

Linee guida

**Gestione del rischio associato
alle fioriture di *Ostreopsis ovata*
nelle coste italiane**

Il documento è stato elaborato da:

Di Girolamo Irene (Ministero dell' Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare)

Fattorusso Ernesto (Università di Napoli Federico II)

Funari Enzo (Istituto Superiore di Sanità)

Grillo Claudio (ARPA Liguria)

Gramaccioni Liana (Ministero della Salute)

Icardi Giancarlo (Università degli studi di Genova)

Mattei Daniela (Istituto Superiore di Sanità)

Poletti Roberto (Centro Ricerche Marine di Cesenatico)

Scardala Simona (Istituto Superiore di Sanità)

Testai Emanuela (Istituto Superiore di Sanità)

INDICE

Linee guida	1
Gestione del rischio associato alle fioriture di <i>Ostreopsis ovata</i> nelle coste italiane 1	
INDICE.....	4
Introduzione.....	5
Attività di monitoraggio.....	7
Presenza di <i>ostreopsis ovata</i> in italia	7
Effetti osservati sulla salute umana	9
Effetti su organismi acquatici.....	12
Caratteristiche chimiche e tossicologiche della palitossina.....	13
Impatto sulle attività economiche: pesca e turismo.....	15
Carenze conoscitive e spunti per la ricerca	16
Linee guida per la sorveglianza di <i>O.ovata</i>	18
Piano di Sorveglianza	20
Strutture di coordinamento	20
Fasi del Piano	21
Allegato 1	29
Allegato 2	32
Allegato 3	33
Allegato 4	34
Allegato 5	35
Bibliografia.....	37

INTRODUZIONE

La proliferazione di microalghe in acque costiere fino al raggiungimento di densità molto elevate (superiori a decine di milioni di cellule per litro) è nota da molto tempo ed è stata descritta riferendosi alla colorazione assunta dalle acque stesse, dovuta al pigmento dominante nella microalga. E' possibile pertanto che l'acqua assuma colorazioni diverse (rossa, rosa, verde, bruna, ecc.). Tale fenomeno sembra essersi intensificato negli ultimi decenni, sia per la maggiore frequenza temporale, sia per la maggiore diffusione geografica, non più limitata alle zone tropicali (Anderson, 1989; Smayda, 1989; Hallagraeff, 1993, 1995). L'aumento del fenomeno è probabilmente legato ad una maggiore pressione antropica: infatti, la proliferazione si verifica prevalentemente nelle zone costiere, dove è maggiore l'apporto di nutrienti (sali di fosforo e azoto, silicati, vitamine). Inoltre, vari Paesi industrializzati hanno dedicato al problema un'attenzione maggiore, attraverso monitoraggi e controlli sistematici per verificare lo stato di salute dell'ambiente marino-costiero.

La proliferazione delle microalghe marine, condizionata anche dalle caratteristiche chimico-fisiche e idrodinamiche del corpo idrico, dalla temperatura e dalla luce, può indurre alterazioni ambientali con danni anche gravi all'ecosistema. Inoltre, le condizioni ipossiche e lo sviluppo di idrogeno solforato e ammoniaca, che spesso accompagnano la necrosi delle cellule a fine fioritura, possono essere responsabili di morie di fauna marina (pesci, molluschi bivalvi e crostacei). Dal punto di vista sanitario la rilevanza del fenomeno risiede nella capacità di alcune microalghe di produrre tossine (ad esempio, PSP, DSP, NSP, ASP), che possono accumularsi in molluschi e altri prodotti ittici abitualmente consumati dall'uomo. Il potenziale rischio per la salute umana associato alla presenza nella dieta di prodotti ittici contaminati merita una attenta valutazione da parte delle autorità sanitarie.

Per quanto riguarda l'uso ricreativo delle acque marine, sono stati riportati disturbi respiratori dovuti ad inalazione di aerosol contenente frammenti di cellule di alghe marine e/o tossine: l'esempio più studiato è quello delle 'red tides' nel Golfo del Messico, associate alla proliferazione di *Karenia brevis*, produttrice di brevetossine.

Sono stati riportati episodi analoghi in alcuni tratti del litorale italiano attribuiti a fioriture di *Ostreopsis ovata*. Sono stati segnalati inoltre casi di dermatiti, anche severe, in bagnanti che avevano nuotato in acque interessate da fioriture di cianobatteri marini. Non sono invece disponibili evidenze di patologie sistemiche associate all'ingestione involontaria di acque interessate dalla presenza di alghe tossiche marine.

L'intensificazione del fenomeno e il risvolto sanitario hanno indotto anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ad occuparsi della problematica nell'ambito delle *Guidelines for safe recreational water environments* del 2003, nelle quali vengono presi in considerazione gli agenti che potrebbero avere un ruolo nella trasmissione di patologie all'uomo. Secondo l'OMS i dati disponibili suggeriscono che il rischio per la salute umana associato alla presenza di alghe tossiche marine durante attività ricreative è limitato a poche specie ed aree geografiche. Ha ritenuto pertanto inappropriato raccomandare valori guida di carattere generale, suggerendo piuttosto di condurre adeguati piani di monitoraggio, programmi di sorveglianza nelle aree potenzialmente interessate, attività di valutazione e gestione del rischio, compresa la comunicazione ai cittadini.

Le *Guidelines for safe recreational water environments* dell'OMS rappresentano la base scientifica sulla quale è stata elaborata la nuova Direttiva Europea (2006/7/CE del 15 febbraio 2006), relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. Tale direttiva individua soltanto due parametri microbiologici, *Escherichia coli* ed enterococchi intestinali, per la classificazione della qualità delle acque di balneazione, non includendo dunque le alghe tossiche marine. Tuttavia, non trascura tale parametro, al quale dedica l'articolo 9, che recita “*Qualora il profilo delle acque di balneazione mostri una tendenza alla proliferazione di macroalghe e/o fitoplancton marino, vengono svolte indagini per determinare il grado di accettabilità e i rischi per la salute e vengono adottate misure di gestione adeguate, che includono l'informazione al pubblico*”.

La presenza di microalghe planctoniche d'interesse sanitario nell'ambiente marino costiero è soggetta ad attività di sorveglianza attraverso appositi piani di monitoraggio.

Scarsa attenzione è stata finora riservata invece al problema delle microalghe bentoniche.

Negli ultimi 10 anni episodi di fioriture algali causate da specie potenzialmente tossiche (*Coolia monotis*, *Fibrocapsa japonica*, *Prorocentrum lima*, *P. emarginatum*, *Amphidinium* sp., *Dinophysis* sp., ecc.) sono state segnalate ripetutamente lungo le coste italiane. Tuttavia ad una specie in particolare sono stati associati i casi più gravi di contaminazione delle acque marine per i risvolti sanitari osservati: l'alga bentonica *Ostreopsis ovata*.

ATTIVITA' DI MONITORAGGIO

Nel nostro Paese vengono svolte diverse attività di monitoraggio per il riconoscimento di specie microalgali:

- il monitoraggio messo in atto dal Ministero della Salute attraverso le Regioni, in adempimento del Regolamento CE 853/2004 nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi;
- i piani di sorveglianza algali in riferimento all'attività di balneazione (DL 13 aprile 1993 n. 109, convertito con modificazioni nella Legge 12 giugno 1993 n. 185).
- i programmi di monitoraggio dell'ambiente marino-costiero svolti dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, in adempimento alla L.979/82, nell'ambito dei quali viene effettuato il rilevamento quali-quantitativo delle microalghe pelagiche.

In tutte queste attività non viene esplicitamente richiesta la sorveglianza delle microalghe bentoniche come *Ostreopsis* spp, *Prorocentrum lima*, *Coolia monotis*.

PRESENZA DI *OSTREOPSIS OVATA* IN ITALIA

In anni recenti in diversi tratti della costa italiana sono state segnalate fioriture di alcune specie di microalghe bentoniche.

Particolarmente importanti risultano le fioriture di *Ostreopsis* (Fig. 1) (Poletti e Pompei, 2005; Grillo e Melchiorre, 2005; Casotti, 2005; Ungaro, 2005), identificata con analisi molecolare come *O.ovata* (Penna et al., 2005).



Fig.1 – Regioni in cui è stata segnalata *Ostreopsis* spp.:

- 2005: Liguria-Toscana-Lazio-Campania-Calabria-Puglia-Molise-Sicilia-Sardegna
- 2006: Abruzzo-Marche-Friuli Venezia Giulia

O. ovata è una microalga appartenente al genere *Ostreopsis*, ordine Gonyaulacales, classe Dinoficeae distribuita essenzialmente nella zona tropicale e sub tropicale che predilige gli ambienti dove sono presenti macroalge brune e/o rosse. *O. ovata* ma anche *O. siamensis*, *O. lenticularis*, *O. heptagona*, *O. mascarenensis*, *O. labens* risultano potenzialmente tossiche, sulla base dei risultati di test biologici (test di tossicità acuta su topo, di citotossità e di emolisi).

Le fioriture si sono verificate tra Luglio ed Agosto ed hanno interessato tratti in prossimità della costa o zone protette. Sansoni e coll. (2002) hanno osservato che fioriture algali di *O. ovata*, verificatesi nelle stagioni estive degli anni 1998, 2000 e 2001 sul litorale apuano (Toscana nord-occidentale), hanno avuto la loro intensità massima in un tratto di costa nel quale opere di difesa dall'erosione circoscrivevano uno specchio marino a debole ricambio idrico, dove le acque raggiungevano temperature molto elevate. Grillo e Melchiorre (2005) hanno descritto le caratteristiche geomorfologiche dei due siti dove sono avvenuti i fenomeni di intossicazione umana

per aerosol attribuiti ad *O. ovata* in fioritura a Genova, nell'estate del 2005. Il primo è un tratto di spiaggia caratterizzato da una baia chiusa con substrato roccioso-ciottoloso, ai piedi di una falesia; l'altro è un tratto di costa alla presenza di pennelli e barriere artificiali per il contenimento dell'erosione marina: in entrambi i siti il dinamismo dell'acqua è scarso. Nei due casi la fioritura algale si manifestava in superficie con aggregati di tipo "foaming" di colore marrone chiaro con dimensioni fino ad alcuni metri quadrati. Le stesse microalghe ricoprivano con una pellicola dello stesso colore gli strati rocciosi e le macroalghe. Il massimo accrescimento della microalga era favorito da condizioni meteo-marine stabili, moto ondoso estremamente ridotto, un elevato irraggiamento solare che portava l'acqua a temperature di 25-26 °C.

Le caratteristiche che sembrano favorire la fioritura in Toscana e Liguria non sono tuttavia generalizzabili, non essendo comuni agli altri siti per i quali è stata descritta la presenza di alte densità di *O.ovata*.

Le fioriture bentoniche nelle coste italiane comprendono almeno altre due specie potenzialmente tossiche: *Prorocentrum lima*, che produce acido okadaico e *Coolia monotis*, che produce tossine non ancora caratterizzate.

Situazioni simili legate a fioriture di *O.ovata* sono state segnalate in altre zone del Mediterraneo: in Spagna nella costa Catalana, Andalusia e nelle isole Baleari (Masò et al., 2005), in Grecia (Aligizaki et al., 2005) e più recentemente, nell'estate 2006, in Francia sulla costa mediterranea (Krys, comunicazione personale).

EFFETTI OSSERVATI SULLA SALUTE UMANA

Dal punto di vista sanitario, nonostante la sua diffusa presenza sulle coste di diverse Regioni italiane, soltanto in alcune aree, peraltro assai limitate (Genova levante, provincia di La Spezia, litorale apuano a levante del porto di Marina di Carrara, provincia di Latina, Palermo-Bagheria e Mola di Bari) sono stati segnalati casi di disturbi alle prime vie respiratorie e talvolta stati febbrili nei bagnanti che stazionavano sulla spiaggia (Fig. 2) (Sansoni et al., 2003; Gallitelli et al., 2004; Gallitelli et al., 2005; Poletti e Pompei, 2005).

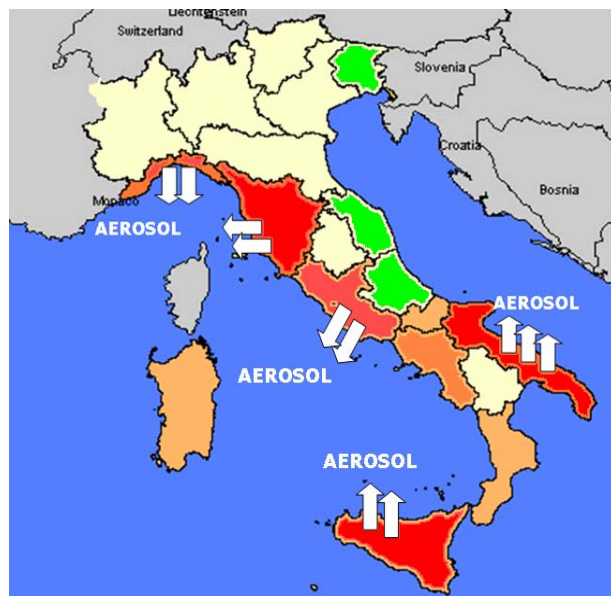


Fig. 2 . ■ Regioni in cui sono stati segnalati disturbi respiratori nelle persone.

Il caso più eclatante si è verificato nell'estate del 2005 a Genova, quando 240 persone che avevano soggiornato in riva al mare o in zone adiacenti senza immergersi in acqua sono ricorse alle cure ospedaliere perché accusavano sintomi quali: febbre, faringodinia, tosse, dispnea, cefalea, nausea, rinorrea, congiuntivite, vomito e dermatite (Tab. 1) (Icardi e Marensi, 2005). Le fioriture di *O. ovata*, osservate in quei giorni nel tratto di costa interessato, furono ritenute il possibile agente causale.

Tab. 1- Caso di Genova 2005 aspetti epidemiologici su 225 pazienti (Icardi e Marensi., 2005).

<u>Pazienti % sintomi</u>	<u>Frequenza dei quadri clinici</u>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Febbre 64 % ▪ Faringodinia 50 % ▪ Tosse 40 % ▪ Dispnea 39 % ▪ Cefalea 32 % ▪ Nausea 24 % ▪ Rinorrea 21 % ▪ Congiuntivite 16 % ▪ Vomito 10 % ▪ Dermatite 5 % 	<p><i>109 Casi con 3 sintomi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Febbre con tosse e faringodinia 36 % ▪ Febbre con tosse e dispnea 34 % ▪ Tosse con faringodinia e dispnea 28 % <p><i>69 Casi con 4 sintomi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Febbre con tosse, faringodinia e dispnea 36 % ▪ Febbre con tosse, faringodinia e rinorrea 25 % ▪ Febbre con tosse dispnea e rinorrea 23 %

E' stato ipotizzato che i sintomi segnalati nell'episodio di Genova potessero essere associati all'inalazione di frammenti di cellule di *O. ovata* o di tossine eventualmente

prodotte dall'alga presenti nell'aerosol marino. Al momento attuale non è ancora stato possibile stabilire una chiara relazione causa-effetto. Tuttavia l'analisi chimica in LC-MS/MS di *O. ovata* raccolta sul campo ha mostrato la presenza di palitossine (Ciminiello et al., 2006).

Non è facile stimare in modo attendibile il numero delle persone che hanno subito effetti a seguito dell'esposizione presunta a *O. ovata* lungo le coste italiane. Si può ragionevolmente ipotizzare che questo numero sia intorno a diverse centinaia di persone.

Episodi simili di disturbi respiratori si verificano in Florida (Stati Uniti) e sono attribuiti ad esposizione per via inalatoria in aree interessate da fioriture della microalga *Karenia brevis*, produttrice di brevetossine. Tuttavia, a differenza di *O. ovata*, *K. brevis* è un'alga planctonica e le brevetossine sono strutturalmente molto diverse dalle palitossine.

Nelle zone interessate dal fenomeno delle fioriture di *K. brevis*, l'identificazione dell'associazione tra esposizione ad aerosol e disturbi respiratori è stata condotta attraverso apposite indagini che hanno previsto campionamenti di controllo anche nelle zone adiacenti. Da questi studi è infatti risultato che solo nei campioni ambientali di aerosol marino prelevati nelle zone interessate da fioriture e non di altre zone limitrofe è stata dimostrata la presenza di brevetossine (Cheng et al, 2005), oltre a detriti cellulari e batteri con diametro medio delle particelle inalate (MMAD) tale da permettere il deposito nelle vie aeree superiori e quindi compatibile con un possibile quadro irritativo delle mucose delle vie respiratorie. Solo i soggetti che avevano stazionato nelle zone della fioritura presentavano effetti respiratori, con maggiore frequenza ed intensità negli individui affetti da patologie respiratorie preesistenti (es: gli asmatici) (Fleming et al, 2005); ne erano immuni soggetti esposti ad aerosol in zone adiacenti non interessate dalla proliferazione della *K. brevis* (Pierce et al., 2003).

La capacità di produrre irritazione alle vie respiratorie è stata confermata sperimentalmente in studi su ratti trattati con brevetossine per inalazione; i risultati

indicano che i fenomeni irritativi delle vie respiratorie sono leggeri, ma che il sistema immunitario è un possibile bersaglio di tossicità sistemica (Benson et al, 2005).

Non sono stati finora osservati effetti associati all'altra possibile fonte di esposizione per la popolazione, che potrebbe essere rappresentata dall'ingestione di prodotti ittici contaminati dalla tossina o da più tossine prodotte da *O. ovata*. Questo problema, tuttavia, non è stato ancora preso sufficientemente in considerazione. In altre aree geografiche sono stati riportati invece effetti anche gravi dovuti ad ingestione di palitossine, come descritto di seguito.

EFFETTI SU ORGANISMI ACQUATICI

Dal punto di vista ambientale, fioriture di *O.ovata* sono state talvolta associate a morie di organismi marini. In Puglia ad esempio, in concomitanza con fioriture di *O. ovata*, nel corso degli anni sono stati ritrovati numerosi animali agonizzanti o morti: si è trattato prevalentemente di saraghi sparaglioni (*Diplodus annularis*), seppie (*Sepia officinalis*) e ricci eduli (*Paracentrotus lividus*). Il tessuto muscolare dei saraghi osservato al microscopio, mostrava sia segni di arrossamento dovuti a fenomeni di congestione, sia la tendenza a staccarsi facilmente dalle strutture ossee. Nelle seppie, l'edema e l'imbibizione dei tessuti erano segni evidenti di fenomeni infiammatori. I ricci si presentavano con aculei abbassati e mancanti in alcune parti della teca (Casavola et al., 2005).

Le alterazioni patologiche più caratteristiche evidenziate dagli esami anatomico-istopatologici effettuati sulle seppie e sui saraghi erano invece alterazioni delle branchie con edema a livello delle lamelle, discontinuità dell'epitelio e accentuata permeabilità capillare; modificazione dell'epidermide e del derma; alterazione delle miofibrille del miocardio; alterazione della mucosa gastrica e intestinale; epatociti interessati da degenerazione vacuolare (Casavola et al., 2005).

Anche in Toscana negli ultimi anni sono stati osservati effetti negativi sulle cenosi bentoniche, in particolare a carico dei popolamenti dei piani mesolitorale e infralitorale. Nel piano mesolitorale, le popolazioni di *Patella* sp., *Monodonta turbinata*, *Actinia equina* apparivano ridotte e in alcuni siti scomparse. Si è inoltre osservata in individui di

Mitylus galloprovincialis di banchi naturali sia una spiccata moria sia l'allentamento del bisso. Estese morie hanno interessato anche banchi di denti di cane (Cirripedi balanidi). Nel piano infralitorale, numerosi ricci di mare (*Paracentrotus lividus*) sono stati rinvenuti morti, mentre molti individui sopravvissuti presentavano vari gradi di perdita degli aculei; le stelle di mare (*Coscinasterias tenuispina*) mostravano un'anomala postura delle braccia, rivolte verso il dorso, e vari gradi di perdita delle braccia stesse. Inoltre, sono stati ritrovati spiaggiati anche numerosi polpi (*Octopus vulgaris*) (Rustighi e Casotti, 2005).

CARATTERISTICHE CHIMICHE E TOSSICOLOGICHE DELLA PALITOSSINA

La palitossina è stata isolata per la prima volta nel 1971 alle Hawaii, dal celenterato marino *Palythoa toxica*, dal quale deriva il suo nome (Moore e Scheuer, 1971). Successivamente la palitossina e suoi analoghi strutturali furono isolati da altre specie di zoantidi del genere *Palythoa* e *Zoanthus*. I diversi analoghi hanno mostrato un peso molecolare compreso tra 2659 e 2680 Da (Tan e Lau, 2000). La molecola base della palitossina è costituita da una lunga catena alifatica parzialmente insatura contenente eteri ciclici, 64 centri chirali, 40-42 gruppi idrossilici e 2 gruppi ammidici (Moore et al., 1981) (Figura 3).

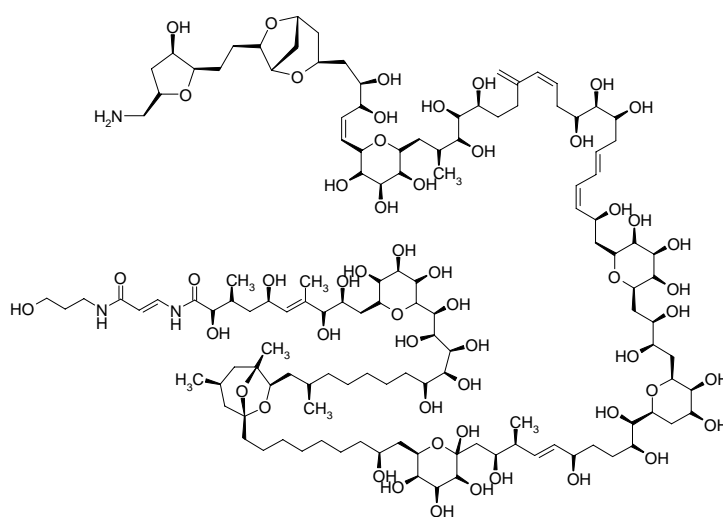


Fig. 3. Struttura chimica della palitossina

La palitossina è una delle più potenti e letali tossine marine non proteiche conosciute. La produzione della tossina e dei suoi analoghi è stata attribuita a *Ostreopsis* spp.. Tuttavia non può essere esclusa la sua sintesi anche da parte di altri organismi, compresi i batteri simbiotici.

Il meccanismo molecolare attraverso cui agisce sulle cellule di mammifero è un legame diretto con l'enzima di membrana $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$, che determina un aumento della permeabilità ionica; a concentrazioni maggiori agisce anche sulle pompe ioniche della membrana cellulare, con ingresso di Na^+ e Ca^{++} ed efflusso di K^+ e conseguente depolarizzazione (Habermann, 1989). Gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco. Gli effetti di depolarizzazione di membrana sono evidenti anche negli eritrociti e nelle cellule degli altri tessuti eccitabili (muscoli scheletrici e lisci e tessuto nervoso).

Per iniezione intraperitoneale al topo, la palitossina è molto tossica, con una LD_{50} di circa $0.75 \mu\text{g/Kg p.c.}$ (peso corporeo) (Rhodes et al., 2002); quando somministrata per via orale (gavaggio) è risultata 700 volte meno tossica con una $\text{LD}_{50} = 510 \mu\text{g/Kg p.c.}$ (Rhodes e Munday, 2004). In uno studio di tossicità sul ratto con diverse vie di somministrazione, è risultato che in seguito a iniezione endovenosa il valore di $\text{LD}_{50}=0.089 \mu\text{g/Kg p.c.}$ è il più basso, seguito da via intramuscolare ($\text{LD}_{50} =0.24 \mu\text{g/Kg p.c.}$), sottocutanea ($\text{LD}_{50} =0.4 \mu\text{g/Kg p.c.}$) e intragastrica ($\text{LD}_{50} > 40 \mu\text{g/Kg p.c.}$) (Wiles et al, 1974).

Le palitossine sono state implicate in alcune gravi intossicazioni per consumo di crostacei e pesci nei tessuti dei quali sono state frequentemente determinate. La palitossina e composti analoghi sono stati ritrovati in policheti (*Hermodice carunculata*), in una stella marina (*Acanthaster planci*) che si nutre d'invertebrati del genere *Palythoa* (Gleibs et al.,1995; Gleibs e Mebs, 1999), in mitili d'Almeria, in Spagna nel 2003 e in Grecia nel 2005 (VIII Meeting of EU-NRLs of Marine Biotoxins 26-28 October 2005, Cesenatico-Italy); in crostacei decapodi quali *Lophozozymus pictor* e in *Demania alcalai* (Yasumoto et al., 1986; Lau et al., 1993, 1995a, b, c). Per

quanto riguarda i pesci, palitossine sono state trovate in *Herklotsichthys quadrimaculatus*, una specie di sardina distribuita soprattutto in Madagascar (Yasumoto, 1998; Onuma et al., 1999), in *Decapterus macrosoma*, una specie di sgombro diffuso soprattutto nelle Filippine (Kodama et al., 1989), in un pesce pappagallo (*Scarus ovifrons*) nel Giappone (Noguchi et al., 1987; Taniyama et al., 2003) ed in pesci tetrodonti (Hashimoto et al., 1969; Taniyama et al., 2001).

La sintomatologia delle persone intossicate si manifesta con vomito, diarrea, dolori agli arti, spasmi muscolari e difficoltà respiratorie (Fusetani et al., 1985). Si è verificato un caso letale in Madagascar (1994) dovuto ad ingestione di pesce contaminato: la vittima dopo aver descritto un sapore metallico del cibo, accusava un malessere generale, vomito, diarrea, paralisi degli arti inferiori e delirio (Onuma et al., 1999).

IMPATTO SULLE ATTIVITÀ ECONOMICHE: PESCA E TURISMO

Non è facile valutare le conseguenze economiche causate dalle palitossine sul settore della pesca. Tuttavia la presenza nel Mediterraneo di questa tossina, che ha la capacità di accumulare nei prodotti ittici, impone una maggiore attenzione da parte di tutte le Autorità competenti nel controllo di questi prodotti. Tale controllo dovrebbe comprendere oltre ai molluschi bivalvi, anche crostacei e pesci, in particolare nei siti dove *O. ovata* si sviluppa.

Attualmente non sono disponibili dati scientifici che dimostrano la presenza delle palitossine nei prodotti ittici lungo le coste italiane. Tuttavia in mitili raccolti in aree interessate da fioriture di *O. ovata*, il test sul topo ha mostrato una positività non riconducibile alle tossine normalmente presenti nei nostri mari e regolamentate dai dispositivi normativi dell'Unione Europea.

Come sopra menzionato, nelle coste italiane sono state associate a fioriture di *O. ovata* estese morie di organismi bentonici con effetti negativi sulla biodiversità.

Nelle aree interessate dal fenomeno delle fioriture di *O.ovata*, dovrebbe essere posta maggiore attenzione nel pianificare le attività di sorveglianza. In determinate circostanze potrebbe essere necessario emettere ordinanze di limitazione o divieto di pesca

professionale. Le Autorità competenti dovrebbero, inoltre, promuovere le misure per evitare la raccolta e il consumo di questi prodotti a livello amatoriale.

L'industria turistica è per l'Italia una delle più importanti fonti di reddito e il turismo balneare è quello che coinvolge il maggior numero di persone. I tratti di mare dove si sono verificati episodi di fioriture di *O.ovata* sono molto frequentati dai turisti durante il periodo estivo; per questo motivo la preoccupazione da parte degli operatori turistici è notevole. I danni all'economia turistica non sono stati per ora esattamente quantificati, poiché non è noto se le presenze turistiche in queste zone di balneazione abbiano subito un calo. Quello che preoccupa maggiormente le Autorità competenti ed il settore dell'economia turistica è la possibilità che questi episodi diventino ricorrenti durante la stagione estiva.

Una esauriente e corretta informazione al pubblico sui rischi, le misure di prevenzione, ecc., dovrebbe consentire una maggiore fiducia da parte dei cittadini e dei turisti nell'operato delle Autorità competenti, riducendo quindi i danni anche per le attività turistiche.

CARENZE CONOSCITIVE E SPUNTI PER LA RICERCA

Molti aspetti ecologici e tossicologici associati alle fioriture di *O. ovata* non sono ancora sufficientemente conosciuti. Ad oggi infatti non è disponibile un quadro completo della distribuzione di *O. ovata* lungo la costa italiana e non sono sufficientemente note le caratteristiche ambientali che ne favoriscono la crescita e la produzione della tossina né l'ecologia. Non si conosce la catena di eventi che dovrebbero portare dalla formazione delle fioriture, al passaggio in superficie delle microalghe (dovuto a mareggiate o a decadimento della fioritura bentonica), fino alla formazione di aerosol contenente detriti cellulari e/o tossina successivamente trasportato verso la riva.

Non sono ancora sufficientemente caratterizzate sia la natura chimica delle tossine prodotte da *O. ovata* lungo le coste italiane, né la composizione dell'aerosol, una volta formato.

Non è noto se le tossine prodotte da *O. ovata* o da altri organismi ad essa associati in Italia accumulino lungo la rete trofica a livelli tali da rappresentare un rischio sanitario significativo.

La carenza di studi specifici disponibili e i limiti conoscitivi fanno sì che il quadro tossicologico associato al fenomeno delle fioriture di *O. ovata* lungo il litorale italiano non sia sufficientemente definito: non è ancora chiaro quale sia il reale agente eziologico dei disturbi respiratori e non se ne conosce la relazione dose-risposta. Inoltre, non è disponibile un quadro completo della reale situazione di esposizione della popolazione. In queste condizioni è quindi difficile condurre una adeguata valutazione del rischio connesso all'esposizione a fioriture di quest'alga.

L'acquisizione di dati dovrebbe prevedere un piano nazionale di ricerche multidisciplinari sia in campo, nei siti marini a maggior rischio, che in laboratorio, i cui possibili obiettivi potrebbero essere così sintetizzati :

- caratterizzazione chimica delle tossine prodotte da *O. ovata* e/o altri agenti causali presenti in diverse matrici ambientali e biologiche (biomassa algale, acqua, aerosol, organismi acquatici);
- caratterizzazione della tossicocinetica e del bioaccumulo delle tossine identificate in organismi acquatici eduli che vivono nelle aree interessate da fioriture di *O. ovata*;
- caratterizzazione del profilo tossicologico delle tossine prodotte da *O. ovata* e/o altri possibili organismi causali attraverso studi *in vitro* e di tipo meccanicistico;
- individuazione dei diversi fattori ambientali che regolano la crescita di *O. ovata* e la produzione di palitossina e/o eventuali altre tossine;
- ruolo giocato dalle macroalghe e da eventuali batteri simbiotici nella formazione di aerosol tossico;
- ruolo della morfologia costiera e di eventuali sorgenti di nutrienti indispensabili per la crescita algale.

Linee guida per la sorveglianza di *O.ovata*

Le linee guida che seguono sono state elaborate per essere utilizzate dalle strutture territoriali al fine di metterle in condizione di affrontare la problematica delle fioriture di *O.ovata* a partire da una base conoscitiva, per quanto possibile, avanzata. Sono stati utilizzati gli elementi conoscitivi e procedurali emersi negli anni passati in alcune aree costiere italiane a seguito delle fioriture massive di *Ostreopsis ovata* e le conoscenze disponibili nella letteratura scientifica.

Le modalità di intervento utilizzate in alcune delle aree costiere interessate dal fenomeno sono state progressivamente ottimizzate nel corso degli anni, giungendo a buoni risultati. Si ritiene che l'estensione su scala nazionale di queste modalità d'intervento permetterà di costruire un modello procedurale condiviso tra le Amministrazioni centrali, quelle locali ed i principali Enti ed Istituti scientifici che operano nel campo, ottimizzando le attività di sorveglianza preventiva del fenomeno e la successiva eventuale gestione delle emergenze.

Il piano di sorveglianza e gestione emergenze consentirà di:

- disporre di una base di dati specifica ed aggiornata sullo stato di salute del mare e dei prodotti ittici;
- seguire i principali fenomeni a livello locale e regionale nel loro insieme e in tempo reale, seguendo e possibilmente riuscendo a prevedere gli effetti negativi della loro evoluzione;
- intervenire con un'organizzazione che dispone di ampie e specifiche competenze;
- migliorare la qualità e l'efficienza delle strutture della rete che operano a livello Regionale e Nazionale grazie allo scambio di informazioni, esperienze e conoscenze;
- disporre non solo dei dati grezzi sui fattori di rischio, ma anche di una loro lettura d'insieme attraverso la quale sarà facilitata l'individuazione dei principali aspetti da tenere sotto controllo o sui quali intervenire per contenere il rischio;
- affrontare, contenere e risolvere situazioni di rischio sanitario associate alla presenza di microalghe bentoniche;

- fornire le informazioni di preallarme agli operatori turistici e ai pescatori;
- fornire ai turisti, ai consumatori e alle loro associazioni, informazioni corrette ed esaurienti sullo stato igienico-sanitario del mare e delle sue risorse.

PIANO DI SORVEGLIANZA

Strutture di coordinamento

L'esperienza maturata nel corso degli episodi di fioriture di *O. ovata* in Italia e la gestione complessiva dei vari aspetti ad essi collegati hanno dimostrato come sia importante affrontare problematiche come questa con l'apporto delle competenze ed esperienze provenienti dai diversi soggetti istituzionali. Grazie alla collaborazione di tali soggetti è possibile l'elaborazione e l'attuazione di efficaci piani di sorveglianza e la gestione per affrontare eventuali emergenze riguardanti le microalghe bentoniche tossiche.

L'elaborazione, l'organizzazione e l'attuazione di un piano di questo genere dovrebbero essere affidate ad un apposito gruppo di coordinamento costituito da esperti nei vari settori di pertinenza. Il comitato oltre all'elaborazione del piano dovrebbe anche espletare compiti di consulenza per le Autorità competenti in relazione alle azioni più appropriate di gestione del rischio.

a) Coordinamento Nazionale

Al fine di garantire un'adeguata sorveglianza del fenomeno ed azioni univoche su scala nazionale in caso di emergenza, è necessario istituire preventivamente una rete di conoscenze e soggetti sia di natura istituzionale che tecnica.

Tale rete deve essere coordinata a livello centrale da un Gruppo di Coordinamento Nazionale, costituito a livello istituzionale da rappresentanti dei Ministeri della Salute e dell'Ambiente e della Conferenza unificata Stato-Regioni e a livello tecnico da esperti degli Enti di Ricerca ed Istituti Universitari di settore. Il Gruppo di Coordinamento deve fornire elementi conoscitivi ed indicazioni procedurali per caratterizzare ed affrontare specifiche criticità rilevate lungo le coste italiane, suggerire alle Autorità competenti le azioni più appropriate per la gestione del rischio nonché fornire eventuale consulenza tecnica ai gruppi di coordinamento regionali.

Il Gruppo di Coordinamento dovrà altresì individuare i centri e laboratori di riferimento sul territorio nazionale con competenze specifiche nel settore d'interesse, nonché definire un piano formativo destinato agli operatori dei laboratori territoriali.

Il Gruppo di Coordinamento dovrà infine promuovere un sistema informativo centralizzato per la raccolta, l'organizzazione e la successiva elaborazione dei dati prodotti a livello locale.

b) Gruppi di coordinamento Regionali

In ciascuna Regione costiera sarebbe opportuna la costituzione di un Gruppo di Coordinamento tecnico-istituzionale di cui facciano parte rappresentanti delle autorità locali nonché esperti delle strutture territoriali ambientali (ARPA) e di quelle sanitarie (ASL), degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e delle altre istituzioni scientifiche presenti sul territorio (Università, Centri di Ricerca, ecc..).

Tale Gruppo di coordinamento dovrebbe espletare i seguenti compiti:

- elaborazione, organizzazione, attuazione del piano di sorveglianza e di emergenza;
- consulenza tecnica e supporto decisionale;
- raccordo con il Gruppo di Coordinamento Nazionale.

Fasi del Piano

1. Fase di routine

Le attività di sorveglianza di routine sono necessarie nelle aree costiere a rischio. Le attività di sorveglianza di routine, che per quanto possibile dovrebbero essere svolte durante la stagione balneare nei punti previsti per le attività di monitoraggio, rappresentano la base necessaria anche per l'eventuale gestione delle fasi successive di allerta ed emergenza, descritte nei paragrafi successivi.

Nella fase di routine dovrebbero essere svolte le seguenti attività:

- a) Individuazione delle aree a rischio

- b) Monitoraggio
- c) Predisposizione di un piano di sorveglianza sindromica
- d) Predisposizione di un piano di comunicazione del rischio

a) Individuazione delle aree a rischio

Dall'esperienza acquisita in questi anni risulta che *O. ovata* è diffusa in molti tratti del litorale costiero nazionale. In generale le fioriture sono state osservate in piccole insenature circondate da barriere rocciose e in specchi di acqua all'interno di frangiflutti artificiali. In queste aree sono spesso presenti macroalghe, il ricambio di acqua è limitato, permettendo il raggiungimento di temperature elevate, che favoriscono la crescita e la diffusione di *O. ovata*. Le fioriture si manifestano nel periodo più caldo, generalmente a luglio o agosto. Questi aspetti meritano particolare attenzione in considerazione dei cambiamenti climatici in atto nel Mediterraneo.

b) Monitoraggio

Il sito del prelievo dovrebbe essere descritto nelle sue caratteristiche generali: profilo geomorfologico, condizioni idrodinamiche, eventuale presenza di macro-alghe, condizioni meteorologiche, temperature.

I prelievi dovrebbero essere effettuati prevalentemente nei primi metri di spiaggia sommersa, o comunque dove l'esperienza ha dimostrato la maggiore crescita di questa microalga, su substrati rocciosi o sabbiosi e su barriere artificiali.

- I punti di campionamento dovrebbero per quanto possibile essere selezionati tenendo conto della localizzazione dei punti di campionamento stabiliti per il controllo della qualità delle acque di balneazione;
- Nei punti di campionamento sarebbe opportuno effettuare la misurazione di parametri chimico-fisici delle acque (almeno dei macronutrienti), registrare le condizioni meteorologiche, la temperatura dell'aria e la direzione ed intensità del vento e del moto ondoso;
- I campioni d'acqua dovrebbero essere prelevati sul fondo, in prossimità del substrato, delle macroalghe e/o altri organismi bentonici. Dovrebbe essere inoltre

prelevata l'eventuale patina presente. In aree con profondità superiori a 1 m, dovrebbero essere effettuate retinate di fitoplancton (con rete da 20 µm) lungo la colonna d'acqua. In caso di presenza di schiume pigmentate rosso-marrone, si dovrebbe prelevare un campione d'acqua in prossimità della superficie, avendo cura di convogliare all'interno della bottiglia la maggior quantità possibile di schiuma. Tutti i campioni dovrebbero essere refrigerati, conservati al buio e consegnati il più presto possibile ai laboratori per le analisi.

- Gli operatori tecnici durante tutte le fasi di raccolta e manipolazione del materiale dovrebbero adottare, quando è necessario, i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI), previsti dalle procedure di sicurezza.

b1) Campionamento e analisi di Ostreopsidaceae (allegato 1)

b2) Identificazione tassonomica (allegato 2)

b3) Test di tossicità (allegato 3)

b4) Caratterizzazione chimica delle tossine (allegato 4)

c) Predisposizione di un piano di sorveglianza sindromica

La sorveglianza sindromica è uno strumento di Sanità Pubblica, che ha recentemente trovato un sempre più diffuso impiego, basata non più sulla diagnosi di malattia, ma sulla presenza di un insieme di segni e sintomi, che costituiscono una sindrome. I recenti episodi di allarme causati da malattie trasmissibili emergenti, come la SARS o da casi umani di virus influenzali a potenzialità pandemica, i timori legati a episodi di bioterrorismo o il ritardo con cui vengono segnalati e caratterizzati episodi epidemici, hanno evidenziato, a livello internazionale, la necessità di realizzare sistemi di sorveglianza e risposta rapidi nei confronti di eventi acuti o inattesi, potenzialmente pericolosi per la salute pubblica.

L'utilizzo del termine sindrome è legato all'oggetto della sorveglianza, che non può essere limitato ad una precisa diagnosi eziologica e un quadro clinico strettamente definito, ma deve comprendere un insieme di sintomi/segni, il cui rilevamento può definire la comparsa di un evento epidemico.

L'istituzione di un sistema di sorveglianza sindromica *ad hoc* risulta particolarmente importante per la precoce identificazione di casi potenzialmente riconducibili all'esposizione alla tossina dell'alga *O. ovata*, al fine di attivare prontamente le necessarie misure preventive di Sanità Pubblica, contribuendo, inoltre, alla sensibilizzazione degli operatori sanitari.

Ulteriori obiettivi di un tale sistema di sorveglianza clinico-epidemiologica sono brevemente di seguito elencati:

- stima dell'incidenza delle sindromi irritative delle alte vie aeree e della mucosa congiuntivale in presenza o assenza di esposizione ad aerosol marini;
- acquisizione di ulteriori informazioni sulla storia naturale e sul quadro clinico riconducibile all'esposizione alla tossina dell'alga *O. ovata*;
- individuazione delle caratteristiche della popolazione a maggior rischio di quadri clinici più gravi;
- integrazione dei dati ambientali per la valutazione dell'esposizione e creazione di una mappa delle aree a maggior rischio;
- integrazione dei dati ambientali per la definizione dello stato di attenzione, di allerta e di emergenza;
- miglioramento della coordinazione tra le diverse componenti coinvolte nella sorveglianza epidemiologica ambientale e in ambito umano e nella risposta rapida ad eventi epidemici legati a fenomeni di tipo microbiologico;
- attivazione delle misure preventive di Sanità Pubblica, in costante collaborazione con Regione, Comune, ASL territoriali, Ospedale.

Per la parte tecnica si rimanda all'allegato 5.

d) Predisposizione di un piano di comunicazione del rischio

L'Autorità competente, dovrebbe predisporre un piano di comunicazione del rischio per informare gli *stakeholders* e la popolazione interessata ancor prima che si presentino situazioni di allerta o emergenza. E' auspicabile che venga promosso un sistema di comunicazione ai cittadini che faciliti lo scambio di informazioni, con aspetti di

feedback, incoraggiando anche la partecipazione nelle attività di sorveglianza (segnalazioni di presenza di fioriture, di casi clinici, spiaggiamenti di fauna ittica, ecc).

L'attività di comunicazione dovrebbe essere rivolta principalmente alle seguenti categorie:

1. operatori turistici, albergatori, commercianti, pescatori e tutti coloro che hanno dal mare una loro fonte di reddito.
2. cittadini, turisti e tutti coloro che utilizzano il mare a livello ricreativo.
3. istituzioni nazionali, locali, strutture tecniche di riferimento.
4. associazioni ambientaliste.

Per quanto riguarda la prima categoria, la comunicazione dovrebbe articolarsi nelle seguenti azioni:

- a) realizzazione di una serie di incontri per divulgare informazioni di base di biologia marina sulle alghe tossiche marine e le possibili conseguenze ad esse associate. Questi incontri dovrebbero essere svolti durante il periodo invernale;
- b) illustrazione del lavoro svolto dalle Autorità competenti (sorveglianza, valutazione e prevenzione del rischio, divulgazione dell'informazione) a tutela della salute umana;
- c) presentazione e discussione del piano operativo nei casi di emergenza;
- d) presentazione e verifica annuale del lavoro svolto durante i periodi critici in termini di efficienza ed efficacia.

Il coinvolgimento dei portatori d'interesse economico dovrebbe permettere di rendere più efficienti le attività di prevenzione ed il successo di eventuali piani di emergenza.

La comunicazione al cittadino, in particolare ai bagnanti, dovrebbe prevedere le seguenti azioni:

- a) realizzazione di un depliant sulla caratterizzazione del pericolo e riferimenti telefonici che il cittadino/turista può utilizzare all'occorrenza;
- b) facilitazione dell'accesso a siti web dove sono raccolti i dati di monitoraggio del periodo balneare e le azioni svolte dalle Autorità competenti in tempo reale;

- c) istituzione di un numero verde per rispondere a quesiti posti dai cittadini/turisti. Questo numero potrebbe essere attivo durante il periodo estivo e fare capo ad uno o più esperti del settore.

2. Fase di attenzione/allerta

Questa fase corrisponde ad una situazione nella quale si ritiene elevata la probabilità di una fioritura di *O.ovata*.

Questa situazione può essere individuata sulla base dei risultati delle attività di routine, quando questi indicano un progressivo aumento della densità delle popolazioni di *O.ovata*. Può essere prevista anche sulla base delle misurazioni o delle stime di incrementi delle temperature nella colonna d'acqua, della valutazione delle situazioni meteo climatiche che favoriscono condizioni di scarso idrodinamismo.

All'insorgenza di tali situazioni, il comitato/gruppo di lavoro dovrebbe svolgere le seguenti azioni:

- individuare e caratterizzare l'area costiera, oggetto dello stato di attenzione;
- informare gli organi Regionali sul possibile rischio;
- attivare le istituzioni che hanno competenze sul mare, al fine di ricevere ulteriori notizie sul fenomeno;
- richiedere di intensificare le attività di monitoraggio. Potrebbe essere inoltre opportuno avviare indagini specifiche allo scopo di approfondire le conoscenze sul fenomeno, riguardanti:

1. ulteriori parametri chimico-fisici e biologici dell'acqua;

2. lo stato dei sedimenti;

3. lo stato di salute degli organismi acquatici, in particolare di interesse commerciale.

In questa fase è opportuno che siano disponibili i risultati dei test di tossicità e di caratterizzazione chimica delle eventuali tossine.

- mettere in atto tutte le azioni previste nel piano di sorveglianza sindromica, come sopra illustrato.

3. Fase di emergenza

Corrisponde alla fase nella quale è presente una fioritura di *O.ovata*. In questa fase è necessario avviare iniziative e misure per il contenimento del rischio e per prevenire esposizioni pericolose per la popolazione.

L'esperienza pregressa ha evidenziato che quando si sono verificati i casi di malessere, *O.ovata* era presente nella colonna d'acqua a concentrazioni $\geq 10^4$ cell L⁻¹, in aree ristrette, con temperature dell'acqua di almeno 22°C ed il contemporaneo permanere per diversi giorni di condizioni di scarso idrodinamismo in prossimità della costa. La presenza sulla superficie dell'acqua di sospensioni di colore marroncino può essere indicatore di pellet di *O. ovata* rimosso dalle macroalghe, soprattutto dopo una mareggiata.

In questa fase è di particolare importanza l'osservazione o la previsione delle condizioni meteo-marine che possono favorire la formazione di aerosol (venti off-shore, alta pressione atmosferica).

In questa fase si dovrebbe:

- individuare, caratterizzare e circoscrivere l'area in stato di emergenza;
- coordinare gli organi regionali sotto l'aspetto tecnico e scientifico;
- attivare tutte le istituzioni che hanno competenze sul mare e sul rischio sanitario, al fine di ricevere ulteriori notizie sul fenomeno;
- richiedere lo svolgimento di eventuali monitoraggi straordinari;
- mettere in atto una corretta comunicazione del rischio come previsto dal piano sopra illustrato;
- notificare al Ministero della Salute e al Ministero dell'Ambiente l'emergenza in atto e le azioni che si stanno effettuando per attenuare il rischio:

Per attenuare i possibili effetti dannosi sulla salute umana sarebbe opportuno:

- effettuare, dove possibile, la pulizia della battigia per impedire l'accumulo di macroalghe o altro materiale organico, evitando (o cercando di evitare) che l'azione

meccanica del mare (risacca) o la decomposizione di tale materiale possa incidere negativamente sulla qualità e salubrità dell'aerosol marino;

- invitare le persone all'allontanamento dalla spiaggia. In particolare dovrebbero essere protette persone affette da disturbi di tipo respiratorio (ad esempio gli asmatici) e coloro che, in seguito alla permanenza in aree di balneazione "a rischio", abbiano avvertito sintomi di irritazione alle vie respiratorie, lacrimazione agli occhi o altri disturbi. Talvolta, infatti, sono sufficienti spostamenti di alcune decine di metri per eliminare o attenuare tali malesseri e in alcuni casi i disturbi si risolvono soggiornando in locali dotati di impianto di condizionamento. Qualora i disturbi dovessero perdurare o aggravarsi, dopo l'allontanamento dalla spiaggia, è opportuno recarsi al pronto soccorso;
- intensificare i controlli della raccolta di organismi eduli (da banco naturale) da parte degli organi competenti.

In seguito al superamento della fase di emergenza sarebbe opportuno procedere infine alla valutazione del danno biologico ed economico.

Il piano di emergenza dovrebbe prevedere anche l'individuazione sul territorio nazionale di una serie di laboratori di riferimento.

Allegato 1

CAMPIONAMENTO E ANALISI DI OSTREOPSIDACEAE

(*Ostreopsis* spp. e *Coolia* spp.)

PRELIEVO

1) **Campioni d'acqua** da prelevare vicino alla macroalga. Fissare il campione di acqua con soluzione di Lugol acida (0,5–1mL di soluzione ogni 250 mL di campione). In alternativa, nel caso si intendesse effettuare degli approfondimenti tramite lettura a epifluorescenza e/o al microscopio elettronico a scansione (SEM), può essere usata formaldeide neutralizzata ad una concentrazione finale del 2-4%. Conservare a $T < -20^{\circ}\text{C}$ una parte di campione non addizionato di formaldeide o soluzione Lugol per le analisi chimiche.

2) **Campioni di Macroalghe.** Prelevare possibilmente 3 campioni (distribuiti entro 10m) della stessa specie macroalgale; procedere:

a) Ricoprendo la macroalga con un sacchetto di plastica, tagliarla alla base e chiudere il sacchetto sott'acqua per ridurre la perdita di cellule dalla superficie dell'alga alla colonna d'acqua.

b) In alternativa tagliare un campione di macroalga (almeno 20g, peso fresco) e conservarla in un barattolo o in un sacchetto di plastica.

Trasferire in laboratorio per il trattamento mantenendo al buio e a temperatura ambiente.

Per tempi di trasferimento o di analisi superiori a 48 ore, fissare il campione con formalina neutralizzata ad una concentrazione finale del 2-4% in volume (nel caso del campione *b* aggiungere un po' di acqua di mare filtrata). Conservare a $T < -20^{\circ}\text{C}$ una parte di campione non addizionato di formaldeide o soluzione Lugol per le analisi chimiche.

3) **Altri substrati.** In mancanza di macroalghe si consiglia di:

- raccogliere organismi bentonici che possano fungere da substrato (ad es. Mitili) o piccole parti rocciose;
- raccogliere, servendosi di un raschietto, la patina superficiale eventualmente presente su substrati rocciosi non asportabili.

Per il trasferimento in laboratorio rimangono valide le stesse indicazioni descritte per i campioni di macroalghe.

Nota: Conservare una parte di campione contenente cellule vive per l'eventuale isolamento e coltura di Ostreopsidaceae.

TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

1) **Campioni d'acqua** – La ricerca e la quantificazione di Ostreopsidaceae nell'acqua viene eseguita seguendo il metodo di Utermöhl (Magaletti et al., 2001).

2) **Campioni di Macroalghe**

Aggiungere nel sacchetto contenente la macroalga acqua di mare filtrata (0,22-0,45 μm). Agitare 2' per consentire il rilascio nell'acqua delle cellule epifitiche. Trasferire l'acqua in un contenitore. Se necessario, ripetere il lavaggio dell'alga con altra acqua filtrata per assicurarsi che tutti gli epifiti siano stati rilasciati. Nel caso di campioni freschi, fissare tutta l'acqua di lavaggio con soluzione di Lugol acida (0,5 – 1mL di soluzione ogni 250 mL di campione) e nel caso si intendessero effettuare degli approfondimenti tramite lettura a epifluorescenza e al microscopio elettronico a scansione (SEM), parte del campione può essere fissato con formaldeide neutralizzata ad una concentrazione finale del 2-4%.

Effettuare la sedimentazione e il conteggio seguendo la metodica di Utermöhl.

3) **Altri substrati**

Le cellule possono essere 'estratte', dai substrati rimossi, sciacquando con acqua di mare filtrata e/o tramite un raschietto, procedendo come per le macroalghe.

Per una corretta identificazione delle Ostreopsidaceae occorre effettuare la determinazione delle misure cellulari e l'analisi morfologica delle placche tecali, possibilmente in microscopia ad epifluorescenza previa colorazione con fluorocromo (Calcofluor White/Fluorescent brightener) e/o SEM.

- Asciugare la macroalga con carta da filtro e pesare per determinare il Peso Fresco/Umido che è quello più frequentemente usato. Potrà eventualmente essere determinato anche il peso secco.

ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Per la determinazione quantitativa sarà necessario annotare sia il volume d'acqua usato per il lavaggio della macroalga che il peso fresco dell'alga in modo da poter ricondurre il numero di cellule contate a grammo d'alga (wet weight).

Se per esempio la densità cellulare determinata risulta uguale a 50000 cellule su un litro d'acqua utilizzato per il lavaggio dell'alga e l'alga pesa 25g il risultato sarà di 2000 cellule/g alga.

Allegato 2

METODI PER L'IDENTIFICAZIONE TASSONOMICA DI MICROALGHE

Per l'identificazione tassonomica delle microalghe si consiglia di consultare “Guida al riconoscimento di plancton dei mari italiani” elaborata dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e dall'ICRAM (Avancini et al, 2006).

Sul territorio nazionale sono uniformemente distribuite strutture pubbliche di ricerca e di controllo all'interno delle quali operano specialisti in grado di identificare gli organismi algali. Ad esempio è stata recentemente costituita una “rete” denominata BENTONEX (consultabile all'indirizzo www.bentoxnet.it) alla quale afferiscono in modo spontaneo e volontario ricercatori italiani con consolidata esperienza nello studio dei bloom di microalghe marine incluse le specie potenzialmente tossiche.

Una sicura identificazione di *O.ovata* è possibile applicando tecniche molecolari (Penna et al., 2005).

Allegato 3

TEST DI TOSSICITÀ

Per quanto riguarda la valutazione della tossicità associata alla presenza di biotossine nei molluschi bivalvi e in altri organismi acquatici, si fa riferimento al decreto legislativo (Decreto Ministero Sanità 16 maggio 2002) che prevede test chimici e biologici.

I test biologici hanno il vantaggio di identificare effetti tossici dovuti alla presenza di eventuali tossine non note o non attese difficilmente identificabili con analisi chimiche. Il test biologico a cui si fa riferimento nel suddetto decreto è il Test sul topo, che ha però una sensibilità piuttosto bassa, una riproducibilità limitata (LeDoux e Hall, 2001) e negli ultimi tempi è stato ampiamente criticato per problemi di natura etica. A questo proposito si elencano di seguito altri possibili metodi di identificazione, basati sulle proprietà tossicologiche delle palitossine con i relativi riferimenti bibliografici.

- Test di emolisi su eritrociti di topo (Bignami, 1993) o su cellule endoteliali bovine (Schilling et al, 2006);
- Saggi immunologici che utilizzano anticorpi monoclonali anti-palitossine (Bignami et al, 1992; Hokama, 1992);
- Saggi di alterazione morfologica sul citoscheletro utilizzando cellule provenienti da tessuti eccitabili e cellule intestinali (Louzao et al, 2007; Ares et al, 2005).

Per l'identificazione di nuove tossine (palitossina, ecc) si può fare riferimento a laboratori specializzati (Istituti Zooprofilattici Sperimentali, Centri di Ricerca, Istituti Universitari, ecc.).

Allegato 4

METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLE TOSSINE

In letteratura vengono riportati diversi metodi per la caratterizzazione chimica della palitossina e dei composti ad essa analoghi. (Riobò et al., 2006; Lenoir S. et al, 2004), tali metodi tuttavia non raggiungono la stessa sensibilità raggiunta dal metodo messo a punto presso l'Università di Napoli (Ciminiello et al., 2006). Tale metodo utilizza la cromatografia liquida in fase inversa accoppiata ad uno spettrometro di massa tandem (LC-ESI-MS/MS) e pur non essendo un metodo ufficiale è risultato essere sensibile e specifico per la determinazione quali- quantitativa della palitossina.

Allegato 5

METODOLOGIA PER LA SORVEGLIANZA SINDROMICA

Dal punto di vista metodologico, merita di essere brevemente descritto il disegno generale del sistema, che prevede la partecipazione allargata di una rete omogenea territorialmente, su base regionale, di DEA di Ospedali di riferimento, afferenti ad un centro coordinatore, responsabile dell'analisi e dell'elaborazione dei dati. I DEA segnaleranno gli accessi/ricoveri corrispondenti alla definizione di caso, che è stata ottenuta sulla base dell'esperienza maturata nel corso degli episodi dell'estate 2005 e 2006 a Genova e da quadri clinici segnalati in letteratura. Feed-back sistematici permetteranno la validazione o il miglioramento della definizione stessa.

Attualmente, un caso è definito da paziente afferente alle strutture sanitarie della rete che presenti contemporaneamente almeno 2 sintomi tra i seguenti:

- febbre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$),
- faringodinia, tosse, dispnea,
- cefalea,
- nausea/vomito,
- rinorrea,
- lacrimazione congiuntivale,
- rash cutaneo

Il dato atteso sarà determinato mediante studio retrospettivo, volto alla stima di un *range* dell'incidenza di accessi riconducibili alla sindrome clinica specificata nella definizione di caso nel periodo maggio-settembre. Il soggetto esposto sarà definito colui che nelle 24 ore precedenti abbia frequentato luoghi di balneazione (spiaggia, scogli, lido) o luoghi prospicienti (entro 100 metri dalla battigia).

I dati di sorveglianza contribuiranno a definire, unitamente alla rilevazione e la valutazione del dato ambientale, lo stato di attenzione, di allerta e di emergenza.

Il feed-back informativo prevede di attuare un sistema di comunicazione con le istituzioni competenti, tra cui il Dipartimento Salute e Servizi Sociali delle Regioni, i

Dipartimenti di Prevenzione delle A.S.L., Ospedali, ecc. sia a livello locale, sia in ambito nazionale.

Sulla base di quanto documentato nel corso delle indagini clinico-epidemiologiche sui casi verificatisi a Genova negli anni 2005 e nel 2006, si indica, a puro scopo conoscitivo, che le terapie attuate, consistenti in farmaci sintomatici e, nei casi di dispnea grave, di O₂ terapia, hanno fornito risultati clinici ottimali, con la dimissione dei casi necessitanti ospedalizzazione entro un termine massimo di 72 ore.

Resta valido il concetto che la gestione terapeutica spetta elettivamente al clinico prestante servizio presso la struttura sanitaria ed è discrezionale sulla base della sintomatologia e della gravità complessiva delle condizioni cliniche del paziente, non essendo ad oggi codificate né necessarie linee guida particolari per la sindrome clinica da *O. ovata*.

Bibliografia

1. Aligizaki K., Koukaras K. and Nikolaidis G. (2005). The genus *Ostreopsis* in Greek coastal waters. - Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
2. Anderson D.M. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: Okaichi T, Anderson D.M., Nemoto T (Ed.). Red tides: biology, environmental science and technology. p. 11-12, Elsevier Science Publishing Co., 1989. New York.
3. Avancini M., Cicero A.M., Di Girolamo I., Innamorati M., Maialetti E., Sartorio Zunini T. (eds.), Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani, Vol.I- Fitoplancton, 503 pp., Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare – ICRAM, 2006. Roma.
4. Ares I.R., Louzao M.C., Vieytes M.R., Yasumoto T., Botana L.M. (2005). Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *J. Exp. Biol.*, 208: 4345-4354.
5. Benson J.M., Hahn F.F. March, T.H. McDonald J.D. Gomez A.P., Sopori M.J. Bourdelais A.J., Naar J., Zaias J. Bossart G.D. and Baden D. (2005). Inhalation Toxicity of Brevetoxin 3 in rats exposed for twenty-two days. *Environ. Health Perspect.* 113: 626-631.
6. Beress L., Zwick J., Kolkenbrock H.J., Kaul P.N., Wassermann O. (1983) A method for the isolation of the Caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zoanthid) *Palytoa caribaeorum*. *Toxicon*, 21:285-290.
7. Bignami G.S. (1993). A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 31(6): 817-820.
8. Bignami G.S., Raybould T.J., Sachinvala N.D., Grothaus P.G., Simpson S.B., Lazo C.B., Byrnes J.B., Moore R.E., Vann D.C. (1992). Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassay for the measurement of palytoxin in biological samples. *Toxicon*, 30(7): 687-700.

9. Casavola N., Troncone A., Rizzi E., Favale M.G., Bello G. (2005). Microalghe marine tossiche nella provincia di Bari:danni ambientali, ittiofaunistici, evidenze epidemiologiche. In: Mattei D., Melchiorre S., Messineo V., Bruno M. (Ed.) Diffusione delle fioriture algali tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche. *Rapporto Istisan* 05/29. pp. 92-97.
10. Casotti M. (2005). Fioriture tossiche di *Ostreopsis ovata* nelle acque costiere del litorale apuano.- Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
11. Chen Y.S., Zhou Y., Irvin C.M., Pierce R.H., Naar J., Backer L., Fleming L.E., Kirkpatrick B., and Baden D. (2005). Characterization of marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins *Environ. Health Perspect.* 113: 638-643.
12. Ciminiello P., Dell’Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N. (2006). The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.*; 78(17): 6153 – 6159.
13. Decreto Ministero della Salute 16 maggio 2002, Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. *Gazzetta Ufficiale* N. 165 del 16 Luglio 2002
14. Fleming L.E., Kirkpatrick B., Backer L., Bean J.A., Wanner A., Dalpra D., Tamer, R., Zaias J., Chen Y.S. Pierce R., Naar J., Abraham W., Clark R., Zhou Y., Henry M.S., Johnson D., Van de Bogart G., Bossart G.D., Harrington M. and Baden D. (2005). Initial evaluation of the effects of aerosolised Florida red tide toxins (Brevetoxins) in persons with asthma *Environ. Health Perspect.* 113: 650-657.
15. Fusetani N., Sato S., Hashimoto K. (1985). Occurrence of a water soluble toxin in a parrotfish (*Scarus ovifrons*) which is probably responsible for a parrotfish liver poisoning. *Toxicon*, 23: 105-112.

16. Gallitelli M., Ungaro N., Addante L.M., Silver N.G., Sabbà C. (2005). Respiratory illness as reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *Journal of the American Medical Association*, 293: 2599-2600.
17. Gallitelli M., Addante LM., Procacci V., Staiano C., Poletti R., Ungano N., Mazzone M., Gentiloni Silveri N., Sabba C. (2004). Toxic Algal Blooms and Public Health Risks. *Annali Italiani di medicina* 105° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Interna Palermo, 23-26 ottobre 2004.
18. Gleibs S., Mebs D., Werding B. (1995). Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon*, 33: 1531-1537.
19. Gleibs S., Mebs D. (1999) Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon*, 37: 1521-1527.
20. Grillo C., Melchiorre N. (2005). Il Caso Liguria: azione integrata per il riconoscimento del fenomeno- Aspetti Ambientali - Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
21. Haberman E. (1989) Palytoxin acts through the Na⁺/K⁺ ATPase. *Toxicon*, 27: 1171-1187.
22. Hallegraeff, G.M. (1993). A review of harmful algae blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79-99.
23. Hallegraeff, G.M. (1995). Harmful algal blooms: a global overview. In Hallegraeff, G.M. et al.(eds.) Manual on Harmful Marine Microalgae, pp. 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
24. Hashimoto Y., Fusetani N., Kimura S. (1969) Aluterin: a toxin of filefish, *Alutera scripta*, probably originating from a Zoantharian, *Palythoa tuberculosa*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 35: 1086-1093.
25. Hokama Y., (1993) Recent methods for detection of seafood toxins: recent immunological methods for ciguatoxin and related polyethers. *Food Addit. Contam.*, 10(1): 71-82.
26. Icardi G., Marensi L. (2005) Aspetti epidemiologici - Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.

27. Kodama A.M., Hokama Y., Yasumoto T., Fukui M., Manea S.J., Sutherland N. (1989) Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (mackerel). *Toxicon*, 27: 1051-1053.
28. Lau C.O., Khoo H.E., Yuen R., Wan M., Tan C.H. (1993) Isolation of a novel fluorescent toxin from the coral reef crab, *Lophozozymus pictor*. *Toxicon*, 31: 1341-1345.
29. Lau C.O., Tan C.H., Khoo H.E., Li Q.T., Yuen R. (1995c) Ethanolic extraction, purification, and partial characterization of a fluorescent toxin from the coral reef crab, *Lophozozymus pictor*. *Natural Toxins*, 3, 87-90.
30. Lau C.O., Tan C.H., Khoo H.E., Yuen R., Lewis R.J., Corpuz G.P., Bignami G.S. (1995a) *Lophozozymus pictor* toxin: a fluorescent structural isomer of palytoxin. *Toxicon*, 33: 1373-1377.
31. Lau C.O., Tan C.H., Li Q.T., Ng F.H., Yuen R., Khoo H.E. (1995b) Bioactivity and mechanism of action of *Lophozozymus pictor* toxin. *Toxicon*, 33: 901-908.
32. LeDoux M., Hall S. (2000). Proficiency testing of eight French Laboratories in using the AOAC mouse bioassay for Paralytic Shellfish Poisoning: Interlaboratory collaborative study. *Journal of the A.O.A.C.*, 83(2): 305-310.
33. Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Bernard C. and Hennion M.C. (2004). First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern indian ocean. *Journal of Phycology*, 40:1042-1051.
34. Louzao M.C., Ares I.R., Vieytes M.R., Valverde I., Vieites J.M., Yasumoto T., Botana L.M. (2007) The cytoskeleton, a structure that is susceptible to the toxic mechanism activated by palytoxins in human excitable cells. *FEBS J.* in press.
35. Magaletti et al., 2001. Fitoplancton – Acqua, scheda 11, In Cicero A.M. & Di Girolamo I. (eds.), *Metodologie Analitiche di Riferimento del Programma di Monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio - ICRAM. © ICRAM, 2001. Roma.

36. Masò M., Vila M., Alvare P. (2005) *Ostreopsis* along the Catalan coast (NE Spain): ecological aspects and epidemiologic study. - Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
37. Moore R.E., Scheuer P.J. (1971) Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science*, 172: 495-498.
38. Moore R.E., Bartolini G. (1981) Structure of palytoxin. *Journal of the American Chemical Society*, 103: 2491-2494.
39. Noguchi T., Hwang D.-F., Arakawa O., Daigo K., Sato S., Ozaki H., Kawai N., Ito M., Hashimoto K. (1987). In: Gopalakrishnakone P., Tan C.K. (Eds). *Progress in Venom and Toxin Research: Proceedings of the First Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*. pp 325-335, 1987.
40. Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteau S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H., Yasumoto T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*, 37: 55-65.
41. Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobó P., Vernesi C. (2005) Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology* 41: 212-225.
42. Pierce R.H., Henry M.S., Blum P.C., Lyons J., Cheng, Y.S. Yazzie D., Zhou Y. (2003) Brevetoxin Concentrations in Marine Aerosol: Human Exposure Levels During a *Karenia brevis* Harmful Algal Bloom. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70(1):161-165.
43. Poletti R., Pompei M. (2005) Lo stato delle conoscenze sul fenomeno *Ostreopsis* lungo le coste italiane- Seminario Internazionale “: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
44. Rhodes L., Towers N., Briggs L., Munday R., Adamson J. (2002) - Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 36: 631-636.

45. Rhodes L., Munday R. (2004) Palytoxins: a risk to human health? Proceedings, 20th Marine Biotoxin Science Workshop, Wellington, New Zealand, New Zealand Food Safety Authority.
46. Riobò P., Paz B., Franco J.M: (2006). Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 566:217-223
47. Rustighi C., Casotti M. (2005) Fioriture tossiche di *Ostreopsis ovata* sul litorale apuano. In: Mattei D., Melchiorre S., Messineo V., Bruno M. (Ed.) Diffusione delle fioriture algali tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche. pp. 118-122. *Rapporto Istisan 05/29*. Roma.
48. Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Fustighi L. (2003) Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales. Dinophyceae) : un problema emergente. *Biologia Ambientale*, 17 (1) : 17:23.
49. Schilling W.P., Snyder D., Sinkins W.G., Estacion M. (2006). Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291(4): 657-667. Epub.
50. Smayda T.J. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkage? In: Cosper E.M., Carpenter E.J., Bricelj V.M. (Ed.). Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms. p. 449-83. Springer Verlag, 1989. Berlin.
51. Tan C. H., Lau C.O. (2000). Chemistry and detection of palytoxin. In Botana, L. M. (Ed.) Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. pp. 533–48. Marcel Dekker, New York.
52. Taniyama S., Mahmud Y., Tanu M.B., Takatani T., Arakawa O., Noguchi T. (2001) Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon*, 39: 725-727.
53. Taniyama S., Arakawa O., Terada M., Nishio S., Takatani T., Mahmud Y., Noguchi T. (2003) *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon*, 42: 29-33.

54. Ungaro N. (2005) – Il caso Puglia: fioriture di Dinoflagellate del genere *Ostreopsis* nelle acque costiere dell'Adriatico Pugliese - Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
55. Wiles J.S., Vick J.A., Christensen M.K.(1974). Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon*, 12(4):427-33.
56. Yasumoto T., Yasumura D., Ohizumi Y., Takahashi M., Alcala A.C., Alcala L.C. (1986) Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 163-167.
57. Yasumoto T. (1998) Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific. *Toxicon*, 36: 1515-1518.