

POSSIBILI RISCHI PER PRESENZA DI TETRODOTOSSINE (TTX) IN MOLLUSCHI BIVALVI IN ITALIA COME CONSEGUENZA DEI CAMBIAMENTI CLIMATICI: I PRIMI RISULTATI DEL PROGETTO STOPTTXS



Carlo Varini, Maura Manganelli ed Emanuela Testai
Dipartimento Ambiente e Salute, ISS

RIASSUNTO - La tetrodotossina (TTX) è una potente neurotossina prodotta da microrganismi marini che in Asia ha provocato casi di intossicazione letali per consumo di prodotti ittici contaminati. Come conseguenza dei cambiamenti climatici, recentemente, è stata trovata anche in Europa, dove il monitoraggio della TTX nei molluschi non è ancora previsto. Nel 2021 il Ministero della Salute ha finanziato un Progetto coordinato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) delle Venezie, a cui partecipa anche l'Istituto Superiore di Sanità, con l'obiettivo di comprendere la dinamica della TTX nei bivalvi eduli, sviluppare programmi di monitoraggio, valutare potenziali rischi. Nella prima fase del Progetto è stata confermata la presenza stagionale di TTX nei bivalvi dell'alto Adriatico che nel 24% dei campioni positivi superava il valore limite stabilito nel 2017 dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (European Food Safety Authority, EFSA), la cui validità è stata confermata sulla base di una ricerca sistematica dei dati disponibili analizzati dal Progetto. Questi primi risultati confermano l'importanza del Progetto per proporre misure di gestione, condivise con gli stakeholder, al fine di proteggere la salute dei consumatori dall'esposizione alla TTX.

Parole chiave: tetrodotossina; valutazione del rischio; prodotti ittici; cambiamenti climatici

SUMMARY (Possible health risk associated to the presence of tetrodotoxins (TTX) in Italy as a consequence of climate changes: first results obtained by the STOPTTX Project) - Tetrodotoxin (TTX) is a potent neurotoxin produced by marine microorganisms, responsible for fatal intoxications following the consumption of contaminated seafood in Asia. As a consequence of climate change, TTX has been detected also in Europe, where routine TTX monitoring in shellfish is not yet foreseen. A project financed by the Ministry of Health and coordinated by the Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) delle Venezie, to which the Istituto Superiore di Sanità is collaborating, started in 2021. The project aims to understand the dynamics of TTX in edible bivalves, to develop tailored monitoring programmes, and to evaluate potential risks for consumer health. In the initial phase, the project detected a seasonal presence of TTX in bivalves from North Adriatic Sea, highlighting that 24% of positive samples exceeds the European Food Safety Authority (EFSA) contamination limit proposed in 2017, whose validity was confirmed, based on a systematic review of the available literature. These results underline the importance of the project in proposing management measures, shared with stakeholders, to protect consumer health from exposure to TTX.

Key words: Tetrodotoxin; risk assessment; seafood; climate change

maura.manganelli@iss.it

I cambiamenti climatici sono una delle più grandi sfide che la nostra società sta affrontando: nel prossimo futuro molteplici effetti potrebbero portare a cambiamenti irreversibili sia a livello ambientale che sociale. La modifica di parametri come temperatura, ossigeno disciolto e acidità delle acque, variazioni nell'apporto di composti eutrofizzanti (a seguito di eventi alluvionali sempre più frequenti o la loro concentrazione a causa di eventi siccitosi), sono in grado di causare massicce crescite di microalghe e/o di con-

sentire a specie, tipicamente localizzate in zone tropicali, di migrare in altre aree tra cui le acque temperate europee (1). Alcuni di questi organismi sono capaci di produrre un'ampia varietà di metaboliti tossici (tra cui ciguatossina, acido domoico, acido ocadacico, saxitossina, tetrodotossina e cianotossine) in grado di provocare effetti sulla salute, tramite il consumo di alimenti contaminati come pesci, molluschi, gasteropodi. Nel 2020 l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (European Food Safety Authority, EFSA) ha pubbli- ▶

Il Progetto STOPTTX

Nel 2023, a seguito di una richiesta degli organi preposti alla sorveglianza della sicurezza dei prodotti ittici, il Ministero della Salute ha finanziato un Progetto finalizzato (Risk mitigation Strategies and Tools for an Ongoing Problem. Tetrodotoxins (TTXs), a group of emerging toxins in live bivalve mollusks intended for human consumption (STOPTTXs) - RF-2021-12373885), coordinato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSV), al quale partecipano l'Università degli Studi di Trieste, il Dipartimento Ambiente e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e il Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine di Cesenatico. L'obiettivo principale del Progetto è di ridurre il rischio di contaminazione da TTX nei molluschi bivalvi destinati al consumo umano attraverso una migliore conoscenza del fenomeno, attuando un approccio che si basa sulla combinazione di sistemi di allerta precoce, strumenti diagnostici innovativi, di valutazione del rischio e di comunicazione dei risultati, per creare maggiore consapevolezza della rilevanza di questo problema da parte dei diversi soggetti interessati e prepararli a un'azione di mitigazione.

Il Progetto è organizzato in tre unità operative (UO):

- la UO1 è coordinata dall'IZSV e ha come scopo principale la comprensione della dinamica della TTX in bivalvi nella laguna di Venezia attraverso il monitoraggio della TTX in molluschi bivalvi, l'identificazione degli organismi produttori e la comprensione dei meccanismi ecologici che ne regolano l'attività;
- l'UO2, coordinata dall'Università degli Studi di Trieste, si propone di sviluppare un metodo rapido di identificazione e quantificazione della TTX nei molluschi, più veloce e accessibile del metodo analitico, ovvero la cromatografia di massa, non disponibile presso tutti i laboratori;
- l'UO3 coordinata dall'ISS (Dipartimento Ambiente e Salute, Reparto Meccanismi, Biomarcatori e Modelli) ha il compito di condurre una valutazione del rischio sulla base dei livelli di TTX misurati durante il Progetto, valutando vari scenari di esposizione dei consumatori anche legati ai cambiamenti climatici.

Un ulteriore scopo generale del Progetto è aumentare la consapevolezza e la preparazione degli stakeholder coinvolti (coltivatori di prodotti ittici, distributo-

ri) sul problema della TTX. Le analisi delle TTX, sia per il monitoraggio che per la validazione del metodo biologico, sono affidate al Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine di Cesenatico.

Nella prima fase della ricerca l'obiettivo fondamentale dell'ISS è stato quello di valutare se il valore di riferimento proposto dall'EFSA nel 2017 (8) fosse ancora valido o se, sulla base dei nuovi studi di tossicità della TTX pubblicati negli ultimi 7 anni, potesse risultare modificato. A questa fase del Progetto ha attivamente partecipato uno studente (Carlo Varini) del corso di laurea magistrale in lingua inglese "Safety assessment of xenobiotics and biotechnological products (SAXBI)" dell'Università degli Studi di Milano, che ha svolto la sua tesi sperimentale presso il Dipartimento Ambiente e Salute.

I risultati della prima fase del Progetto

L'aggiornamento della letteratura è stato realizzato attraverso una ricerca bibliografica sistematica condotta secondo le linee guida EFSA, su tre motori di ricerca (Scopus, PubMed e Science Direct). Una combinazione di parole chiave ha permesso di recuperare tutti gli articoli (12.741) disponibili sulla produzione e tossicità della TTX, a partire dal 2016. Successivamente, una serie di livelli di screening a cascata (basati su specifici criteri di inclusione ed esclusione) (Figura), hanno portato alla selezione di circa 360 articoli. Di questi ne sono stati selezionati 13 specificamente rilevanti per la determinazione della tossicità:

- 7 inerenti a studi di tossicità *in vivo*, con unica dose acuta o con dosi ripetute per tempi brevi;
- 5 relativi a studi svolti per analizzare il meccanismo di tossicità della tossina *in vitro*;
- 1 focalizzato sugli effetti della tossina sull'uomo.

A fronte di un numero consistente di articoli sulla TTX pubblicati negli ultimi sette anni, il numero limitato di studi di tossicità indica che, nonostante la stessa opinione EFSA sostenesse la necessità di avere ulteriori dati per diminuire l'elevato grado di incertezza nella derivazione dell'ARfD, permangono alcune difficoltà allo svolgimento di studi tossicologici in parte imputabili alla scarsa disponibilità di tossina con accettabile grado di purezza.

Per valutare la qualità degli studi selezionati (rispetto ad affidabilità, pertinenza e adeguatezza), è stato utilizzato uno strumento sviluppato dall'EURL-ECVAM (JRC, Ispra) chiamato ToxRTool, per ►

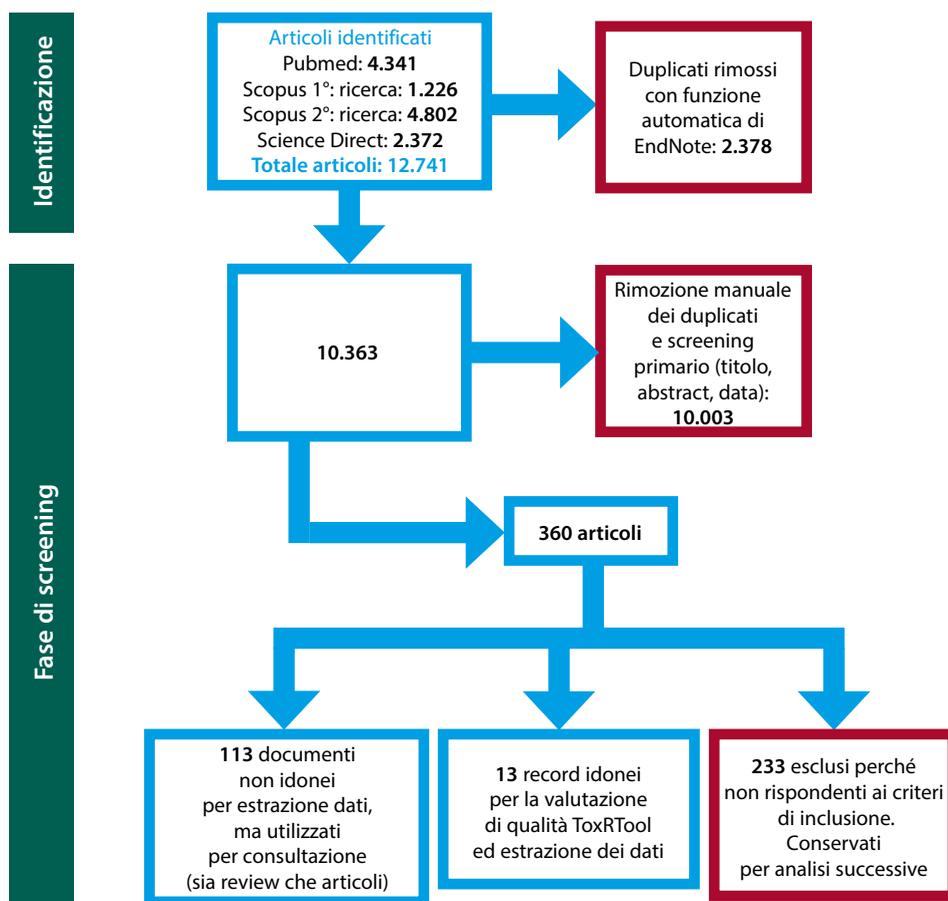


Figura - Processo di revisione sistematica della letteratura sulla tossicità della TTX

garantire trasparenza, tracciabilità e maggior armonizzazione nella valutazione. Il punteggio attribuito con ToxRTool indica che la qualità degli studi prodotti è generalmente scarsa. Le criticità riscontrate durante la valutazione sono imputabili sia al disegno dello studio (ad esempio, veicoli o matrici non consone per la somministrazione orale della tossina, vie di esposizione non fisiologiche come la intra-tracheale), ma soprattutto alla dimensione dei gruppi di trattamento, del tutto inadeguata a ottenere risultati statisticamente robusti e spesso variabile tra le dosi: le deviazioni rispetto alle procedure descritte nelle linee guida dell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) erano quindi decisamente rilevanti. Tra l'altro, l'uso di diverse metodologie rende difficile un confronto tra i dati. In conclusione, quindi, si può affermare che, per la presenza di molteplici criticità, la qualità degli studi non è adeguata per giustificare una modifica dell'at-

tuale ARfD proposta dall'EFSA per la tossicità acuta, né per derivare un valore di riferimento per tossicità ripetuta a breve termine.

Per valutare il livello di esposizione della popolazione italiana, sono stati impiegati dati preliminari raccolti dall'IZSV nel primo anno del Progetto in quattro siti in Provincia di Venezia. A conferma di dati sparsi ottenuti tra il 2017 e il 2021, la campagna ha mostrato che la TTX è determinabile nel 67% dei campioni bivalvi con una specifica stagionalità (tra fine maggio e giugno). I siti presentano livelli diversi di contaminazione. Quello con il valore più elevato, pari a circa 196 µg/kg di prodotto ittico edule, è caratterizzato da valori medi di 3-4 volte maggiore degli altri (127 ± 63,2 µg/kg di prodotto ittico edule), sempre superiori al limite di contaminazione di 44 µg/kg di carne di pesce/mollusco suggerito dall'EFSA, definito per proteggere i forti consumatori.

Per il consumo della popolazione generale, i dati estratti dal database dell'EFSA (FoodEX2) indicano, per la popolazione adulta italiana, consumi *blue*

mussels al 95° percentile di 162 g per singolo pasto. Facendo riferimento alla ARfD di 0,25 µg/kg pc e considerando un adulto di peso medio (70 kg), è stato possibile stimare che nel 24,24% dei casi il valore di contaminazione misurato in questa prima campagna del 2023 eccede il valore di ARfD.

Questa valutazione preliminare pone l'accento non solo sulla presenza oramai costante della TTX sulle coste italiane, ma anche di un potenziale rischio per la popolazione e rafforza la validità del Progetto proposto. I primi risultati sottolineano la necessità di produrre dati tossicologici di qualità, dai quali sia possibile derivare valori di riferimento affetti da un minore grado di incertezza.

Il Progetto darà informazioni utili all'identificazione di fattori critici nel fenomeno della contaminazione da TTX, sulla base dei quali disegnare piani di monitoraggio efficienti, per i quali sarà importante disporre anche del metodo biologico rapido in sviluppo nel Progetto. Tutto ciò per proteggere la salute del consumatore e quella dell'ambiente, senza sottovalutare la salvaguardia di un settore economico importante come la molluschicoltura, che potrà trarre benefici dalla dimostrazione di tali risultati e consentire quindi di commercializzare un prodotto che globalmente non impatti sulla salute pubblica. ■

Dichiarazione sui conflitti di interesse

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Sections. In: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Lee H, Romero J. (Ed.). Geneva (Switzerland) 2023; p. 35-115 (doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647).
2. European Food Safety Authority (EFSA). Maggiore A, Afonso A, Barrucci F, DeSanctis G, 2020. *Climate change as a driver of emerging risks for food and feed safety, plant, animal health and nutritional quality*. EFSA supporting publication 2020; 146 p. (doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1881).
3. Bane V, Lehane M, Dikshit M, et al. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins* 2014; 6(2):693-755 (doi.org/10.3390/toxins6020693).
4. Katikou P, Gokbulut C, Kosker AR, et al. An Updated Review of Tetrodotoxin and Its Peculiarities. *Mar Drugs* 2022;20(1): 47 (doi.org/10.3390/md20010047).
5. Turner AD, Powell A, Schofield D, et al. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European Bivalves, England, 2013 to 2014. *Eur Surveill* 2015;20(2):21009 (doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.2.21009).
6. Dell'Aversano C, Tartaglione L, Polito G, et al. First detection of tetrodotoxin and high levels of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Sicily (Italy) by three different analytical methods. *Chemosphere* 2019;215:881-92 (doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.081).
7. Bordin P, Dall'Ara S, Tartaglione L, et al. First occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks from Northern Adriatic Sea (Italy). *Food Control* 2021;120:107510 (doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107510).
8. European Food Safety Authority (EFSA). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen HK, Alexander J, et al. Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J* 2017;15(4): 4752. 65 p. (doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4752).

TAKE HOME MESSAGES

- I cambiamenti climatici e l'antropizzazione stanno cambiando i sistemi naturali, favorendo la diffusione di tossine tipiche di zone tropicali anche nelle acque temperate dell'Europa.
- La TTX è una neurotossina che è stata segnalata in prodotti ittici anche sulle coste italiane e può avere effetti sulla salute dei consumatori: per la TTX non sono previsti controlli di routine.
- L'obiettivo del Progetto finalizzato StopTTX è prevenire o mitigare l'esposizione dei consumatori utilizzando un approccio multidisciplinare che permetta di conoscere la dinamica della TTX in bivalvi destinati al consumo umano, lo sviluppo di programmi di monitoraggio *ad hoc*, la valutazione dei rischi e il coinvolgimento degli stakeholder.
- La prima fase del Progetto ha messo in luce la necessità di produrre dati tossicologici di qualità per derivare valori di riferimento con meno incertezze, e ha confermato la presenza di TTX nelle acque dell'alto Adriatico, con potenziali rischi per la salute.
- I risultati di questo Progetto potranno essere utilizzati dal Ministero della Salute per valutare l'opportunità di inserire la TTX fra le tossine da monitorare nei controlli di routine.