettuare tutte le operazioni in giornata, al fine di evitare di manipolare campioni fissati con formalina, per l'utilizzo della quale occorre far riferimento alle prescrizioni previste nel DL.vo 81/2008, Titolo IX, Capo II "Protezione da agenti cancerogeni e mutageni" (Italia, 2008).

C.1.3.1.3. Trattamento dei campioni

Macroalghe

Agitare accuratamente per almeno 2 min i barattoli contenenti le macroalghe nella loro acqua di raccolta per favorire il distacco delle dinofitiche epifite. Trasferire l'acqua di raccolta in un contenitore. Risciacquare il tallo aggiungendo al barattolo acqua di mare filtrata e agitare nuovamente per altri 2 min, sempre raccogliendo l'acqua del lavaggio. Ripetere le operazioni di risciacquo per almeno tre volte, al fine di rimuovere completamente le epifite. Controllare la superficie del tallo mediante osservazione al binoculare per assicurarsi che la rimozione delle cellule sia completa. Eventualmente ripetere il trattamento con risciacqui aggiuntivi.

Annotare il volume del campione finale (acqua di raccolta del campione e acqua utilizzata per i risciacqui).

Fissare con soluzione di Lugol (0,5-1 mL di soluzione ogni 250 mL di campione) o nel caso si intendesse effettuare analisi in epifluorescenza e/o al SEM, parte del campione può essere

fissata con formaldeide neutralizzata ad una concentrazione finale assoluta dello 0,8% (v. sopra). Conservare il campione al buio e meglio se in frigorifero fino al momento del conteggio al microscopio.

Conservare una parte di campione non addizionato di fissativo a -20°C per le analisi chimiche.

Conservare una parte di campione non addizionato di fissativo a temperatura ambiente (per 2-3 giorni al massimo) per l'eventuale isolamento di microalghe e allestimento di colture.

Le macroalghe campionate vanno opportunamente identificate possibilmente a livello di specie. Dopo i trattamenti di risciacquo, determinare il peso fresco pesando la macroalga, previo sgocciolamento su carta assorbente per rimuovere l'acqua in eccesso. Si consiglia di appoggiare il tallo tra due fogli di carta assorbente senza fare pressioni per un paio di minuti (va eliminata solo l'acqua esterna). Se sono presenti più specie macroalgali insieme, queste ove possibile vanno pesate separatamente. Se possibile, determinare anche la superficie del tallo secondo Accoroni *et al.* (2011).

Altri substrati

Togliere delicatamente dal barattolo il substrato da analizzare, senza toccarne la superficie, avendo cura di conservare l'acqua di raccolta, dato che potrebbe contenere cellule distaccate.

Rimuovere le cellule raschiando la superficie del substrato tramite un raschietto o una lametta e sciacquando accuratamente con acqua di mare filtrata. Il grattato e l'acqua usata per i risciacqui vanno trasferiti in un barattolo assieme all'acqua di raccolta.

Annotare il volume di campione finale. Aggiungere il fissativo e conservare il campione come per i campioni di macroalghe.

Quindi misurare il più accuratamente possibile l'area del substrato sottoposta a grattaggio mediante l'uso di un comune metro da sarta, riferendola alla forma geometrica più opportuna.

C.1.3.1.4 Analisi e conteggio

L'identificazione e il conteggio delle dinofitofite potenzialmente tossiche vengono eseguiti al microscopio ottico rovesciato secondo il metodo Utermöhl (Zingone *et al.*, 2010) (vedi paragrafo C.1.1.2.).

I risultati vengono infine espressi come segue:

– *Substrato duro*

numero di cellule per unità di superficie (cell/cm²)

$$\text{cell/cm}^2 = \left(\frac{c_{\text{cont}} * \text{fattore} * \text{vol}_{\text{fin}}}{\text{vol}_{\text{sed}}} \right) / \text{area}$$

– *Macroalghe*

numero di cellule per grammo di peso fresco (cell/g fw)

$$\text{cell/g fw} = \left(\frac{c_{\text{cont}} * \text{fattore} * \text{vol}_{\text{fin}}}{\text{vol}_{\text{sed}}} \right) / \text{fw}$$

o numero di cellule per unità di superficie (cell/cm²);

$$\text{cell/cm}^2 = \left(\frac{c_{\text{cont}} * \text{fattore} * \text{vol}_{\text{fin}}}{\text{vol}_{\text{sed}}} \right) / \text{area}$$

dove: c_{cont} = cellule contate

fattore = rapporto tra area della camera e area esplorata (1 o 2 transetti, n campi casuali, 1/2 camera, 1 camera); se si osserva tutta la camera il fattore è = 1

vol_{fin} = volume finale del campione (mL)

vol_{sed} = volume di campione sedimentato (mL)
 fw = peso fresco del tallo (g)
 $area$ = area del substrato (cm²)

Esempio: se da un campione di acqua dal volume di 500 mL (ottenuto da una macroalga avente peso fresco di 5 g), si sedimentano 10 mL e si contano 300 cellule di *Ostreopsis* su mezza camera (fattore = 2), l'abbondanza cellulare sarà 6.000 cell/g fw.

Per le macroalghe, solitamente si usa esprimere le abbondanze delle epifite come numero di cellule per grammo di peso (fresco o secco). Tuttavia, considerando che le macroalghe hanno talli molto diversificati (per forma, consistenza, grado di ramificazione ecc.), esprimere le abbondanze delle epifite in tal modo non consente di fare dei corretti paragoni tra specie diverse di macroalghe. L'espressione delle abbondanze per unità di superficie di substrato è sicuramente preferibile, anche perché consentirebbe di paragonare le abbondanze sulle macroalghe con quelle su substrato duro (es. substrati rocciosi, gusci di molluschi, ecc.).

C1.3.2. Metodo della siringa

Il metodo della siringa si basa sull'aspirazione, tramite siringa, delle cellule adese al substrato direttamente dallo stesso. Rappresenta un metodo semiquantitativo in quanto i valori di abbondanza cellulare che si ottengono non sono riferibili né ad un unità di peso né di superficie del substrato campionato. Questo metodo presenta tuttavia numerosi vantaggi in termini di praticità, in quanto non prevede la raccolta e il successivo trattamento dei substrati, abbreviando notevolmente i tempi di analisi. Inoltre permette di campionare substrati diversi utilizzando un metodo non distruttivo. Da una comparazione con i risultati ottenuti tramite il metodo classico è stata ottenuta una buona correlazione, con pattern spaziali e temporali altamente sovrapponibili (Abbate *et al.*, 2012). Per i dettagli del metodo si rimanda al protocollo ISPRA (2012).

C1.3.3. Metodo della Falcon

Il metodo della provetta Falcon (proposto da Zingone A., Regione Campania) rappresenta una semplificazione del metodo classico, presentando delle innovazioni sia per le modalità di raccolta del materiale, sia per il metodo di conteggio e interpretazione dei risultati. Tale metodo si basa sulla raccolta di frammenti di substrato macroalgale in un contenitore standard (un tubo Falcon). I vantaggi di questo metodo sono di poter osservare rapidamente, eventualmente anche con microscopi da campo, un numero elevato di campioni, permettendo di individuare prontamente tratti di costa che richiedono attenzione. La correlazione con i risultati ottenuti con il campionamento classico è buona, e i pattern spaziali e temporali che risultano da entrambi i metodi sono del tutto paragonabili. Per i dettagli del metodo si rimanda al protocollo ISPRA (2012).

Bibliografia

- Abbate M, Bordone A, Cerrati G, Di Festa T, Melchiorre N, Pastorelli AM, Peirano A, Petruzzelli R, Ungaro N. A new method for sampling potentially toxic benthic dinoflagellates. *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):165-70.
- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Tartaglione L, Penna A, Totti C. *Ostreopsis* cf.

- ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2512-9.
- Andersen P, Throndsen J. Estimating cell numbers. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. Paris, France: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2004. (UNESCO, Monographs on oceanographic methodology). p. 99-129.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C, Casabianca S, Penna A. First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols. *Environ Sci Tecnol* 2014 (in corso di stampa).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e Ostreopsis spp.: protocolli operativi*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. (ISPRA, Quaderni – Ricerca marina 5/2012).
- Italia. Decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale* n.101 del 30 aprile 2008 - Suppl. Ordinario n. 108.
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.
- Steidinger KA, Tangen K. Dinoflagellates. In: Tomas CR (Ed.). *Identifying marine phytoplankton*. San Diego: Academic Press; 1997. p. 387-584.
- Totti C, De Stefano M, Facca C, Ghirardelli LA. Microphytobenthos. *Biol Mar Mediterr* 2004;11(s1):247-66.
- Zingone A, Totti C, Sarno D, Cabrini M, Caroppo C, Giacobbe MG, Lugliè A, Nuccio C, Socal G. Fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa. In: Socal G, Buttino I, Cabrini M, Mangoni O, Penna A, Totti C (Ed.). *Metodologie di campionamento e di studio del plancton marino*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010 (ISPRA, Manuali e linee guida 56/2010) p. 213-37.

C2. METODOLOGIA PER LA SORVEGLIANZA SANITARIA

Paolo Durando (a), Emanuela Testai (b)

(a) Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova e IRCCS AOU San Martino
IST di Genova, Genova

(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'istituzione di un sistema di sorveglianza sanitaria *ad hoc* risulta particolarmente importante per la precoce identificazione di casi potenzialmente riconducibili all'esposizione alla tossina dell'alga *Ostreopsis cf. ovata*, al fine di attivare prontamente le necessarie misure preventive di sanità pubblica. Sulla base delle informazioni disponibili relative alle varie segnalazioni di intossicazione umana, è possibile definire i segni e sintomi associati ad esposizione a palitossine (PLTX) attraverso le tre vie di esposizione descritte (vedi paragrafo B1.1). Ovviamente poiché durante la balneazione sono interessate più vie di esposizione, i sintomi potrebbero presentarsi anche contemporaneamente.

In un recente articolo scientifico è stata proposta una definizione di 'caso' per le tre vie di esposizione a PLTX (Tubaro *et al.*, 2011):

– *Intossicazione orale*

Dopo ingestione di prodotti ittici, i sintomi più frequentemente riportati sono: malessere generale, sintomi gastro-intestinali, mialgia, crampi muscolari e debolezza agli arti, disfunzioni del miocardio, problemi respiratori con potenziale progressione a cianosi; solo occasionalmente l'ingestione è stata associata ad un sapore metallico in bocca. I disturbi muscolari (mialgia fino alla rabdomiolisi) sono i sintomi più gravi e comuni anche alle altre vie di esposizione, che hanno anche sintomi specifici. Si ha la definizione di caso quando si verifica la simultanea presenza di almeno due dei seguenti sintomi: malessere generale e sintomi gastrointestinali (nausea, vomito e/o diarrea), mialgia, disfunzione cardiaca, disturbi respiratori, unitamente a livelli serici aumentati di CPK o presenza di mioglobuliuria (quest'ultima nei casi più gravi che possono accusare insufficienza renale).

– *Esposizione cutanea*

Si ha l'identificazione di caso quando si presentano almeno due dei seguenti segni e sintomi: dermatite maculo-papulare e/o eritematosa, rash cutaneo sistemico, intorpidimento e debolezza agli arti, vertigini, mialgia, dolore toracico difficoltà respiratorie, febbre, disturbi neurologici. I casi più gravi si verificano in presenza di ferite sulla cute che aumentano la biodisponibilità sistemica.

– *Esposizione inalatoria*

si ha la definizione di caso quando si verifica la simultanea presenza di almeno due dei seguenti sintomi: tosse, rinorrea, faringodinia³, dispnea⁴, febbre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), cefalea, lacrimazione, nausea/vomito, rash cutaneo.

³ Dolorabilità aspecifica della faringe, non caratterizzata da un'inflammatione e un'infezione clinicamente riconoscibili.

⁴ Difficoltà, permanente o occasionale, della respirazione

Un presupposto fondamentale è la verifica della possibilità di esposizione: sarà definito *soggetto esposto* colui che nelle 24 ore precedenti abbia frequentato luoghi di balneazione (spiaggia, scogli, lido) o del litorale o luoghi prospicienti (entro 100 metri dalla battigia) o svolto attività di pesca amatoriale o professionale, in zone interessate da fioriture di *O. cf. ovata*. Nel caso in cui si verificano *casi* potenziali senza che ci sia stata la segnalazione di una fioritura nella zona, è necessario allertare le strutture territoriali per una verifica. L'unica eccezione riguarda l'intossicazione a seguito di consumo di prodotti ittici che può essere dovuta anche a prodotti non locali: anche in questo caso è necessario allertare le autorità sanitarie preposte, per una verifica.

I dati ad oggi disponibili in letteratura hanno permesso di elaborare e proporre una scheda di segnalazione per *case report* di sospetta intossicazione da PLTX, riportata in allegato al capitolo.

Nella scheda sono anche suggeriti i campioni del paziente e/o delle matrici sospette fonti di intossicazione da prelevare, alcune analisi ematocliniche e suggerimenti per la gestione clinica e terapeutica del paziente. Ovviamente la scheda, sulla base dei dati che saranno raccolti, potrà essere perfezionata in seguito, ma rappresenta una buona base di lavoro.

La gestione clinica e terapeutica dei casi documentati a Genova (es. utilizzo di trattamenti sintomatici e, nei casi di dispnea grave, di O₂ terapia) si è dimostrata ottimale, con la dimissione di tutti i casi che avevano necessitato di ospedalizzazione, dopo accesso al Pronto soccorso in fase acuta, entro un termine massimo di 72 ore (Durando *et al.*, 2007).

Si ribadisce il concetto che la gestione diagnostica, clinica e terapeutica dei casi sindromici sospetti e accertati spetta esclusivamente al clinico prestante servizio presso la struttura sanitaria ed è discrezionale sulla base della sintomatologia e della gravità complessiva delle condizioni del paziente, non essendo ad oggi codificate linee guida particolari per la cura della sindrome clinica da *O. cf. ovata*.

Una volta compilata, la scheda dovrà essere trasmessa al Portale acque del Ministero della Salute entro le 24 successive l'evento, o inviata al seguente indirizzo di posta elettronica DGprevenzione@sanita.it (vedi paragrafo B3.2.).

Allegato al capitolo C2

Scheda di raccolta dati per i casi di sospetta intossicazione da palitossine

Data |_|_|||_|_|||_|_|
(giorno, mese, anno)

Identificativo del paziente/.....
(prime due lettere del nome e cognome)

Data di nascita |_|_|||_|_|||_|_|
(giorno, mese, anno)

Sesso ☐ M ☐ F

Data di comparsa dei sintomi |_|_|||_|_|||_|_|
(giorno, mese, anno)

Indicazioni per il compilatore

Definizione di caso

Il caso si definisce in base al tipo di esposizione alla presenza di almeno due dei sintomi correlati

Esposizione	Definizione e sintomi
Orale	Ingestione di acqua e/o cibi di origine marina (occasionalmente con uno strano sapore metallico e/o amaro). <i>Sintomi</i> - malessere generale e sintomi gastrointestinali (nausea, vomito e/o diarrea) - mialgia - disturbi respiratori - disfunzioni cardiache (spesso in associazione ad aumentati livelli sierici di creatin-fosfochinasi, CPK).
Inalatoria ("sindrome algale")	Stazionamento lungo la costa e/o presso la spiaggia (<90 m dalla battigia) in concomitanza con una fioritura algale di <i>Ostreopsis</i> spp.; lavoro in laboratori che analizzano alghe/tossine algali; inalazione di vapori/aerosol durante la pulizia degli acquari. Richiesta di cure mediche <i>Sintomi</i> - tosse - dispnea - faringodinia - rinorrea - febbre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - cefalea - lacrimazione - nausea/vomito - rash cutaneo
Cutanea	Contatto con acqua di mare in concomitanza con una fioritura algale di <i>Ostreopsis</i> spp.; contatto con alghe/tossine algali in laboratorio; manutenzione/gestione di acqua e/o zoantidi di acquari. <i>Sintomi</i> - dermatite locale - rash cutaneo sistemico - intorpidimento o debolezza estremità agli arti - vertigini - mialgia - dolore toracico - difficoltà respiratorie - febbre - disturbi neurologici

1. ESPOSIZIONE E MATRICI

	via orale	via inalatoria	via cutanea	altro
Esposizione				
Luogo				
Data	giorno, mese, anno	giorno, mese, anno	giorno, mese, anno	giorno, mese, anno
Durata (in giorni)				
Periodo di latenza fra esposizione e comparsa dei sintomi				
Matrice contaminata*				
Pesci				
Granchi				
Molluschi				
Acqua di mare				
Zoantidi/alghe				
Acqua di acquari				
Alghe coltivate				
Alghe/estratti di cibo di provenienza marina				

* se possibile specificare la specie

2. SEGNI E SINTOMI

Sintomi manifestati					
febbre $\geq 38^{\circ}\text{C}$	☐ no	☐ sì	nausea	☐ no	☐ sì
tosse	☐ no	☐ sì	vomito	☐ no	☐ sì
cefalea	☐ no	☐ sì	diarrea	☐ no	☐ sì
dispnea	☐ no	☐ sì	mialgia	☐ no	☐ sì
faringodinia	☐ no	☐ sì	aritmia	☐ no	☐ sì
rinorrea	☐ no	☐ sì	parestesie	☐ no	☐ sì
irritazione oculare/lacrimazione	☐ no	☐ sì	intorpidimento/debolezza degli arti	☐ no	☐ sì
rash	☐ no	☐ sì			
altro (specificare)					

Patologie e condizioni mediche pre-esistenti	
☐ malattie cardiovascolari (specificare)	☐ asma e altre patologie respiratorie cronico- ostruttive
☐ rinite	☐ dermatiti
☐ ipercolesterolemia	☐ altro (specificare)

Farmaci utilizzati precedentemente o al momento dell'esposizione:

.....

3. ESAMI DIAGNOSTICI CONSIGLIATI

	sì (indicare valori e range di laboratorio)	no
Ematochimici		
Emocromo	☐	☐
Conta leucocitaria	☐	☐
CPK	☐	☐
LDH	☐	☐
Velocità di eritrosedimentazione	☐	☐
AST	☐	☐
ALT	☐	☐
Gamma-GT	☐	☐
Proteina C reattiva	☐	☐
Na ⁺	☐	☐
K ⁺	☐	☐
.....	☐	☐
.....	☐	☐
Urine		
Colore	☐	☐
Mioglobinuria	☐	☐
K ⁺	☐	☐
.....	☐	☐
.....	☐	☐
Altro		
ECG	☐	☐
RX torace	☐	☐
.....	☐	☐
.....	☐	☐

4. TERAPIA

.....

.....

.....

.....

5. ACCESSO A STRUTTURA OSPEDALIERAAccesso al Pronto Soccorso ☐ no ☐ sìData di ammissione
(giorno, mese, anno)Data di dimissione
(giorno, mese, anno)Ospedalizzazione ☐ no ☐ sìData di ammissione
(giorno, mese, anno)Data di dimissione
(giorno, mese, anno)

Tempo trascorso dall'esposizione (in ore/giorni)

Prognosi

Note

6. INFORMAZIONI DA REPERIRE E ASSOCIARE AL CASO SOSPETTO**Analisi di laboratorio per l'identificazione di palitossine****Materiale per l'analisi***

- | | |
|---|---|
| ☐ Pesce | ☐ Acqua di acquari |
| ☐ Crostacei | ☐ Acqua di mare |
| ☐ Molluschi | ☐ Alghe |
| ☐ Zoantidi | ☐ Alghe coltivate |
| ☐ altro <i>specificare</i> | |

* se possibile specificare la specie e/o la parte

Concentrazioni di palitossine riscontrate dalle analisi effettuate per tipo di prova

	Residui di cibo	Campioni biologici umani*	Altro*
Metodo HPLC (µg/g)			
Test di emolisi +anticorpi anti-PLTX (µg/g)			
Test su topo			
Metodo ELISA			
LC-MS			
Altro			

* specificare

C3. METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLE TOSSINE

Patrizia Ciminiello

Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

Recentemente, sono stati messi a punto metodi molto sensibili basati sulla combinazione cromatografia liquida spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) per la determinazione delle tossine prodotte da *Ostreopsis* spp. (palitossina putativa e ovatossine) in matrici algali e alimentari (Ciminiello *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; Ciminiello *et al.*, 2012a; Ciminiello *et al.*, 2012b), bioaerosol (Ciminiello *et al.*, 2014) e acqua di mare (Ciminiello, Dell'Aversano, Tartaglione, dati non pubblicati). Ciascun tipo di matrice richiede una diversa procedura di estrazione.

C3.1. Estrazione dalle varie matrici

C3.1.1. Matrice algale

Aggiungere al pellet algale una miscela di Metanolo/Acqua 1:1, utilizzando circa 3mL di solvente per ogni milione di cellule. Sonicare la sospensione (pellet + solvente estraente) per 3 min con l'ausilio di un bagno di ghiaccio. Centrifugare la sospensione e separare l'estratto dal residuo di pellet algale. Conservare l'estratto in vial di vetro in frigo (+ 4°C) fino al momento dell'analisi chimica.

C3.1.2. Matrice alimentare

Estrarre circa 1g di tessuto per ciascun tipo di matrice alimentare (molluschi, ricci di mare, pesci, ecc.) con 3 mL di Metanolo/Acqua 8:2. Sonicare la sospensione per 3 min con l'ausilio di un bagno di ghiaccio. Centrifugare la sospensione e separare l'estratto dal residuo. Conservare l'estratto in vial di vetro in frigo (+ 4°C) fino al momento dell'analisi chimica.

C3.1.3. Acqua di mare

Studi sulla messa a punto di una procedura di estrazione quantitativa delle tossine dall'acqua di mare, sono ancora in corso presso i laboratori del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II. Dati preliminari indicano che i risultati migliori, in termini di recupero, si ottengono caricando acqua di mare campionata su cartuccia SPE (*Solid Phase Extraction*) ed eluendo le tossine mediante soluzioni metanolo/acqua a polarità decrescente.

C3.1.4. Aerosol marino

Estrarre il fluido di raccolta del campionatore SAS PCR (*Surface Air System - pathogenic micro-organisms air sampler*), ovvero l'acqua di mare sintetica, 5 volte con ugual volume di

butanolo in imbuto ripartitore. Evaporare l'estratto butanologico ottenuto e sciogliere il residuo in metanolo/acqua 1:1 allo 0,2 % di acido acetico. Il recupero dell'intera procedura di estrazione è del 75% (Ciminiello *et al.*, 2014). Conservare l'estratto in vial di vetro in frigo (+ 4°C) fino al momento dell'analisi chimica.

Gli estratti grezzi ottenuti dalle varie estrazioni devono essere sottoposti a filtrazione in centrifuga mediante utilizzo di Ultrafree MC 0,45µm prima di essere analizzati mediante LC-MS.

Di seguito si riportano le condizioni cromatografiche da utilizzare:

<i>Colonna</i>	2,6 m Kinetex C18 (100 × 2,10 mm)
<i>Fase mobile</i>	A = acqua, B = 95% acetonitrile in acqua, entrambe le fasi addizionate di acido acetico 30 mM
<i>Eluizione a gradiente</i>	dal 25% B al 30% B in 15 min seguito da scarico con 100% B e riequilibrio
<i>Flusso</i>	0,2 mL/min
<i>Temperatura</i>	ambiente (circa 21°C)
<i>Volume di iniezione</i>	5 µL

C3.2. Analisi chimica

La rivelazione mediante spettrometro di massa può essere condotta su strumenti a triplo quadrupolo o su spettrometri ad alta risoluzione. (Ciminiello *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; Ciminiello *et al.*, 2012a; Ciminiello *et al.*, 2012b). In base al tipo di strumentazione a disposizione varia il tipo di esperimento da effettuare, nonché i limiti di rivelazione del metodo.

C3.2.1. Strumento a triplo quadrupolo

Se si ha a disposizione uno strumento a triplo quadrupolo è consigliato effettuare esperimenti di *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), monitorando le transizioni ione precursore → ione prodotto riportate in Tabella C3.1.

Tabella C3.1. Transizioni ione precursore → ione prodotto da monitorare in esperimenti *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) su strumenti di massa a triplo quadrupolo

Tossina	ione precursore [M+2H-H ₂ O] ²⁺	→	ione prodotto [A moiety] ⁺	ione precursore [M+H+Ca] ³⁺	→	ione prodotto [A moiety] ⁺
Palitossina	1331,2		327,2	906,5		327,2
Ovatossina-a	1315,2		327,2	895,8		327,2
Ovatossina-b	1337,2		371,2	910,5		371,2
Ovatossina-c	1345,2		371,2	915,8		371,2
Ovatossina-d	1323,2		327,2	901,1		327,2
Ovatossina-e	1323,2		343,2	901,1		343,2
Ovatossina-f	1329,3		327,2	905,2		327,2

Bisogna notare che la ionizzazione delle palitossine può variare drasticamente a seconda della sorgente utilizzata (*ElectroSpray Ionization*, ESI; *Ion Spray Ionization*, ISI; *Turbo Spray*

Ionization, TSI; ecc.) (Ciminiello *et al.*, 2008) e che la palitossina tende a formare numerosi addotti con cationi monovalenti e divalenti, che possono essere presenti nelle soluzioni acquose (Ciminiello *et al.*, 2012b). È quindi consigliabile effettuare esperimenti preliminari sullo standard di palitossina in modalità full-MS e MS/MS in modo da ottimizzare i parametri di ionizzazione nonché gli ioni da selezionare come precursori.

C3.2.2. Strumento ad alta risoluzione

Lo strumento ad alta risoluzione è molto più sensibile di uno strumento a triplo quadrupolo e consente di rivelare livelli di palitossine paragonabili ai tenori massimi di contaminazione stabiliti dall'EFSA (30 µg/kg di parte edibile).

Se si ha a disposizione uno strumento ad alta risoluzione è consigliabile effettuare esperimenti in modalità full MS nel range di massa 800-1400 dove le palitossine ionizzano formando numerosi ioni bicarica e tricarica. I principali sono riportati nella Tabella C3.2.

Tabella C3.2. Ioni bicarica e tricarica da monitorare per ciascuna tossina in modalità full MS (range di massa 800-1400) su strumenti di massa ad alta risoluzione

Ione	PLTX $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$	OVTX-a $C_{129}H_{223}N_3O_{52}$	OVTX-b $C_{131}H_{227}N_3O_{53}$	OVTX-c $C_{131}H_{227}N_3O_{54}$	OVTX-d/-e $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	OVTX-f $C_{131}H_{227}N_3O_{52}$
[M+2H-H₂O]²⁺						
più intenso	1331,7436	1315,7498	1337,7623	1345,7584	1323,7456	1329,7650
monoisotopico	1331,2417	1315,2480	1337,2595	1345,2566	1323,2439	1329,2624
[M+H+Ca]³⁺						
più intenso	906,8167	896,1572	910,8318	916,1628	901,4884	905,4976
monoisotopico	906,4851	895,8255	910,4976	915,8286	901,1533	905,1632

Per l'analisi quantitativa possono essere selezionati gli ioni riportati in Tabella C3.2 per generare lo XIC (*eXtracted Ion Chromatogram*) di ciascuna tossina. L'area del picco cromatografico ottenuto, in paragone a quello di uno standard di palitossina a concentrazione nota, fornirà la concentrazione della tossina considerata.

Per maggiori dettagli sulle procedure di estrazione e la rivelazione LC-MS fare riferimento alle pubblicazioni di Ciminiello *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; Ciminiello *et al.*, 2011a; Ciminiello *et al.*, 2011b; Ciminiello *et al.*, 2012a; Ciminiello *et al.*, 2012b.

C3.2.3. Metodo con derivatizzazione

In alternativa ai metodi suddetti un altro metodo per la determinazione delle palitossine nelle matrici alimentari è quello pubblicato recentemente da Selwood *et al.* (2012) che prevede la derivatizzazione delle palitossine e successiva analisi LC-MS su strumento a triplo quadrupolo.

Bibliografia

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. The Genoa 2005 Outbreak. determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis*

- ovata* by a new Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry method. *Analytical Chemistry* 2006;78:6153-9.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. 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* 2008;19:111-20.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R. Complex palitoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high resolution LC-MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:2735-44.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Rossi R, Soprano V, Capozzo D, Serpe L. Palytoxin in seafood by liquid chromatography tandem mass spectrometry: investigation of extraction efficiency and matrix effect. *Anal Bioanal Chem* 2011a;401:1043-50.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L. LC-MS of palytoxin and its analogues: state of the art and future perspectives. *Toxicon* 2011b;57:376-89.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Battocchi C, Penna A.. The unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain. HR LC-MSⁿ characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chemical Research in Toxicology* 2012a;25:1243-52.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L. High resolution LC-MSⁿ fragmentation pattern of palytoxin as template to gain new insights into ovatoxin-a structure. The key role of calcium in MS behavior of palytoxins. *J Am Soc Mass Spectrom* 2012b;23:952-63.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C, Casabianca S, Penna A. First Finding of *Ostreopsis cf. ovata* Toxins in Marine Aerosols. *Environ Sci Technol* 2014;48(6):3532-40.
- Selwood A, van Ginkel R, Harwood DT, McNabb PS, Rhodes LR, Holland PT. A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of cleavage fragments from micro-scale oxidation. *Toxicon* 2012;60:810-20.

C4. METODI MOLECOLARI DI IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI *OSTREOPSIS* spp.

Antonella Penna

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino

C4.1. Campionamento

Per il campionamento nelle 3 matrici, colonna d'acqua, macroalghe e altri substrati fare riferimento al capitolo C1.

C4.2. Conservazione e trattamento dei campioni

C4.2.1. Acqua

Fissare il campione con soluzione di Lugol acida (0,5-1 mL di soluzione ogni 250 mL di campione) o formaldeide neutralizzata ad una concentrazione finale di 0,8-1,6% e conservare a +4°C fino alle analisi molecolari.

C4.2.2. Macroalghe e altri substrati

Trasferire i campioni di macroalghe e/o di substrato duro in barattoli assieme all'acqua di raccolta e/o ad acqua di mare filtrata. Trattare subito le tipologie dei due campioni come descritto nel capitolo C1. Per le macroalghe fissare con soluzione di Lugol acida o formaldeide neutralizzata ad una concentrazione finale di 0,8-1,6% il volume finale di campione del lavaggio di macroalghe. Conservare i campioni a +4°C fino al momento delle analisi molecolari. Dopo i trattamenti di risciacquo, determinare il peso fresco della macroalga come illustrato nel capitolo C1.

Per i substrati duri estrarre delicatamente dal barattolo il substrato da analizzare e seguire le indicazioni del capitolo C1.

C4.3. Analisi molecolare qualitativa di PCR

Nel caso si voglia procedere all'identificazione tassonomica molecolare specie-specifica delle cellule di *Ostreopsis* contenute nei campioni ambientali si procede all'analisi molecolare qualitativa di PCR (*Polymearse Chain Reaction*). È consigliabile sottoporre il campione ambientale anche al conteggio di *Ostreopsis* spp. e delle altre microalghe secondo il metodo Utermöhl come descritto nel capitolo C1.

Il metodo molecolare di PCR è stato sviluppato e validato presso l'Università degli Studi di Urbino (Penna *et al.*, 2007; Battocchi *et al.*, 2010). L'identificazione tassonomica molecolare della specie o del genere basata sul metodo di PCR consiste nell'amplificazione di regioni

genomiche bersaglio taxon-specifiche mediante l'uso di *primer* (sonde costituite da corte sequenze oligonucleotidiche complementari a una porzione della sequenza del gene di interesse) disegnati su sequenze nucleotidiche note di *Ostreopsis*. La lunghezza del frammento amplificato rappresenta il segnale di identificazione taxon specifico. I geni ribosomali, come il 5.8S, e le regioni non codificanti ITS (*Internal Transcribed Spacer*) sono state impiegate per il disegno dei *primer* specifici (Tabella C4.1) (Penna *et al.*, 2007).

Tabella C4.1. Primer disegnati sulle regioni ITS-5.8S rDNA di *Ostreopsis* spp. del mar Mediterraneo

Taxon algale	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')	Frammento amplificato (bp*)	Posizione primer
<i>Ostreopsis</i> spp.	F'-AAAACGATATGAAGAGTGCAGC R'-CCAGGAGTATGCCTACATTCAA	92	5.8S (5'-3') 5.8S (3'-5')
<i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	F'-CAATGCTCATGTCAATGATG R'-CCAGGAGTATGCCTACATTCAA	210	ITS1 (5'-3') 5.8S (3'-5')
<i>Ostreopsis</i> cf. <i>siamensis</i>	F'-TGTTACCATTGCTGAGTTTG R'-CCAGGAGTATGCCTACATTCAA	223	ITS1 (5'-3') 5.8S (3'-5')

* base pair (paio di basi)

Tale metodo prevede l'estrazione, la purificazione e il dosaggio del DNA genomico totale del campione ambientale (acqua, lavaggio di macrofite, altri substrati) come descritto in Battocchi *et al.* (2010). Quindi, l'analisi di PCR è effettuata secondo il seguente protocollo:

- *Volume di reazione* (50 µL)
 - 200-400 µM di ciascun dNTP (*deoxynucleotide triphosphates*)
 - 0,4 µM di ciascun primer
 - 3,0 mM MgCl₂
 - 1X PCR buffer (Diatheva)
 - 0,2 U di Taq Polimerasi (Diatheva)
 - acqua distillata (volume finale)
 - 0,5-1 ng di DNA.
- *Protocollo termico*

Uno step di denaturazione iniziale di 10 min a 95°C, 40 cicli di 30 s a 95°C, 30 s a 58°C e 30 s a 72°C, e 7 min a 72°C (estensione finale).

I prodotti di PCR sono visualizzati in elettroforesi su gel di agaroso all'1,8% (w/v). La presenza o assenza di frammenti di DNA amplificati con pesi molecolari noti dei campioni analizzati indica se il taxon è presente o assente nel campione ambientale.

Inoltre, l'analisi di PCR su campioni ambientali deve includere tre tipi di controllo. Un controllo positivo, contenente la sequenza del gene bersaglio clonata in un plasmide, per verificare l'efficienza della reazione; un controllo negativo, contenente solo i reagenti senza il DNA stampo per testare eventuali contaminazioni con DNA estraneo; e infine, un controllo contenente quantità note di DNA plasmidico, includente la regione bersaglio, aggiunto al DNA dei campioni ambientali per verificare eventuali attività inibitorie sull'enzima DNA polimerasi prodotte da vari contaminanti ambientali.

C4.4. Analisi molecolare quantitativa di qPCR

L'analisi molecolare di identificazione e quantificazione delle cellule di *Ostreopsis cf. ovata* nelle differenti tipologie di campioni ambientali può essere effettuata utilizzando la tecnica di *real time* PCR o PCR quantitativa. Il metodo sviluppato da Perini *et al.* (2011) si basa sull'uso del colorante SYBR Green I che combina una curva standard plasmidica con una curva "gold" ambientale creata con un pool di cellule di *O. cf. ovata* di vari campioni ambientali durante una fioritura. Poiché le due curve di quantificazione hanno la stessa efficienza, il numero di copie di DNA ribosomiale per cellula da campioni ambientali è ottenuto dalla curva ambientale standard. I primers oligonucleotidici utilizzati sono stati sviluppati sulle regioni target LSU (*Large Sub Unit*) del DNA ribosomiale con sequenze specifiche: F-5'-TTTGATCACTTTGGCAATCT-3' e R-5'-TGAACCTTACCATGCCATTAG-3'. La reazione di amplificazione di PCR produce frammenti specifici di 204 bp (*base pair*). La sensibilità analitica della qPCR è fissata a due copie di rDNA e a $8,0 \times 10^{-4}$ cellule per reazione rispettivamente per la curva standard plasmidica e per la curva standard gold. I protocolli di processamento dei campioni di acqua di mare, di acqua di lavaggio delle macroalghe e altri substrati sono gli stessi riportati nel capitolo C1. I protocolli di estrazione del DNA genomico dei campioni e di reazione di qPCR sono riportati in Perini *et al.* (2011).

C4.5. Analisi molecolare di qPCR dell'aerosol marino

È stato ipotizzato che palitossina e analoghi aerosolizzati, cellule e/o frammenti cellulari tossici di *Ostreopsis* possono essere responsabili o essere associati ai sintomi respiratori in persone che frequentano spiagge o litorali costieri. Recentemente, presso l'Università di Urbino, è stato sviluppato e validato un metodo molecolare di PCR quantitativa (qPCR) per la quantificazione di *Ostreopsis cf. ovata* nella matrice dell'aerosol marino. Il metodo è basato sullo sviluppo di una curva standard plasmidica e ambientale, quest'ultima costruita da un pool di campioni di fioriture di *O. cf. ovata*, per la quantificazione specie-specifica dell'alga nella complessa matrice di aerosol potenzialmente contaminato da palitossine. La quantificazione effettiva delle cellule si basa sull'uso della curva plasmidica di *O. cf. ovata*. Il frammento specie-specifico amplificato sul gene ribosomiale LSU ha una lunghezza di 204 paia di basi utilizzando gli stessi primers del lavoro di Perini *et al.* (2011). La sensibilità analitica della qPCR è fissata a due copie di rDNA e a $8,0 \times 10^{-4}$ cellule per reazione rispettivamente per la curva standard plasmidica e per la curva standard ambientale.

Il protocollo di campionamento di aerosol marino è descritto nel capitolo C1. I filtri sono posti singolarmente in falcon contenenti 50 mL di etanolo puro e agitati *over-night* per lavare ciascun filtro rimuovendo il particolato marino dell'aerosol. Poi, ogni filtro viene eliminato e la risospensione è centrifugata a 4.000 rpm per 10 min a temperatura ambiente. Il sopranatante è eliminato e il pellet è trasferito in un'epENDORF (1,5 mL), centrifugato a 12.000 rpm per 10 min, asciugato a temperatura ambiente per eliminare tracce di etanolo e processato per le analisi molecolari.

I protocolli di estrazione del DNA genomico dei campioni e di reazione di qPCR sono riportati in Casabianca *et al.* (2013).

Bibliografia

- Battocchi C, Totti C, Vila M, Masò M, Capellacci S, Accoroni S, René A, Scardi M, Penna A. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Mar Pollut Bull* 2010;60:1074-84.
- Casabianca S, Casabianca A, Riobò P, Franco JM, Vila M, Penna A. Quantification of the toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR assay in marine aerosol. *Environ Sci Technol* 2013;47:3788-95.
- Penna A, Bertozzini E, Battocchi C, Giacobbe MG, Galluzzi L, Garcés E, Vila M, Lugliè A, Magnani, M. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular techniques. *J Plank Res* 2007;29: 19-38.
- Perini F, Casabianca A, Battocchi C, Accoroni S, Totti C, Penna A. New approach using the real-time PCR method for estimation of the toxic marine Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17699.

C5. TEST BIOLOGICI E FUNZIONALI PER IL RILEVAMENTO DELLE PALITOSSINE

Anna Milandri (a), Marco Pelin (b), Rossella Pistocchi (c)*, Silvio Sosa (b), Aurelia Tubaro (b)*

(a) *Fondazione Centro Ricerche Marine, Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, Cesenatico*

(b) *Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Trieste*

(c) *Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Bologna, Bologna*

*rossella.pistocchi@unibo.it; tubaro@units.it

Per quanto riguarda la valutazione della tossicità associata alla presenza di biotossine nei molluschi bivalvi e in altri organismi acquatici, in Italia si fa riferimento alla normativa comunitaria in materia: Regolamento (EC) 853/2004 (Europa, 2004) e s.m.i., che ne stabilisce i tenori massimi consentiti e Regolamento (EC) 2074/2005 (Europa, 2005) e s.m.i., che decreta i metodi chimici e biologici di riferimento per diverse altre tossine, ma non per la palitossina (PLTX). I limiti di legge per la presenza di PLTX nei prodotti della pesca non sono ancora stati fissati, tuttavia lo *European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain* ha suggerito un limite di 30 µg/kg nei molluschi (EFSA, 2009).

I test biologici hanno il vantaggio di identificare effetti tossici dovuti alla presenza di eventuali tossine non note o non attese, difficilmente identificabili con analisi chimiche. Il test biologico cui si fa riferimento nel suddetto decreto è il test sul topo per le tossine lipofile (*mouse bioassay*), che ha però una sensibilità piuttosto bassa, una riproducibilità limitata (LeDoux & Hall, 2000), può dare falsi positivi ed è stato ampiamente criticato per problemi di natura etica legati al benessere animale. Pertanto, nel 2011 la Commissione Europea ha stabilito che la cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) sostituisca gradualmente il test sul topo e rappresenti il metodo standard per determinare la presenza di tossine lipofile nei molluschi; anche la PLTX può essere rilevata dal test sul topo, ma in maniera non sempre riproducibile, data la sua natura anfipatica (Riobó *et al.*, 2008; Riobó & Franco, 2011).

Vista la crescente presenza di *O. cf. ovata* nel Mediterraneo e le possibili ripercussioni sulla salute umana, sarebbe particolarmente utile disporre di test semplici e rapidi in grado di dare informazioni attendibili sulla presenza di tossine nell'ambiente e/o negli organismi marini. Diversi metodi biologici e immunologici in grado di evidenziare la PLTX e i suoi analoghi in organismi marini, molluschi e microalghe sono già stati sviluppati, anche se nessuno è ancora stato validato. Tali metodi potrebbero essere utili o come screening preliminari cui far seguire le analisi strumentali o nel caso in cui i metodi strumentali non siano disponibili.

Si elencano di seguito possibili metodi di identificazione delle PLTX con i relativi riferimenti bibliografici.

C5.1. Saggio di mortalità con *Artemia salina*

Il crostaceo *Artemia salina* è risultato l'organismo modello più sensibile alla presenza di cellule vive di *O. cf. ovata* con valori di DL₅₀ (Dose Letale 50%) di 8 cell/mL dopo 24 h (Pezzolesi *et al.*, 2012) e inferiori a 4 cell/mL dopo 48 h (Faimali *et al.*, 2011). Il test di mortalità è risultato molto sensibile anche con campioni ambientali di *O. cf. ovata* dove, in

presenza di concentrazioni cellulari inferiori a 10 cell/mL, è stato osservato il 100% di mortalità. La elevata sensibilità di tale metodo permette di evidenziare la tossicità anche con concentrazioni microalgali inferiori a 10.000 cell/L. Utilizzando estratti di alghe in metanolo/acqua (Pezzolesi *et al.*, 2012) o lisati acquosi di cellule liofilizzate (Pagliara & Caroppo, 2012) la mortalità è ancora presente, ma la sensibilità diminuisce notevolmente (DL_{50} = 80 cell/mL e 620 cell/mL, rispettivamente). Questo test, benché semplice e sensibile, è altamente aspecifico e può dare falsi positivi per la presenza di altre tossine/contaminanti ambientali eventualmente presenti nei campioni in esame, anche se ad esempio test preliminari indicano che le tossine di *Prorocentrum lima*, eventualmente presenti nel campione insieme ad *O. ovata*, potrebbero avere scarsa influenza sul risultato data la loro minore tossicità per le artemie.

C5.2. Saggio emolitico

Il saggio emolitico è un saggio biologico *in vitro*, basato sulla capacità della PLTX di determinare un'emolisi ritardata concentrazione-dipendente negli eritrociti di diverse specie animali (Habermann *et al.*, 1981). È stato inizialmente messo a punto per valutare la presenza di PLTX nei molluschi (Bignami, 1993; Riobó *et al.*, 2008b) e utilizzato per lo screening di alcuni prodotti ittici, tra cui diversi estratti di molluschi e pesci (Aligizaki *et al.*, 2008; Onuma *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2001, 2002). Il test prevede l'impiego di una sospensione di eritrociti murini (o di altre specie di mammiferi) che viene incubata con il campione per 4 ore. L'emolisi può essere quantificata misurando l'assorbanza dell'emoglobina liberata dalle cellule. Il saggio è sensibile (in grado di rilevare concentrazioni di PLTX <1 pg/mL), di semplice esecuzione e in grado di rilevare tutti gli analoghi della PLTX ad attività emolitica.

Data la semplicità di esecuzione e l'elevata sensibilità è stato impiegato anche per altre tipologie di campioni, tra cui estratti di campioni ambientali di *Ostreopsis* spp. (Aligizaki *et al.*, 2008) e di colture di *O. cf. ovata* (Pezzolesi *et al.*, 2012), anche se non è stato validato per l'impiego nell'analisi di tali matrici. Nelle colture, la DE_{50} (Dose Efficace al 50%) ottenuta è stata messa a confronto con quella di uno standard di PLTX, senza evidenziare differenze significative. Inoltre è stata dimostrata una buona correlazione tra l'effetto emolitico osservato e la quantità di tossine totali analizzata con LC-MS, tanto da poterlo utilizzare come metodo semi-quantitativo (Pezzolesi *et al.*, 2012). Il saggio però è aspecifico, in quanto altri composti presenti nelle cellule o nei relativi estratti possono provocare emolisi, dando luogo a "falsi positivi". Tuttavia, l'eventuale contributo di altre sostanze può essere individuato mediante l'inibizione dell'emolisi da PLTX e analoghi e/o con l'impiego del glicoside cardioattivo ouabaina che, legandosi alla pompa Na^+/K^+ , previene parzialmente l'emolisi indotta dalla PLTX e/o con specifici anticorpi anti-PLTX, che attualmente non sono però disponibili in commercio (Bignami, 1993; Riobó & Franco, 2011).

C5.3. Mouse bioassay

Fino a poco tempo fa, il metodo più utilizzato per il rilevamento delle PLTX nei molluschi era il *mouse bioassay* per le tossine lipofile, basato sull'inoculazione intraperitoneale di un estratto di molluschi in un numero prefissato di topi, e sulla misurazione del tempo di sopravvivenza degli animali (Yasumoto *et al.*, 1978). Quest'ultimo sembra essere dose-dipendente e i tipici segni di tossicità comprendono *stretching*, atassia, paralisi, cianosi,

difficoltà respiratorie e convulsioni prima della morte. Tuttavia, oltre alle implicazioni di natura etica derivanti dall'uso di animali, il saggio presenta molti aspetti problematici: i risultati sono caratterizzati da una grande variabilità, influenzata soprattutto dalla possibile interferenza di altre tossine o di composti diversi che possono essere presenti negli estratti di molluschi e persistere anche dopo la loro purificazione (Europa, 2002), ma anche dal ceppo di animali e dalle condizioni sperimentali che possono variare nei diversi laboratori. Alcuni parametri di questo saggio, tra cui il limite di rilevabilità delle PLTX e il periodo di osservazione degli animali (da 4 a 48 ore), non sono riportati in maniera chiara in letteratura (Riobó & Franco, 2011), e l'intervallo dei valori di DL_{50} (compresi tra 150 e 720 ng/kg) è molto ampio. Pertanto, un risultato positivo al *mouse bioassay* richiede una conferma della presenza di PLTX mediante il metodo chimico della LC-MS.

C5.4. Saggi di citotossicità

La morte cellulare o la perdita di funzionalità cellulari, quali la depolarizzazione della membrana indotti dalla PLTX, sono stati utilizzati per sviluppare saggi funzionali su linee cellulari stabilizzate, con lo scopo di essere impiegati per rilevare la tossina e/o i suoi analoghi nei molluschi. Analogamente al saggio emolitico, i risultati dei test di citotossicità possono fornire falsi positivi per la presenza negli estratti di sostanze citotossiche o di altre tossine. Questo problema può essere ridotto mediante l'utilizzo dell'ouabaina o di anticorpi anti-PLTX, che aumentano la specificità del test.

Basandosi sulla potente citotossicità della PLTX nei confronti delle cellule Neuro2a di neuroblastoma – *Inhibitory Concentration* 50% (IC_{50}) = $42,9 \pm 3,8$ pM; test di vitalità cellulare, MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) dopo 19 h di esposizione – Ledreaux *et al.* (2009) hanno messo a punto un test di citotossicità in grado di quantificare la PLTX nei mitili. Il test è stato in grado di rilevare la tossina in estratti di mitili fino a 50 µg/kg polpa (Ledreaux *et al.*, 2009), concentrazione di poco superiore al tenore massimo di PLTX suggerito dalla *European Food Safety Authority* (EFSA, 2009).

Contemporaneamente, è stato sviluppato un saggio su micropiastra per rilevare la PLTX utilizzando la linea cellulare BE(2)-M17 di neuroblastoma, con o senza pretrattamento con ouabaina. Impiegando l'Alamar blu, una sonda in grado di misurare l'attività mitocondriale, il saggio è in grado di rilevare la PLTX a 150 o 75 pM dopo 4 ore o 72 h di incubazione. Sebbene necessiti di una validazione per essere utilizzato nell'analisi dei mitili, il saggio è stato in grado di rilevare in modo differenziato la PLTX dall'acido okadaico in estratti di mitili, sulla base dell'inibizione selettiva della citotossicità esercitata dall'ouabaina (Espiña *et al.*, 2009).

Un ulteriore metodo di quantificazione della PLTX è stato sviluppato impiegando la linea di carcinoma mammario MCF7. Il metodo si basa sull'attività citolitica della tossina, misurata per via spettrofotometrica quantificando il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) dalle cellule esposte alla tossina. Il metodo per la quantificazione della PLTX in mitili naturalmente contaminati è stato confrontato con l'LC-MS, rilevando una buona correlazione dei risultati (Bellocci *et al.*, 2008).

C5.5. Saggio di immunofluorescenza

È un metodo qualitativo che permette di evidenziare con certezza analoghi della PLTX in cellule di *O. cf. ovata*, ed è basato su una tecnica di immunofluorescenza indiretta. La tecnica è

stata messa a punto con anticorpi monoclonali e policlonali anti-PLTX i quali sono stati in grado di riconoscere le ovatossine, ovvero gli analoghi della PLTX più abbondanti in *O. cf. ovata*. Gli anticorpi sono stati fatti reagire con cellule fissate, sezionate con un criomicrotomo, e applicate a vetrini; dopo la reazione, la presenza di ovatossine legate agli anticorpi è stata evidenziata con microscopio a fluorescenza e con microscopio confocale. Il metodo ha evidenziato una percentuale di positività del 100%, ovvero di 49 cellule colorate su 49, e mancanza di reazione degli anticorpi con cellule di *Coolia monotis*, prive di tali tossine (Honsell *et al.*, 2011). Al momento però gli anticorpi non sono in commercio.

C5.6. Saggio con polarizzazione di immunofluorescenza

È un metodo spettroscopico basato sulla fluorescenza polarizzata, in grado di rilevare la PLTX in base alla sua interazione con la Na^+/K^+ ATPasi purificata e marcata con un fluoroforo (fluorescina) mediante l'impiego di un kit disponibile in commercio (Alfonso *et al.*, 2012). Si tratta di una tecnica che non richiede i numerosi lavaggi previsti con le altre tecniche immunologiche; il metodo è veloce tuttavia, per evitare interferenze dovute alla matrice, gli estratti necessitano di un rigoroso metodo di purificazione. Il metodo è sensibile nel rilevare la PLTX in soluzione: *Limit of Detection* (LoD) = 2 nM; *Limit of Quantitation* (LoQ) = 10 nM. È stato applicato ad estratti di colture di *Ostreopsis* spp. con risultati positivi per PLTX, mentre estratti di microalghe produttrici di altri tipi di tossine non hanno determinato interferenze con il saggio che, pertanto, ha anche una certa specificità. È stato anche utilizzato per identificare la tossina in campioni di mitili, senza peraltro determinare il limite di quantificazione in questa matrice, che necessita un accurato processo di purificazione prima dell'analisi.

C5.7. Saggi immunoenzimatici

Diversi sono i metodi finora messi a punto che utilizzano anticorpi per il rilevamento e la quantificazione delle PLTX. Tuttavia, gli anticorpi anti-PLTX non sono attualmente disponibili in commercio. Tra questi, due sono quelli meglio caratterizzati per la quantificazione delle PLTX nei mitili. Gareth *et al.*, (2010), dopo aver ottenuto un anticorpo anti-PLTX a singola catena (scFv) mediante la tecnica del *phage display*, hanno sviluppato un saggio immunoenzimatico competitivo di tipo indiretto, basato sull'impiego di tale anticorpo e della PLTX adsorbita alla fase solida. Il metodo di Gareth risulta essere sensibile, con un intervallo di lavoro di 0,0005-500 ng/mL e un limite di rilevabilità di 0,5 pg/mL. Analizzando estratti di molluschi, gli autori hanno rilevato un recupero della PLTX piuttosto variabile, senza però determinare il limite di rilevabilità della tossina nei molluschi, l'eventuale capacità dell'anticorpo scFv di individuare analoghi della PLTX e di rilevare altre tossine marine, per dimostrarne la specificità.

In seguito, è stato messo a punto e caratterizzato un saggio immunoenzimatico di tipo non competitivo indiretto, basato sull'impiego di un anticorpo monoclonale anti-PLTX murino (73D3) usato come agente di cattura e di uno policlonale di coniglio come agente di rilevamento. Il saggio si è rivelato accurato, preciso e ripetibile. Il range di linearità della curva di calibrazione è risultato compreso tra 1,25 e 80 ng/mL, con un LoD di 1,1 ng/mL e un LoQ di 2,2 ng/mL. Il saggio, inoltre, è risultato altamente specifico nel rilevare solo analoghi strutturali della PLTX (quali la 42-idrossi-PLTX), ma non altre tossine algali che possono essere copresenti in campioni naturali. L'analisi di estratti metanolici di mitili, che presentano solo

modeste interferenze con la rilevazione della tossina, ha evidenziato un LoQ pari a 11 ng/mL, corrispondente a 11 µg/kg di polpa. Il saggio è pertanto uno dei pochi metodi che attualmente permettono di quantificare la tossina al di sotto dei limiti suggeriti dall'EFSA (EFSA, 2009). Inoltre, l'analisi di mitili contenenti quantità note di PLTX ha evidenziato un recupero della tossina prossimo al 100 % (Boscolo *et al.*, 2013).

C5.8. Biosensori

Recentemente è stato messo a punto un biosensore ad elettrochemiluminescenza, basato sull'architettura del saggio immunoenzimatico messo a punto da Boscolo *et al.*, (2013). L'elevata sensibilità del biosensore è stata raggiunta coniugando l'anticorpo monoclonale anti-PLTX a nanotubi di carbonio funzionalizzati che hanno aumentato la conduttanza del biosensore (Zamolo *et al.*, 2012). Il biosensore ha un LoD di 0,07 ng/mL e un LoQ di 0,24 ng/mL, che nei mitili corrisponde a 2,2 mg/kg di polpa, ossia circa 15 volte inferiore al limite massimo suggerito dall'EFSA (EFSA, 2009).

Un altro biosensore precedentemente messo a punto è un saggio basato sulla tecnica della *Surface Plasmon Resonance* (SPR) e sull'utilizzo dell'anticorpo anti-PLTX 73D3. Il biosensore è risultato specifico per la PLTX e sensibile (LoD = 0,52 ng/mL), ma non sono presenti informazioni relative alla quantificazione della PLTX nei mitili, ma solo in estratti di vongole e cernie (LoD = 1,4 e 2,8 ng/mL, rispettivamente) (Yakes *et al.*, 2011).

Bibliografia

- Alfonso A, Fernández-Araujo A, Alfonso C, Caramés B, Tobio A, Louzao MC, Vieytes MR, Botana LM. Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique. *Anal. Biochem* 2012;424:64-70.
- Aligizaki K, Katikou P, Nikolaidis G, Panou A. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean sea, Greece). *Toxicon* 2008;51:418-27.
- Bellocci M, Ronzitti G, Milandri A, Melchiorre N, Grillo C, Poletti R, Yasumoto T, Rossini GP. A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. *Anal. Biochem* 2008;374:48-55.
- Bignami G.S. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 1993;31:817-820.
- Boscolo S, Pelin M, De Bortoli M, Fontanive G, Barreras A, Berti F, Sosa S, Chaloin O, Bianco A, Yasumoto T, Prato M, Poli M, Tubaro A. Sandwich ELISA assay for the quantitation of palytoxin and its analogs in natural samples. *Environ Sci Technol* 2013;47:2034-42.
- EFSA. Marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 2009;7(12):1393:1-38.
- Espiña B, Cagide E, Louzao MC, Fernandez MM, Vieytes MR, Katikou P, Villar A, Jaen D, Maman L, Botana LM. Specific and dynamic detection of palytoxins by *in vitro* microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci Rep* 2009;29:13-23.
- Europa. 2002/225/CE: Decisione della Commissione, del 15 marzo 2002, che fissa norme specifiche per l'attuazione della direttiva 91/492/CEE del Consiglio per quanto concerne i tenori massimi e i metodi d'analisi di talune biotossine marine in molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini (Testo rilevante ai fini del SEE) [notificata con il numero C(2002) 1001]. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L075 del 16 marzo 2002.

- Europa. 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 animale. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L139/55 del 30 aprile 2004.
- Europa. Regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L338/27 del 22 dicembre 2005.
- Faimali M, Giussani V, Piazza V, Garaventa F, Corrà C, Asnaghi V, Privitera D, Gallus L, Cattaneo-Vietti R, Mangialajo L, Chiantore M. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Mar Env Res* 2012;76:97-107.
- Garet E, Cabado AG, Vieites JM, González-Fernández A. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: palytoxin. *Toxicon* 2010;55:1519-26.
- Habermann E, Ahnert-Hilger G, Chhatwal GS, Beress L. Delayed haemolytic action of palytoxin. *Biochem Biophys Acta* 1981;649:481-6.
- Honsell G, De Bortoli M, Boscolo S, Dell'Aversano C, Batocchi C, Fontanile G, Penna A, Berti F, Sosa S, Yasumoto T, Ciminiello P, Poli M, Tubaro A. Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environ Sci Technol* 2011;46:7051-9.
- LeDoux M, Hall S. Proficiency testing of eight French Laboratories in using the AOAC mouse bioassay for paralytic shellfish poisoning: interlaboratory collaborative study. *J AOAC* 2000;83(2):305-10.
- Ledreux A, Krysz S, Bernard C. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon* 2009;53:300-8.
- Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto N, Naoki H, Yasumoto T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 1999;37: 55-65.
- Pagliara P, Caroppo C. Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon* 2012;60:1203-14.
- Pezzolesi L, Guerrini F, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Pistocchi R. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Res* 2012;46:82-92.
- Riobó P, Franco JM. Palytoxins: biological and chemical determination. *Toxicon* 2011;57:368-75.
- Riobó P, Paz B, Franco JM, Vázquez JA, Murado MA, Cacho E. Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food Chem Toxicol* 2008a;46:2639-47.
- Riobó P, Paz B, Franco JM, Vázquez JA, Murado MA. Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin. Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability. *Harmful Algae* 2008b;7:415-29.
- Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetradon* sp. toxin. *Toxicon* 2001;39:725-7.
- Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin form a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J Nat Toxins* 2002;11:277-82.
- Yakes BJ, DeGrasse SL, Poli M, Deeds JR. Antibody characterization and immunoassays for palytoxin using an SPR biosensor. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:2865-9.

- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1978;44:1249-55.
- Zamolo VA, Valenti G, Venturelli E, Chaloin O, Marcaccio M, Boscolo S, Castagnola V, Sosa S, Berti F, Fontanive G, Poli M, Tubaro A, Bianco A, Paolucci F, Prato M. Highly sensitive electrochemiluminescent nanobiosensor for the detection of palytoxin. *ACS Nano* 2012;6:7989-97.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2014, 1° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità
Roma, dicembre 2014*