



**Alternative alla sperimentazione animale nello studio e rilevazione
delle biotossine marine
Teramo, 9 Marzo 2009**

NUOVI ORIENTAMENTI COMUNITARI SUL RISCHIO BIOTOSSINE MARINE

R.Poletti

**LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER LE BIOTOSSINE MARINE
NATIONAL REFERENCE LABORATORY ON MARINE BIOTOXINS
(G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)
V.le A. Vespucci, 2 - 47042 - CESENATICO (FC) ITALY
Tel +39 0547 80278 Fax + 39 0547 75094**

1

**Quali sono i temi in Discussione nella Ue in
Riferimento alle Biotossine Marine alla luce dei
nuovi Regolamenti ?**

- 1) Adeguatezza degli attuali limiti**
- 2) I metodi di prova**
- 3) Le nuove biotossine marine**



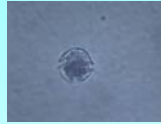
2

Comunemente le biotossine marine sono divise in Idro e liposolubili

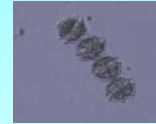
1) Tossine idrosolubili

Produttori

- PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)



Alexandrium minutum
Halim



Alexandrium catenella
(Whedon & Kofoid) Balech

- ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)



Pseudo-nitzschia pungens Hasle

- TTX (Sindrome neurotossica da pesce palla)

Vibrio
Bacillus
Moraxella

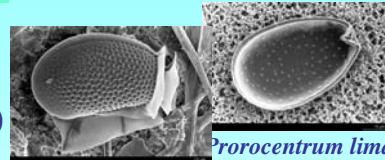


3

2) Tossine liposolubili

Produttori

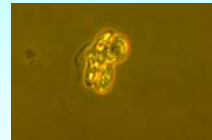
- DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning)



Prorocentrum lima
(Ehrenberg) Dodge

Dinophysis fortii Pavillard

- NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning)



Gymnodinium breve Davis

- Ciguatera o CFP



Gambierdiscus toxicus Adachi & Fukuyo



4

Recentemente la comunità scientifica ha preferito classificare le biotossine marine in otto gruppi in base alla loro struttura chimica (FAO/WHO/IOC workshop, 2004):

- Azaspiracidi (AZAs)
- Acido Okadaico e DTXs
- Pectenotossine (PTXs)
- Yessotossine (YTXs)
- Brevetossine (NSP- PbTXs)
- Imine cicliche ●
- ● Acido Domoico (DAs)
- ● Saxitossine (STXs)
- Ciguatossine (CFP)
- Tetrodotossine (TTX)
- Palitossine (PITX) ●

Food and Agriculture Organization (FAO)
Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC)
World Health Organization (WHO)

| | |
|---|-----------------------------------|
| ● | tossine recenti trovate in Italia |
| { | Gruppo DSP |
| ● | ASP |
| ● | PSP |



DSP

Le DSP sono divise in quattro classi strutturali completamente diverse per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e lesioni biochimiche:

| Tossina | Limite di Legge | |
|---------------------------------|-----------------|----------------|
| acido okadaico e derivati (OAs) | 160 µg/kg pe | } 160 µg/kg pe |
| Pectenotossine (PTXs) | 160 µg/kg pe | |
| Yessotossine (YTXs) | 1 mg/kgpe | |
| Azaspiracidi (AZAs) | 160 µg/kg pe | |



Per il Tossicologo

Il consumo dei molluschi bivalvi (FAO/WHO/IOC Expert Consultatio, 2004) **è considerato a carattere saltuario**, conseguentemente gli effetti dannosi che eventuali biotossine, contenute nell'alimento, hanno sulla salute umana sono da considerarsi come una **tossicità acuta**. In questa situazione, il parametro adatto da impiegare nella valutazione del rischio è **la Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**.

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



FAO/WHO/IOC Expert Consultation, 2004

7

Valutazione del Rischio

Per la valutazione del rischio e per definire limiti delle varie biotossine è importante stabilire

la quantità di alimento che può essere ingerita nelle 24 ore.

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

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

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



8



Altri elementi importanti per la valutazione del rischio

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

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



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

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

Fattori di Incertezza (FI) generalmente utilizzati (WHO)

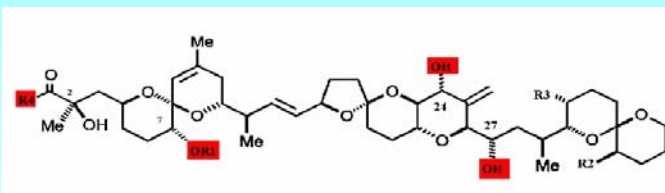
| Sorgente d' incertezza | FI |
|---|------|
| Variatione interspecie (da animali \Rightarrow all'uomo) | 1-10 |
| Variatione intraspecie (variazione di sensibilità fra membri della stessa specie) | 1-10 |
| Validità dei dati sperimentali | 1-10 |
| Natura e severità degli effetti tossici | 1-10 |

FI è il prodotto dei singoli fattori e può avere valori che vanno da 1 a 10000*

* In alcuni casi viene inserito un ulteriore FI per gruppi ad alto rischio (es. feto, nel caso di agenti teratogenici)

TOSSINE LIPOFILICHE

1- Acido Okadaico e derivati



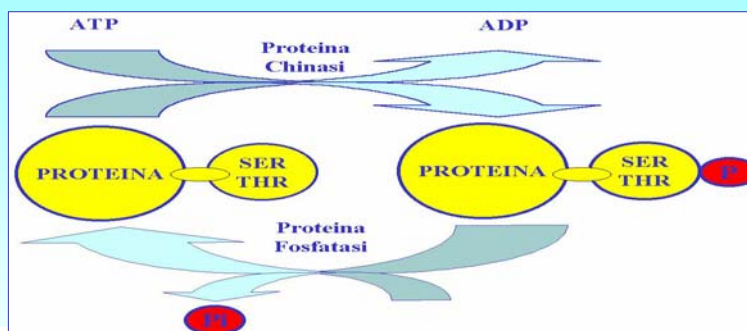
| | | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | PM |
|-----------------------------|------------|-------|-----------------|-----------------|----|----|--------|
| Acido okadaico | (AO) | H | CH ₃ | H | OH | - | 804,46 |
| Dinophysitossina 1 | (DTX1) | H | CH ₃ | CH ₃ | OH | - | 818,48 |
| Dinophysitossina 2 | (DTX2)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

Valutazione del Rischio Ac. okadaico e derivati (AOs)

| | |
|---------------------------------------|--|
| Distribuzione | Le tossine (AOs) sono state trovate in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud america, Oceania. |
| Assorbimento Distribuzione | AOs sono rapidamente assorbite e distribuite in tutto il corpo: nel contenuto intestinale > urine > feci > tessuti intestinali > polmone > fegato > stomaco > sangue. |
| Tossicità in animali (topo) | Per iniezione intraperitoneale (i.p.): 200 µg/kg AO; 160 µg/kg DTX1; 250 µg/kg DTX3 Per os la tossicità è inferiore di 3 – 6 volte rispetto a quella i.p.. |

Meccanismo d'azione

Potenti inibitori delle Proteine Fosfatasi PP2A e PP1



Tossicità in animali (topo)

Per iniezione intraperitoneale (i.p.): 200 µg/kg AO; 160 µg/kg DTX1; 250 µg/kg DTX3
Per os la tossicità è inferiore di 3 – 6 volte rispetto a quella i.p..

Tossicità umana

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

LOAEL 0,8 µg/kg peso corporeo (p.c.) ovvero circa 50 µg di OA/per una persona di 60 kg.



Mal di testa

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

Dose Acuta di Riferimento (ARfD)

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

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

| Grammi di Parte Edibile Assunta | Limite Guida µg/kg p.e. | Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 100 | 180 * | 160 |
| 250 | 72 * | |
| 400 | 45 * | |

| Concentrazione di tossina µg/Kg p.e. | Porzione (Kg) | Tossina introdotta per porzione µg AO equivalenti/ porzione |
|--------------------------------------|---------------|---|
| 160 (Attuale limite di legge) | 0,400 | 64 |
| 45 | 0,400 | 18 |

* Indicazione EFSA novembre 2007

Yessotossina e analoghi

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

| R | n | Nome |
|---|---|---|
| | 1 | Yessotoxin (YTX, 1) |
| | 2 | Homoyessotoxin (HomoYTX, 2) |
| | 1 | 45-hydroxyessotoxin (45-OHYTX, 3) |
| | 2 | 45-hydroxyhomoyessotoxin (45-OHhomoYTX, 4) |
| | 1 | Carboxyessotoxin (CarboxyYTX, 5) |
| | 2 | Carboxyhomoyessotoxin (CarboxyhomoYTX, 6) |
| | 1 | 42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxoYTX (NoroxoYTX, 7) |
| | 2 | 42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxohomo YTX (NoroxohomoYTX, 8) |
| | | Adriatoxin (ATX, 9) |

CENTRO RICERCHE MARINE

17

Struttura Chimica

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

Valutazione del Rischio YTXs

| | |
|-----------------------------|---|
| Distribuzione | YTXs sono state trovate in microalghe e molluschi bivalvi in: Australia, Canada, Giappone, Inghilterra, Italia, Nuova Zelanda, Norvegia. |
| Assorbimento | Non ci sono dati per quanto riguarda l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo ed l'escrezione. L'assorbimento delle YTXs nel tratto gastrointestinale è molto limitato. |
| Distribuzione | |
| Metabolismo | |
| Escrezione | |
| Meccanismo d'azione | Non ci sono dati disponibili sul dettaglio del meccanismo o meccanismi dell'azione tossica delle YTXs. |
| Tossicità in animali (topo) | Per i.p. dei 9 analoghi della YTX, 7 mostrano una tossicità (LD ₅₀) che varia dai 100 ai 750 µg/kg p.c.. Per os la tossicità è notevolmente inferiore. La somministrazione per os di 5 mg/kg p.c. per breve tempo non ha rilevato tossicità (NOAEL). |



| | |
|----------------------------------|---|
| Tossicità umana | Non sono mai stati riportati casi di intossicazione. |
| Dose Acuta di Riferimento (ARfD) | Sulla base del NOAEL di 5 mg/kg p.c. ed utilizzando un fattore d'incertezza di 100x2, l'ARfD è stata calcolata in 25 µg YTXeq/Kg p.c. (1,5 mg/Persona) |

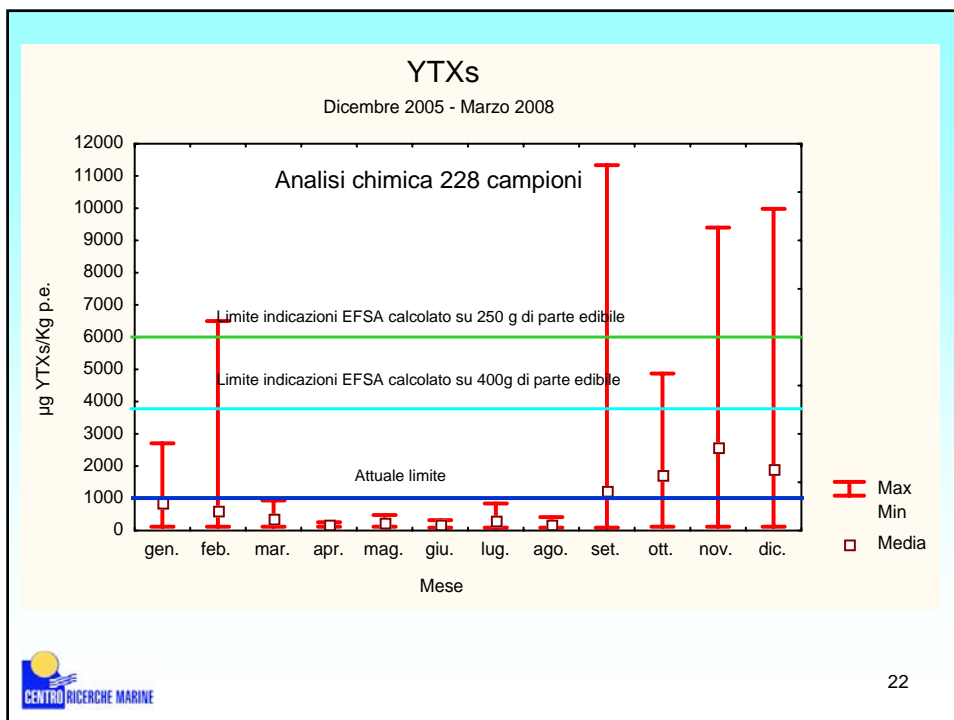
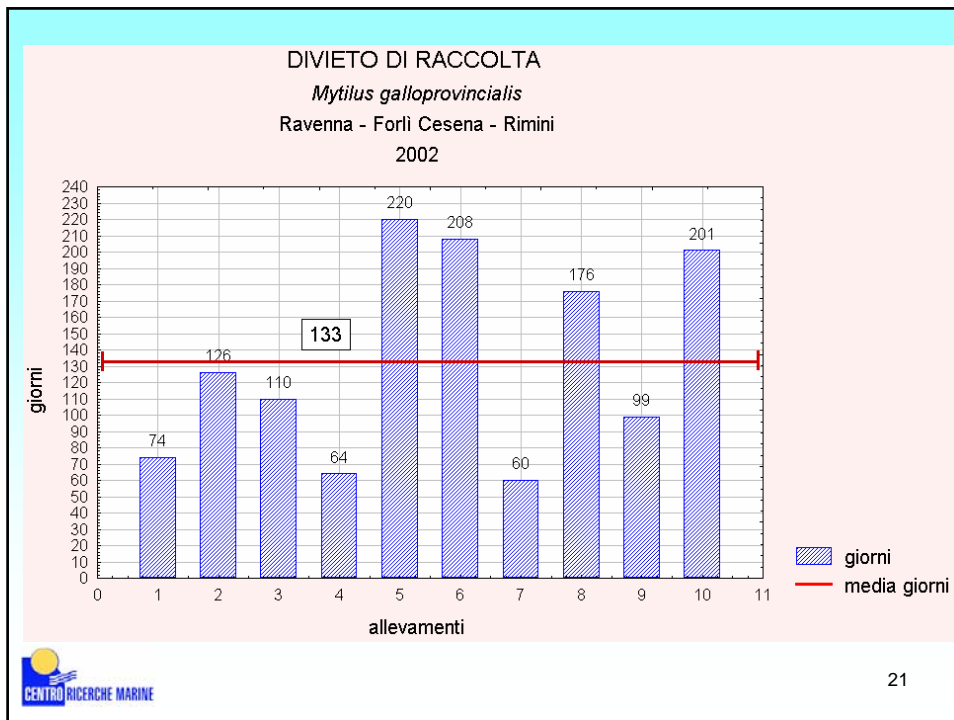
Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

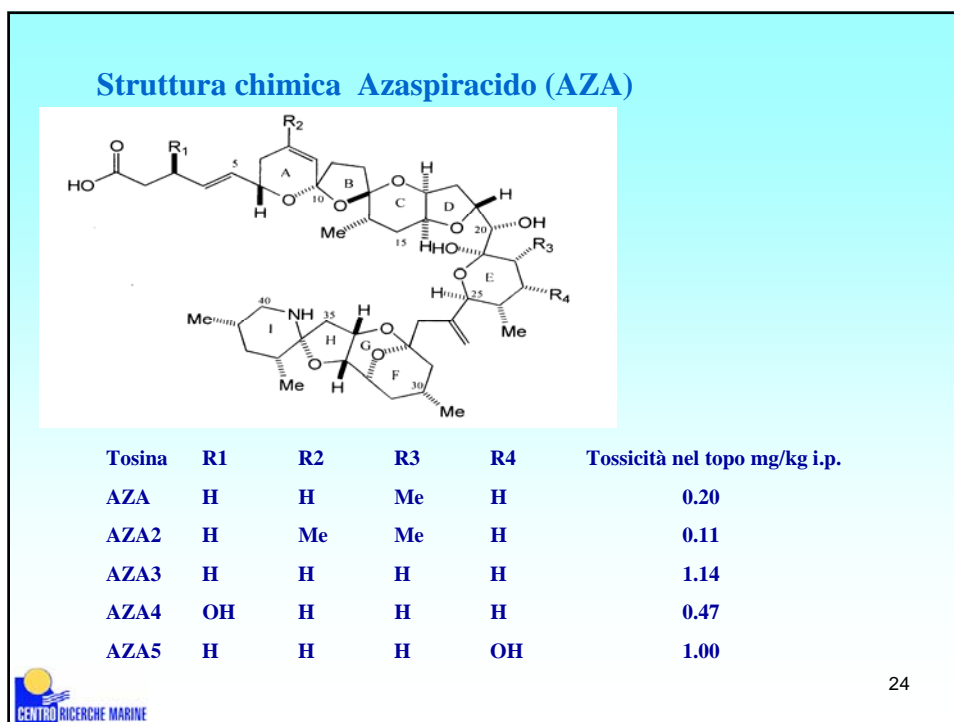
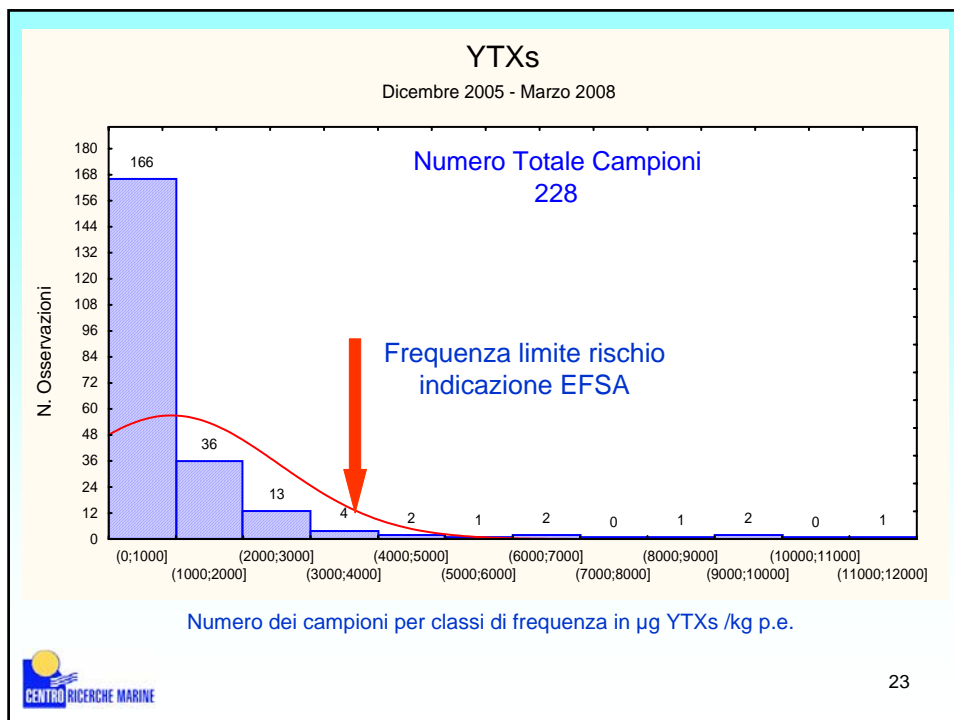
| Grammi di Parte Edibile Assunta | Limite Guida mg/kg p.e. | Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 100 | 15 * | 1 |
| 250 | 6 * | |
| 400 | 3,75 * | |

* Indicazione EFSA 3 Febbraio 2009

20







Valutazione del Rischio AZAs

| | |
|---------------------|--|
| Distribuzione | Le AZAs sono state trovate in molluschi bivalvi: Irlanda, Norvegia e Inghilterra. La microalga implicata sembra essere una Dinoflagellata (<i>Protoperdinium crassipes</i>). |
| Assorbimento | |
| Distribuzione | Non ci sono dati |
| Metabolismo | |
| Escrezione | |
| Meccanismo d'azione | Non ci sono dati |
| Tossicità umana | Effetto acuto disturbi gastrointestinali. L'AZA1 provoca gravi danni al: fegato, pancreas, timo, tessuti linfoidi e tratto digestivo. Dati EFSA indicano un LOAEL di 113 µg/Persona (60 kg), 1,9 µg di AZA1 equivalenti/Kg p.c. |



25

Dose Acuta di Riferimento (ARfD) Gli esperti EFSA hanno estrapolato il NOAEL dal LOAEL applicando un fattore d'incertezza di 3. Un altro fattore d'incertezza di 3 è stato applicato al NOAEL portando ARfD di 0,2 µg/kg pc (**12 µg/Persona**)

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

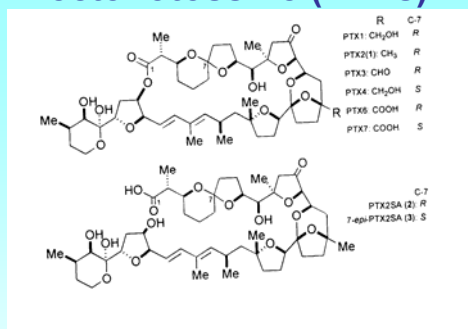
| Grammi di parte edibile assunta | Limite Guida µg/kg p.e. | Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|--------------------------------------|-------------------------|---|
| 100 | 120 * | 160 |
| 250 | 48 * | |
| 400 | 30 * | |
| Concentrazione di tossina µg/Kg p.e. | Porzione (Kg) | Tossina introdotta per porzione µg AZA1 equivalenti/ porzione |
| 160 (Attuale limite di legge) | 0,400 | 64 |
| 30 | 0,400 | 12 |



* Indicazione EFSA giugno 2008

26

Pectenotossine (PTXs)



| Tossina | Massa molecolare | Tossicità (topo i.p.) µg/kg | Effetto patologico |
|---------|------------------|-----------------------------|--------------------|
| PTX1 | 874 | 250 | epatotossico |
| PTX2 | 858 | 230 | epatotossico |
| PTX3 | 872 | 350 | epatotossico |
| PTX6 | 888 | 500 | epatotossico |

27

Vaqlutazione del Rischio

| | |
|------------------------------------|--|
| Distribuzione | Le PTXs sono state trovata in microalghe e molluschi bivalvi in: Italia, Norvegia, Portogallo, Spagna, Australia, Giappone, Nuova Zelanda. |
| Assorbimento | |
| Distribuzione | Non ci sono dati. |
| Metabolismo | |
| Escrezione | |
| Meccanismo d'azione | Non ci sono dati. |
| Tossicità in animali (topo) | Parecchie pectenotossine, compreso PTX-1, PTX-2, PTX-3, PTX-4, PTX-6 e PTX-11, sono tossiche agli animali per iniezione intraperitoneale. Le pectenotossine sono molto meno tossiche per os. |

Tossicità in animali (topo)

In uno studio della nuova Zelanda in cui topi sono stati alimentati oralmente con PTX-2 o PTX-11 alla dose di 5000 µg/kg pc non si è osservata diarrea o qualunque altro effetto tossico. Tuttavia in recenti studi giapponesi PTX-2 pura data tramite alimentazione con sonda gastrica a 2000 µg/kg pc ha causato la diarrea nei topi. I cambiamenti istologici sono stati visti nello stomaco, nei polmoni, nel fegato, nei reni e negli intestini. L'accumulazione fluida nel tratto gastrointestinale inoltre è stata registrata ai dose-livelli più bassi di PTX-2. Il NOAEL è stato calcolato in 300 µg/kg pc.

Tossicità umana

In Australia alcuni casi di intossicazione umana (disturbi gastrointestinali) sono stati inizialmente attribuiti a PTX poi, in un secondo tempo, agli esteri dell'acido okadaico (DTX3).



29

Dose Acuta di Riferimento (ARfD)

Sulla base del NOAEL di 300 µg/kg di p.c, applicando un fattore d'incertezza di 100, l' ARfD è stata calcolata in 3 µg equi. di PTX/Kg p.c. (**180 µg/Persona**).

Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

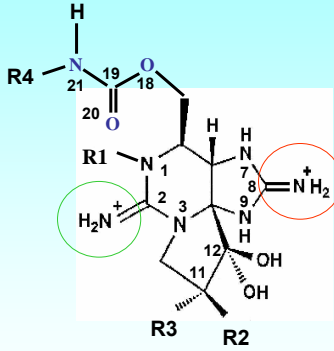
| Grammi di parte edibile assunta | Limite Guida µg/kg p.e. | Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 100 | 1800 | 160 |
| 250 | 720 | |
| 400 | 450 | |

(Codex Committee on Fish & Fishery Product - FAO/WHO/IOC Expert Consultatio, 2004)



30

Saxitossina e analoghi (STXs)



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

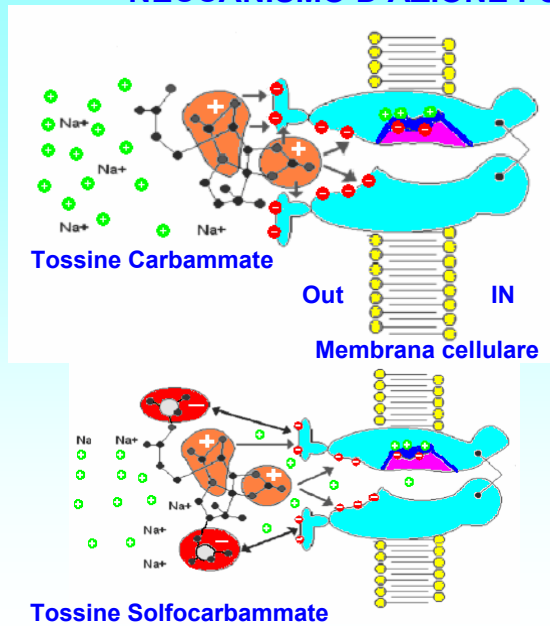
● = ++
● = +
● = 0

* Tossicità Relativa Carica a pH 7.0

31



MECCANISMO D'AZIONE PSP



32

Valutazione del Rischio - PSP (STXs)

| | |
|----------------------|--|
| Distribuzione | Le STXs sono state trovate in microalghe e molluschi bivalvi in: Africa, Asia, Europa, Nord e Sud America, Oceania. |
| Assorbimento | In gatti STX iniettata i.v. si distribuisce in tutto il corpo. Scompare rapidamente nel sangue (nel plasma il tempo di dimezzamento è di circa 22 minuti). In cani e gatti la STX ha un tempo di dimezzamento di 12-18 ore. La fonte principale di escrezione sono le urine. I dati sul metabolismo umano della STX sono molto scarsi. |
| Distribuzione | |
| Metabolismo | |
| Escrezione | |



33

| | |
|------------------------------------|---|
| Tossicità in animali (topo) | La tossicità acuta (LD ₅₀) in topo per via i.v. è di 2,4-3,4 µg/kg p.c.; per i.p. 9,0 - 11,6 µg/kg p.c.; per os 260-263 µg/kg p.c.. |
|------------------------------------|---|

| | |
|------------------------|--|
| Tossicità umana | Effetto acuto dopo 5-30 minuti con formicolio delle labbra, paralisi facciale e nei casi più gravi paralisi degli arti, blocco del diaframma, paralisi respiratoria e morte. L'esposizione umana alla STX è stata stimata valutando una numerosa serie di intossicazioni umane che hanno coinvolto decine di persone con età variabili dai 3 ai 72 anni. La valutazione di questi avvenimenti ha consentito di stimare i sintomi della PSP nelle persone in leggeri, moderati e gravi. Nella sintomatologia leggera è stata valutata una ingestione di 2 - 30 µg STX equi./Kg p.c. (peso corporeo). Per le persone coinvolte nei casi più gravi di intossicazione le tossine ingerite sono state calcolate da 10 a 300 µg STX equi./Kg p.c. Gli esperti, sulla base di questi dati e a titolo provvisorio, hanno calcolato un LOAEL di 2,0 µg / kg p.c.. |
|------------------------|--|

STX

Dose Acuta di Riferimento (ARfD) Sulla base del LOAEL di 2 µg STX /kg p.c., utilizzando un fattore d'incertezza di 3, l'ARfD è stata calcolata in 0,7 µg/Kg p.c. **(42 µg/Persona)**

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

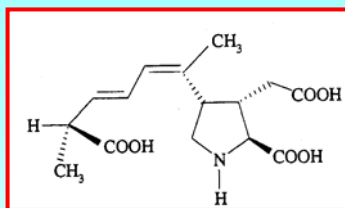
| Grammi di Parte edibile assunta | Limite Guida µg/kg p.e. | Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 100 | 420 | 800 |
| 250 | 170 | |
| 400 | 105 | |

(Codex Committee on Fish & Fishery Product - FAO/WHO/IOC Expert Consultatio, 2004)



35

Valutazione del rischio ASP (ADs)



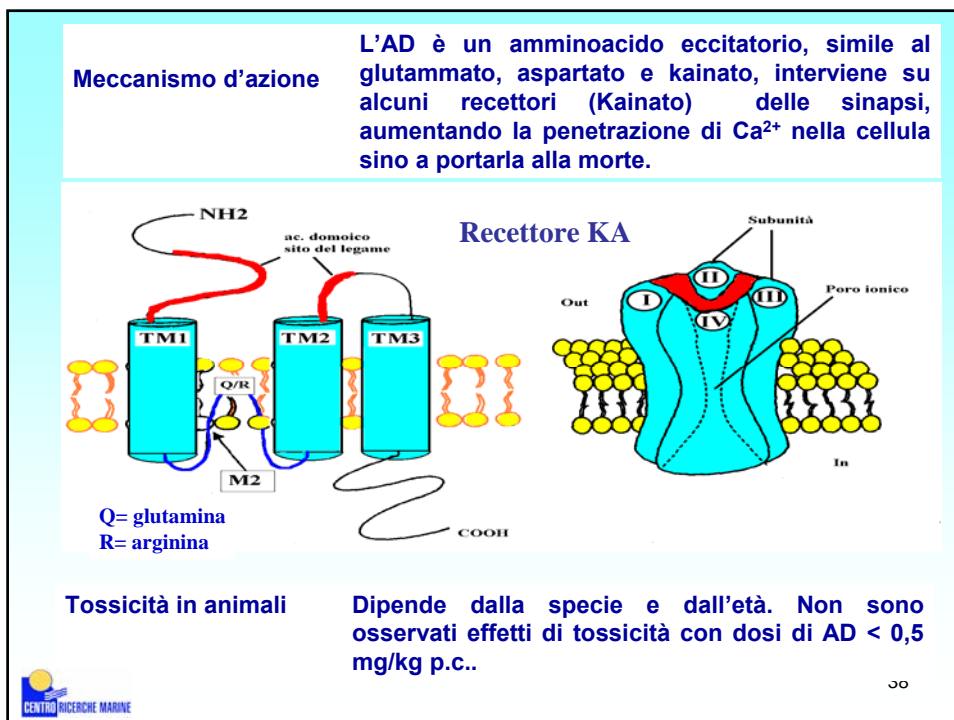
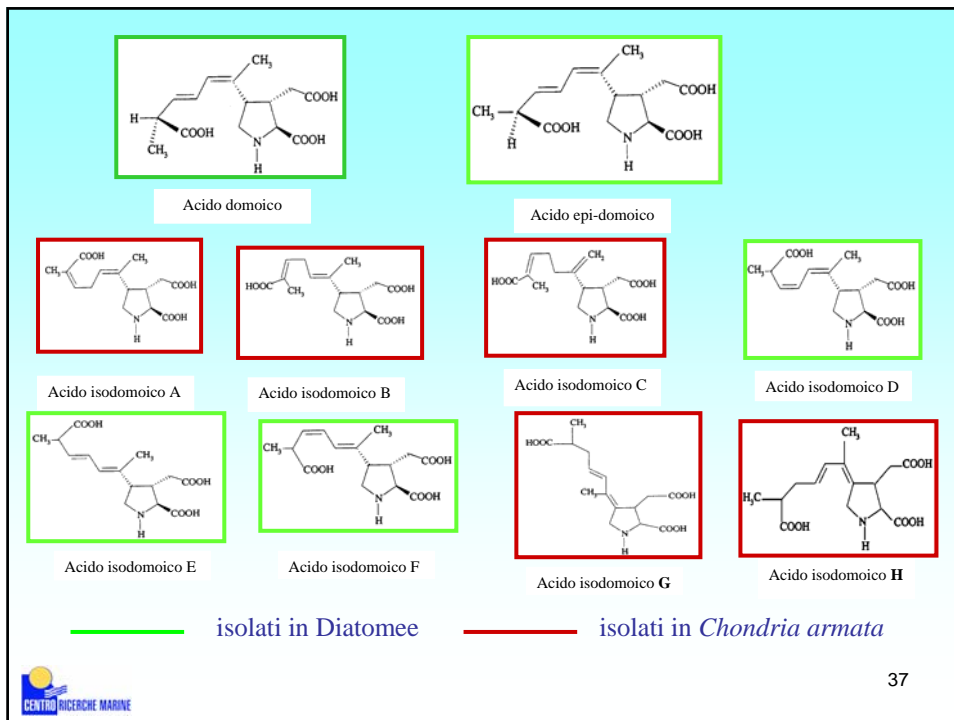
Distribuzione L'acido domoico è stato trovato in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud america, Oceania.

Assorbimento La dose di AD assorbita è il 5-10% di quella ingerita. La massima penetrazione è nel sangue, ma c'è scarsa penetrazione, in condizioni normali, della barriera emato-encefalica. AD non sembra essere metabolizzato e la secrezione avviene prevalentemente attraverso le urine. Il tempo di dimezzamento della tossina in scimmie è di 20-140 minuti.

Distribuzione

Metabolismo

Escrezione



ASP

Tossicità umana Effetto acuto disturbi gastrointestinali, diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, perdita della memoria breve (60-110 mg di AD) e sintomi neurologici più gravi con dosi di 270-290 mg di AD. Sulla base dei dati epidemiologici è stato indicato un LOAEL di 1,0 mg/kg p.c..

Nausea
Vomito
Crampi addominali



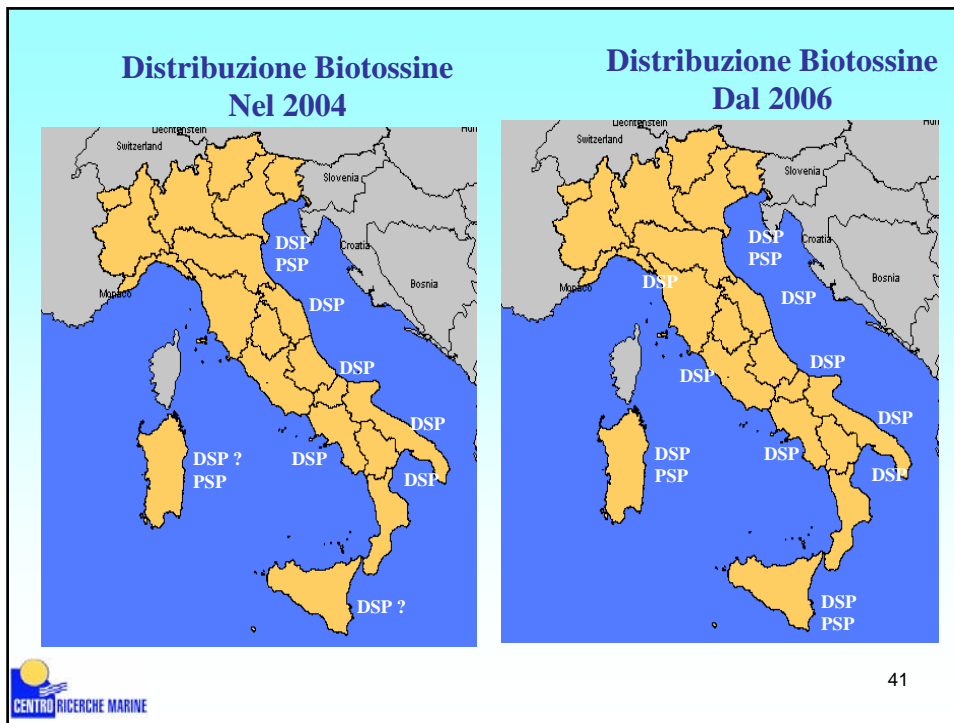
Mal di Testa
Perdita della memoria breve
Lesioni gravi ai neuroni dell'ippocampo e coma

Dose Acuta di Riferimento (ARfD) Sulla base del LOAEL di 1,0 mg AD/kg p.c. ed utilizzando un fattore d'incertezza di 3, la ARfD è stata calcolata in 0,1 mg/Kg p.c. (6 mg/Persona).

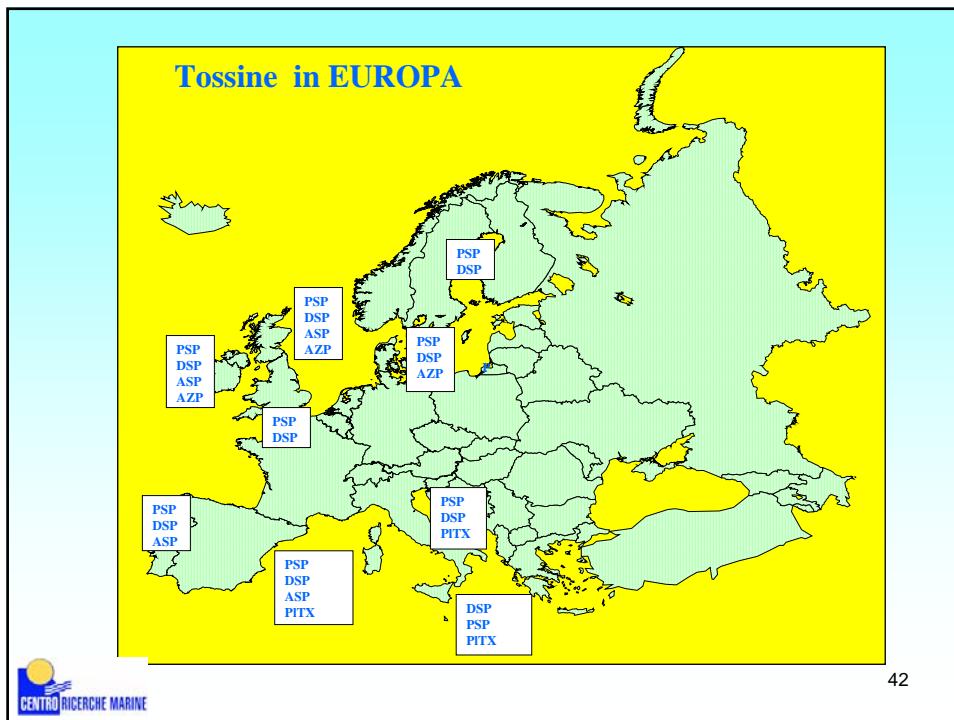
Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

| g. Parte Edibile | Limite Guida mg/kg p.e. | Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 100 | 60 | 20 |
| 250 | 24 | |
| 400 | 15 | |

(Codex Committee on Fish & Fishery Product - FAO/WHO/IOC Expert Consultatio, 2004)

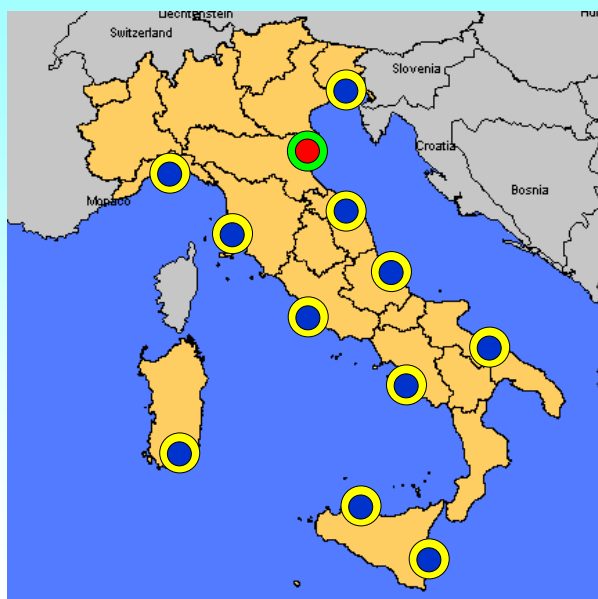


41



42

Comparsa di nuove microalghe - Nuove tossine



- *Ostreopsis ovata*
- *Coolia monotis*
- *Prorocentrum lima*
- *Alexandrium ostenfeldii*

Gruppo Imine Cicliche

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

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

2. Spirolidi

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

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

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

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

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

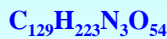


45

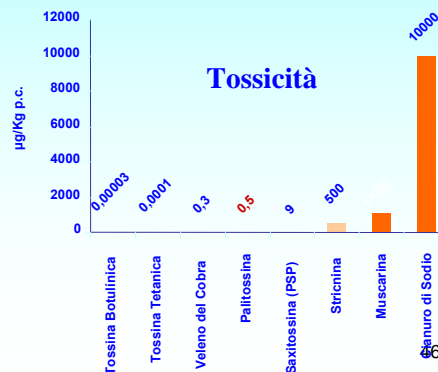
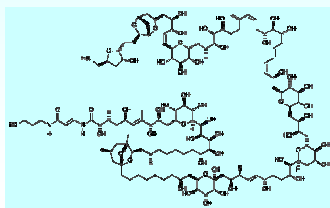
PALITOSSINE

Struttura chimica della Palitossina

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



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



Ostreopsis ovata

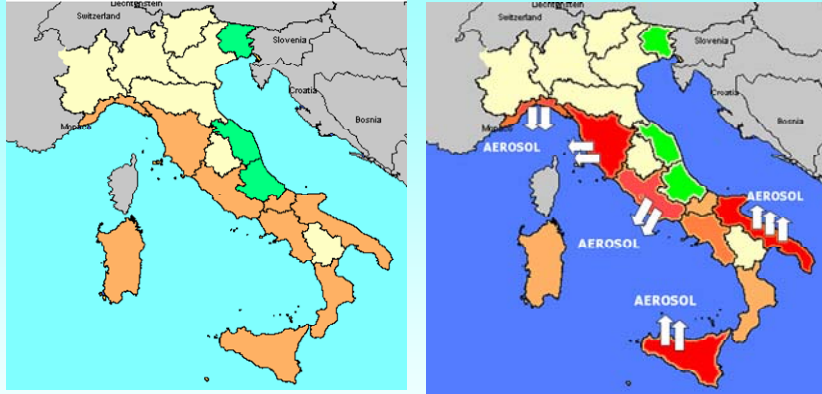


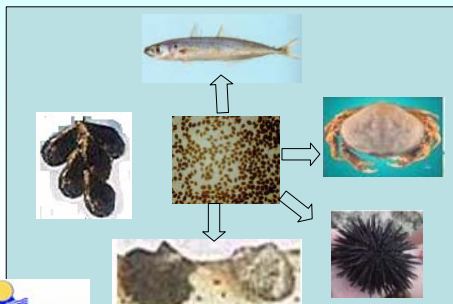
Fig. 1- Regioni in cui è stata segnalata *Ostreopsis spp.*:
 2005: ■ Liguria - Toscana - Lazio - Campania - Calabria - Puglia - Molise - Sicilia - Sardegna;
 2006: ■ Abruzzo - Marche - Friuli Venezia Giulia

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

Diffusione di Palitossine



Per inalazione ?



Per OS



| | |
|------------------------------------|--|
| Distribuzione | TOSSINE trovata in microalghe, molluschi bivalvi, crostacei e pesci. Le aree di massima diffusione sono quelle tropicali e sub tropicali. |
| Meccanismo d'azione | Agisce sui canali della pompa Na⁺/K⁺ ATPase. |
| Tossicità in animale (topo) | Per iniezione intraperitoneale la palitossina è eccezionalmente tossica. LD₅₀ di palitossina pura, in topo, è di 0,72 µg/kg p.c.. La palitossina è meno tossica se somministrata per via orale LD₅₀ di 510 µg/kg p.c.. |
| Tossicità umana | Gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco. Sintomi: sapore metallico o amaro, nausea, ipersalivazione, vomito, dolori addominali, diarrea, paralisi degli arti inferiore, spasmi muscolari e difficoltà respiratoria. Casi mortali sono stati attribuiti a palitossine di persone che avevano mangiato pesci e crostacei. |



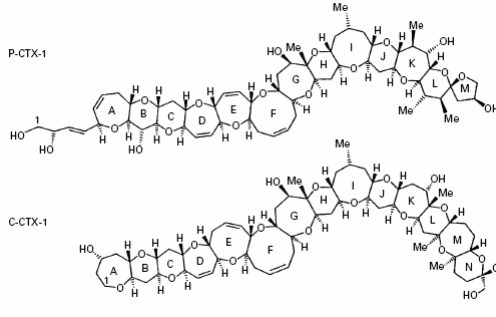
| | | |
|---|---|---------------------------------------|
| Dose Acuta di Riferimento (ARfD) | Il NOAEL per os è calcolato in 320 µg/kg p.c.. A causa dell' alta tossicità di queste sostanze, per la valutazione di rischio, è stato utilizzato un <u>fattore d'incertezza di 300</u>. L'ARfD è quindi di 1,07 µg/kg p.c. (64,2 µg PLTXs/Persona) | |
| Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta | | |
| g. Parte Edibile | Limite Guida µg/kg p.e. | Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
| 100 | 642 ** | |
| 250 | 256 ** | |
| 400 | 161 ** | |

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

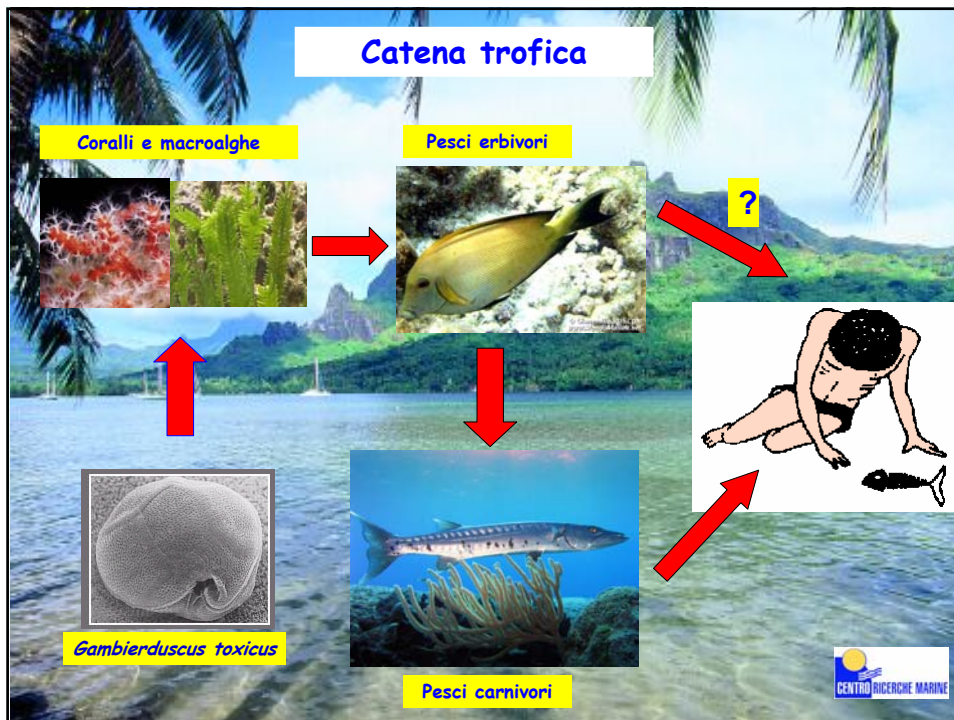


Ciguatera o CFP (Ciguatera Food Poisoning)

Le Ciguatossine sono dei polietere transfusi prodotti da Dinoflagellate.



| Tossina | ip. LD50 Topo 20g µg/kg p.c. |
|---------|---------------------------------|
| P-CTX1 | 0,25 |
| P-CTX2 | 2,30 |
| P-CTX3 | 0,90 |
| GTX-4B | 4,00 |
| MTX-1 | 0,05 |



Ciguatossine

| | |
|---|--|
| Distribuzione | TOSSINE trovate in microalghe e molte specie di pesci della zona Tropicale e subtropicale. |
| Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione | Rapido assorbimento e distribuzione in tutto il corpo. Le ciguatossine si accumulano nella parte lipofila della cellula. |
| Meccanismo d'azione | Le CTX si legano ai canali del Na ⁺ (α subunità - sito 5) aumentando l'entrata dello ione Na depolarizzando la membrana neuronale. |
| Tossicità umana Sintomi | <p><u>Neurologici</u>: Parestesia della bocca e degli arti; Atassia; Mialgia; Emicrania; Vertigini; Debolezza muscolare; L'inversione sensitiva di caldo e freddo; Tremore; Salivazione; ecc...</p> <p><u>Gastrointestinali</u>: Nausea; Diarrea; Vomito; Dolori addominali.</p> <p><u>Cardiovascolari</u>: Aritmia; Bradicardia; Ipotensione; Tachicardia.</p> <p>L'inizio dei sintomi avviene dalle 4 alle 16 ore dopo l'ingestione del pesce.</p> <p>I sintomi Neurologici, nei casi gravi, perdurano per mesi e in alcuni casi per anni.</p> |



Dose Acuta di Riferimento (ARfD)

È stato rilevato che la tossicità, in esseri umani, può essere indotta con 1,75 ng/kg p.c.. Prendendo questo dato come LOAEL ed applicando un fattore d'incertezza di 10, si ottiene un ARfD di 0,175 ng/kg p.c. **(64,2 ng/Persona)**

Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

| g. Parte Edibile | Limite Guida ng/kg p.e. | Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE) |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 100 | 105 ** | |
| 250 | 42 ** | |
| 400 | 26 ** | |

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





NATIONAL REFERENCE LABORATORY ON MARINE BIOTOXINS
(G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)
V.le A. Vespucci, 2 - 47042 - CESENATICO (FC) ITALY
Tel +39 0547 80278 Fax + 39 0547 75094
e - mail cerimarine@tin.it
<http://www.centroricerchemarine.it>

Grazie per l'attenzione