



## **Intossicazione da ciguatossina: aspetti clinici e ricerca sperimentale**

**Davide Lonati, Carlo Alessandro Locatelli**  
*Centro Antiveleni di Pavia - Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, Unità di Tossicologia  
IRCCS Fondazione Maugeri (Pavia) e Università degli Studi di Pavia*

Le intossicazioni da tossine algali possono configurare una emergenza sanitaria e costituiscono una problematica emergente e in continuo cambiamento. Recentemente alcune zone costiere italiane sono state interessate dal fenomeno di fioritura di alcune specie di microalghe bentoniche come la *Ostreopsis ovata*. Tale fenomeno è influenzato da fattori ambientali legati prevalentemente a cambiamenti climatici, come il rialzo della temperatura dell'acqua. A causa della "tropicalizzazione" del Mar Mediterraneo la ciguatossina, tipicamente presente in mari tropicali o subtropicali, è stata identificata anche nei nostri mari anche se finora limitatamente ad alcune zone (Isola di Creta, Israele, Isole Canarie e Madeira). Ad oggi, casi di intossicazione acuta da ciguatossina sono stati registrati anche in Europa in seguito all'ingestione di pesce contaminato e importato dai mari caraibici o indiani. I casi hanno coinvolto numerose persone (da 15 a 70 pazienti) e, anche in considerazione delle difficoltà legate alla formulazione del sospetto diagnostico (intossicazione non frequente in Europa), hanno costituito una vera e propria emergenza. Negli anni il Centro Antiveleni - Centro Nazionale di Informazione Tossicologica e il Laboratorio di Tossicologia Clinica e Sperimentale dell'IRCCS Fondazione Maugeri di Pavia sono divenuti il centro di riferimento nazionale per il trattamento e lo studio di tale intossicazione che finora ha riguardato

### **Indice:**

- Intossicazione da ciguatossina: aspetti clinici e ricerca sperimentale  
*Davide Lonati, Carlo Alessandro Locatelli .... pag. 2*
- Risultati preliminari degli studi in corso sulla predisposizione genetica allo sviluppo della ciguatera cronica  
*Annamaria Pasi, Miryam Martinetti, Davide Lonati, Carlo Alessandro Locatelli .... pag. 4*
- Risultati preliminari degli studi in corso sui meccanismi molecolari di neurotossicità indotti da ciguatossina in modelli cellulari del sistema nervoso umano  
*Uliana De Simone, Davide Lonati, Carlo Alessandro Locatelli, Teresa Coccini ..... pag. 4*
- Insetti come alimenti o mangimi: che rischi si corrono?  
*Emanuela Corsini ..... pag. 6*
- Micotossine e micotossicosi: un problema di salute pubblica?  
*Chiara Dall'Asta ..... pag. 8*

principalmente connazionali rientrati da vacanze in zone tropicali (Santo Domingo, Cuba, Antigua e Polinesia Francese). In caso di accertata o sospetta intossicazione da ciguatossina, il paziente può essere valutato sia in regime ambulatoriale che di ricovero attraverso un protocollo diagnostico-terapeutico che prevede la somministrazione di terapia specifica e finalizzato alla stadiazione della malattia tramite accertamenti elettrofisiologici mirati e immunogenetici. I pazienti vengono seguiti successivamente con follow-up clinici ambulatoriali.

L'intossicazione da ciguatossina (ciguatera) è dovuta a contaminazione della catena alimentare: l'intossicazione umana consegue all'ingestione di pesce contaminato. Le ciguatossine, famiglia di tossine di origine non batterica, sono presenti in molti microrganismi e in particolare nel dinoflagellato *Gambierdiscus toxicus*. L'intossicazione acuta (*Ciguatera Fish Poisoning*) è normalmente associata al consumo di pesci provenienti da mari tropicali o subtropicali. Le specie ittiche causa di ciguatera sono molte, appartenenti ad un gran numero di famiglie e in genere di elevatissimo valore commerciale ed alimentare. Tutti i vari predatori di taglia medio-grande che hanno il loro *habitat* naturale presso la barriera corallina possono provocare la ciguatera, ma anche piccoli pesci pelagici come i *Clupeidae* possono causare avvelenamenti, perlopiù molto gravi. Nella maggioranza dei casi i pesci coinvolti sono grandi predatori all'apice della catena trofica (es. barracuda, cernie e lutianidi), pesci in cui la tossina si può concentrare per il fenomeno definito "biomagnificazione".

Il meccanismo d'azione delle ciguatossine, solo in parte caratterizzato, è legato all'attivazione di canali del sodio a voltaggio dipendenti con conseguente aumento della permeabilità di membrana agli ioni sodio e della depolarizzazione delle cellule nervose. La sintomatologia classica è caratterizzata da una iniziale sindrome gastroenterica comprendente vomito, diarrea profusa e dolori addominali che possono comparire con latenza compresa tra le 4 e le 24 ore

dall'ingestione del pesce contaminato; la risoluzione è solitamente spontanea nei successivi 4 giorni. Sia per la gravità e l'intensità delle manifestazioni (es. rischio di grave disidratazione) che per l'andamento, tali sintomi sono facilmente confondibili con una gastroenterite di origine virale o batterica (es. colera). Più specifici invece sono i sintomi a carico del sistema nervoso caratterizzati da alterazioni della sensibilità come parestesie (definite come sensazioni sgradevoli - anche non dolorose - di formicolio e intorpidimento) e/o disestesie alle estremità degli arti e in regione peri-labiale, inversione della sensibilità caldo-freddo (le superfici fredde vengono avvertite come calde), alterazioni del gusto, marcata astenia, dolore all'apparato genitourinario, urgenza minzionale, prurito, singhiozzo, disautonomie e raramente allucinazioni. I disturbi della sensibilità (peculiare manifestazione della intossicazione) possono essere stimolati dal contatto con oggetti o con acqua freddi.

Le alterazioni della sensibilità sono valutabili e quantificabili con test neurofisiologici standardizzati e dal più specifico *thermal-quantitative sensory tests* (QST). In alcuni casi sono state documentate alterazioni o disfunzioni permanenti evidenziabili con lo studio della densità delle piccole fibre attraverso la biopsia cutanea neurodiagnostica.

La sintomatologia (prevalentemente quella neurologica) può persistere per settimane/mesi/anni o ricomparire dopo un periodo di benessere e configurare la forma cronica della intossicazione (ciguatera cronica). Non è noto il meccanismo per il quale la sintomatologia cronica compaia solo in un certo numero dei pazienti intossicati sebbene si pensi che una predisposizione genetica sia alla base di tali osservazioni.

In assenza di test diagnostici e *biomarkers* specifici, la diagnosi deve basarsi sulle caratteristiche cliniche associate ad anamnesi positiva per ingestione di pesce. Per quanto riguarda il trattamento, al momento in associazione ad un trattamento sintomatico è indicata la somministrazione per via endovenosa di alte dosi di mannitolo (1 grammo/kg). Tale terapia è maggiormente efficace se somministrata precocemente

anche se, in pazienti con sintomatologia persistente, è stato riferito un beneficio soggettivo dopo successive somministrazioni anche a distanza di mesi dall'intossicazione acuta. Recentemente, attraverso l'attività di consulenza specialistica del Centro Antiveneni - Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, sono stati identificati e descritti casi di intossicazione acuta secondari all'assunzione di invertebrati marini (*Trochus niloticus*) verificatisi in Polinesia Francese. Sono stati coinvolti 9 pazienti adulti che hanno presentato sintomatologia acuta e cronica atipica rispetto alla forma classica di ciguatera e che è stata identificata come una nuova sindrome definita "*Ciguatera Shellfish Poisoning, CSP*". Alcuni pazienti erano di nazionalità italiana e, una volta rientrati, sono stati ricoverati presso il Centro Antiveneni di Pavia per gli approfondimenti diagnostico-terapeutici e per il trattamento specifico. Le analisi eseguite sugli invertebrati prelevati sul posto e coordinate dal Laboratoire de recherche sur les Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé di Papeete di Tahiti hanno evidenziato per la prima volta la presenza di una ciguatossina (P-CTX-3B) in tale tipologia di mollusco. Nello stesso invertebrato marino inoltre è stata identificata una ulteriore tossina algale appartenente alla famiglia delle Azaspiracidi (AZA-2), mai ritrovata prima nei mari della Polinesia Francese. È ipotizzabile che la co-presenza di più tossine possa essere stata la causa delle differenti manifestazioni cliniche, caratterizzate da grave sintomatologia gastroenterica acuta e dalla persistenza dei sintomi a carico del sistema nervoso periferico.

Queste esperienze sottolineano come la continua variazione o la nuova comparsa di tossine algali rivestano un fattore cardine nel determinare le peculiarità di ogni intossicazione, che possono differire dal quadro classico finora descritto.

Il Centro Antiveneni di Pavia ha avviato progetti di ricerca, in collaborazione con il Laboratorio di Immunogenetica, Immunoematologia e Centro Trasfusionale dell'IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo di Pavia e con l'Unità di Neurofisiologia Clinica e di Biopsia Cutanea Neurodiagnostica dell'IRCCS Fondazione Maugeri di Pavia, al fine di

caratterizzare meglio la sintomatologia acuta e cronica della ciguatera, di valutare eventuali predisposizioni genetiche (profilo molecolare HLA e interazione con KIR - *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) e di identificare eventuali alterazioni neuropatologiche caratterizzanti gli effetti tossici acuti o cronici. Inoltre la collaborazione con il Laboratoire de Recherche sur les Micro-algues Toxiques (LMT) dell'Istituto Louis Malardé Papeete di Tahiti (Polinesia Francese) permetterà di valutare gli aspetti anamnestici e clinici dei casi di intossicazione da ciguatera registrati in aree del Pacifico e di studiare il meccanismo di tossicità delle tossine appartenenti alla famiglia delle ciguatossine, per molti aspetti ancora ignoto.

#### Bibliografia

- Aligizaki K and Nikolaidis G, 2008. Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysys* in the Mediterranean Sea. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 9, 75-82.
- Aligizaki K, Nikolaidis G and Fraga S, 2008. Is *Gambierdiscus* expanding to new areas? *Harmful Algae News*, 36, 6-7.
- Bentur Y and Spanier E, 2007. Ciguatoxin-like substances in edible fish on the eastern Mediterranean. *Clinical Toxicology*, 45, 695-700.
- Boada LD et al. Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*. 2010; 56(8): 1516-9.
- Boada LD, Zumbado M, Luzardo OP, Almeida-González M, Plakas SM, Granade HR, et al. Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*. 2010; 56(8): 1516-9.
- Epelboin L et al. Two clusters of ciguatera fish poisoning in Paris, France, related to tropical fish imported from the French Caribbean by travelers. *J Travel Med*. 2014 Nov-Dec; 21(6): 397-402.
- Gatti CM, Darius HT, Chinain M, Lonati D. First report of a mass-poisoning outbreak following the consumption of *Tectus niloticus* (Gastropod) in French Polynesia: a novel pathway of Ciguatera Shellfish Poisoning? *Harmful Algae New. An IOC Newsletter on Toxic Algae and Algal Blooms; No. 50, p. 19 - January 2015 (www.ioc-unesco.org/hab)*.
- Lonati D, Gatti CM, Zancan A, Darius HT, Fleure M, Chinain M, Buonocore M, Locatelli CA. Novel ciguatera shellfish poisoning (CSP) cluster after consumption of *Tectus niloticus*, a gastropod, in Nuku-Hiva, French Polynesia. XXXV International Congress of the EAPCCT, 26-29 May 2015, Malta. *Clinical Toxicology* (2015), 53, 278.
- Lonati D, Martinetti M, Pasi A, Gatti A, Buonocore M, Locatelli CA. Clinical findings and genomic biomarkers in three cases of chronic ciguatera poisoning. *Clinical Toxicology* 2014; 52(4): 395.
- Mattei C et al. Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. *Toxicon*. 2014 Dec; 91: 76-83.

- Matute P, Núñez D, Abadía N. Characterisation of two indigenous outbreaks of ciguatera food poisoning which occurred in Tenerife in November 2008 and January 2009. XXXVII Reunión de la Sociedad Española de Epidemiología; 2009 Oct 28-30; Zaragoza, Spain. Spanish.
- Nunez D et al. Outbreak of ciguatera food poisoning by consumption of amberjack (*Seriola spp.*) in the Canary Islands, May 2012. Euro Surveill. 2012 Jun 7; 17(23).
- Schlaich C, Hagelstein JG, Burchard GD, Schmiedel S. Outbreak of ciguatera fish poisoning on a cargo ship in the port of Hamburg. J Travel Med. 2012.
- Zimmermann K et al. Imported tropical fish causes ciguatera fish poisoning in Germany. Dtsch Med Wochenschr. 2015 Jan; 140(2): 125-30.

## Risultati preliminari degli studi in corso sulla predisposizione genetica allo sviluppo della ciguatera cronica

Annamaria Pasi<sup>(1)</sup>, Miryam Martinetti<sup>(1)</sup>, Davide Lonati<sup>(2)</sup>, Carlo Alessandro Locatelli<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio di Immunogenetica, Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia

<sup>(2)</sup> Centro Antiveleni di Pavia - Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, Unità di Tossicologia, IRCCS Fondazione Maugeri, Pavia

Alcuni pazienti possono manifestare la ciguatera cronica, caratterizzata dalla persistenza della sintomatologia o riacutizzazione della stessa anche a distanza di settimane/mesi dall'evento acuto.

La durata, le caratteristiche e l'intensità della sintomatologia della ciguatera cronica possono variare; secondo alcuni autori la cronicizzazione della intossicazione potrebbe riguardare fino al 5% dei pazienti. Le cause o i fattori predisponenti la cronicizzazione non sono noti. Dati sperimentali hanno evidenziato come l'esposizione a neurotossine marine possa determinare una risposta neuroprotettiva e anti-infiammatoria tessutale mediata dall'attivazione di specifici geni. Studi molto recenti di trascrittomica in soggetti affetti da ciguatera cronica attribuiscono genericamente ai geni HLA di classe II un ruolo importante nell'eziopatogenesi.

Lo studio ha riguardato il polimorfismo genomico HLA di classe I e II di 11 casi

di intossicazione da ciguatera seguiti dal Centro Antiveleni - Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, 10 dei quali hanno presentato persistenza della sintomatologia per mesi o anni (ciguatera cronica). Il 60% dei casi di ciguatera cronica portava l'aplotipo HLA-DRB1\*11,DQB1\*03:01/19, 4/10 HLA-DRB1\*04,DQB1\*03:02 e 3/10 HLA-DRB1\*07,DQB1\*02:02. L'unico caso di ciguatera acuta era HLA-DRB1\*10:01,\*14:04;DQB1\*05,\*05 positivo. L'analisi dei profili HLA di classe II ha evidenziato l'alta frequenza di fenotipi immunogenetici caratteristici di patologie autoimmuni in soggetti del tutto privi di autoanticorpi: 8/11 pazienti avevano eterodimeri DQ di suscettibilità alla celiachia, 7/11 motivi di sequenza DRB1 artritogenici. Riguardo all'unico caso di ciguatera acuta che non ha manifestato persistenza dei sintomi e che pur condivideva con i pazienti "cronici" la presenza di motivi DRB1 artritogenici, è stato valutato l'impatto delle molecole HLA classe I nella loro funzione di ligandi dei recettori KIR. Inaspettatamente il paziente con la forma acuta è risultato l'unico sprovvisto dei ligandi HLA-A e B dei KIR. I dati di questi casi sono coerenti con i risultati riportati nell'unica pubblicazione scientifica che riporta una possibile predisposizione allo sviluppo di patologie croniche associata agli aplotipi HLA-DRB1\*11 e DRB1\*04 [Shoemaker et al., 2010]. Anche l'assenza di ligandi HLA dei recettori inibitori KIR espressi sulle cellule natural killer potrebbe avere un ruolo nella cronicizzazione.

### Bibliografia

- Ryan JC, Morey JS, Bottein MY, et al. Gene expression profiling in brain of mice exposed to the marine neurotoxin ciguatoxin reveals an acute anti-inflammatory, neuroprotective response. BMC Neurosci. 2010; 26; 11:107.
- Shoemaker RC, House D, Ryan JC. Defining the neurotoxin derived illness chronic ciguatera using markers of chronic systemic inflammatory disturbances: a case/control study. Neurotoxicol Teratol. 2010; 32(6): 633-9



## Risultati preliminari degli studi in corso sui meccanismi molecolari di neurotossicità indotti da ciguatossina in modelli cellulari del sistema nervoso umano

**Uliana De Simone, Davide Lonati, Carlo Alessandro Locatelli, Teresa Coccini**

Laboratorio di Tossicologia Clinica e Sperimentale, Centro Antiveneni di Pavia e Centro Nazionale di Informazione Tossicologica - Unità di Tossicologia, IRCCS Fondazione Maugeri di Pavia

Il concetto di “tossine marine emergenti” è utilizzato da organi regolatori, quali la Commissione Europea e l’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), per identificare tossine marine recentemente scoperte, ma anche tossine marine che risultano attualmente presenti in acque e frutti di mare prima assenti. La scarsa informazione sui meccanismi di tossicità, la complessità strutturale di queste tossine marine e la limitata disponibilità di standard purificati hanno ostacolato lo sviluppo di metodologie per la loro individuazione e regolamentazione, così come la possibilità di poter fare diagnosi certa e di poter individuare il trattamento specifico per la cura dei pazienti intossicati.

Ad oggi gli studi per la valutazione della tossicità utilizzano principalmente il modello “cell based assay” (CBA) con cellule di derivazione animale (i.e., primarie o linee cellulari immortalizzate, soprattutto i neuroni N2a, di topo). Lo studio sperimentale in corso presso il Laboratorio di Tossicologia Clinica e Sperimentale dell’IRCCS Fondazione Maugeri di Pavia si inserisce in questo contesto con lo scopo di approfondire i meccanismi di tossicità indotti dall’esposizione a ciguatossina (CTX) utilizzando il modello cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Il modello *in vitro* permette di studiare i meccanismi alla base della neurotrasmissione e nocicezione. Le cellule, derivate da tessuto neuronale simpatico umano, esprimono canali del sodio (Nav) rilevanti per la segnalazione del dolore (tra i quali Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.7) e canali del calcio (in particolare i sottotipi essenziali per la nocicezione). CTX è risultata

essere sia un potente attivatore dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (VGSC) con conseguente aumento del calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracellulare, sia un potente inibitore dei canali del potassio.

Lo studio prevede anche di utilizzare un sistema di co-cultura di neuroni e astrociti quale modello più realistico di tessuto cerebrale che più strettamente mima le condizioni fisiologiche del SNC. Le cellule gliali infatti svolgono varie funzioni interagendo con i neuroni. Tra le principali possiamo annoverare gli effetti sullo sviluppo, differenziazione e riparazione del sistema nervoso e sulla regolazione dell’omeostasi extracellulare. Inoltre supportano i neuroni danneggiati aumentandone la tolleranza allo stress, attenuano l’eccitotossicità neuronale indotta da glutammato e migliorano la sopravvivenza dei neuroni corticali cerebrali *in vitro*. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che la linea cellulare catecolaminergica SH-SY5Y di neuroblastoma umano diventa marcatamente resistente a xenobiotici in co-cultura con astrociti. L’obiettivo è quello di approfondire i meccanismi molecolari di tossicità indotti da ciguatossina (CTX-3: ciguatossina sintetica, tipo II, dell’Oceano Pacifico) sia dopo esposizione acuta che dopo esposizione prolungata in neuroni di origine umana (SH-SY5Y), e in co-culture di neuroni e astrociti umani. Le cellule sono state esposte a CTX in presenza o in assenza di farmaci quali la ouabaina e veratridina, al fine di contrastare o enfatizzare l’azione della tossina.

Dai primi risultati è emerso chiaramente che CTX, anche a dosi elevate (0.1-10 nM), non è in grado di indurre mortalità cellulare (valutata mediante l’MTT test e morfologia cellulare) nelle cellule SH-SY5Y di neuroblastoma umano senza un pre-trattamento con ouabaina-veratridina, analogamente a quanto riportato per le cellule di neuroblastoma N2a murino. La Ouabaina (O) è risultata molto potente in queste cellule umane: una mortalità delle cellule SH-SY5Y pari all’80% era indotta con 0.5 microM rispetto al 30% di mortalità causato da 500 microM nelle cellule N2a (dopo 20 h dal trattamento). La Veratridina (V) era priva di effetti nelle SH-SY5Y fino

a dosi pari a 50 microM analogamente a quanto osservato per le cellule N2a. Nelle SH-SY5Y, dosi molto basse di ouabaina (10 nM) somministrata singolarmente o in associazione a veratridina 1:1 (10 nM : 10 nM) erano in grado di ridurre in modo significativo (30%) la vitalità cellulare. In quest'ultima condizione (cioè di O+V), la co-presenza di CTX non aggravava l'effetto citotossico indotto da O+V: si assisteva cioè ad una mortalità cellulare del 35% dopo 4 e 24 ore dal trattamento.

D'altra parte, un pretrattamento con dosi elevate di OV (0.5 microM : 0.5 microM) era in grado di determinare una marcata mortalità cellulare tempo-dipendente ossia una riduzione della vitalità pari al 50% e 80% dopo 4 e 24 ore, rispettivamente, che ancora una volta non veniva esacerbata dalla somministrazione di CTX.

Questi primi risultati indicano che il modello CBA-SH-SY5Y (di derivazione umana) è molto più sensibile alla O rispetto alle cellule murine. È da sottolineare infatti che le dosi tossiche di O (10 nM) nelle cellule neuronali umane sono decisamente inferiori a quelle capaci di indurre citotossicità nel modello di topo (500 microM), ma decisamente elevate rispetto ai livelli fisiologici plasmatici (circa 0.25 nM) della O endogena nell'uomo.

Lo studio intende approfondire le condizioni fisiopatologiche che determinano la suscettibilità/tossicità delle cellule neuronali umane SH-SY5Y alla CTX nonché identificare bersagli biochimici/molecolari sensibili, dosi critiche, tempi di insorgenza degli effetti in seguito ad esposizione a CTX quali informazioni rilevanti per poter testare successivamente *in vitro* l'azione contrastante di farmaci.

### **Conclusioni**

Le intossicazioni da tossine algali, tra queste l'intossicazione da ciguatossina, sono caratterizzate da aspetti meccanicistici, clinici e ambientali ancora poco noti e in continua evoluzione. La ricerca traslazionale svolge quindi un ruolo essenziale. In termini preventivi è necessario migliorare la diffusione delle informazioni riguardanti la tossicità acuta e potenzialmente la tossicità cronica nell'uomo così come l'educazione per i soggetti a

rischio (turisti, velisti, etc). La divulgazione di informazioni su questa problematica emergente e di potenziale rischio per la salute pubblica ha lo scopo di migliorare la conoscenza di tale patologia, al fine di porre il sospetto diagnostico e di indirizzare i pazienti a centri specializzati per una ottimale gestione dell'intossicazione acuta e per monitorare eventuali effetti tossici a distanza.

## **Insetti come alimenti o mangimi: che rischi si corrono?**

*Emanuela Corsini*

*Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari Università degli Studi di Milano*

L'8 ottobre 2015 è stato pubblicato sul sito dell'EFSA, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, un comunicato stampa relativo alla pubblicazione di un'opinione scientifica dal titolo: "Insetti come alimenti o mangimi: che rischi si corrono?". Per chi fosse interessato, l'intero documento è scaricabile al seguente indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/it/press/news/151008a>. Questa tematica è stata anche oggetto di approfondimento durante l'EXPO e la notizia è stata ovviamente ripresa su tutti i quotidiani. Il parere scientifico dell'EFSA è stato richiesto a supporto di un progetto di ricerca cofinanziato dall'EU per esplorare la fattibilità di impiegare proteine ricavate da insetti per i mangimi. La Commissione sta inoltre valutando lo sviluppo di politiche in materia di nuovi prodotti alimentari e mangimi che rispecchino il possibile uso di insetti come alimenti o mangimi. Anche altri enti - tra cui l'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura delle Nazioni Unite (FAO) - in passato si sono espressi sulla possibilità di usare gli insetti come alimenti e mangimi, e tre Stati membri dell'UE - Belgio, Francia e Paesi Bassi - hanno eseguito valutazioni del rischio connesso agli insetti come alimenti o mangimi.

Il documento dell'EFSA prende in considerazione il possibile uso degli insetti come fonte alternativa di proteine destinate all'alimentazione umana o animale e

l'eventuale rischio associato. La ricerca di fonti proteiche alternative si inserisce nella necessità di sfamare la popolazione mondiale sempre in aumento e quindi come risposta alla crisi alimentare globale. Nel documento l'EFSA si chiede quali sarebbero i rischi derivanti dalla produzione, trasformazione e consumo di questa fonte alternativa di proteine. Tra i possibili rischi connessi all'uso di insetti allevati come cibi e mangimi vengono citati i potenziali pericoli biologici (trasmissione di patogeni), chimici (allergia, contaminazione con metalli pesanti, tossine, farmaci veterinari, ecc.) ed ambientali. L'eventuale presenza di pericoli biologici e chimici nei prodotti alimentari e nei mangimi derivati da insetti dipenderebbe dai metodi di produzione, da ciò con cui gli insetti vengono nutriti, dalla fase nel ciclo di vita nella quale gli insetti vengono raccolti, dalle specie di insetti, nonché dai metodi utilizzati per la loro successiva trasformazione.

Dal comunicato stampa si legge: "L'EFSA ha concluso che quando gli insetti non trasformati vengono nutriti con sostanze per mangimi attualmente autorizzate, la potenziale insorgenza di pericoli microbiologici è prevedibilmente simile a quella associata ad altre fonti di proteine non trasformate. Quanto al trasferimento di contaminanti chimici da diversi tipi di substrato agli insetti stessi i dati disponibili sono limitati. Si suppone che la probabilità di comparsa di prioni - proteine abnormi che possono causare malattie come l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) nel bestiame e la malattia di Creutzfeldt-Jakob nell'uomo - sia uguale o inferiore se il substrato non comprende proteine ricavate da deiezioni umane o di ruminanti... Il rischio ambientale derivante dall'allevamento di insetti si prevede paragonabile a quello da altri sistemi di produzione animale...".

L'allevamento degli insetti offrirebbe dei vantaggi rispetto ai tradizionali allevamenti, in quanto richiede meno territorio e meno cibo rispetto a quello necessario per allevare bovini, ovini, suini, che tra l'altro emettono un quantitativo considerevole di gas ad effetto serra. In Europa, ci sono tuttavia limitazioni all'uso di insetti come fonte alternativa di proteine nel mangime animale, il cui uso è

infatti consentito solo nei mangimi destinati a pesci, crostacei e molluschi. Tra le specie di insetti con maggior potenziale d'uso come alimento o mangime si potrebbero includere mosche, larve della farina, grilli e bachi da seta.

Forse più che la sicurezza, nei paesi occidentali quella da superare sarebbe la sensazione di disgusto che molti di noi provano all'idea di mangiare un insetto. Certamente questo tipo di alimento non è molto gradito e gli insetti vengono visti più come parassiti che come fonte di nutrimento. L'entomofagia non è in realtà una novità, nel senso che ci sono popolazioni che si cibano da sempre di insetti, tra cui cavallette, locuste, formiche. La pratica di mangiare insetti risale a migliaia di anni fa ed è stata documentata in quasi ogni parte del mondo. Si stima che siano più di 1900 le specie di insetti mangiate nel mondo. Nei tempi moderni, tuttavia, il consumo di insetti è diminuito in molte società ed è a volte ridicolizzato come primitivo e nocivo per la salute. Anche in Italia ritroviamo qualche esempio, si pensi al formaggio con i vermi sardo o casu fràzigu, che contiene le larve della mosca del formaggio e la cui produzione è consentita in quanto inserito all'interno dei Prodotti agroalimentari tradizionali italiani del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Per ulteriori informazioni sul consumo di insetti si consiglia la lettura del documento FAO "Forest insects as food: humans bite back" ([www.fao.org/docrep/012/i1380e/i1380e00.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i1380e/i1380e00.pdf)).

Ma veniamo ai possibili rischi ipotizzati.

**Rischio biologico.** Gli studi pubblicati sulla presenza di agenti patogeni per gli uomini o gli animali negli insetti o nei prodotti da essi derivati sono molto limitati. Si ritiene che il substrato utilizzato e l'ambiente possano influenzare fortemente il microbiota degli insetti, e quindi la presenza di un rischio biologico dipende dalla natura del substrato utilizzato e dalle condizioni igieniche in cui gli insetti vengono fatti crescere.

**Rischio chimico.** I metodi di produzione, il substrato utilizzato, la fase di raccolta e la specie possono influenzare il potenziale accumulo di sostanze chimiche tossiche. Nel rischio chimico viene incluso anche

il potenziale allergenico. Mentre è noto che gli insetti possono causare reazioni allergiche come eczema, rinite, congiuntivite, angioedema ed asma bronchiale, non ci sono evidenze riportate in letteratura di reazioni allergiche causate dal consumo di mangimi contenenti insetti o dal consumo diretto di insetti nell'uomo. Le reazioni allergiche più familiari per gli insetti sono quelle causate da punture di insetti, per esempio per le api o vespe. Altre reazioni allergiche sono causate da inalazione (ad esempio, la polvere con le feci di scarafaggio) o da contatto (ad esempio peli del bruco) e si verificano soprattutto tra le persone che entrano regolarmente in contatto con gli insetti (es. entomologi, allevatori di pesce, ecc.). Come per ogni nuovo prodotto alimentare destinato al consumo umano, il potenziale di elicitazione di reazioni allergiche deve essere valutato e non può essere escluso a priori. L'insetto utilizzato e il suo stadio di sviluppo sono ovviamente importanti nel determinare il rischio di reazioni allergiche. La valutazione di questo rischio potrebbe rispecchiare in parte quanto viene fatto per gli organismi geneticamente modificati. Nel caso di proteine allergeniche, o di reazione incrociata con allergeni noti come tropomiosina o arginina chinasi dei crostacei o acari, una misura preventiva potrebbe essere quella di indicare la presenza di proteine allergeniche sull'etichetta del prodotto.

Uno dei problemi nella valutazione dei possibili effetti sulla salute legata al consumo di insetti è la mancanza di raccolte sistematiche di dati. Il documento EFSA conclude raccomandando ulteriori ricerche per una migliore valutazione dei rischi microbiologici e chimici associati all'uso degli insetti come cibo destinato ad uso umano o animale, nonché studi mirati alla valutazione della presenza di pericoli associati all'utilizzo di particolari substrati, quali rifiuti alimentari e letame.

## **Micotossine e micotossicosi: un problema di salute pubblica?**

**Chiara Dall'Asta**

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti,  
Università degli Studi di Parma*

Le micotossine sono metaboliti secondari tossici, prodotti da funghi filamentosi che infettano le colture in campo in particolari condizioni ambientali. Ad oggi si conoscono più di 400 micotossine, con strutture chimiche differenti e caratterizzate da effetti tossici molto diversi (Tabella 1); tra queste, solo un numero ristretto si ritrova con frequenza e concentrazioni significative negli alimenti, ed è pertanto sottoposto a regolamentazione. La rilevanza di questi composti in termini di salute pubblica è legata alla loro presenza pressoché ubiquitaria in moltissime derrate alimentari, specialmente cerealicole, a livello mondiale. I recenti fenomeni di cambiamento climatico e, conseguentemente, agronomico hanno reso ancora più intenso il problema, consentendo la diffusione e la presenza di funghi patogeni in aree geografiche e in colture fino a pochi decenni fa meno interessati dalla problematica.

Le micotossine sono generalmente estremamente termostabili, pertanto non vengono distrutte dalle normali operazioni di cottura, né dai diversi trattamenti a cui vengono sottoposte le derrate durante i processi di preparazione degli alimenti. Inoltre, non vi è una correlazione diretta tra crescita fungina e accumulo di micotossina: prodotti apparentemente poco ammuffiti possono di fatto contenere quantità anche molto elevate di micotossine.

L'accumulo in campo è influenzato ampiamente dalle condizioni climatiche e geografiche, dalle pratiche di coltivazione e di conservazione e dal tipo di substrato interessato, in quanto alcuni prodotti sono più suscettibili rispetto ad altri alla crescita fungina. È fondamentale ricordare che ogni specie tossinogenica può produrre più micotossine e che la stessa micotossina può essere prodotta da più specie fungine. Conseguentemente, è molto frequente la co-contaminazione delle derrate alimentari



e, ancor più, dei prodotti finiti: il potenziale effetto sinergico di micotossine, anche molto diverse, è un problema attualmente molto sentito e ancora poco studiato.

Le micotossine si sviluppano sia sulle colture in fase di pre-raccolto (contaminazione da campo) che in fase di post-raccolta durante i processi di conservazione (in magazzini, silos...), trasformazione e trasporto. Gli alimenti più esposti alla contaminazione diretta sono soprattutto i cereali, i semi oleaginosi, la frutta secca ed essiccata, i legumi, le spezie, il caffè e il cacao. Inoltre, le micotossine possono essere ritrovate come residui o in forma di metaboliti tossici nei prodotti alimentari che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati (contaminazione indiretta).

Nonostante l'associazione tra ingestione di cereali ammuffiti e comparsa di fenomeni tossici sia stata largamente descritta nel tempo, il duplice ruolo sanitario ed economico giocato dalle micotossine fu messo in luce solo a partire dal 1960, anno in cui in Inghilterra si ebbe la comparsa della Turkey-X disease, che provocò la rapida perdita di numerosi capi avicoli. Tale sindrome fu infatti causata da una partita di farina di arachidi contaminata da una tossina prodotta da *Aspergillus flavus*, in seguito isolata e identificata come aflatossina B1.

La presenza di micotossine, e in particolare di aflatossine, è causa di fenomeni di tossicità cronica, come spesso descritto, ma anche di gravi intossicazioni acute. L'outbreak di aflatossicosi forse più intenso registrato negli ultimi anni è avvenuto in Kenya tra il gennaio e il giugno 2004, quando vennero registrati 317 casi di intossicazione caratterizzata da insufficienza epatica acuta di cui 125 mortali, in seguito a consumo di mais fortemente contaminato da aflatossine. Tali casi di intossicazione acuta trovano una spiegazione nelle condizioni agronomiche, alimentari e igienico-sanitarie in essere nelle fasce tropicali dove le caratteristiche del clima, le condizioni di stoccaggio dei cereali e la pressoché totale assenza di refrigerazione facilitano la crescita delle muffe produttrici. Nonostante in Europa la copertura legislativa e le misure di controllo e gestione messe in

atto siano tali da garantire la sicurezza del consumatore nei confronti della presenza da micotossine, l'emergenza legata ai cambiamenti climatici e l'insufficienza di dati tossicologici soprattutto relativi a composti di recente scoperta pone nuove sfide nella valutazione del rischio e nell'emanazione di nuovi regolamenti.

In particolare, la normativa vigente in Unione Europea regola i livelli massimi di micotossine negli alimenti mediante il regolamento (CE) n. 1881/2006 e successive modifiche. Le disposizioni relative ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale delle concentrazioni di micotossine sono state introdotte con il regolamento (CE) n. 401/2006. Dal punto di vista della salute animale, la direttiva 2002/32/CE stabilisce i livelli massimi di contaminanti, comprese le micotossine, consentiti nei mangimi.

### Aflatossine

Le aflatossine, le prime micotossine ad essere studiate in modo sistematico, sono essenzialmente delle epatotossine dotate di attività mutagena, cancerogena (classificate come Gruppo I dalla IARC) e probabilmente teratogena. Esse sono prodotte da alcuni ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* sia per infezione fungina in campo che durante lo stoccaggio. Le derrate alimentari più suscettibili sono quelle amidacee come i cereali, oppure proteico-lipidiche come semi oleosi e frutta a guscio.

Le aflatossine sono assorbite nel tratto gastrointestinale dove vengono attivate metabolicamente o detossificate nella mucosa intestinale e nel fegato. La biotrasformazione della aflatossina B1 (AFB1) varia molto da specie a specie ed è largamente influenzata da fattori endogeni ed esogeni. Tale biotrasformazione avviene attraverso processi di epossidazione, ossidrilazione, O-demetilazione, coniugazione e processi non enzimatici. In particolare, l'AFB1 subisce un'ossidazione dipendente dal citocromo P-450 che porta sia a vari metaboliti ossidrilati, sia all'8,9-epossido, elettrofilo instabile e altamente reattivo dal punto di vista biologico, che forma addotti covalenti con DNA (soprattutto AFB-N7-guanina), RNA e proteine. Mentre la formazione di

addotti con il DNA è responsabile dell'attività cancerogena, la reazione tra l'epossido e le proteine potrebbe essere responsabile della tossicità acuta di questa tossina. Attualmente gli studi tossicologici e clinici stanno valutando la possibile correlazione fra esposizione ad aflatossine e infezione cronica da HBV: numerose evidenze indicano come l'aflatossicosi acuta accompagnata da infezione cronica da HBV sarebbe la leva di conversione del danno epatico dovuto ad HBV in carcinoma epatocellulare.

### Ocratossina A

L'ocratossina A è prodotta su matrici proteico-amidacee come cereali, cacao e caffè da *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viridicatum*, su matrici proteico-lipidiche come superfici di formaggio e salumi da *Penicillium nordicum*. È inoltre prodotta in campo sull'uva infetta da *A. niger*.

L'ocratossina A è un agente cancerogeno e nefrotossico, che esplica la sua azione attraverso una biotrasformazione citocromo P450-dipendente. La permanenza nell'organismo dell'ocratossina A è molto lunga se comparata ad altre micotossine, in virtù dell'elevata affinità con la frazione albuminica delle proteine plasmatiche. A livello cellulare inibisce il trasporto intramitochondriale del fosfato e la sintesi proteica a livello della translazione mediante il blocco della fenilalanina RNA sintetasi.

### Fumonisine

Le fumonisine sono un gruppo di sostanze strutturalmente correlate prodotte principalmente da *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*, sebbene anche altre specie ne siano potenzialmente produttrici. A differenza delle altre micotossine, le fumonisine sembrano essere prodotte esclusivamente su mais, motivo per cui i livelli massimi ammessi sono un ordine di grandezza superiori a quelli stabiliti per altre micotossine.

La potente azione inibente delle fumonisine sulla sintesi degli sfingolipidi sembra essere alla base degli effetti tossici associati e della loro attività cancerogena, per perdita da parte della sfingosina della funzione di agente antitumorale endogeno.

Nonostante le fumonisine siano ad oggi ancora classificati come cancerogeni di Gruppo III, numerose evidenze sono state raccolte anche per l'uomo, in particolare relativamente all'insorgenza di tumore esofageo in certe zone del Sud-Africa, della Cina e anche del Nord-Est d'Italia.

### Zearalenone

Lo zearalenone è prodotto da *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *F. equiseti*, che infettano i cereali in campo.

Nonostante alcuni dati recenti indichino una possibile cancerogenicità epatica e ipofisaria, la principale attività biologica dello zearalenone rimane la xenoestrogenicità.

Studi epidemiologici condotti in aree geografiche anche molto lontane mostrano come l'esposizione a zearalenone nell'uomo, soprattutto in età precoce, possa portare a fenomeni prepuberali intensi. In questo contesto, di grande rilevanza è anche la possibile presenza di forme derivate dello zearalenone in carni bovine utilizzate per la produzione di omogeneizzati e baby-food.

### Deossinivalenolo

Il deossinivalenolo, appartenente al gruppo dei tricoteceni di tipo B, è prodotto da *F. graminearum* e *F. culmorum* prevalentemente sulle colture cerealicole in campo.

Tale composto è considerato il principale contaminante del frumento tenero e duro e dell'orzo, nei quali svolge anche il ruolo di importante fattore di virulenza per lo sviluppo di patologie di campo (es. fusariosi della spiga).

Dal punto di vista tossicologico, il deossinivalenolo esplica i propri effetti prevalentemente a livello del tratto gastrointestinale. La letteratura riporta principalmente studi effettuati su suino, considerata la specie più sensibile rispetto a questa micotossina. Il potente effetto immunosoppressore sembra legato alla capacità del deossinivalenolo di deprimere l'attività fagica dei neutrofili, favorendo così l'instaurarsi di stati infiammatori. Inoltre, numerosi studi evidenziano l'azione neuroendocrina del deossinivalenolo, che si evidenzia in un serio rifiuto del cibo dose-dipendente.

## Conclusioni

Lo scenario attuale in Europa e in Italia relativo all'esposizione del consumatore a micotossine è rassicurante, grazie alla messa in essere di pratiche efficaci di gestione in campo e di piani di controllo mirati lungo tutta la filiera produttiva. Nonostante questo, i cambiamenti climatici in atto comportano un conseguente cambiamento di incidenza della contaminazione nelle colture di campo, con conseguente necessità di implementare le attività di gestione e di controllo. Inoltre, nell'ottica di "food security" e di conseguente limitazione degli scarti agroalimentari, diventa urgente lo sviluppo di tecniche di prevenzione atte a diminuire la quantità di raccolti non conformi e di contenere il relativo danno economico.

Diversa è la sfida che la comunità scientifica dovrà affrontare dal punto di vista della salute pubblica. Il mercato globale e l'ampia diffusione di nuovi regimi dietetici rendono infatti inadatto il metodo di valutazione del rischio basato sull'incrocio dei dati di contaminazione medi con i dati di consumo alimentare europei. Gruppi di popolazione caratterizzati da diete peculiari per ragioni mediche (es. soggetti celiaci in regime dietetico gluten-free), socio-culturali (es. vegetariani, vegani) o di età (es. bambini in età prescolare) potrebbero infatti essere diversamente esposti rispetto

alla popolazione adulta normo-dieta. Inoltre, alcuni studi preliminari indicano come l'esposizione cronica a dosi anche molto basse di alcune micotossine (es. deossinivalenolo, zearalenone) possa favorire l'insorgenza di patologie o disturbi fisiologici non direttamente e facilmente collegabili alla micotossina stessa, soprattutto a carico dell'apparato gastrointestinale e riproduttivo. Queste osservazioni, così come la recente scoperta di nuovi composti non ancora regolamentati, e i dati relativi alla co-presenza di numerose micotossine a basse concentrazioni negli alimenti stanno muovendo la comunità scientifica e il regolatore verso un nuovo e più accurato risk assessment, basato sul biomonitoraggio dell'individuo per verificare le relazioni fra esposizione, livello di biomarkers e rischio per la salute associato. Nonostante questo sia già stato in parte fatto per le aflatossine, la limitata disponibilità di biomarkers affidabili e l'insufficiente conoscenza dei meccanismi molecolari di tossicità comportano grandi sforzi scientifici per poter estendere questo approccio anche alle altre principali micotossine.

È quindi urgente che gli sforzi della comunità scientifica internazionale siano direzionati verso una più completa comprensione degli aspetti tossicologici e biologici legati all'esposizione a micotossine e tesi all'individuazione di biomarkers robusti.

**Tabella 1** - Principali micotossine, funghi produttori ed effetto tossico correlato.

Micotossine	Funghi produttori	Effetto tossico
Aflatossine	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> ,	Cancerogenicità, epatotossicità anche acuta, immunosoppressione
Fumonisine	<i>Fusarium verticillioides</i> (syn. <i>moniliforme</i> ), <i>F. proliferatum</i>	Possibile cancerogenicità, epatotossicità, alterazione del metabolismo sfingolipidico
Ocratossina A	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cancerogenicità, nefrotossicità, epatotossicità, teratogenicità
Deossinivalenolo	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Attività emorragica intestinale, attività immunosoppressiva
Zearalenone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>	Attività xenoestrogenica



COSMETICA ITALIA  
associazione nazionale imprese cosmetiche

## CORSO TEORICO-PRATICO DI VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA DEI COSMETICI

alla luce del regolamento 1223/2009

Responsabili Scientifici:

Corrado L. Galli, Marina Marinovich



**lunedì 8 febbraio - venerdì 12 febbraio 2016**

**Università degli Studi di Milano  
MILANO**

Seguici su Facebook  e Twitter 

**SITOX Informa** è scaricabile on line.  
Visita il nostro sito [www.sitox.org](http://www.sitox.org)

**SITOX INFORMA** - Periodico della Società Italiana di Tossicologia Fondata nel 1967

Riconosciuta con DPR 16/05/1972, n. 376 - C.F.: 96330980580

Iscritta Registro Persone Giuridiche Prefettura di Milano n. 3512 pag. 606 vol. II

Anno XVIII n. 2 - Dicembre 2015

Direttore Responsabile: Sarah Vecchio

Comitato Editoriale: Isabella Andreini, Emanuela Corsini, Elena De Felip, Ivano Eberini, Marco Pivato, Aurelia Tubaro

Segreteria Editoriale: Ida Ceserani

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente: Patrizia Hrelia

Presidente Eletto: Corrado Lodovico Galli

Consiglieri: Isabella Andreini, Orazio Cantoni, Angelo Moretto, Michele Navarra, Sarah Vecchio

Segretario: Francesca Maffei

Past President: Carlo Alessandro Locatelli

Sede Legale: Viale Abruzzi, 32 - 20131 Milano

Sede Operativa: Via Giovanni Pascoli, 3 - 20129 Milano - Tel 02 29520311 - Fax 02 700590939 - E-mail: [sitox@comm2000.it](mailto:sitox@comm2000.it) - Sito Internet: <http://www.sitox.org>

Impaginazione e stampa: RB stampa e grafica - Torino

SITOX Informa - Registrazione del Tribunale di Milano, N. 332 del 31.05.97