

Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine

Paola ADE (a), Enzo FUNARI (a) e Roberto POLETTI (b)

(a) Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Centro di Ricerche Marine, Laboratorio Nazionale di Riferimento
per le Biotossine Marine, Cesenatico (FO)

Riassunto. - Delle circa 5000 specie algali identificate, all'incirca 75 producono tossine. Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle dinoflagellate e quindi a quelli delle diatomee. Le intossicazioni dell'uomo finora accertate sono state associate al consumo di molluschi bivalvi. Le principali sindromi da intossicazione sono state descritte, in base alla tipologia dei sintomi, come paralitiche, diarrhoeiche, neurotossiche ed amnesiche, rispettivamente abbreviate in: PSP (*paralytic shellfish poisoning*), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), ASP (*amnesic shellfish poisoning*). Questo lavoro costituisce una rassegna del problema sanitario rappresentato dalle alghe tossiche marine, con particolare riferimento alla situazione del Mediterraneo e delle coste italiane.

Parole chiave: alghe tossiche marine, tossine algali.

Summary (Risk to human health associated with marine toxic algae). - Among the about 5000 of marine algal species, some 75 produce algal toxins. These latter mainly belong to the taxa first of dinoflagellates and then diatoms. The so far known human intoxications have been associated with mollusc consumption. The main poisoning syndromes have been termed, on the basis of the observed symptoms, as paralytic, diarrhetic, neurotoxic and amnesic and shortened as: PSP (paralytic shellfish poisoning), DSP (diarrhetic shellfish poisoning), NSP (neurotoxic shellfish poisoning), ASP (amnesic shellfish poisoning), respectively. This paper is a review of the problem of human health implications associated with marine toxic algae, with particular reference to the situation of the Mediterranean and the Italian coastal areas.

Key words: marine toxic algae, algal toxins.

Introduzione

Nelle zone marine costiere, la presenza di organismi fitoplanctonici tossici rappresenta uno dei principali rischi per la salute umana. Alcuni di questi organismi producono tossine molto potenti che possono raggiungere concentrazioni particolarmente elevate in occasione di fioriture.

Attualmente il problema delle alghe tossiche marine a livello mondiale sembra assumere dimensioni preoccupanti sia per l'aumentare del numero delle specie riconosciute come dannose sia per l'aumento dei fenomeni di fioritura algale e. Tale aumento sembra essere dovuto da un lato all'eutrofizzazione delle aree costiere e dall'altro alla progressiva diffusione di specie tossiche in nuove aree geografiche attraverso, ad esempio, l'acqua di zavorra trasportata dalle navi da carico.

Per dar luogo ai cambiamenti di colore dell'acqua, la proliferazione dei microrganismi deve essere notevole. Le dinoflagellate conferiscono colore

all'acqua con un numero di microrganismi non inferiore a un milione di cellule per l; queste alghe, in condizioni particolarmente favorevoli, possono raggiungere densità di 60-70 milioni di cellule per l [1].

Vengono definiti come "harmful algal bloom" i fenomeni associati alla presenza di alghe tossiche e/o dannose [2, 3]. Questa definizione si applica non solo alle alghe microscopiche ma anche alle macroalghe bentoniche e planctoniche, che possono proliferare in condizioni di elevate concentrazioni di nutrienti, producendo danni ecologici dovuti all'allontanamento di specie autoctone, alle alterazioni dell'habitat e alle condizioni di ipossia dei fondali.

Le fioriture algali in mare sono note fin dall'antichità, ma negli ultimi decenni sono notevolmente aumentate [4-6]. In alcune aree, come ad esempio il Mar Baltico, il Mare del Nord, il Mare Adriatico, lungo le coste giapponesi e nel Golfo del Messico, sono diventate un fenomeno ricorrente. In Italia, fenomeni di proliferazione algale si verificano con una certa frequenza dal 1975 nella zona costiera a sud della foce

del Po [7]. I primi eventi significativi si verificarono nel 1975 e 1976 e causarono un'elevata mortalità di fauna bentonica e di pesci [8]. Da allora, fioriture algali di maggiore o minore entità si sono verificate ogni anno, interessando progressivamente altre zone costiere. L'evento più significativo fu quello del 1984, quando si verificarono imponenti fioriture di *Gymnodinium* sp., con valori di clorofilla fino a 800 mg/m³ in corrispondenza della foce del Po e fino a 200 mg/m³ nelle vicinanze di Ancona [1].

Allontanandosi dalla costa emiliano-romagnola, il fenomeno diminuisce di entità, ma è stato segnalato a volte sulla costa marchigiana [9] e nel golfo di Trieste [10, 11] dove nel 1976 e 1977 la balneazione fu vietata per alcune settimane.

Negli estuari, il verificarsi di fioriture di alghe marine dipende dalla quantità di nutrienti e di sostanze umiche trasportate con le acque dei fiumi. Condizioni particolarmente favorevoli si verificano soprattutto a seguito di forti piogge.

Le fioriture algali sono favorite dal fenomeno dell'*upwelling*, che consiste nel verificarsi di correnti ascensionali di masse d'acqua, ricche di nutrienti. Quest'ultimo fenomeno è la causa principale delle "acque colorate" nell'India del sud, nel sud-ovest dell'Africa, nell'est dell'Australia, sulle coste dell'Arabia, Perù, Cile e California.

Organismi alieni, e tra questi le alghe tossiche marine, possono essere trasportati con le acque di zavorra delle navi da carico da un'area geografica ad un'altra anche molto distante, che può quindi essere colonizzata. Questo problema è da tempo al centro dell'attenzione della comunità scientifica internazionale [12].

Si ritiene che l'antropizzazione delle aree costiere ed in particolare il progressivo aumento dell'immissione nell'ambiente marino di effluenti urbani, industriali, agricoli e zootecnici abbiano favorito lo sviluppo di alghe tossiche marine [13].

Sono circa 5000 le specie algali identificate, delle quali circa 75 sono quelle che producono tossine [14]. Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle diatomee e delle dinoflagellate. Gli altri taxa sono molto meno rappresentati, sia quantitativamente che qualitativamente, e la loro presenza è legata a condizioni particolari; così, ad esempio, le siliconflagellate si osservano nei mesi più freddi, le coccolitoforidee sono per lo più pelagiche, le cloroficee e le euglenoficee prediligono condizioni estuariali.

Le fioriture di alghe tossiche, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate in [14]:

- fioriture di specie che provocano soltanto una colorazione dell'acqua con diminuzione della visibilità e della qualità estetica, ed eventualmente morie di pesci e invertebrati acquatici a causa delle conseguenti condizioni di ipossia. Appartengono a questo gruppo

soprattutto specie di dinoflagellati (ad es., *Noctiluca scintillans*) e di diatomee (ad es., *Skeletonema costatum*);

- 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). Si tratta per lo più di dinoflagellate appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Dinophysis* e di diatomee del genere *Nitzschia*;

- fioriture di specie che, nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo ma risultano dannose in vario modo per pesci ed invertebrati. Esempi di queste specie sono: *Alexandrium tamarense*, *Gyrodinium aureolum*, *Chaetoceros convolutus*, *Nodularia spumigena*, *Chattonella antiqua*;

- fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa (ad es., *Gymnodinium breve*).

Le tossine algali

Le tossine prodotte dai dinoflagellati sono, nell'ambito delle tossine di natura non proteica, tra le più potenti sino ad oggi conosciute. Non è ancora chiaro il possibile ruolo di queste molecole nel metabolismo delle alghe, ma si ipotizza un loro intervento nel mantenimento dell'equilibrio fisiologico dell'organismo: alcune tossine sono importanti nella sintesi di acidi nucleici, altre nella sintesi della parete cellulare.

A seconda della loro solubilità, le tossine possono essere divise in tossine idrosolubili (tra cui la saxitossina e i suoi derivati) e liposolubili (come le brevetossine e le tossine del tipo DSP).

L'uomo può essere esposto a queste tossine attraverso il consumo di organismi ittici, che le accumulano, e lo svolgimento di attività ricreative.

Mentre non sono noti casi di intossicazione umana riconducibili allo svolgimento di attività ricreative in acque marine interessate da fioriture algali, importanti intossicazioni umane si verificano a seguito dell'ingestione di molluschi bivalvi. Questi ultimi sono organismi filtratori che si nutrono di plancton e che, pur accumulando le tossine, ne subiscono gli effetti solo marginalmente. Tuttavia, in un singolo mollusco, in determinate circostanze possono essere raggiunte concentrazioni tali da risultare letali per l'uomo [2]. I molluschi bivalvi maggiormente interessati da questo tipo di intossicazione appartengono ai generi *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Mytilus*, *Pecten*, *Saxidomus* e *Spisula*. Le ostriche accumulano le tossine algali, ma nella gran parte dei casi in misura minore rispetto ai generi appena elencati [15].

Nei paesi industrializzati, i programmi di controllo degli allevamenti di molluschi permettono un sostanziale contenimento di questo rischio, vietando la com-

mmercializzazione di questi organismi quando vengono raggiunte concentrazioni inaccettabili di tossine nei tessuti dei molluschi.

Per quanto riguarda l'Italia il DL.vo 30 dicembre 1992 n. 530 recepisce la Direttiva Comunitaria 91/492/CEE del 15 luglio 1991 che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. Nella direttiva comunitaria si considerano esplicitamente le biotossine PSP e DSP.

Negli altri paesi, i danni alla salute provocati dalle tossine algali sono invece frequenti, soprattutto nelle aree dove le popolazioni ricavano dalle risorse marine gran parte dei prodotti per l'alimentazione.

Le tossine algali marine possono anche provocare morie di pesci sia direttamente che in seguito ad ingestione di piccoli molluschi planctonici contaminati. I pesci sono in genere molto sensibili a queste tossine e muoiono prima che vengano raggiunte nelle loro carni concentrazioni pericolose per l'uomo [2]. Tuttavia alcune tossine liposolubili, come le ciguatossine, non hanno effetti significativi sui pesci ma tendono ad accumulare lungo la catena alimentare fino a raggiungere elevate concentrazioni nei grossi pesci predatori che risultano quindi tossici per l'uomo.

Le principali sindromi da intossicazione umana associate al consumo di molluschi sono state descritte, in base alla tipologia dei sintomi, come paralitiche, diarreiche, neurotossiche ed amnesiche, rispettivamente abbreviate in: PSP (*paralytic shellfish poisoning*), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), ASP (*amnesic shellfish poisoning*).

Tossine PSP

La sindrome paralitica da molluschi bivalvi è una sindrome neurotossica che si manifesta a seguito del consumo di molluschi eduli che hanno accumulato saxitossina e/o suoi prodotti di degradazione. L'origine algale di questa intossicazione è stata dimostrata da tempo [16], rendendo tossici molluschi sani alimentandoli con *Gonyaulax catenella*. Successivamente, il ruolo del fitoplancton nel causare la PSP nell'uomo fu ulteriormente evidenziato con l'isolamento della saxitossina da *Mytilus californianus* e da *Saxidomus giganteus* [17].

Specie tossiche e loro distribuzione

Nelle acque temperate, le tossine idrosolubili del tipo PSP sono prodotte da specie algali appartenenti al genere *Alexandrium* quali *A. tamarensis*, *A. catenella*, *A. acatenella*, *A. fundyense* e *A. minutum* [18]. Responsabile della produzione di PSP nei mari tropicali è invece *Pyrodinium bahamense*, var. compressa. Un'altra specie che produce tossine PSP è *Gymnodium*

catenatum, che ha un'ampia distribuzione geografica, che va dalla costa atlantica e mediterranea della Spagna alla costa pacifica dell'America, al Giappone, all'Australia.

Nel Mediterraneo sono presenti specie del genere *Alexandrium* e ceppi di *G. catenatum*, che producono tossine PSP.

Nel Golfo di Trieste sono state identificate *A. fundyense*, *A. pseudogonyaulax*, *A. lusitanicum* [19]; è stata identificata anche *A. catenella* e ne è stata messa in evidenza la produzione di tossine PSP [20]. Nel 1993, in mitili provenienti dalle principali aree di allevamento della costa dell'Emilia Romagna furono rilevate goniautossine a livelli assai bassi, indicando tuttavia la presenza di alghe (non identificate in quell'occasione) produttrici di tossine PSP nel mare Adriatico [21]. Nel maggio del 1994, in occasione dell'identificazione di tossine PSP nei mitili lungo la costa dell'Emilia-Romagna, fu osservata la simultanea presenza di *A. minutum* nella stessa area [21]. Tracce di tossine PSP associate a fioriture di *A. minutum* sono state rilevate nel medio Adriatico nella baia di Kastela [22].

A. tamarensis è stata evidenziata nel Tirreno settentrionale e in Adriatico [23, 24].

Nei golfi di Napoli e Salerno sono state identificate *A. tamarensis*, *A. minutum* e *A. balechi* [25]. *Gymnodinium catenatum* è stata segnalata nel Tirreno [26], nell'Adriatico [27] e nel mare Egeo [28]. Tossine PSP associate ad *A. minutum* e *A. catenella* in Sardegna, nel maggio del 2002, hanno determinato il divieto di raccolta e di commercializzazione di mitili nel golfo di Olbia (Poletti, comunicazione personale).

Delle diverse specie di molluschi analizzate nel periodo 1989-1996 nelle stazioni di monitoraggio del Friuli Venezia Giulia, Veneto ed Emilia Romagna, le tossine PSP sono state rilevate in *Mytilus galloprovincialis* e *Tapes philippinarum* dal 1994, con percentuali di presenza non superiori all'1,1% e allo 0,4% rispettivamente [29].

Chimica delle tossine PSP

Le tossine PSP sono rappresentate dalla saxitossina e dai suoi 21 analoghi. La saxitossina fu isolata per la prima volta dal mollusco *Saxidomus giganteus*, raccolto in zone costiere dell'Alaska dove mantiene livelli di tossicità durante tutto l'anno [17].

La struttura di base delle saxitossine è una tetroidopurina con due gruppi guanidinici; uno di questi (inserito nel cerchietto), è responsabile del blocco dei canali del Na⁺ (Fig. 1).

Le tossine carbammate sono i principali costituenti presenti nei molluschi bivalvi, mentre i composti N-sulfocarbamilici rappresentano il gruppo dominante nelle cellule dei dinoflagellati [30, 31]. In tutti i casi si tratta di composti idrosolubili, resistenti al calore, stabili in ambiente acido ma non in quello alcalino [32].

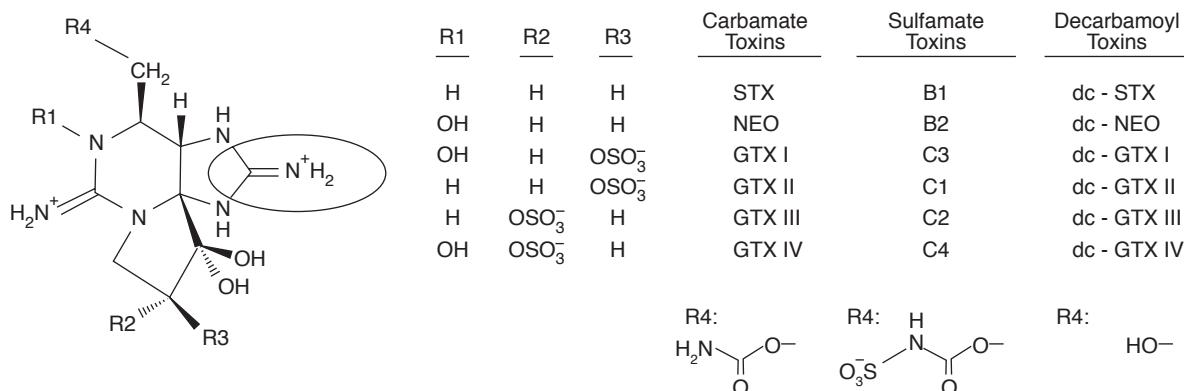


Fig. 1. - Struttura chimica delle saxitossine.

Profilo tossicologico

Le tossine PSP agiscono sui canali del sodio, bloccando il trasporto di questi ioni attraverso la membrana. In questo modo possono bloccare la trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici, con conseguente paralisi respiratoria e morte [33]. La saxitossina è una tossina con elevatissima tossicità acuta per l'uomo, con una dose letale di 1-2 mg; i suoi effetti sono analoghi a quelli della tossina botulinica [34, 35, 30]. I primi sintomi compaiono entro 30 min dall'ingestione di molluschi contaminati e consistono in: parestesia delle labbra, lingua ed estremità delle dita, profonda astenia muscolare, incapacità a mantenere la stazione eretta, perdita dell'equilibrio [36]. Nei casi più gravi, l'evoluzione è molto rapida e la morte sopraggiunge per arresto respiratorio o cardiocircolatorio entro 2-12 ore, a seconda della quantità di tossina ingerita. La prognosi è favorevole nei casi di sopravvivenza nelle prime 12-24 ore. In circa il 50% dei pazienti che sopravvivono all'intossicazione permangono per circa tre settimane astenia e parziale perdita di memoria.

Poiché attualmente non sono disponibili antisieri efficaci contro tutte le tossine PSP, la terapia rimane essenzialmente sintomatica per combattere la paralisi respiratoria [36] e si basa sul lavaggio gastrico. Poiché la tossina è instabile in ambiente alcalino, è utile la somministrazione di bicarbonato di sodio. Nei casi più gravi, si fa ricorso all'intubazione e alla ventilazione meccanica.

Epidemiologia

Il pericolo di intossicazione, nella maggior parte dei casi, è associato al consumo di molluschi bivalvi che filtrano acqua contenente cellule algali tossiche, accumulando tossine nei loro tessuti. Anche alcuni crostacei, come ad esempio le aragoste, possono accumulare tossine algali.

I bivalvi maggiormente responsabili di questa intossicazione nell'uomo sono *Mytilus edulis* e *Saxidomus giganteus*. Un ruolo più marginale viene svolto da specie appartenenti ai generi *Argopecten*, *Cardium*, *Mya*, *Pecten* e *Spisula*.

Le tossine PSP vengono trasferite anche a livelli più elevati della catena alimentare, ed in particolare nei pesci [37]. Il problema della intossicazione attraverso il consumo di prodotti ittici si pone se questi vengono consumati crudi e con le interiora [31]. Tuttavia, nel gennaio 2002 in Florida si sono registrate intossicazioni umane per il consumo di pesci tetrodonti contenenti soltanto tossine PSP (Poletti, comunicazione personale).

Una volta ingerite, le tossine PSP subiscono processi di trasformazione più o meno complessi che influiscono sulla loro tossicità. Ad esempio, le tossine del tipo sulfocarbammato, che rappresentano il gruppo con tossicità più bassa, vengono facilmente trasformate nelle più potenti carbammato tossine, con un aumento della tossicità fino a 40 volte. Questa trasformazione ha un risvolto clinico importante poiché molluschi con bassa tossicità possono causare intossicazioni sproporzionalmente gravi una volta ingeriti.

La maggior parte degli episodi di sindromi PSP riportati in questo secolo sono avvenuti lungo le coste orientali e occidentali del nord America e sono quasi tutti legati a "maree rosse", dovute a dinoflagellati. In Canada, dal 1973 sono stati documentati oltre 300 casi di sindromi PSP e 35 decessi [38].

Sulla costa atlantica di Portogallo, Spagna, Inghilterra, Norvegia e delle isole Faroe, sono stati riportati casi di PSP dal 1960. La presenza di tossine associate a sindrome PSP è stata rilevata ogni anno dal maggio 1968, quando 78 persone si intossicarono dopo aver consumato mitili provenienti dalla costa nordorientale dell'Inghilterra. Nel 1976 un'epidemia di PSP è stata riportata in Europa occidentale a seguito del consumo di mitili provenienti dalla costa atlantica della Spagna,

con intossicazioni in Spagna (63 casi), Francia (33), Italia (38) Svizzera (23) e Germania (19) [39].

La presenza di tossicità da PSP in mitili è stata rilevata successivamente anche lungo le coste spagnole del Mediterraneo [40, 41]. Nel 1994 una fioritura di *A. minutum* lungo le coste del Marocco provocò 64 casi di intossicazione, di cui 4 mortali [42].

Per quanto riguarda il sud America, l'intossicazione da PSP risultava rara prima del 1970. Successivamente sono state riportate diverse epidemie in Venezuela; nel 1987 fu registrata un'intossicazione in Guatemala, che richiese l'ospedalizzazione di almeno 186 persone, 26 delle quali morirono [43].

Tutti gli episodi menzionati si riferiscono al consumo di mitili. È stato registrato tuttavia un caso di morte in Indonesia dovuto al consumo di pesci contaminati da tossine PSP, ingeriti con le interiora [31].

Durante gli ultimi due decenni, gli episodi di sindromi da tossine PSP sono aumentati in tutto il mondo, nelle zone temperate e in quelle tropicali. Non è chiaro se si tratti di un aumento reale o se sia piuttosto il risultato del miglioramento dei metodi di sorveglianza e di monitoraggio.

La mortalità varia notevolmente nei diversi continenti. Ad esempio negli episodi in America settentrionale e in Europa, che hanno coinvolto circa 200 persone, non sono stati riportati casi mortali; episodi analoghi in Asia e America meridionale hanno dato luogo invece ad un tasso di mortalità del 2-14%, probabilmente per una maggiore difficoltà di accesso alle strutture ospedaliere [44].

Livelli di tolleranza e considerazioni di sicurezza per la saxitossina e suoi derivati

La legislazione italiana ha recepito le indicazioni europee che prevedono un limite di tolleranza per le tossine PSP nei molluschi bivalvi di 800 µg/kg. Questo valore è basato sulle valutazioni della WHO [30], che si riferiscono in particolare all'episodio epidemico del 1976 in Europa, dovuto al consumo di mitili della costa atlantica della Spagna. In quell'occasione, in Italia, i più bassi livelli che diedero luogo ad intossicazioni furono di 566 µg di tossine PSP in 100 mg di tessuto edibile [45].

Tossine DSP

La sindrome diarreica da molluschi bivalvi (DSP) è una definizione proposta per una intossicazione nettamente diversa da quella PSP sia per sintomatologia che per eziologia [46]. Si manifesta dopo il consumo di molluschi che hanno accumulato tossine da diverse specie di dinoflagellati. Pur non essendo letale, rappresenta un importante problema sanitario.

La natura tossico-algue di questa sindrome è stata riconosciuta dopo numerosi casi diarreici a elevata morbosità che si sono verificati in Giappone alla fine degli anni settanta [47].

Specie tossiche e loro distribuzione

Le tossine che causano sindrome DSP sono prodotte da dinoflagellati marini appartenenti ai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum*. *D. fortii* è stata identificata come alga produttrice di DSP in Giappone, mentre *P. lima* e varie altre specie di *Dinophysis* sono state associate ad intossicazioni lungo le coste atlantiche dell'Europa, in Olanda e Scandinavia.

Varie specie dei generi *Dinophysis* e *Prorocentrum* sono presenti anche nel Mediterraneo e nei mari italiani, dove non formano mai maree rosse. Alcune specie di *Dinophysis* fanno da sempre parte del fitoplancton dell'Adriatico [48], dove l'intossicazione da DSP avvenuta nel 1989 fu associata alla presenza di *D. fortii*, *D. tripos* e *D. caudata* [49]. Nel fitoplancton dell'Adriatico settentrionale e centrale sono state identificate anche *D. rotundata*, *D. acuta* e *D. diegensis* [49-51]. Complessivamente, in Adriatico sono state finora identificate 55 specie di *Dinophysis* [52]. La produzione di tossine DSP è stata tuttavia finora dimostrata soltanto per: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata* e *D. tripos* [53] e *D. sacculus* [54].

Le *Dinophysis* sono responsabili della produzione di tossine del gruppo dell'acido okadaico [55] e la *D. fortii* anche di una pectenotossina (PTX2) [56].

Chimica delle tossine DSP

Le DSP sono polieteri ciclici, composti liposolubili, divisi nelle tre seguenti classi strutturali, completamente diverse per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e alterazioni biochimiche (Fig. 2):

- *tossine acide*: acido okadaico e suoi derivati (OAs);
- *tossine neutre*: pectenotossine (PTXs);
- *yessotossina* e suoi derivati (YTXs).

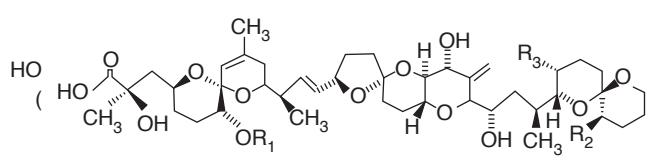
Profilo tossicologico delle tossine DSP

Tossine acide. - Sono state riportate le seguenti dosi (mg/kg) che provocano mortalità nei topi per i.p. [57]:

OA	0,20
DTX1	0,16
DTX2	0,20 (stimata)
DTX3	0,25
7-O-acylDTX2	0,25 (stimata)

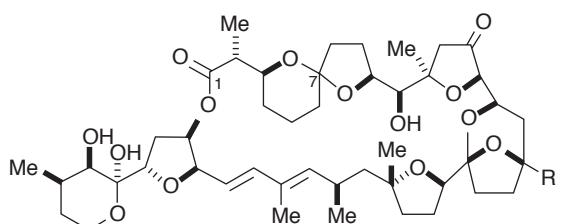
L'acido okadaico e i suoi derivati (OAs), essendo liposolubili, possono attraversare facilmente la membrana cellulare [58]. OA, DTX1 e DTX2 inibisco-

Tossine acide (Acido okadaico e derivati)



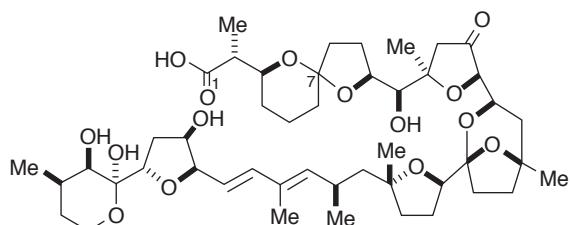
	R1	R2	R3
AO	H	H	CH ₃
DTX1	H	CH ₃	CH ₃
DTX2	H	H	CH ₃
DTX3	acyl	CH ₃	CH ₃
7-O-acyIOA	acyl	CH ₃	H
7-O-acylDTX2	acyl	H	CH ₃

Tossine neutre (Pectenotossine PTXs)



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

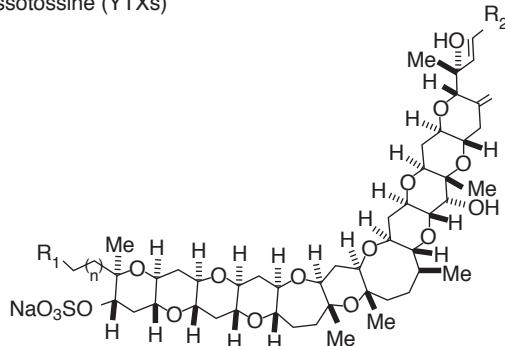
macrolide



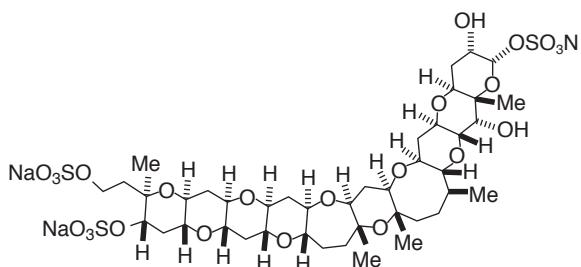
C-7	PTX2SA (2): R 7- <i>epi</i> -PTX2SA (3): S
	secotoxin

Non è la nota struttura chimica della PTX5

Yessotossine (YTXs)



Adriatotoxin (ATX)



yessotoxin (YTX)

45-hydroxyyessotoxin (hydroxyYTX)

45, 46, 47-trinoryessotoxin (norYTX)

2-homoyessotoxin (homoYTX)

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

44-carboxylyessotoxin (carboxyYTX)

R ₁	R ₂	n
OSO ₃ Na		1
OSO ₃ Na		1
OSO ₃ Na		1
OSO ₃ Na		2
OSO ₃ Na		2
OSO ₃ Na		1

Fig. 2. - Struttura chimica delle tossine DSP (diarrhetic shellfish poisoning).

no selettivamente le proteine fosfatasi con particolare riferimento alla PP2A [59], alterando i processi di fosforilazione-defosforilazione che sono fondamentali per la regolazione dell'attività cellulare. L'acido okadaico probabilmente provoca diarrea stimolando la fosforilazione che controlla la secrezione di sodio da parte delle cellule intestinali. Inoltre l'acido okadaico stimola direttamente la contrazione della muscolatura liscia, anche intestinale [60].

Nei topi è stata riportata una tossicità orale di 0,20-0,30 mg/kg per l'acido okadaico e di 0,10-0,30 per la DTX1 [61]. In uno studio nel quale l'acido okadaico è stato somministrato per via orale in topi adulti, è risultato che alla dose di 75 µg/kg OA veniva indotto un trascurabile accumulo di fluidi nell'intestino. Questo valore è stato individuato come LOAEL [62].

A seguito di iniezione intraperitoneale di DTX-1 a varie concentrazioni (50-500 µg/kg bw), sono state osservate nel topo alterazioni principalmente a livello dell'intestino tenue [63], con degenerazione dell'epitelio e distruzione dell'apparato del Golgi, cosa che suggerisce un possibile attacco diretto a questo organello.

L'effetto distruttivo sull'epitelio dell'intestino tenue è stato dimostrato anche per le altre tossine acide (OA e DTX-3) da [64].

Utilizzando dimetil-benzantracene come iniziatore tumorale, è stato dimostrato che l'acido okadaico e la DTX1 agiscono come promotori di tumori della pelle nel topo, inducendo per lo più papillomi e carcinomi [65, 66]. A seguito dell'osservazione che l'acido okadaico induce l'attività dell'ornitina decarbossilasi nello stomaco ghiandolare dei ratti, attività tipica di altri promotori tumorali, è stato suggerito che l'acido okadaico possa essere anche un promotore di tumori dello stomaco [65].

In studi successivi è stata evidenziata anche una possibile attività genotossica dell'acido okadaico, a seguito dell'osservazione di addotti al DNA su colture cellulari ed embrioni di pesce [67].

L'intossicazione da DSP nell'uomo è caratterizzata da disturbi gastrointestinali quali diarrea nel 92% dei casi, nausea nell'80%, vomito nel 79% e dolori addominali nel 53%. I sintomi compaiono dopo un periodo che va da mezz'ora a 12 ore dall'ingestione di molluschi contaminati e possono durare fino a tre giorni nei casi più gravi, senza tuttavia lasciare conseguenze. Non è stato mai riportato alcun caso letale.

Tossine neutre. - Le pectenotossine (PTXs) sono un gruppo di polieteri ciclici di origine marina strutturalmente divisi in due gruppi [68].

L'origine di queste tossine è attribuito alle Dinophysis. In *D. fortii* è stata dimostrata la presenza di una pectenotossina, la PTX2 [53]; anche in Adriatico *D. fortii* mostra la presenza di PTX2 oltre a quella dell'acido okadaico [56].

La PTX2 è ritenuta il precursore delle altre pectenotossine (PTXs) attraverso processi di biotrasformazione ad opera dei bivalvi.

Le pectenotossine sono state isolate dai bivalvi in differenti aree geografiche: Europa, Asia ed Oceania [56, 69]. Soltanto recentemente in Australia è stato segnalato un avvelenamento da molluschi bivalvi attribuito a PTX2SA [70].

Sono state riportate le seguenti tossicità delle PTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg [57]:

PTX1	0,25
PTX2	0,23
PTX3	0,35
PTX4	0,77
PTX6	0,50
PTX7	> 5,0
PTX8	> 5,0
PTX9	> 5,0

I risultati delle prime ricerche sulle alterazioni istopatologiche causate dalle pectenotossine risalgono al 1986 [63]. Dopo un'ora dall'iniezione intraperitoneale di PTX1, nei topi furono osservati negli epatociti intorno alle regioni periportali dei lobuli epatici numerosi vacuoli non contenenti lipidi.

In cellule epatiche *in vitro*, la PTX1 induce una diminuzione del numero e una perdita dell'arrangiamento radiale dei microtubuli; il danno alle cellule epatiche è reversibile se le cellule sono trattate con concentrazioni inferiori a 0,5 µg/ml per meno di 4 ore. Dopo 24 ore dalla rimozione della tossina gli epatociti recuperano le condizioni di normalità [71].

In una recente ricerca è stato dimostrato *in vitro* che anche la PTX6 agisce selettivamente sul citoscheletro provocando cambiamenti nella polimerizzazione dell'actina [72].

La PTX2 induce diarrea in topi adulti dopo somministrazione orale alla dose di 1,0 mg/kg. Alla dose di 0,25 mg/kg non induce diarrea ma è possibile osservare che l'intestino crasso si gonfia e si riempie di fluidi. A concentrazioni da 0,25 a 2,0 mg/kg si notano anche lesioni al fegato, allo stomaco e all'intero intestino [73].

Yessotossine. - Sono state riportate le seguenti tossicità delle YTXs espresse come mortalità del topo per i.p. in mg/kg [57]:

YTX	0,10
HydroxyYTX	0,50
DesulfoYTX	0,50
HomoYTX	0,10
Hydroxy-homoYTX	0,50
NorYTX	0,22
CarboxyYTX	0,50
ATX	>0,10

La yessotossina (YTX) è stata per la prima volta isolata dal bivalve *Patinopecten yessoensis* [74]. Ha una struttura chimica simile a quella della brevetossina isolata da *G. breve* e della ciguatossina isolata da *Gymnothorax javanicus*. Questa somiglianza ha fatto pensare che le YTXs potessero intervenire a livello dei canali del Na⁺ facilitando l'entrata di questo ione. Tuttavia questo meccanismo non è stato dimostrato sperimentalmente [75]. Successivamente numerosi studi hanno dimostrato la presenza di diversi analoghi della yessotossina.

La prima dimostrazione della presenza di yessotossine in mitili dell'Adriatico risale al giugno del 1995 [21]. Successivamente, in mitili raccolti nella stessa area di mare nell'estate del 1996 e 1997, furono messi in evidenza analoghi delle yessotossine [76-78]: homo-yessotossina, 45-idrossihomo-yessotossina e 45-idrossi-yessotossina. Un nuovo analogo della yessotossina, l'adriatossina, con tre gruppi solforici (ATX), è stata identificata in mitili del Mare Adriatico [79]. Due specie di dinoflagellate sono considerate responsabili della produzione di yessotossine *Protoceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum* [76, 78].

Negli studi sugli effetti tossici della yessotossina come tale e della sua forma desulfatata, è risultato che la prima ha come organo bersaglio il miocardio mentre la seconda il fegato e il pancreas [80].

La causa di morte nel topo (alla dose di 0,10 mg/kg) è dovuta ad un'insufficienza cardiaca acuta per azione della yessotossina e ad un'alterazione del fegato e del pancreas per la yessotossina desolfatata.

La yessotossina risulta tossica in epatociti e in cellule di glioma di ratto [75]. A livello istologico si osserva un edema intracitoplasmatico nelle cellule del muscolo cardiaco 3 ore dopo l'iniezione i.p. di 300 mg/kg di YTX mentre non si osservano danni agli organi digestivi. La YTX desulfata, alla stessa dose, causa invece una grave degenerazione grassa del fegato ed una necrosi intracellulare nello stesso organo e nel pancreas, senza agire sul cuore [80].

La scarsa conoscenza a livello biologico molecolare e farmacologico degli analoghi della yessotossina, alcuni dei quali sono stati ritrovati nei mitili delle coste adriatiche, dipende dalla non disponibilità in commercio dei principi attivi. Questi ultimi attualmente sono utilizzati solo dai ricercatori che le estraggono e purificano a partire dai mitili contaminati. Non si conoscono casi di intossicazione umana attribuibili alle YTXs.

Epidemiologia

Le pectenotossine e le yessotossine sono state erroneamente ritenute responsabili di sindromi diarreiche (DSP), in quanto si ritrovano spesso in presenza simultanea con l'acido okadaico e i suoi derivati nei molluschi bivalvi.

Le sindromi DSP dovute all'acido okadaico sono associate all'ingestione di molluschi contaminati. In Giappone, questo tipo di intossicazione è stato osservato a seguito del consumo di mitili (*M. edulis* e *M. coruscum*), pettini (*Patinopecten yessoensis* e *Chlamis nipponensis*) e vongole (*Tapes japonica* e *Gomphina melaegis*). Sulle coste atlantiche dell'Europa, *Mytilus edulis* e *Ostrea* sp. sono stati associati a episodi di intossicazione DSP. Nei molluschi, queste tossine si accumulano principalmente nell'epatopancreas. Per questa ragione, anche se la cottura non altera significativamente la tossicità dei molluschi, l'intossicazione può essere considerevolmente ridotta evitando di consumare le ghiandole digestive dei molluschi.

L'entità dell'accumulo di tossine DSP è sensibilmente diversa nei molluschi bivalvi. Attività di monitoraggio nell'Adriatico settentrionale hanno permesso di stabilire che le concentrazioni più elevate di tossina vengono raggiunte nei mitili e, anche se in misura molto inferiore, nelle vongole [81].

La concentrazione di cellule nell'acqua di mare necessaria a contaminare i molluschi è molto variabile. È stato riportato che una concentrazione di 1000-2000 cellule/l di *Dinophysis* spp. provoca un accumulo significativo di cellule (20 000-30 000 per epatopancreas) e un elevato livello di tossicità nei mitili [82]. Le intossicazioni DSP sulla costa olandese sono state associate a concentrazioni di oltre 20 000 cellule/l [83].

D'altra parte, l'accumulo di tossine DSP nei molluschi sembra dipendere anche da altri fattori. In uno studio su *Dinophysis* nelle acque costiere del Portogallo, è stato ad esempio osservato che il tempo necessario ai molluschi per diventare tossici dipende dalla presenza non solo di alghe tossiche ma anche di altre specie non tossiche [84].

Fino agli anni '80, le aree dove sono state registrate intossicazioni da tossine DSP erano circoscritte all'Oceano Atlantico, al mare del Nord, alle coste degli Stati Uniti (dell'Atlantico e del Pacifico), del Cile, del Sud Africa, della Thailandia e del Giappone.

In quest'ultimo paese, dal 1976 al 1982 sono stati registrati oltre 1300 casi di intossicazione da tossine DSP [68]. In Francia, negli anni 1983 e 1984, sono state riportati più di 5000 casi di intossicazioni, e altri 21 000 casi sono stati descritti successivamente [85]. Intossicazioni di simile entità hanno interessato le coste olandesi [86]. In Scandinavia, nel 1984, 300-400 casi sono stati attribuiti a ingestione di tossine DSP [87]. In Spagna, nel settembre 1981, sono stati osservati circa 5000 casi di disturbi gastrointestinali causati dalla presenza di tossine DSP nei molluschi [85].

Per quanto riguarda il Mediterraneo, dai dati disponibili sembra che la contaminazione da DSP sia limitata ad alcune aree della parte settentrionale del bacino. I primi casi di contaminazione sono stati quelli, sopra citati, rilevati in Francia nel 1987. Contamina-

zioni da DSP si sono verificate anche lungo la costa orientale della Corsica [88].

Per quanto riguarda i mari italiani, il primo episodio noto di intossicazione da tossine DSP si è verificato in Adriatico nel giugno del 1989. In tale occasione, fu dimostrata la presenza di cellule di *D. fortii* nell'epatopancreas di mitili della fascia costiera dell'Emilia Romagna, che avevano causato disturbi diarrhoeici in circa un centinaio di consumatori [49]. Questo fenomeno è stato successivamente osservato nel Golfo di Trieste e lungo la costa marchigiana [89, 50]. Contaminazioni di mitili da tossine DSP sono state segnalate anche lungo le coste della Croazia e della Slovenia [90].

La tossicità dei mitili dell'Adriatico settentrionale dovuta a tossine DSP si manifesta con una certa continuità, presentandosi piuttosto puntualmente nel periodo stagionale estivo-autunnale.

Azaspiracido, una nuova tossina marina isolata dai mitili

Recentemente è stata individuata una nuova tossina liposolubile, l'azaspiracido (Fig. 3 e Tab. 1).

Il primo episodio di intossicazione da azaspiracido (AZA) è avvenuto nel 1995, quando i mitili raccolti nella baia di Killary in Irlanda causarono forti disturbi gastrointestinali nei consumatori dei Paesi Bassi. La struttura della tossina responsabile dell'intossicazione fu successivamente individuata in Giappone e, sulla base della sua composizione chimica, fu definita come azaspiracido [91, 92]. Altri casi di intossicazione da tossina AZA causati da mitili provenienti dall'Irlanda sono stati segnalati nell'Irlanda stessa e in altri paesi dell'Europa, Italia compresa [81].

Sono stati isolati, oltre all'AZA quattro analoghi (AZA2-AZA5) [93]. Si ipotizza che AZA e i suoi analoghi siano prodotti da dinoflagellate.

Sono state riportate per la tossina AZA dosi letali per via orale nel topo di 250 e 500 µg/kg e di 200 µg/kg a seguito di iniezione intraperitoneale [94]. In questi studi è stata osservata una marcata variabilità nella sensibilità alla tossina, in relazione all'età.

In uno studio condotto con estratti di mitili parzialmente purificati sono stati messi in evidenza gravi danni al fegato, al pancreas, al timo, ai tessuti linfatici e al tratto digestivo [95]. In un secondo studio con la tossina purificata somministrata per via orale alle dosi di 500, 600 e 700 µg/kg, sono stati osservati effetti di gravità progressiva agli stessi organi entro 24 ore [94].

I dati disponibili riguardanti questi studi hanno permesso di individuare LOAEL di 23 e 86 µg di tossina, con un valore medio di 51,7 µg.

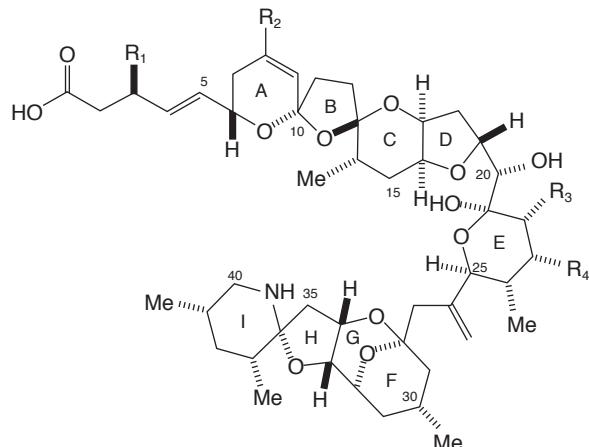


Fig. 3. - Struttura chimica degli azaspiracidi (AZAs).

Tab. 1. - Tossicità degli 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].

Livelli di tolleranza e considerazioni di sicurezza dell'acido ocadaico e delle altre tossine DSP

Per quanto riguarda l'OA e la DTX, i dati riguardanti le intossicazioni umane in Giappone e in Norvegia hanno permesso di ricavare un LOEL di 48-65 µg per una persona di 60 kg, corrispondente a circa 0,8 µg di acido ocadaico/kg di peso corporeo. Da questo valore è stata definita un'assunzione tollerabile di 0,27 µg/kg di peso corporeo, applicando un fattore di incertezza di 3.

Per la tossina PTX2 è stato individuato un LOAEL per somministrazione orale di 0,25 mg/kg [73]. Applicando un fattore di sicurezza di 100 è stato ottenuto un limite tollerabile di 0,25 µg/kg per l'uomo. Questo valore corrisponde ad una dose di 15 µg in una persona adulta di 60 kg di peso e ad un livello tollerabile nei molluschi di 15 µg/100 g di parte edibile.

Per le yessotossine, sulla base del NOAEL sul topo, applicando un fattore di incertezza di 100, è stata definita un'assunzione tollerabile di 10 µg/kg di peso corporeo, che per un adulto di 60 kg di peso corrisponde ad una dose di 600 µg.

In considerazione dell'esiguità dei dati tossicologici ed epidemiologici, è stato suggerita una dose tollerabile di 100 µg. Di conseguenza, è stato proposto un livello massimo nei molluschi di 100 µg/100 g di parte edibile.

Recentemente, con una decisione della Commissione Europea del 15 marzo 2002, che fissa norme specifiche per l'attuazione della Direttiva 91/492/CE del Consiglio, sono stati definiti i seguenti tenori massimi di alcune biotossine marine in molluschi bivalvi e in altri organismi:

- 160 µg di acido okadaico equivalente/kg parte edibile per acido okadaico, DTX e pectenotossine;
- 1 mg equivalente di yessotossina/kg parte edibile;
- 160 µg equivalenti di azaspiracido/kg parte edibile.

Tossine NSP

La NSP è una sindrome di tipo neurotossico legata alle fioriture del dinoflagellato *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). Le fioriture di quest'alga si verificano per lo più in Florida, dove causano morie degli animali marini. Il rischio per l'uomo deriva dall'ingestione di molluschi contaminati e dall'inalazione di aerosol contenente cellule o loro frammenti, in prossimità di aree interessate dalle fioriture.

Specie tossiche e loro distribuzione

L'area geografica in cui si verifica maggiormente la presenza di questa alga è rappresentata dal golfo del Messico e dalle coste della Florida e del nord Carolina [96]. Sono state riportate fioriture di questa specie, non associate a morie di pesci o a intossicazioni nell'uomo, anche nella Spagna settentrionale, in Giappone e lungo la costa orientale del Mediterraneo [97, 98].

Lungo le coste dell'Adriatico settentrionale, nel 1976 e 1977 e successivamente nel 1984, sono state osservate fioriture attribuite a *Gymnodinium* sp [99, 9]. La specie responsabile delle fioriture non è stata tassonomicamente definita, è tuttavia diversa da *G. breve* e non produce tossine NSP [100].

Una fioritura di *Gymnodinium* spp. è stata riportata nel golfo di Olbia (Sardegna) nell'autunno del 1985, ma anche in questo caso non sono state rilevate tossine NSP [101].

Chimica delle tossine NSP

La neurotossina di *P. brevis*, denominata BTx-B, è stata descritta per la prima volta come un sistema di 11 anelli eterociclici contenenti ossigeno, terminante con un lattone insaturo a una estremità e con una aldeide insatura all'altra [102]. In seguito, sono state caratterizzate altre brevetossine [103].

Profilo tossicologico

I primi casi di intossicazione causati da brevetossine risalgono all'800, ma solo nel 1952 è stata chiarita la relazione tra "maree rosse" dovute a *P. brevis* e sindrome neurotossica (NSP) [104]. Questa intossicazione avviene in seguito al consumo di bivalvi che hanno accumulato le brevetossine nei loro tessuti. Gli episodi finora osservati sono circoscritti lungo le coste del Golfo del Messico e sono stati associati al consumo di vongole. Non è stato riportato nessun caso letale.

La NSP è dunque una forma relativamente blanda di intossicazione da molluschi bivalvi. I principali sintomi sono: sensazione di paralisi alla bocca e alle dita, atassia, rallentamento del battito, sensazione di caldo e freddo, midriasi e lieve diarrea. La guarigione avviene in pochi giorni.

Mentre le saxitossine responsabili della PSP agiscono come agenti non-depolarizzanti nelle membrane delle cellule eccitabili, le brevetossine, liposolubili, agiscono come sostanze depolarizzanti, inducendo l'apertura dei canali di membrana permeabili al Na⁺ e quindi favorendo il flusso di questo ione verso l'interno [105].

Durante le fioriture di *P. brevis* si possono verificare disturbi di tipo respiratorio, dovuti all'inalazione di aerosol di acqua marina contenente cellule e loro frammenti o brevetossine discolte. Si possono determinare forti irritazioni della congiuntiva e delle mucose (soprattutto nasali) seguite da tosse secca e rinorrea [106]. Anche in questo caso, la tossina provoca l'apertura dei canali di membrana permeabili al Na⁺, rilasciando acetilcolina che a sua volta causa la contrazione della muscolatura liscia tracheale. Gli effetti sono solo temporanei. Le maree rosse causate da *P. brevis* e associate a questa sindrome respiratoria sono frequenti soprattutto in Florida, ma sono state descritte anche nel Golfo del Messico e nella Carolina del nord [96], nella Spagna settentrionale e in Giappone [97]. Anche nell'Adriatico sono stati riportati casi di irritazione respiratoria, probabilmente dovuti alla presenza di una specie di *Gymnodinium* non ancora definita tassonomicamente [100].

Tossine ASP

Nel 1987 in Canada è stata riportata un'intossicazione attribuita al consumo di mitili che coinvolse 153 persone. Oltre a disturbi di tipo gastrointestinale, questa intossicazione provocò in alcuni casi confusione e perdita di memoria, da cui il termine *amnesic shellfish poisoning* (ASP) proposto per questa sindrome [107].

Specie tossiche e loro distribuzione

La tossina responsabile di questa sindrome risultò essere l'acido domoico, un amminoacido neurotossico

relativamente raro [107], e la specie algale produttrice fu identificata nella diatomea pennata *Nitzschia pungens* f. *multiseries*. Dopo l'episodio di intossicazione del 1987 sopra citata, nella Baia di Cardigan fu rilevata una concentrazione di *N. pungens* di 10 milioni di cellule/l, con livelli di acido domoico fino all'1% di peso secco.

Un'altra diatomea produttrice di acido domoico, *Pseudonitzschia australis*, è stata individuata lungo le coste della California [108]. In quest'area le tossine ASP sono state rilevate nei molluschi e in alcuni pesci, in particolare nelle acciughe. Il consumo di pesci contenenti queste tossine è stato ritenuto responsabile delle morie di uccelli marini osservate in questa zona nello stesso periodo.

Alcuni casi di intossicazione umana sono stati attribuiti al consumo di molluschi contenenti acido domoico anche nello Stato di Washington.

Attualmente, la biointossicazione da acido domoico è presente non solo in Canada e in California, ma anche lungo le coste dell'Australia e della Nuova Zelanda. In Europa, benché non sia stato mai registrato alcun episodio di intossicazione, la presenza di acido domoico è stata dimostrata in mitili coltivati lungo la costa della Galizia [109] e nella diatomea *P. pungens* f. *multiseries*, raccolta nelle coste olandesi [110].

In Italia, il problema del possibile rischio sanitario associato alle tossine ASP è stato sollevato quando, negli anni 1988/91, sono comparsi nell'alto e medio Adriatico aggregati mucillaginosi contenenti diatomee del genere *Nitzschia*. In realtà fu possibile escludere la presenza di acido domoico in questi aggregati [111].

Tuttavia questa tossina rappresenta attualmente anche per l'Italia un problema sanitario. Infatti l'assenza di acido domoico nei molluschi bivalvi dei mari italiani non esclude il rischio che molluschi contaminati provenienti da altri paesi provochino intossicazioni in Italia; inoltre le varie specie del genere *Pseudonitzschia* produttrici di acido domoico, e quindi potenzialmente tossiche, hanno una distribuzione piuttosto ampia.

Meccanismi d'azione e tossicologia clinica

Ricerche sul meccanismo d'azione dell'acido domoico hanno mostrato che questo aminoacido, analogo dell'acido glutammico e dell'acido kainico, agisce sui recettori dell'acido glutammico, uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale [112]. Questo meccanismo d'azione a livello delle sinapsi spiega in parte gli effetti neurotossici dell'acido domoico.

Il meccanismo d'azione dell'acido domoico è attualmente noto a livello dei recettori degli amminoacidi eccitatori e della trasmissione sinaptica. La sintomatologia da ASP non si limita al sistema nervoso ma riguarda anche l'apparato digerente.

In confronto alle tossine PSP, l'acido domoico è una neurotossina relativamente blanda. Nell'intossicazione avvenuta in Canada, vi furono 153 casi di disturbi gastroenterici con nausea, vomito e diarrea entro 24 ore, e disturbi neurologici (principalmente confusione e perdita di memoria) dopo 48 ore nei pazienti più anziani (oltre 60 anni), tre dei quali morirono [107].

Livelli di tolleranza e considerazioni di sicurezza

E' stato proposto un livello tollerabile di acido domoico di 20 µg/g di parte edibile di mollusco, derivato dopo aver osservato effetti tossici sui consumatori di molluschi ad una concentrazione di 200 µg/g [113].

Intossicazione da venerupina (VSP)

L'intossicazione da venerupina è una sindrome non paralitica causata dall'ingestione di ostriche (*Crassostrea gigas*) e vongole (*Venerupis semidecussata*) che hanno accumulato dinoflagellate tossiche. La specie che si ritiene responsabile di questa intossicazione è *Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae* e var. *triangulatum* [114], che produce "acque colorate" soprattutto in Giappone, nel Mar Baltico e in Portogallo.

Nel Mediterraneo è stato osservato un progressivo aumento di *P. minimum* [115]. Nell'estate del 1983, costituì una parte considerevole della regolare fioritura estiva nella Baia di Sibenik (costa orientale adriatica); negli anni seguenti, la sua presenza è costantemente aumentata ed è stata riportata anche in altre zone costiere dell'Adriatico [116].

La maggior parte degli episodi dell'intossicazione da venerupina si sono verificati in Giappone, con numerosi casi letali [117]. Anche in Norvegia, nel 1979, sono stati descritti i sintomi di questa intossicazione in 70 persone che avevano consumato mitili raccolti in prossimità di una massiccia fioritura di *P. minimum* [118].

La natura della tossina responsabile dell'intossicazione da venerupina non è stata ancora definita. L'avvelenamento è caratterizzato da una lunga incubazione (24-48 ore) a cui fa seguito un inizio repentino dei sintomi: nausea, vomito, diarrea, cefalea e agitazione. Nei casi più gravi possono manifestarsi disfunzione epatica, delirio e coma epatica. La morte sopraggiunge in circa il 33% dei pazienti.

Intossicazioni associate al consumo di pesci “Ciguatera disease”

La ciguatera è un'intossicazione tipica delle regioni costiere tropicali e subtropicali, particolarmente dei Caraibi e delle isole del Pacifico. E' causata dall'ingestione di una grande varietà di pesci delle barriere

coralline che contengono tossine accumulate lungo la catena alimentare. Il termine ciguatera deriva dal nome usato nel 18° secolo nelle Antille spagnole per una intossicazione alimentare causata dalla "cigua", un mollusco del genere *Cittarium*. Responsabile della produzione di ciguatossine è un dinoflagellato bentonico, *Gambierdiscus toxicus* [119], di cui si nutrono i pesci erbivori che a loro volta vengono ingeriti dai pesci carnivori. In questo modo i pesci più grandi e più vecchi accumulano una grande quantità di tossina, che si concentra in tutto l'organismo e soprattutto nelle interiora.

Sono almeno cinque le tossine responsabili di questa intossicazione, tra le quali un composto ammonico quaternario (ciguatossina) e una componente idrosolubile (maitotossina) [120]. La ciguatossina è una tossina molto potente, con una DL50 nel topo di 0,45 µg/kg i.p. La sua azione principale è quella di aumentare la permeabilità al sodio delle membrane eccitabili causandone la depolarizzazione [121]. La ciguatera si presenta come una sindrome acuta con vomito, diarrea, dolori addominali, disturbi neurologici e, in alcuni casi, bradicardia o tachicardia. Non trattata, la comune sindrome gastroenterica si risolve entro 24-48 ore, ma alcuni sintomi neurologici possono persistere per mesi [122].

Il problema dell'importazione di alghe tossiche marine

La progressiva diffusione delle specie algali marine dannose è un problema che merita un'attenzione particolare. Le acque di zavorra delle navi da carico sono ritenute la causa principale di tale diffusione. Queste acque possono infatti contenere gli organismi presenti nelle aree portuali dalle quali vengono pompatte (virus, batteri, fitoplancton, crostacei, molluschi, pesci), i quali possono sopravvivere durante il trasporto e così essere immessi nell'ambiente dove queste vengono scaricate. La loro sopravvivenza in questo nuovo ambiente è legata all'analogia con l'ambiente d'origine. In questo modo avviene la colonizzazione di aree geografiche da parte di nuove specie algali. Enormi volumi di acque di zavorra sono in continuo movimento in tutto il mondo ed è presumibile che aumentino in futuro con la globalizzazione dei commerci. E' stato stimato che ogni anno circolano in tutto il mondo circa 10 miliardi di tonnellate di acqua di zavorra.

Il problema dell'importazione di alghe tossiche marine, così come di altri organismi alieni, è stato ampiamente riconosciuto e documentato in vari paesi. In Tasmania sono state campionate acque e sedimenti accumulati nelle cisterne di zavorra di grandi navi da carico e sono state rilevati oltre 300 milioni di cisti di dinoflagellati in una sola nave [123, 124].

In Australia, è attivo dal 1991 un programma di ricerca per minimizzare il trasporto di organismi alieni.

Questo problema è stato oggetto di un workshop dell'International Council for the Exploration of the Sea (ICES), nel corso del quale è emerso che numerosi paesi si sono dati l'obiettivo di elaborare specifici sistemi di sorveglianza.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 22 ottobre 2002.

BIBLIOGRAFIA

1. Vollenweider RA, Rinaldi A, Montanari G. Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten-year monitoring along the Emilia-Romagna coast (Northwest Adriatic Sea). In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani G (Ed.). *Marine coastal eutrophication Proceedings of an International Conference*. Bologna 21-24 March 1990. Italy: 1992. p. 63-106.
2. Anderson DM. Le maree rosse. *Le Scienze* 1994;314(10):74-81.
3. Hallegraeff GM. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. Paris: UNESCO. 1995. p. 1-24.
4. Anderson DM. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: Okai T, Anderson DM, Nemoto T (Ed.). *Red tides: biology, environmental science and technology*. New York: Elsevier Science Publishing Co.; 1989. p. 11-2.
5. Smayda TJ. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkage? In: Cosper EM, Carpenter EJ, Bricelj VM (Ed.). *Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms*. Berlin: Springer Verlag; 1989. p. 449-83.
6. Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 1993;32(2):77-99.
7. Boni L. Red tides of the coast of Emilia Romagna (North Western Adriatic Sea) from 1975 to 1982. *Inf Bot It* 1983;15(1): 18-24.
8. Viviani R. Relazione. In: *Fenomeni di eutrofizzazione lungo le coste dell'Emilia Romagna*. Regione Emilia Romagna: a cura del Dipartimento Sicurezza Sociale e Ambiente; 1976. p. 27-38.
9. Artegiani A, Azzolini R, Marzocchi M, Morbidoni M, Solazzi A, Cavolo F. Prime osservazioni su un "bloom" fitoplanctonico lungo la costa marchigiana nell'anno 1984. *Nova Thalassia* 1985;7(suppl. 3):137-42.
10. Fonda Umani S. Hydrology and "red tides" in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Oebalia* 1985;11:141-7.
11. Honsell G, Talarico L, Cabrini M. Interesting ultrastructural features of a green dinoflagellate. *G Bot It* 1988;122:76-8.
12. Hallegraeff GM, Bolch CJ. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores via ship's ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J Plankton Res* 1992; 14:1067-84.
13. Smayda T. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Graneli E, Sundstrom

- B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier; 1990. p. 29-40.
14. Andersen P. Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. *IOC Techn Ser UNESCO* 1996;44:102
 15. Shumway SE, Barter J, Sherman-Caswell S. Auditing the impact of toxic algal blooms on oyster. *Environ Auditor* 1990;2: 41-56.
 16. Sommer H, Meyer KF. Paralytic shellfish poisoning. *Arch Pathol* 1937;24:560-98.
 17. Schantz EJ, Mold JD, Stanger DW, Shavel J, Riel FJ, Bowden JP, Lynch JM, Wyler RS, Riegel BR, Sommer H. Paralytic shellfish poisoning. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J Am Chem Soc* 1957;72:5230-35.
 18. Taylor FYR. Toxic dinoflagellates: taxonomic and biogeographic aspects with emphasis on seafood toxins. In: Ragelis EP (Ed.) *Seafood toxins ACS Symposium*. Washington DC: American Chemical Society 1984; Series 262: p. 77.
 19. Honsell G. First report of *Alexandrium minutum* in the northern Adriatic waters (Mediterranean Sea). In: Smayda TJ, Shimizu Y (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea 5th int conf. on toxic marine phytoplankton*. Newport, RI, USA, 28 October-1 November 1991. Elsevier Science Publishers, B.V 1993; p. 127-32.
 20. Cabrini M, Mozetic P, Chiurco R, Cok S, Predonzani S. *PSP toxicity and the distribution of Alexandrium spp in the gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea)*. Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae (abstract and poster classification). Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 48.
 21. Ciminiello P, Fattorusso E, Magno S, Oshima Y, Poletti R, Viviani R, Yasumoto T. Determination of PSP toxins in mussels from the Adriatic sea. *Mar Pollut Bull* 1995;30:733-5.
 22. Marasovic I, Nincevic Z, Orhanovic S, Pavela-Vrancic M. *DSP and PSP toxicity in the coastal waters of the middle Adriatic (Kastela Bay)*. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 132.
 23. Innamorati M, Lazzara L, Nuccio C, De Pol M, Mannucci M, Mori, G. *Popolamenti fitoplanctonici e condizioni idrologiche nell'arcipelago toscano. Resoconti dei rilevamenti in mare*. Firenze; 1989. n. 6. p. 1-115.
 24. Boni L, Pompei M, Reti M. Maree colorate e fioriture algali lungo le coste dell'Emilia Romagna dal 1982 al 1985 con particolare riguardo alla comparsa di *protogoniaulax tamarensis*. *Nova Thalassia* 1986;3:237-45.
 25. Montresor M, Marino D, Zingone A, Dafnis G. Three *Alexandrium* species from coastal Tyrrhenian waters (Mediterranean Sea). In: Granelli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier Science Publishing Co.; 1990. p. 82-7.
 26. Carrada GC, Casotti R, Modich M, Saggiomo V. Presence of *gymnodinium catenatum* (dinophyceae) in a coastal Mediterranean lagoon. *J Plankton Res* 1991;13:229-38.
 27. Honsell G, Boni L, Cabrini M, Pompei M. Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. In: Vol-
 - lenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. New York: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 107-14.
 28. Pagou K. Eutrophication problems in Greece. In: *Eutrophication-related phenomena in the Adriatic Sea and in other Mediterranean coastal zones*. Commission of the European Communities; 1990. (Water Pollution Research, Report 16). p. 97-114.
 29. Poletti R, Milandri A, Pompei M, Viviani R. Controllo delle tossine ASP nei prodotti ittici. *Laguna* 1997;5:6-17.
 30. World Health Organization. *Aquatic (marine and freshwater) biotoxin*. Geneva: WHO; 1984. (Environmental Health Criteria, 37). p. 1.
 31. Viviani R. Eutrophication, marine biotoxins, human health. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. *Sci Total Environ*;1992(suppl.):631-62.
 32. Schantz EJ, Mold JD, Howard WL, Bowden JP, Stanger DW, Lynch JM, Wintersteiner OP, Dutcher JD, Walters DR, Riegel B. Paralytic shellfish poisoning. VIII. Some chemical and physical properties of purified clam and mussel poisons. *Can J Chem* 1961;39:2117-23.
 33. Kao CY. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Fed Proc* 1972;31:1117-23.
 34. Steidinger KA, Baden DG. Toxic marine dinoflagellates. In: Spector DL (Ed.). *Dinoflagellates*. Orlando, Florida: Academic Press Inc.; 1984. p. 201-49.
 35. Viviani R. *The veterinarian in the control of aquatic biotoxins*. Bologna: Grasso; 1981. p. 1-151.
 36. Auerbach PS. Clinical therapy of marine envenomation and poisoning. In: Tu AT (Ed.). *Handbook of natural toxins-marine toxins and venoms*. New York and Basel: M Dekker Inc.; 1988. p. 493-565.
 37. Chang FH, Anderson DM, Kulis DM, Till DG. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty New Zealand. *Toxicon* 1997;35:393-409.
 38. White AW. Paralytic shellfish toxins and finfish. In: Ragelis EP (Ed.). *Seafood toxins ACS Symposium Series 269*. Washington DC: American Chemical Society; 1984. p. 171-80.
 39. Luthy J. Epidemic paralytic shellfish poisoning in western Europe, 1976. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*. North Holland, New York: Elsevier; 1979. p. 15-22.
 40. Bravo I, Reguera B, Martinez A, Fraga S. First report of *gymnodinium catenatum* graham in the Mediterranean coast. In: Granelli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier Science Publisher Co; 1990. p. 449-52.
 41. Delgado M, Estrada M, Camp J, Fernandez JV, Santmarti M, Lleti C. Development of toxic *Alexandrium minutum* halim (Dinophyceae) bloom in the harbour of Sant Carles de la Rapita (Ebro Delta, northwestern Mediterranean). *Sci Mar* 1990;54:1-7.
 42. Tagmouti F, Chafak H, Fellat-Zarrouk R, Talbi M, Blaghen M, Mikou A, Guittet E. (1995) Detection of toxins in bivalves of Moroccan coasts. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyama Y (Ed.). *Harmful and toxic algal blooms*. Sendai: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 85-7.

43. Rosales-Loessner F, De Porras E, Dix MW. Toxic shellfish poisoning in Guatemala. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (Ed.). *Red tides: biology, environmental science and toxicology*. New York: Elsevier; 1989. p. 113-6.
44. Kao CY. Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer IR (Ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; 1993. p. 75-86.
45. Viviani R, Proja M, D'Alessandro F, Mancini L, Poletti R, Montanaro G. Primi casi in Italia di "paralytic shellfish poisoning" da mitili coltivati nei rias della Spagna. *Atti Soc Ital Vet* 1977;31:331.
46. 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.
47. Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, Fujita N. Identification of *dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1980;46:1405-11.
48. Relevante N, Williams WT, Gilmarin M. A numerical assessment of the temporal and spatial distribution of phytoplankton assemblages in the Northern Adriatic Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 1984;77:137-50.
49. Boni L, Mancini L, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Viviani R. First cases of DSP in the Northern Adriatic Sea. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. *Sci Total Environ* 1992(suppl.):419-26.
50. Ammazzalorso P, Ercolelli M, Giorgi G, Trotta I, De Rosa F, Grassini P. Indagine sulla presenza di dinophysis e tossina liposolubile DSP in molluschi ed acque di mare adibite alla molluschicoltura in provincia di Pesaro, nell'estate 1990. *Ig Mod* 1991;96:142-72.
51. Della Loggia R, Cabrini M, Del Negro P, Honsell G, Tubaro A. Relationship between dinophysis spp. in seawater and DSP toxins in mussels in the Northern Adriatic Sea. In: Smayda TJ, Shimizu Y (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea. 5° Int Conf. on toxic marine phytoplankton*. Newport RI, USA, 28 October-1 November 1991. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, BV; 1993. p. 483-8.
52. Sidari L, Honsell G. Il genere *dinophysis ehrenberg* (pyrrophyta) in Adriatico: revisione bibliografica. *Boll Soc Adr Sci* 1994; 75:413-22.
53. Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol* 1989;1:147-52.
54. Giacobbe MG, Penna A, Ceredi A, Milandri A, Poletti R, Yang X. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *dinophysis sacculus* (dinophyta). *Phycologia* 2000;39(3):177-82.
55. Fattorusso E, Ciminiello P, Costantino V, Magno S, Mangoni A, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Viviani R. Okadaic acid in mussels of Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull* 1992;24:234-7.
56. Draisici R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 1996;34:923-35.
57. Working Group on Toxicology of DSP and AZP. *Report of the meeting of the Working Group on Toxicology of DSP and AZP*. Brussels, 21-23rd May 2001. p. 21.
58. Saganuma M, Suttajit M, Suguri H, Ojika M, Yamada K, Fujiki K. Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter, in mouse skin. *FEBS Lett* 1989;250:615-8.
59. Takai A, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G, Yasumoto T. Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. *Biochem J* 1992;284:539-44.
60. Shibata S, Ishida Y, Ditano H, Ohizumi Y, Habon J, Kikuchi H. Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 223:135-43.
61. Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T. Toxicological evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* 1997;5:255-9.
62. Ito E, Yasumoto T, Takai A, Imanishi S, Harada K. Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon* 2002;40:159-65.
63. Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T. Histopathological studies on experimental marine-toxin poisoning. I: Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysis-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 1986; 24:1141-51.
64. Hamano Y, Kinoshita Y, Yasumoto T. Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *J Food Hyg Soc Jpn* 1986;27:375-9.
65. Saganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Djika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradeca-noato-13-acetate-type tumor promotor. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:1768-71.
66. Fujiki H, Saganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M, Yasumoto T, Sugimura T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1 is a potent promoter on mouse skin. *Gann* 1988;79:1089-93.
67. Fessard V, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Puiseux-Dao S. Ocadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat Res* 1996;361:133-41.
68. Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Matsumoto CK, Clardy J. Diarrhetic shellfish poisoning. In: Rageli EP (Ed.). *Seafood toxins*. Washington DC: American Chemical Society; 1984. (ACS Symposium Series, 262). p. 207-14.
69. James KJ, Bishop AG, Draisici R, Palleschi L, Marchiafava G, Ferretti E, Satake M, Yasumoto T. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J Chromatogr A* 1999;844:53-65.
70. Quilliam M, Eaglesham G, Hallegraeff G, Quaine J, Richard D, Nunez P. *Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales, Australia*. Abstract, International Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmania, 7-11 Feb. 2000. p. 48.
71. Zhou J, Komiyama M, Terao K, Shimada Y. Effects of pectenotoxin-1 on liver cells *in vitro*. *Natural Toxins* 1994;2:132-5.

72. Leira F, Cabado AG, Veytes MR, Roman Y, Alfonso A, Botana LM, Yasumoto T, Malaguti C, Rossini GP. Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 72:35:1-10.
73. Ishige M, Satoh N, Yasumoto T. *Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2)*. Hokkaido Institute of Health; 1988. (Report, 38). p. 15-9.
74. Murata T, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett* 1987;28: 5369-872.
75. Aune T. Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes. In: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (Ed.). *Mycotoxins and phycotoxins '88*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1988. p. 461-8.
76. Satake M, Terasawa K, Kadokawa Y, Yasumoto T. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallop. *Tetrahedron Lett* 1996;37:5955-8.
77. Satake M, MacKenzie, Yasumoto T. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* 1997;5:164-7.
78. Tubaro A, Sidari L, Della Loggia R, Yasumoto T. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 470-2.
79. Ciminiello P, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Poletti R, Viviani R. Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett* 1998;39: 8897-900.
80. Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T. Histopathological studies on experimental marine toxins poisoning. 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicology* 1990;28:1095-104.
81. Poletti R. Monitoring activities on marine toxic algae in the Adriatic Sea. In: *Algal bloom detection, monitoring and prediction*. 3rd Workshop: "Public health". Rome, 21-22 April 1998. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1999. (Rapporti ISTISAN, 99/8). p. 62-73.
82. Séchet V, Safran P, Hovgaard P, Yasumoto T. Causative species of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway. *Mar Biol* 1990;105:269-74.
83. Kat M. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia* 1983;68:81-4.
84. Sampayo MA, Alvito P, Franca S, Sousa I. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: Granelli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. Amsterdam: Elsevier; 1990. p. 215-20.
85. Van Egmond H.P, Aune T, Lassus P, Speijers GJA, Walcock M. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J Nat Toxins* 1993;2:41-83.
86. Kat M. Diarrhetic mussel poisonings in The Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1983;49:417-27.
87. Underdal B, Yndestad M, Aune T. DSP intoxication in Norway and Sweden, autumn 1984-spring 1985. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (Ed.). *Toxic dinoflagellates*. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 489-94.
88. Belin C. Distribution of *dinophysis* spp. and *alexandrium minutum* along french coasts since 1984, and their DSP and PSP toxicity levels. In: Smayda TJ, Shimizu Y (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 469-74.
89. Tubaro A, Sosa S, Bussani D, Sidari L, Honsell G, Della Loggia R. Diarrhoeic toxicity induction in mussels of the Gulf of Trieste. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (Ed.). *Harmful marine algal blooms*. Paris: Lavoisier Science Publishers; 1995. p. 249-54.
90. Sedmak B, Fanuko N. Occurrence of *dinophysis* spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic. *J Appl Phycol* 1991;3:289-94.
91. Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat Toxins* 1999;7:99-102.
92. Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silk J, Yasumoto T. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels. *J Am Chem Soc* 1998;120:9967-8.
93. Ofuji K, Satake M, McMahon T, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:740-2.
94. Ito E, Satake M, Ofuji K, Kurita N, McMahon T, James KJ. Multiple organ damage caused by new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicology* 2000;38: 917-30.
95. Ito E, Terao K, McMahon T, Silke J, Yasumoto T. Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; 1998. p. 588-9.
96. Pierce RH. Cooperative scientific effort identifies red tide toxin. *Environ (The Marine Biomedical Center) Newsletters* 1987;10:7-12.
97. Steidinger KA. A reevaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. *Prog Phycol Res* 1983;2:148-88.
98. Pagou K, Ignatiades L. The periodicity of *Gymnodinium breve* (Davis) in Saronicos Gulf, Aegean Sea. In: Granelli E, Sundstroem B, Edler L, Anderson DM (Ed.). *Toxic marine phytoplankton*. New York: Elsevier; 1990. p. 206-8.
99. Viviani R, Boni L, Cattani O, Mancini L, Poletti R, Annibaldi A, Milandri A, Montanari G, Nizzoli C, Pirini M, Pompei M, Rinaldi A. Occurrence of various types of phytoplankton blooms in coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna during 1978. *Atti dell'Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna, Classe di Scienze Fisiche*, 267. (Memorie Serie IV) 1985;10:1-81.

100. Viviani R. Le diverse fioriture di fitoplancton, dal 1978 al 1982, nell'area del mare Adriatico settentrionale prospiciente la costa dell'Emilia-Romagna. In: *Atti del Convegno Eutrofizzazione dell'Adriatico. Ricerche e linee di intervento*. Bologna, Italy, 18-20 maggio 1983. Regione Emilia-Romagna; 1983. p. 79-87.
101. Sechi N, Volterra L, Aulicino FA, Bonadonna L, Bagella G, D'Amadio P, Moresu MC, Soggia G. Un caso di eutrofizzazione nel golfo di Olbia. *Ig Moderna* 1987;88:126-36.
102. Alam M, Trieff NM, Ray SM, Hudson JE. Isolation and partial characterization of toxins from the dinoflagellate *G. breve*. *J Pharmacol Sci* 1975;64:865-7.
103. Nakanishi K. The chemistry of brevetoxins: A review. *Toxicon* 1985;23:473-9.
104. McFarren EF, Tanabe H, Silva FJ, Wilson WB, Campbell JE, Lewis KH. The occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams and *gymnodinium breve* cultures. *Toxicon* 1965;3:111-23.
105. Risk M, Lin YY, MacFarlane RD, Sadagopa-Ramanujam VM, Smith LL, Tieff NM. Purification and chemical studies on a major toxin from *gymnodinium breve*. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*. North Holland: Elsevier; 1979. p. 335-44.
106. Pierce RH Red tide *ptychodiscus brevis* toxin aerosols: A review. *Toxicon* 1986;24:955-6.
107. Wright JLC, Boyd RK, De Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Loycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, Pathak VP, Quilliam MA, Ragan MA, Sim PG, Hibault P, Walter JA, Gilgan M, Richard DGA, Dewar D. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chem* 1989; 67:481-90.
108. Buck KR, Uttal-Cooke L, Pilskaln CH, Roelke DL, Villac MC, Fryxell GA, Cifuentes L, Chavez FP. Autecology of the diatom *Pseudonitzschia australis* Frenguelli, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. *Marine Ecol Progr Ser* 1992; 84:293-302.
109. Miguez A, Fernandez ML, Fraga S. First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain). In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.). *Harmful and toxic algal blooms. Proceedings of the VII International Conference on Toxic Phytoplankton*. Sendai, Japan, 12-16 July 1995. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 143-5.
110. Vrieling EG, Koeman RPT, Peperzak L, Veenhuis M, Scheerman P, Gieskes WWC. *Pseudo-nitzschia pungens* forma multiseries and other *Pseudo-nitzschia* species in the Dutch Wadden Sea. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.). *Harmful and toxic algal blooms. Proceedings of the VII International Conference on Toxic Phytoplankton*. Sendai, Japan, 12-16 July 1995. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 139-42.
111. Viviani R, Boni L, Cattani O, Milandri A, Poletti R, Pompei M, Sansoni G. ASP, DSP, NSP and PSP monitoring in "mucilaginous aggregates" and in mussels in a coastal area of the Northern Adriatic sea facing Emilia Romagna in 1988, 1989 and 1991. In: Vollenweider RA, Rinaldi A (Ed.). *Proceedings of International Workshop, Cesenatico 10-12 Sept. 1992. Sci Total Environ* 1995;165:203-11.
112. Todd ECD. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning: a review. *J Food Prot* 1993;56:69-83.
113. Waldichuk M Amnesic shellfish poisoning. *Mar Pollut Bull* 1989;20:359-60.
114. Okaichi T, Imatomi Y Toxicity of *prorocentrum minimum* var *mariae-lebouriae* assumed to be a causative agent of short-necked clam poisoning. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*. New York: Elsevier/North Holland; 1979. p. 385-9.
115. Marasovic I, Pucher-Petkovic T. Effects of eutrophication on the coastal phytoplankton community. *Rapp Comm Int Mer Médit* 1985;29:137-9.
116. Marasovic I, Pucher-Petkovic T, Alegria-Hernandez V. Phytoplankton productivity of the Adriatic Sea in relation to pelagic fisheries. *Biljeske-Notes Inst Oceanogr Fish* 1988; 72:1-8.
117. Nakajima M. Studies on the sources of shellfish poison in Lake Hamana. IV. Identification and collection of the noxious dinoflagellates. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1968;34:130-1.
118. Tangen K. Brown water in the Oslo Fjord, Norway, in September 1979, caused by the toxic *Prorocentrum minimum* and other dinoflagellates. *Blyttia* 1980;38:145-58.
119. Yasumoto T, Nakajima I, Bagnis R, Adachi R. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of Ciguatera. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1977;43:1021-6.
120. Miyahara JT, Akau CK, Yasumoto T. Effects of ciguatoxin and maitotoxin on the isolated guinea pig atria. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;25:177-80.
121. Rayner MD. Mode of action of ciguatoxin. *Fed Proc* 1972;31: 1139-45.
122. Bagnis R. Ciguatera Fish Poisoning. In: Falconer IR (Ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; 1993. p. 105-16.
123. Anderson DM, Keafer BA. Dinoflagellate cyst dynamics in coastal and estuarine waters. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (Ed.). *Toxic dinoflagellates*. New York: Elsevier; 1985. p. 219-24.
124. Hallegraeff GM. Transport of toxic dinoflagellate via ship's ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar Ecol Prog Ser* 1998;168:297-309.

Rosanna MANCINELLI e Maria Soccorsa GUIDUCCI