



Tossine algali

Loredana Cozzi

Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Molluschi eduli lamellibranchi

- § 20.000 specie
- § habitat: acque salmastre e marine
- § valore nutrizionale elevato:
 - proteine 65%
 - lipidi 10%
- § attività filtrante



Alghe unicellulari marine

§ 5000 specie

§ 75 specie produttrici di tossine
(appartenti alle Dinoflagellate e
Diatomee)

Fioriture algali

Upwelling: correnti ascensionali di masse d'acqua, ricche di nutrienti



Red Tide o maree rosse

India del sud
sud-ovest dell'Africa
est dell'Australia
coste dell'Arabia, Perù, Cile e California.

Fioriture di alghe tossiche (I)

1. Fioriture di specie che provocano colorazione dell'acqua con diminuzione della trasparenza e possibili morie di pesci e invertebrati acquatici a causa delle condizioni di ipossia instauratesi. Dinoflagellate (es. *Noctiluca scintillans*) e Diatomee (es. *Skeletonema costatum*)
2. Fioriture di specie che producono potenti tossine che si accumulano nella catena alimentare e che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori). Dinoflagellate appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Dinophysis* e diatomee del genere *Nitzschia*

Fioriture di alghe tossiche (II)

3. Fioriture di specie tossiche per pesci ed invertebrati (es. *Alexandrium tamarense*, *Gyrodinium aureolum*, *Chaetoceros convolutus*, *Nodularia spumigena*, *Chattonella antiqua*)
4. Fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa (es. *Gymnodinium breve*)

Biotossine marine

Gruppo eterogeneo di composti raggruppabili in base alla struttura chimica:

- aminoacidi simili (ac. domoico e analoghi)
- purine-derivati (saxitossine)
- imine cicliche (spirolidi, gymnodimine e pinnatoxin A)
- polieteri lineari e ciclici (ac. okadaico ed analoghi, pectenotossine, azaspiracido, brevetossine, yessotossine, ciguatossine)

Biotossine marine idrosolubili

PSP (Paralytic shellfish poisoning)

ASP (Amnesic shellfish poisoning)

TTX (Sindrome paralitica da pesce
palla)

Biotossine marine liposolubili

DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning)

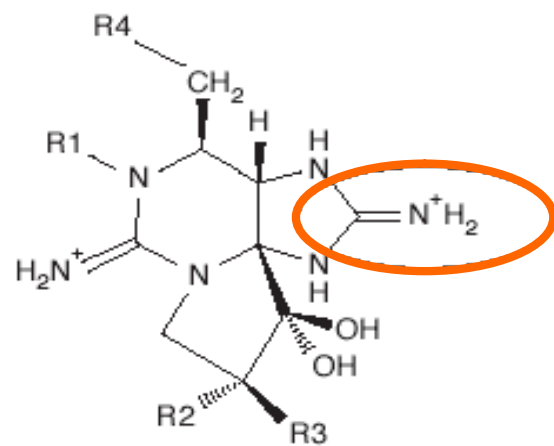
NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning)

Ciguatera

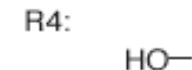
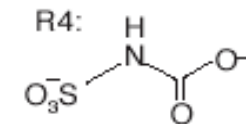
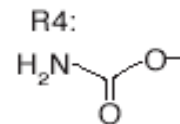
Organismi produttori		Principi tossici	Vettori	Sindrome tossica nell'uomo
Batteri	Microalghe			
	Dinoflagellate			
Vibrio, Moraxella, Bacillus	<i>Alexandrium tamarense</i> <i>Alexandrium minutum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Alexandrium catenella</i>	saxitossina, neosaxitossina, gonyautossine 1-4	Molluschi bivalvi	PSP
	<i>Dynophysis spp.</i> , <i>Gonyaulax grindleyi</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i>	ac. okadaico e altre tossine acide, yesotossina, omo-YTX, 45 -OHYTX	Molluschi bivalvi	DSP
	<i>Gymnodinium breve</i>	brevitossine	Molluschi bivalvi	NSP
	<i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Coolia monotis</i> <i>Ostreopsis lenticularis</i>	ciguatossine	Pesci (specie bentoniche)	Ciguatera
	Diatomee			
	<i>Pseudonitzschia seriata</i> <i>Nitzschia pungens</i>	ac. domoico e derivati	Molluschi bivalvi, pesci, uccelli marini	ASP

Tossine PSP

- carbammato-tossine (molluschi bivalvi)
- decarbammato-tossine
- sulfocarbammato tossine (dinoflagellati)



R1	R2	R3	Carbamate Toxins	Sulfamate Toxins	Decarbamoyl Toxins
H	H	H	STX	B1	dc - STX
OH	H	H	NEO	B2	dc - NEO
OH	H	OSO_3^-	GTX I	C3	dc - GTX I
H	H	OSO_3^-	GTX II	C1	dc - GTX II
H	OSO_3^-	H	GTX III	C2	dc - GTX III
OH	OSO_3^-	H	GTX IV	C4	dc - GTX IV

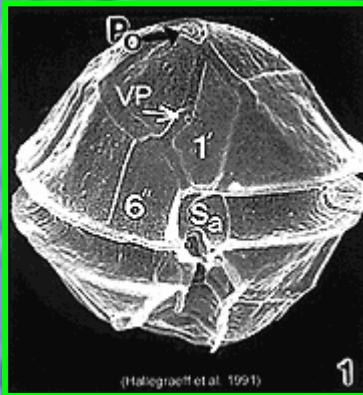


- § idrosolubili
- § termostabili (nei molluschi una cottura di 5' riduce il contenuto del 30%, se protratta a 20' del 40%)
- § stabili in ambiente acido

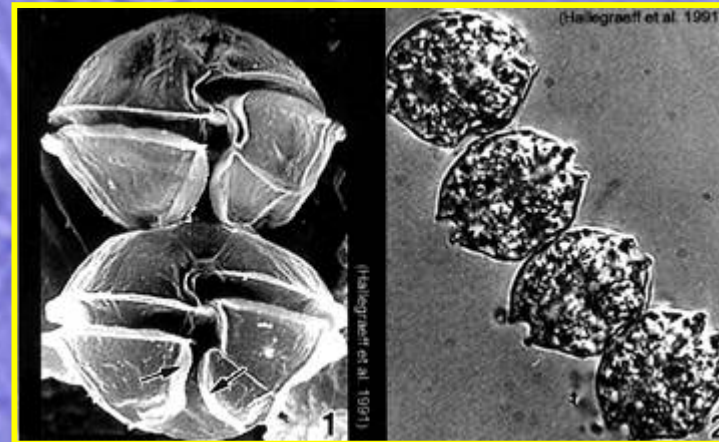
Sintomatologia da PSP

- ü Blocco dei canali del sodio (arresto della trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici)
- ü Sintomi (entro 30' dall'ingestione): parestesie labiali, della lingua e delle estremità delle dita, astenia muscolare, perdita dell'equilibrio, paralisi respiratoria ed arresto cardiaco.
- ü Prognosi: favorevole in caso di sopravvivenza nelle prime 12-24 ore. Nel 50% dei pazienti che sopravvivono all'intossicazione permangono per circa tre settimane astenia e parziale perdita di memoria
- ü Trattamento: lavanda gastrica, somministrazione di bicarbonato di sodio, intubazione e ventilazione meccanica per 24-48h

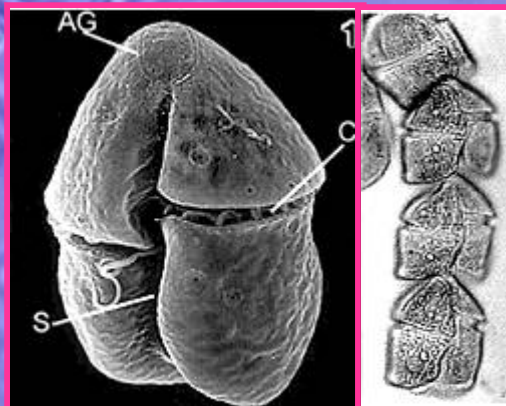
Alghe produttrici di PSP



Alexandrium minutum

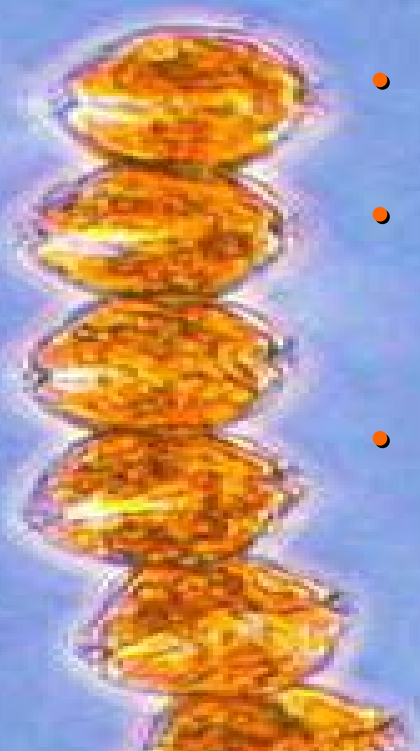


Alexandrium catenella



Gymnodinium catenatum

Alexandrium sp.



- 20.000 cellule/L $\Rightarrow$ fioritura
- > 20 milioni di cellule/L $\Rightarrow$ maree rosse
- 100-200 cellule/L sono tuttavia sufficienti a provocare la tossicità nei molluschi

Non tutti i molluschi concentrano le alghe alla stessa maniera (es.: *pecten* è raramente vettore di tossine PSP)

Diffusione di PSP

Aree tropicali (*Pyrodinium bahamense*) e **temperate** (*Alexandrium spp*) di tutto il mondo

Mediterraneo (*Alexandrium spp*, *Gymnodinium catenatum*)

- § nel 1994 presenza di *A.minutum* lungo la costa dell'Emilia Romagna
- § nel 2002-2003 presenza di *A.minutum* ed *A.catenella* in Sardegna
- § dal 2003 ad oggi positività nei mitili in Sardegna
- § dal 2006 presenza di *A.minutum* in Sicilia

I molluschi coinvolti sono stati mitili e vongole

Nel mondo vengono riportati circa 2000 casi/anno con un tasso di mortalità del 15%

Tossine DSP

- **Tossine acide:**
acido okadaico (OA) e derivati (DTX)
- **Tossine neutre:**
pectenotossine (PTX)
- **Yessotossina (YTX) suoi derivati**
- **Azaspiracido e derivati (AZA)**

Sintomatologia dell'intossicazione da DSP

Sintomi ($\frac{1}{2}$ ora - 12 ore):

- ✖ diarrea (92%)
- ✖ nausea (80%)
- ✖ vomito (79%)
- ✖ dolori addominali (53%)

Durata: fino a 3 giorni nei casi più gravi

Esito: favorevole

Diffusione DSP



Giappone: legato al consumo di **mitili** (*M. edulis* e *M. coruscum*), **pettini** (*Patinopecten yessoensis* e *Chlamis nipponensis*) e **vongole** (*Tapes japonica* e *Gomphina melaegis*).

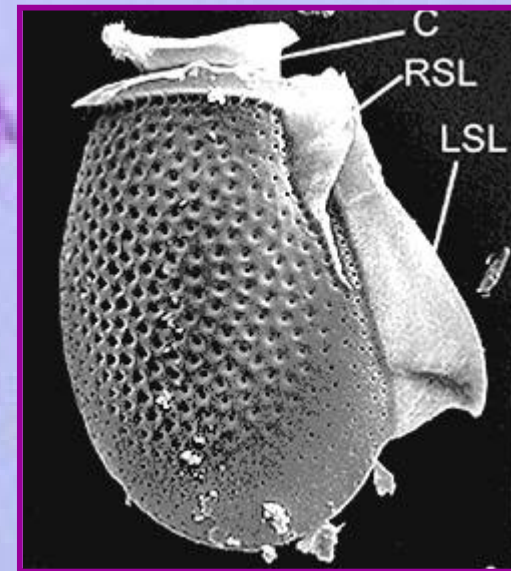
Europa: legato al consumo di **mitili** (*M. edulis*) e **ostriche** (*Ostrea sp.*)

Oceania, Asia, Nord- e Sud-America

Alghe produttrici di DSP

- § Varie specie dei generi *Dinophysis* e *Prorocentrum* sono presenti anche nel Mediterraneo e nei mari italiani, dove non formano mai maree rosse.
- § 55 specie di *Dinophysis* nel mare Adriatico;
- § Specie produttrici di tossine DSP :
 - *D. acuminata*
 - *D. caudata*
 - *D. mitra*
 - *D. tripos*
 - *D. acuta*
 - *D. fortii*
 - *D. rotundata*
 - *D. sacculus*
- § Altre specie produttrici di DSP (yessotossine) sono:
 - *Protoceratium reticulatum*
 - *Lingulodinium polyedrum* (responsabile di maree rosse in Adriatico)

Alghe produttrici di DSP (I)



Dinophysis fortii

Alghe produttrici di DSP (II)

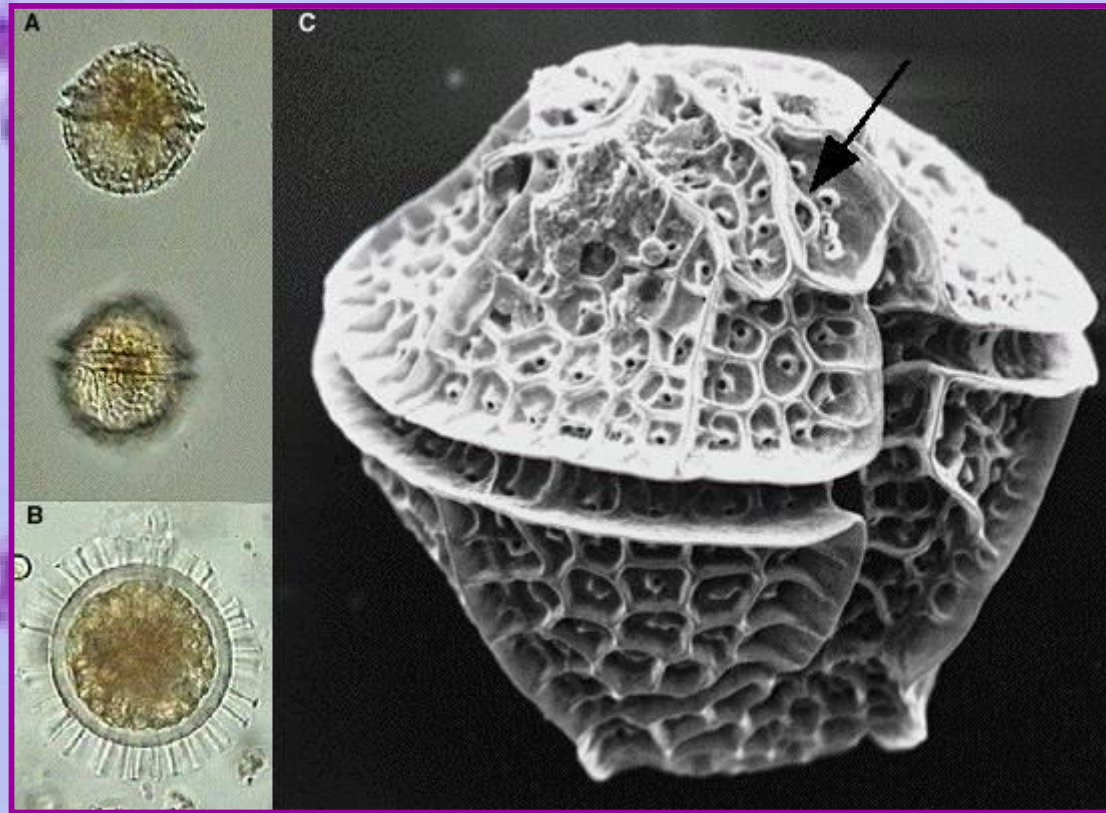


Dinophysis acuta



Dinophysis caudata

Alghe produttrici di DSP (III)

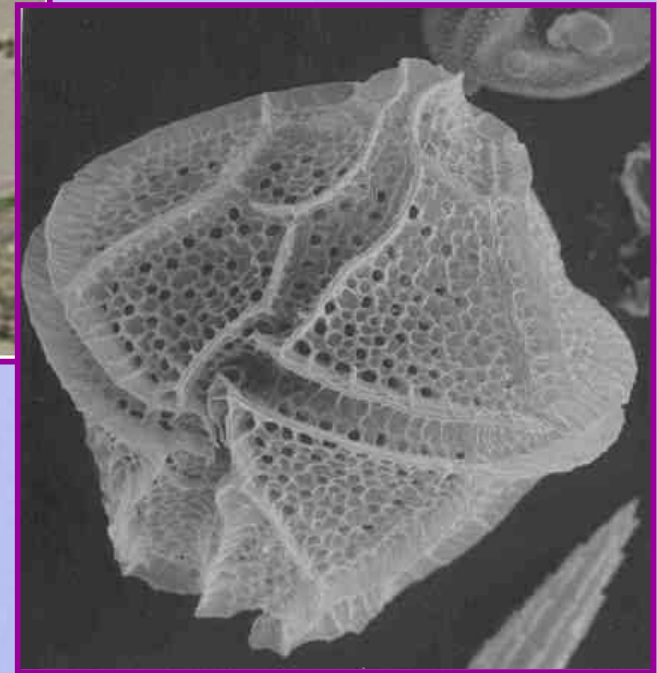


Gonyaulax grindleyi
(*Protoceratium reticulatum*)

Alghe produttrici di DSP (IV)



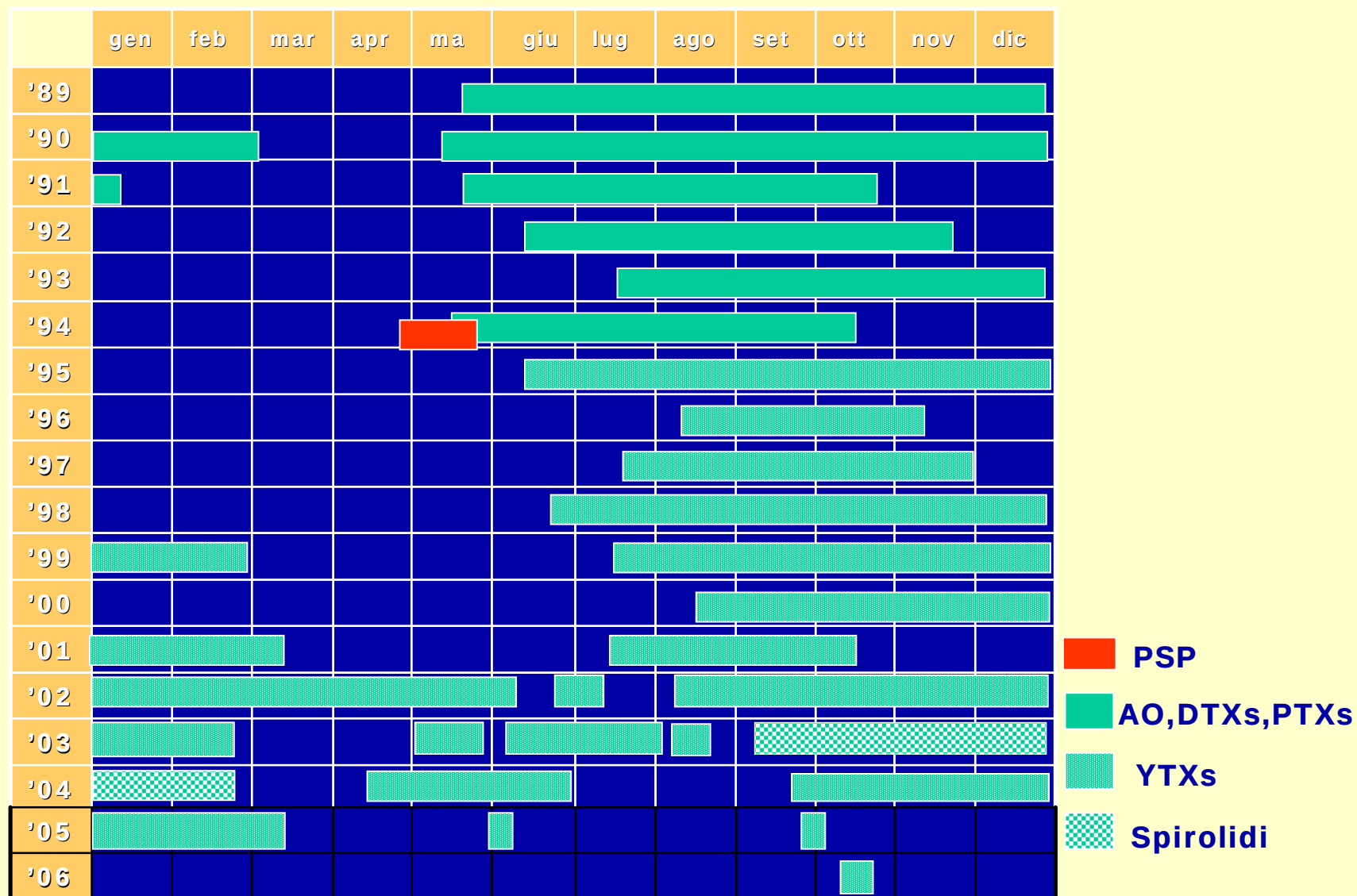
Lingulodinium polyedrum



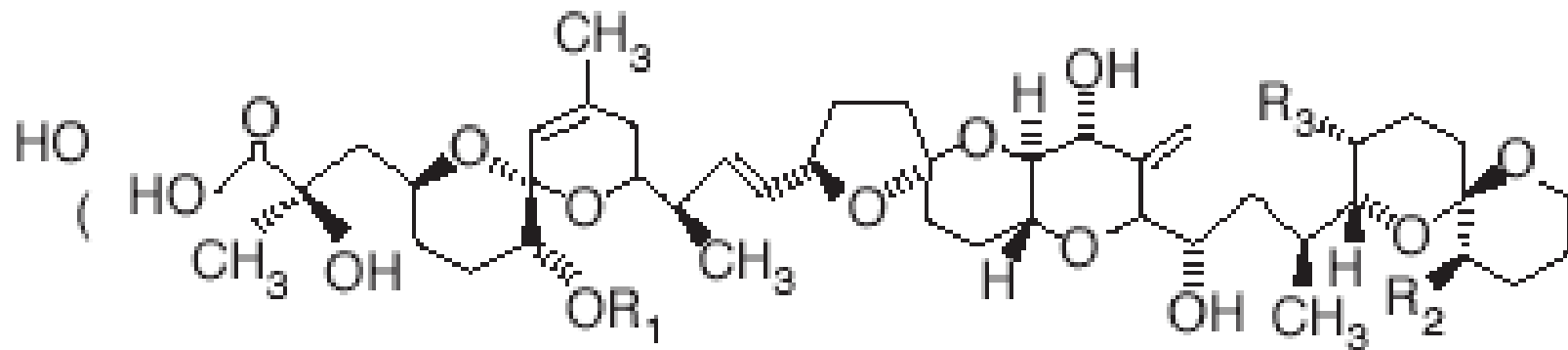
Tossine DSP - epidemiologia

- ù 1000-2000 cellule/l di *Dinophysis spp.* à accumulo di 20 000 - 30 000 cellule per epatopancreas e elevato livello di tossicità nei mitili.
- ù Intossicazioni DSP sulla costa olandese sono state associate a concentrazioni di oltre 20 000 cellule/l
- ù L'accumulo di tossine DSP nei molluschi dipende da diversi fattori:
 - il tempo necessario ai molluschi per diventare tossici dipende dalla presenza non solo di alghe tossiche ma anche di altre specie non tossiche
 - le concentrazioni di tossina vengono raggiunte nei mitili, concentrazioni inferiori nelle vongole

Periodi di sospensione temporanea della raccolta di *Mytilus galloprovincialis* per DSP e PSP in Emilia Romagna



Acido okadaico e derivati



	R1	R2	R3
AO	H	H	CH ₃
DTX1	H	CH ₃	CH ₃
DTX2	H	H	CH ₃
DTX3	acyl	CH ₃	CH ₃
7-O-acylOA	acyl	CH ₃	H
7-O-acylDTX2	acyl	H	CH ₃

Effetti di OA - DTX (I)

Ø OA, DTX1 e DTX2 inibiscono le proteine fosfatasi (in particolare la PP2A) importanti per la regolazione dell'attività cellulare

Ø OA stimola:

la fosforilazione che controlla la secrezione di sodio da parte delle cellule intestinali

direttamente la contrazione della muscolatura liscia anche intestinale

Ø OA, DTX1, DTX3 hanno effetto distruttivo sull'epitelio dell'intestino tenue

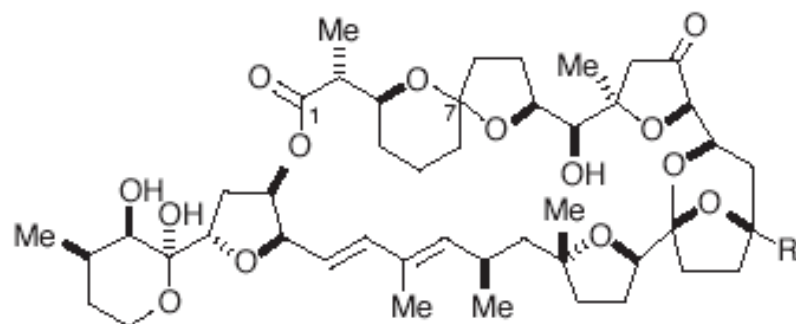
Effetti di OA - DTX (II)

- v OA e DTX1 agiscono come promotori di tumori della pelle (papillomi e carcinomi)**
- v OA agisce probabilmente anche come promotore di tumori dello stomaco (attivazione ornitina-decarbossilasi)**
- v OA ha mostrato attività genotossica**

Pectenotossine (PTX)

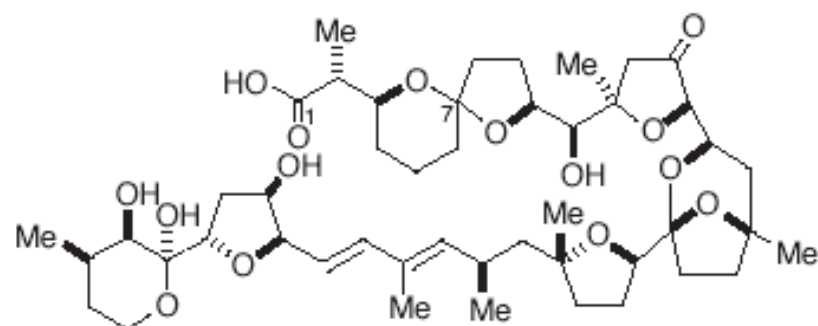
- Prodotte principalmente da *D. fortii*
- 9 composti derivati dalla PTX2 attraverso processi di biotrasformazione ad opera dei molluschi

Pectenotossine (PTX)



R	C-7
PTX1: CH ₂ OH	<i>R</i>
PTX2(1): CH ₃	<i>R</i>
PTX3: CHO	<i>R</i>
PTX4: CH ₂ OH	<i>S</i>
PTX6: COOH	<i>R</i>
PTX7: COOH	<i>S</i>

macrolide



C-7
PTX2SA (2): <i>R</i>
7- <i>epi</i> -PTX2SA (3): <i>S</i>

seco acid

Non è la nota struttura chimica della PTX5

Effetti delle PTX

- ➔ diminuzione del numero e perdita dell'arrangiamento radiale dei microtubuli in epatociti di topo in vitro (PTX1)
- ➔ cambiamenti nella polimerizzazione dell'actina con disorganizzazione del citoscheletro (PTX6)
- ➔ aumento dei vacuoli non contenenti lipidi negli epatociti di topo (PTX1)
- ➔ diarrea in topi adulti dopo somministrazione orale alla dose di 1,0 mg/kg. A concentrazioni che raggiungono i 2,0 mg/kg si notano anche lesioni al fegato, allo stomaco e all'intero intestino (PTX2)

Yessotossine (YTX)

Isolate per la prima volta dal bivalve
Patinopecten Yessoensis

prodotte da:

Protoceratium reticulatum

Lingulodinium polyedrum

presenti in Adriatico nel giugno 1995 e nelle estati
1996 e 1997

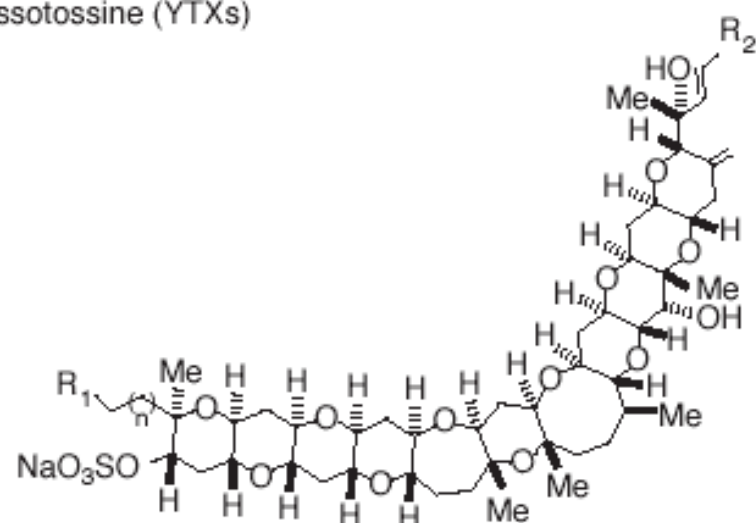
Microflora
intestinale



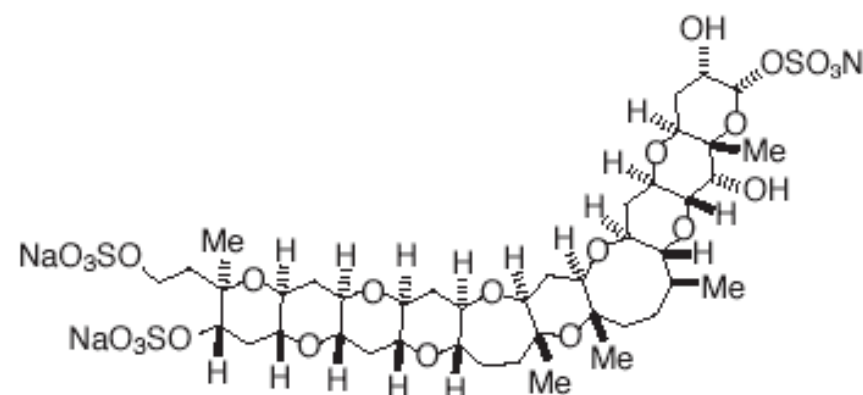
Yessotossina → miocardio

Desulfo-YTX → { fegato
pancreas

Yessotossine (YTXs)



Adriatoxin (ATX)



yessotoxin (YTX)

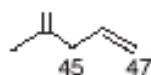
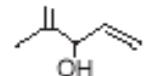
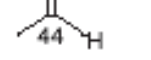
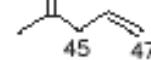
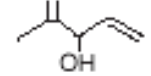
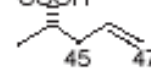
45-hydroxyessotoxin (hydroxyYTX)

45, 46, 47-trinoryessotoxin (norYTX)

2-homoyessotoxin (homoYTX)

2-homo-45-hydroxyessotoxin (hydroxy-homoYTX)

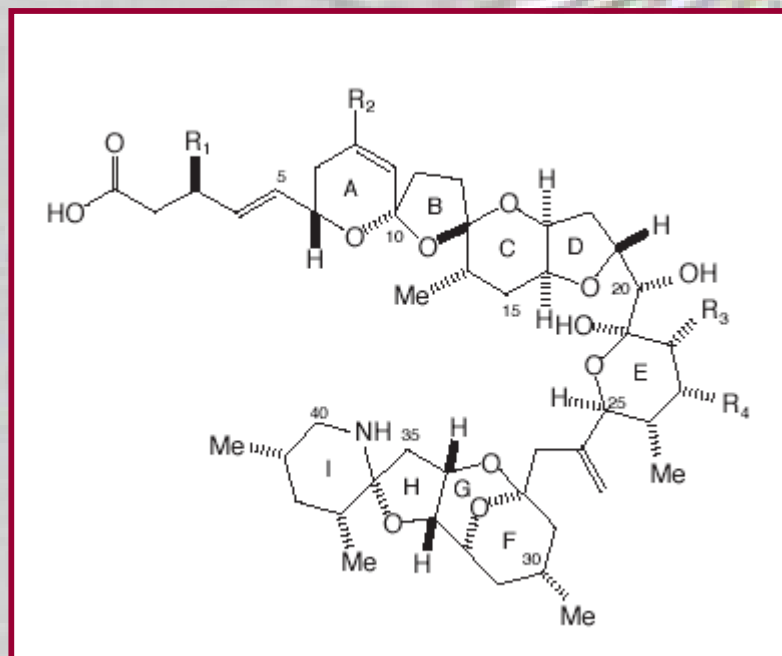
44-carboxyessotoxin (carboxyYTX)

R_1	R_2	n
OSO_3Na		1
OSO_3Na		1
OSO_3Na		1
OSO_3Na		2
OSO_3Na		2
OSO_3Na		1

Azaspiracido

- Ⓒ tossina liposolubile (+4 analoghi)
probabilmente prodotta da Dinoflagellate
- Ⓒ primo caso: 1995, baia di Killary
(Irlanda)
- Ⓒ causa danni al fegato, pancreas, timo,
tessuti linfatici, tratto digestivo
- Ⓒ variabilità nella sensibilità in relazione
all'età

Azaspiracidi (AZAs)



Tossina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	mg/kg*
Azaspiracido (AZA)	H	H	Me	H	0,20
Azaspiracido-2 (AZA2)	H	Me	Me	H	0,11
Azaspiracido-3 (AZA3)	H	H	H	H	0,14
Azaspiracido-4 (AZA4)	OH	H	H	H	0,47
Azaspiracido-5 (AZA5)	H	H	H	OH	1,00

(*) Tossicità delle AZAs espressa come mortalità del topo per i.p. [57].

Metodi di analisi per PSP e DSP

- v Mouse test
- v Test su colture cellulari
- v Metodi immunologici (RIA, ELISA)
- v HPLC; LC-MS

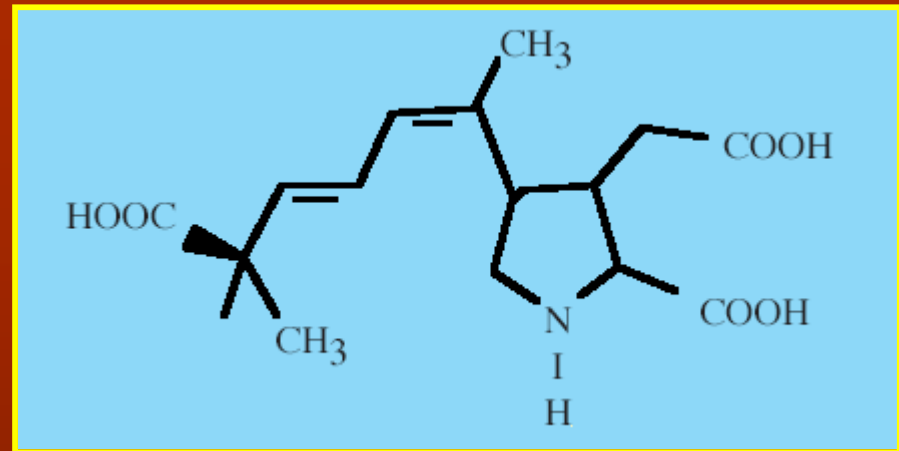
Limiti di biotossine

Il Regolamento (CE) n. 853/2004, definisce i seguenti tenori massimi di alcune biotossine marine in molluschi bivalvi e in altri organismi:

- 800 μg di equivalente saxitossina/kg parte edibile;
- 160 μg di equivalente acido okadaico/kg parte edibile;
- 1 mg di equivalente yessotossina/kg parte edibile;
- 160 μg di equivalente azaspiracido/kg parte edibile.

Tossine ASP

Acido Domoico e suoi isomeri (8)



Nitzschia pungens f. multiseriata

- idrosolubili
- termostabili
- stabili in ambiente acido

Sintomatologia da ASP

Aminoacidi neurotossici che si legano a livello cerebrale ai recettori del glutammato



stimolazione delle cellule nervose
possibilità di lesioni

Sintomi:

dopo 24 ore à nausea, vomito e diarrea

dopo 48 ore à confusione, perdita di memoria, disorientamento

Durata: qualche giorno (anziani e soggetti con
insufficienza renale sono più sensibili)

Diffusione di ASP

- casi di intossicazione in Canada e California (USA)
- mitili contaminati in Australia, Nuova Zelanda, Spagna, Olanda
- in Italia negli anni 1988/91 sono comparsi nell'alto e medio Adriatico varie specie del genere *Nitzschia* senza tuttavia produzione di tossine.



Metodi di analisi per ASP

v Mouse test

v HPLC

v Elettroforesi capillare

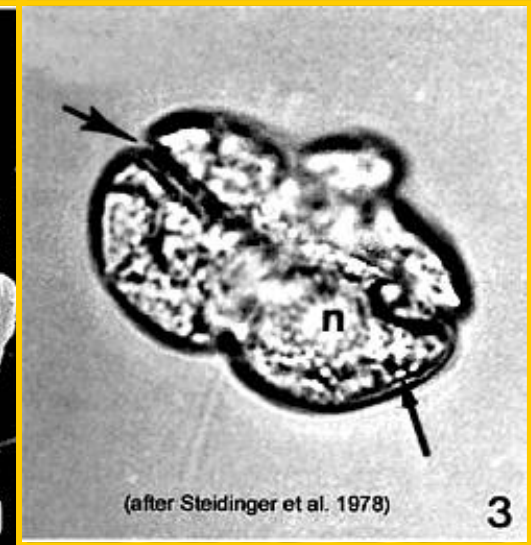
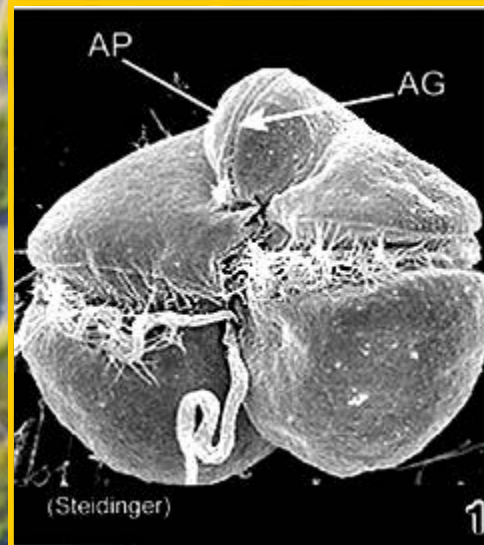
Tossine NSP

Brevetossine

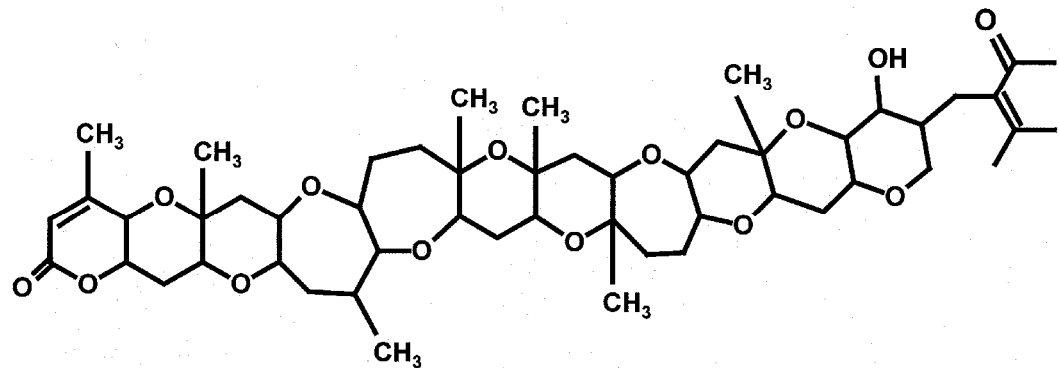
(8 composti di cui 2 contenenti fosforo)

- liposolubili
- termostabili
- letali per i pesci
- 5000 cell/mL inducono tossicità nei molluschi (soprattutto mitili e ostriche)

(*) responsabile di red-tides



Gymnodinium breve (*)



Sintomatologia da NSP

Sostanze depolarizzanti che inducono l'apertura dei canali di membrana del Na



inibizione della trasmissione neuromuscolare nei muscoli scheletrici

§ forma da **ingestione di molluschi** (ostriche e mitili):

sintomi (entro le 24 ore): paralisi alla bocca e alle dita, atassia, sensazione di caldo e freddo, bradicardia, midriasi, lieve diarrea. Durata: 2-3 giorni. Esito favorevole

§ forma da **inalazione di aerosol**:

sintomi: tosse e irritazione delle vie aeree superiori. Esito favorevole

Diffusione di NSP

Stagione favorevole alla fioritura: da gennaio ad aprile.

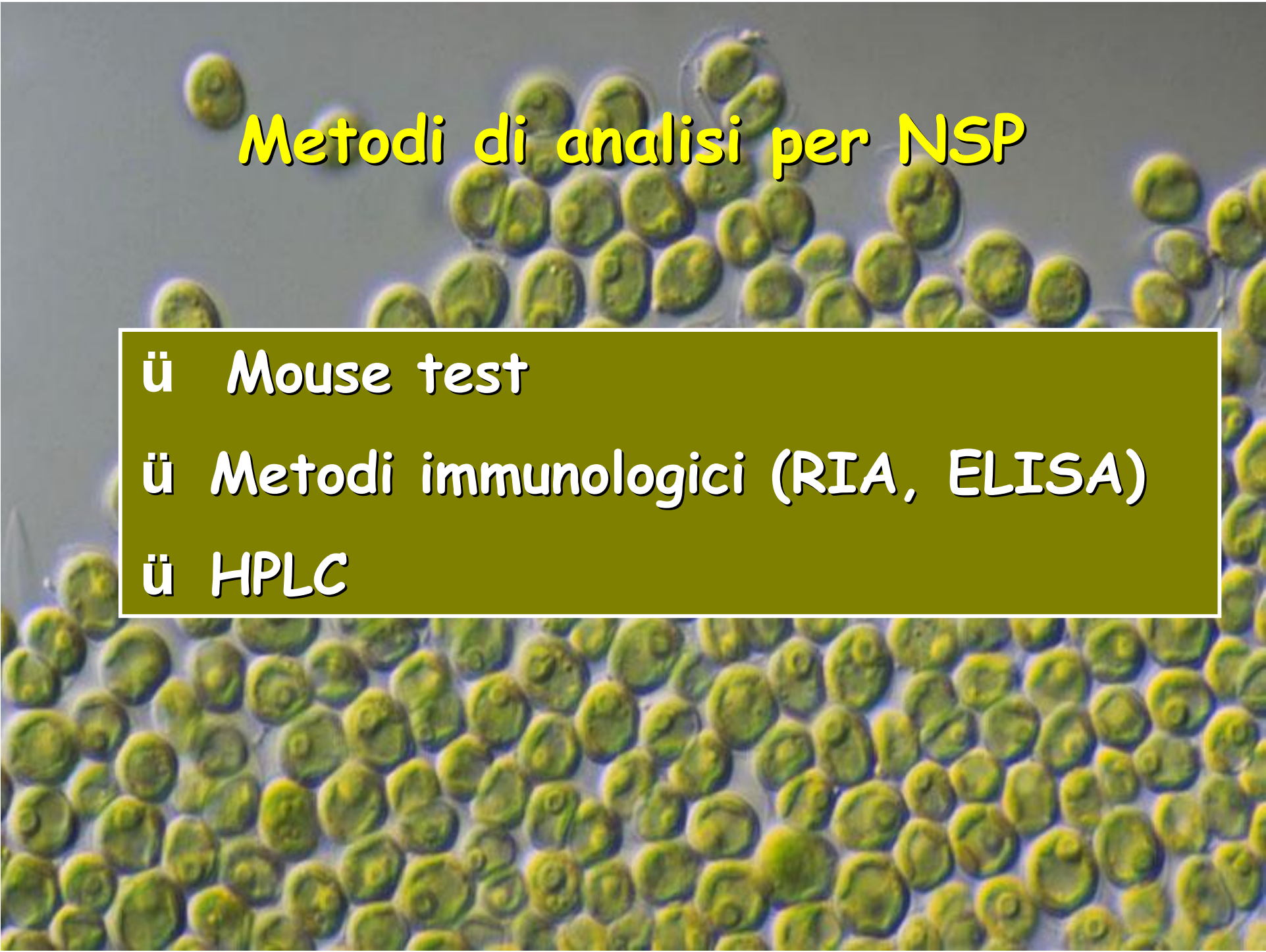
Golfo del Messico (intossicazioni nell'uomo)

Florida, North Carolina (morie di pesci)

Spagna settentrionale, Giappone, costa orientale del Mediterraneo.

Adriatico settentrionale (1976-1977-1984)
(*Gymnodinium spp.*)

Sardegna (1985) (*Gymnodinium spp.*)



Metodi di analisi per NSP

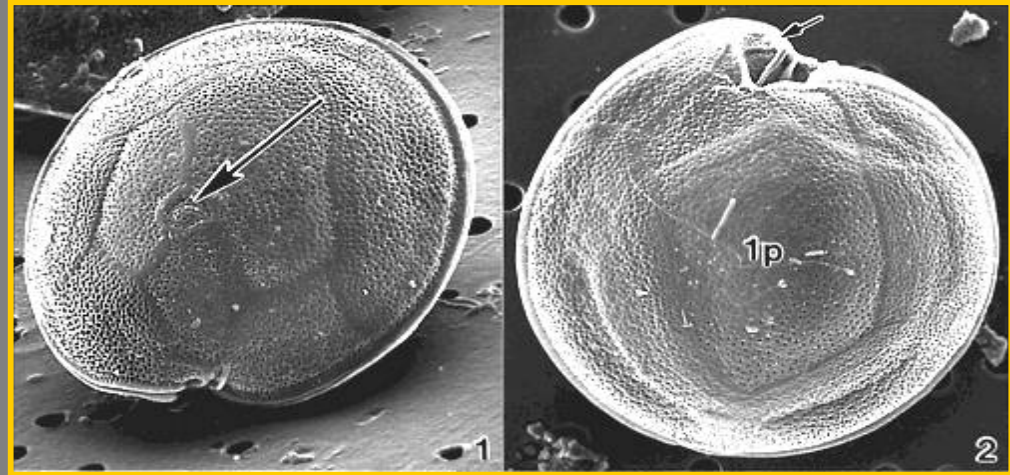
- ü Mouse test

- ü Metodi immunologici (RIA, ELISA)

- ü HPLC

Ciguatera

- 5 tossine (ciguatossina, maitotossina, scaritossina)



Gambierdiscus toxicus

- termostabili
- idro- e lipo-solubili
- struttura chimica poco nota
- veicolate da oltre 400 specie di pesci (es. scari, pesci-chirurgo, barracuda, maccarelli...) accumulandosi nell'intero organismo e preferenzialmente nelle interiora

Sintomatologia da Ciguatera

Aumento della permeabilità al Na della membrana cellulare delle fibre nervose e muscolari



depolarizzazione

Sintomi (1-6 ore): nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, astenia, mialgie, disturbi neurologici, bradicardia o tachicardia

Durata: 24-48 ore, l'astenia e alcuni sintomi neuro-logici possono persistere per mesi o anni.

Evitare una reintossicazione poiché anche piccole quantità di tossina possono dare un peggioramento della malattia

Diffusione della Ciguatera

Aree tropicali (Antille, Caraibi, Venezuela) e subtropicali;

Atlantico del nord (Canada);

Regioni del Pacifico (Giappone, Australia, Polinesia, Isole Hawaii)

Metodi di analisi per Ciguatera

- v Mouse test
- v Colture cellulari
- v Metodi immunologici (RIA, EIA)
- v HPLC

Palitossina

Estate 2005: Genova

200 persone:

rinorrea

tosse

febbre

broncocostrizione con dispnea

dermatite

congiuntivite

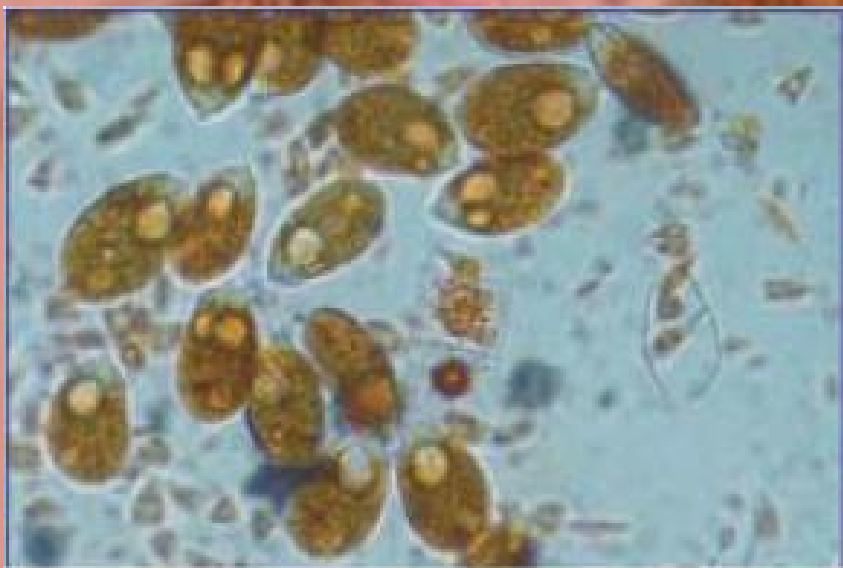
I sintomi sono comparsi circa 4h dopo l'esposizione e sono scomparsi dopo 24-48h

Estate 2006: Genova, La Spezia

Estate 2003-2004: Toscana, Puglia, Sicilia

Estate 2007: Marche, Friuli

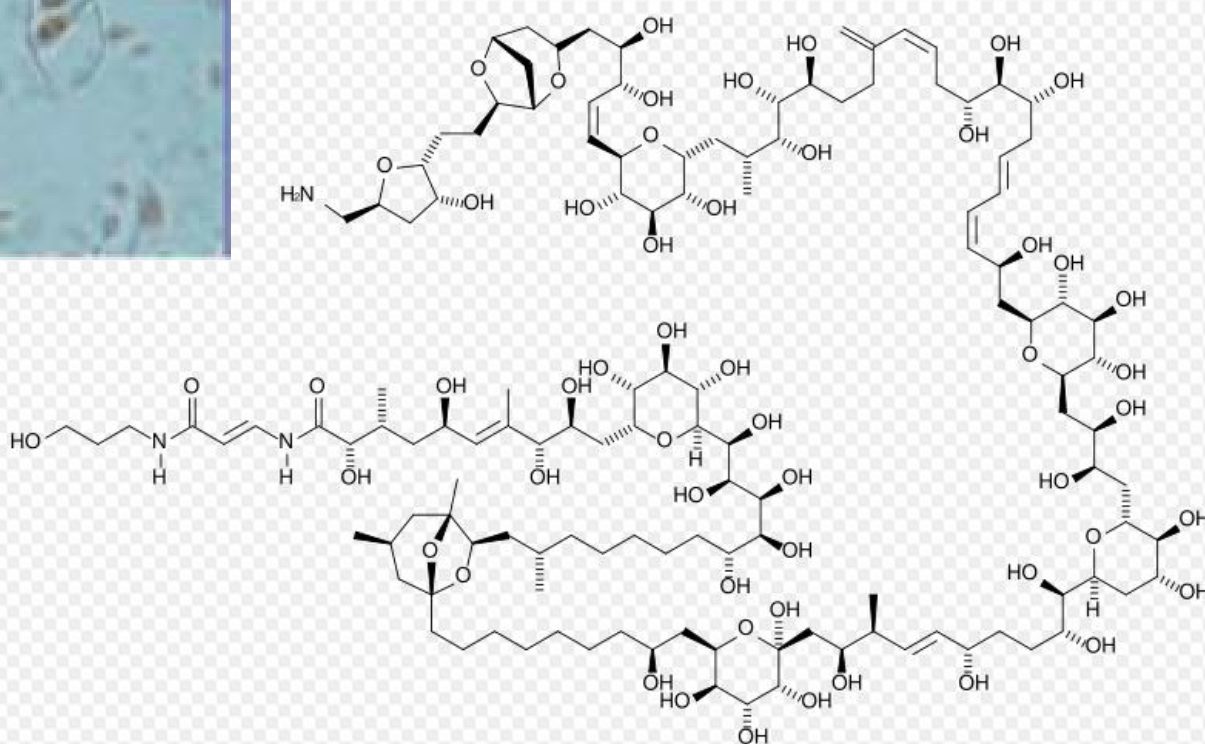
Palitossina



Ostreopsis ovata - migliaia di cellule / L

Dinoflagellata bentonica spesso associata a macroalghe rosse e marroni

Isolata originariamente da vari coralli del genere *Palytoa*



Diffusione di Ostreopsis

Distribuzione prevalentemente tropicale e subtropicale

Negli ultimi anni presenza in acque temperate (Mediterraneo)

Le tossine sono largamente diffuse nel mare dei Caraibi, nella zona meridionale-occidentale dell'oceano Pacifico, nell'oceano Atlantico e nell'oceano Indiano.

Fioriture di *Ostreopsis*



Fioritura in superficie: presenza di schiume superficiali; opalescenza dell'acqua; materiale gelatinoso in sospensione

Fioritura in profondità: pellicola bruna avvolgente gli scogli e ciò che si trova sul fondo, fiocchi di materiale in sospensione, sofferenza di organismi marini (ricci, stelle marine, cefalopodi e pesci)

Palitossina

Forma da ingestione da prodotti della pesca
(molluschi, granchi, maccarelli, sardine) :

nausea, diarrea, crampi addominali, parestesie, spasmi
muscolari, tachicardia, dispnea, anemia emolitica

promotore tumorale

Meccanismo d'azione:

Citolisi conseguente alla inibizione della pompa Na^+ / K^+

Metodi di analisi per la Palitossina

- ▼ Mouse test
- ▼ Saggio di emolisi
- ▼ HPLC
- ▼ LC-MS