

STUDIO SULLA PRESENZA DI BIOTOSSINE ALGALI NELL'AEROSOL MARINO

ISPRA-ARPACAL
Contratto del 27.08.2009
Nr. rep. ARPACAL 807
Art.6 – Rapporti tecnici



RAPPORTO TECNICO FINALE

INDICE

Abstract	pag 3
1. Introduzione	pag 4
2. Materiali e metodi	pag 5
2.1. Campionatori	pag 5
2.2. Area di studio	pag 6
2.3. Campionamento	pag 7
3. Determinazioni analitiche sul bioaerosol	pag 8
3.1. Reattivi, solventi e standard	pag 8
3.2. Preparazione dei campioni	pag 8
3.3. Cromatografia	pag 9
3.4. Spettrometria di massa	pag 10
3.5. Validazione del metodo	pag 10
4. Studi <i>in vivo</i>	pag 13
4.1. Animali	pag 13
4.2. Trattamento	pag 13
4.3. Analisi western-blotting	pag 13
4.4. Morfologia	pag 14
5. Risultati	pag 15
5.1. Analisi campioni di bioaerosol	pag 15
5.2. Risultati degli studi <i>in vivo</i>	pag 17
6. Discussioni e conclusioni	pag 20
7. Bibliografia	pag 21

“Studio sulla presenza di biotossine algali nell’aerosol marino”

Abstract

La microalga dinoflagellata *Ostreopsis ovata* (Cimminiello et al. 2008) è una specie di origine tropicale ad *habitus* epi-bentonico, in grado di produrre biotossine estremamente tossiche.

L’*Ostreopsis ssp.*, a partire dal 2001, è stata frequentemente segnalata ed identificata lungo i litorali italiani; la sua diffusione deriva probabilmente dalla movimentazione delle acque di zavorra delle navi provenienti da aree tropicali (Penna et al. 2005).

Durante la sua fioritura (detta *bloom*), le alghe proliferano fino a raggiungere concentrazioni di milioni di cellule/litro. Tale fenomeno si verifica tipicamente nella stagione estiva in concomitanza di più fattori: prolungata luminosità, temperatura elevata, scarso idrodinamismo e apporti trofici.

E’ ancora da verificare la via di trasmissione delle biotossine di *O. ovata* all’uomo. L’ipotesi più accreditata è quella dell’inalazione di aerosol marino. I sintomi dell’intossicazione si manifestano con stato febbrile, faringodinia, tosse, dispnea, cefalea, nausea, rinorrea, congiuntivite, vomito e dermatite (Icardi et Marenzi 2005).

Nel presente lavoro, eseguito da ARPACAL nell’ambito del Contratto di Ricerca ISPRA-ARPACAL “Studio sulla presenza di biotossine algali nell’aerosol marino” sono stati utilizzati in via sperimentale campionatori automatici per il bioaerosol marino con conseguente possibilità di identificare e quantificare le biotossine algali.

L’area di studio situata a Nord di Bari, località Giovinazzo, è stata prescelta in quanto esposta ad intensa criticità per fioriture algali (*hot spot*).

Il campionamento è stato effettuato mediante un campionatore portatile per bioaerosol AIRCUBE COM2 con associato sistema di captazione in vetro borosilicato ed un campionatore per microinquinanti AIRFLOW PUF con membrana filtrante in fibra di quarzo e fiala in schiuma poliuretanic purificata (PUF).

Dopo estrazione con metanolo, i campioni sono stati analizzati mediante tecnica LC-IT-MS utilizzando una colonna RP-C18 Hypersil gold (ThermoFisher).

Alla concentrazione di 5.700.000 cellule/litro di *Ostreopsis ovata* in colonna d’acqua è stata identificata una molecola yessotossina-like.

Parallelamente alle analisi chimiche, allo scopo di verificare la tossicità della palitossina somministrata via aerosol, è stato condotto uno studio *in vivo* su topi maschi (CD1 di peso 18-20 g). Agli animali è stata somministrata palitossina (Wako Chemicals, Germania) alle dosi di 450 e 900 ng/kg, mediante l’utilizzo di un apparecchio di tipo pneumatico per la produzione di aerosol, in camera chiusa ed a controllo di flusso. Gli esperimenti sono stati eseguiti secondo le linee guida OECD sulla tossicità acuta da inalazione.

La somministrazione di palitossina è risultata letale (18 h dopo il trattamento) per tutti gli animali trattati con la dose di 900 ng/kg, mentre entrambe le dosi di tossina hanno evidenziato, all’esame autoptico, una marcata iperemia polmonare.

I risultati ottenuti mettono in evidenza l’idoneità dei sistemi utilizzati per il campionamento del bioaerosol marino con conseguente possibilità di determinazione delle biotossine presenti.

Le determinazioni analitiche effettuate non rilevano livelli significativi di palitossina. Dagli studi *in vivo* emerge che l’inalazione di dosi relativamente basse di palitossina è in grado di indurre una marcata tossicità polmonare negli animali da esperimento.

1.Introduzione

La microalga dinoflagellata *Ostreopsis ovata* (Fukuyo 1981), specie di origine tropicale ad habitus epi-bentico, è stata segnalata lungo i litorali italiani, compresi quelli pugliesi, sin dal 2001. Le fioriture massive della specie sono state tipiche della stagione calda (Fusetani N, et al 2009), ed a queste, talvolta, sono state associate patologie riscontrate in bagnanti, pescatori e residenti nelle zone litorali (rinorrea, faringite, congiuntivite, dermatite, tosse, dispnea, febbre). Il fenomeno è stato evidenziato spesso dai mass-media in diverse zone del mediterraneo (Villar-Gonzalez et al 2007) e dell'Italia (Ciminiello et al 2007).

La problematica ha avuto dunque per la regione Puglia una valenza non solo ambientale, ma anche sanitaria, ed infatti nell'autunno 2008 è stato istituito un tavolo tecnico sull'argomento presso l'Assessorato Regionale alle Politiche della Salute.

Queste motivazioni hanno indotto l'ARPA Puglia ad adottare un piano di monitoraggio e sorveglianza avviato per la prima volta nella stagione estiva 2007 con lo scopo di rispondere in maniera pronta ed efficace alle esigenze ambientali e sanitarie del territorio pugliese.

Il monitoraggio condotto nel periodo 2001-2003 (Poletti et al 2003) ha permesso di identificare degli "hot spot" per le fioriture della microalga; in particolare l'area immediatamente a nord di Bari, tra gli insediamenti di Molfetta e S. Spirito (Fig. 1), è quella in cui si sono verificate le più alte concentrazioni (sino a 5.000.000 di cellule/litro in prossimità del fondo), tra i mesi di luglio e settembre.

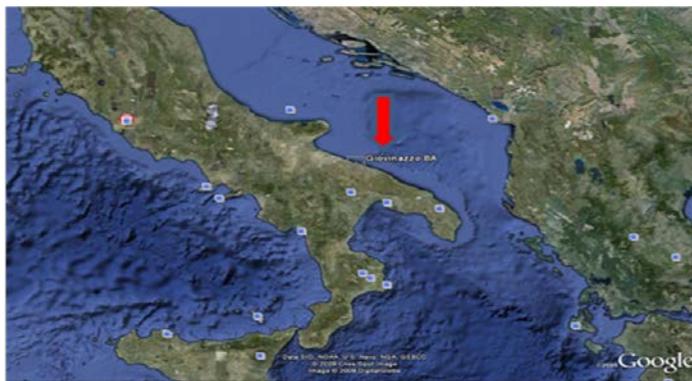


Fig.1: Area hot-spot

Nell'ambito del Programma di ricerca ISPRA-MATTM "*Ostreopsis ovata ed Ostreopsis spp.: nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani*", relativamente alle problematiche sia di tipo ambientale che sanitario legate alla presenza di fioriture di microalghe potenzialmente tossiche, è stata ravvisata l'opportunità di indagare gli aspetti inerenti lo sviluppo di aerosol marino ed i suoi possibili effetti tossici. Infatti, per quanto l'aerosol sia indicato come il principale veicolo di compromissione della salute pubblica anche nelle zone immediatamente circostanti le acque di balneazione, a tutt'oggi resta da dimostrare in modo inequivocabile la biotossicità delle cellule (interi o in frammenti) di *O. ovata* o delle sue tossine.

Pertanto, questa Agenzia nell'ambito del Contratto di ricerca ISPRA-ARPACAL "Studio sulla presenza di biotossine algali nell'aerosol marino" ha condotto uno specifico studio allo scopo di fornire indicazioni sui sistemi da utilizzare per il campionamento e la determinazione delle biotossine algali nel bioaerosol marino e fornire elementi certi su cui basare una metodologia scientificamente valida e condivisa a livello nazionale, da utilizzare nelle attività di controllo e tutela dell'ambiente e della salute umana. Lo studio è stato articolato in due distinte fasi: 1) campionamento del bioaerosol marino mediante due tipi di dispositivi di captazione corredato dall'acquisizione di una serie di parametri meteo-marini; 2) analisi delle biotossine algali.

Inoltre sono stati condotti studi in vivo su animali da laboratorio allo scopo di verificare la tossicità della palitossina somministrata per via inalatoria.

2. Materiali e metodi

2.1 Campionatori

Per il campionamento dell'aerosol marino l'ARPACAL si è avvalsa di due tipi di campionatori: un dispositivo di captazione per BioAerosol in vetro borosilicato tipo Biosampler, ed un campionatore per microinquinanti Air FlowPUF.

Il primo dispositivo, del tipo Biosampler, è un sistema con capacità di adsorbimento su liquido (soluzioni fisiologiche sterili apirogene, terreni di coltura selettivi, grasso siliconico) con movimento centrifugo e flusso di aspirazione di 12,5 litri/minuto, con possibilità di lavorare fino ad 8 ore senza il danneggiamento delle bio particelle adsorbite (Fig. 2).

Tale dispositivo è stato associato ad un campionatore portatile AirCube COM2 (pompa di aspirazione), avente le seguenti caratteristiche: campo di regolazione del flusso 0,2-30 litri/minuto in un unico range dinamico senza ausilio di adattatori o orifizi, flusso massimo di impiego 28 litri/minuto, massima compensazione raggiungibile 2200 mm/H₂O, compensazione a controllo elettronico delle perdite di carico, attenuatore di pulsazioni con controllo di pressione incorporato.

La pompa aspirante, tarata con flusso di 10 litri/minuto, è dotata inoltre di: regolazione automatica del flusso di aspirazione con valvola proporzionale motorizzata, controllo del flusso con dispositivo Mass Flow Meter e lettura istantanea ed integrata, impostazione del campionamento per tempi e volumi direttamente dalla tastiera, impostazione del flusso di campionamento da tastiera, rilevazione istantanea e calcolo della media per temperatura al contatore, temperatura ambiente, pressione barometrica atmosferica, flusso di aspirazione, velocità e direzione del vento. E' resa possibile anche la visualizzazione grafica dell'andamento del campionamento con calcolo della deviazione standard e la possibilità di controllo remoto mediante scheda GSM/GPRS.

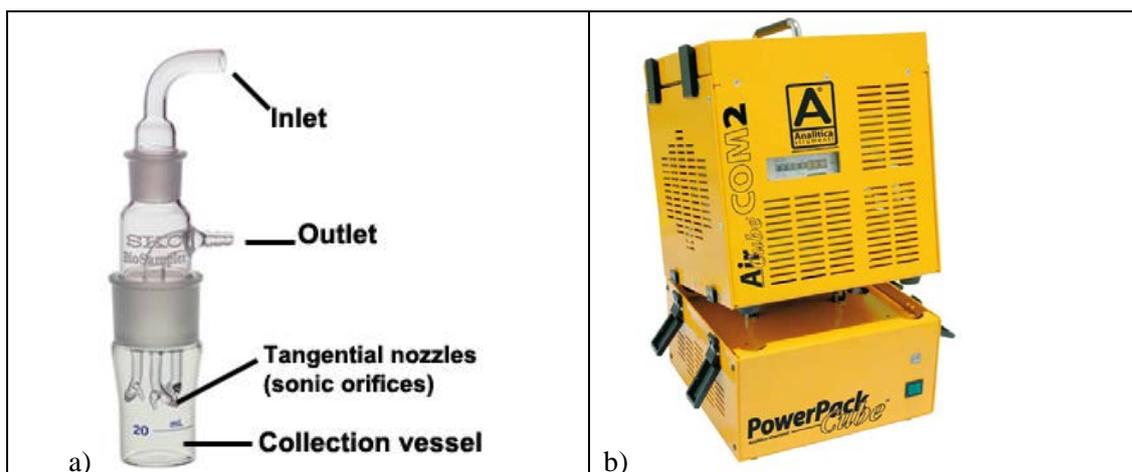


Fig. 2: a) BioSampler b) Campionatore portatile AirCube COM2

Il secondo dispositivo utilizzato è il campionatore per microinquinanti Air FlowPUF che consente di campionare simultaneamente particolato solido sospeso e vapori organici ad un flusso di aspirazione compreso tra 120 e 600 litri per minuto. Il campionatore ad alto volume AirFlowPUF è completamente gestito da microprocessore ed attraverso il nuovo sistema di rilevazione flusso con tubo Venturi, in conformità ai requisiti della normativa ISO-5167, è in

grado di gestire in modalità estremamente accurata tutti i campionamenti, anche per periodi prolungati (Fig. 3).

Uno speciale modulo di campionamento consente l'alloggiamento di due dispositivi d'adsorbimento, uno per particelle composto da una membrana filtrante in fibra di quarzo avente diametro 102mm e l'altro per composti organici costituito principalmente da una fiala avente 6 cm di diametro contenente della schiuma poliuretanicata (PUF).

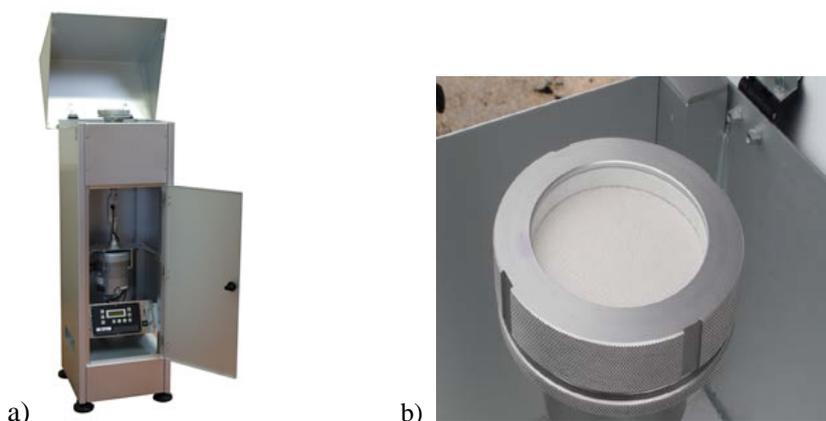


Fig. 3: a) campionatore per microinquinanti Air FlowPUF b) membrana filtrante

2.2 Area di studio

L'area di studio, segnalata dall'ARPA Puglia a seguito di programmi di monitoraggio condotti negli anni precedenti, è una zona ad intensa criticità per il fenomeno di fioritura algale (*hot spot*), ubicata a Nord di Bari, tra gli insediamenti di Molfetta e S. Spirito, in località Giovinazzo. La stazione di campionamento, situata sul fronte costiero della struttura balneare "Riva del Sole", si mostra come una baia semichiusa, a scarso idrodinamismo e ad elevato apporto trofico dovuto alla presenza, nelle immediate vicinanze, di uno scarico di depurazione (Fig. 4)



Fig. 4: Località Giovinazzo di Bari – Fronte costiero "Riva del Sole".

2.3 Campionamenti

Nell'area di studio descritta i tecnici ARPACAL hanno eseguito quattro campionamenti di aerosol marino in quattro distinti momenti (18/09/09 – 02/10/09 – 20/10/09 - 19/11/09) ed in diverse condizioni meteorologiche (soleggiato – pioggia - vento forte – nebbia).

Entrambi i campionatori sono stati posizionati ad una distanza di circa 2-3 metri dalla battigia e ruotati occasionalmente in direzione del vento dominante al fine di garantire una captazione diretta dell'aerosol marino. In tabella 1 e in tabella 2 sono schematizzati i valori medi dei parametri acquisiti da entrambi i dispositivi di captazione per bioaerosol.

Parametri	Unità	Date di campionamento			
		18/09/09	02/10/09	20/10/09	19/11/09
Tempo di acquisizione	ore	8:00	1:49	8:00	6:00
Flusso di campionamento	l/min	449	355	354	450
Volume campionato e riportato alle condizioni standard	Nm ³	208.2	36.4	145.2	190.2

Tab.1: valori medi dei parametri acquisiti con Air FlowPUF.

Parametri	Unità	Date di campionamento			
		18/09/09	02/10/09	20/10/09	19/11/09
Tempo di acquisizione	ore	8:00	1:49	8:00	6:00
Flusso di campionamento	l/min	10.1	10.1	10.0	10.0
Volume campionato e riportato alle condizioni standard	Nm ³	3.5	1.0	3.8	3.9

Tab.2: valori medi dei parametri acquisiti con sistema associato Biosampler/AirCube COM2.

In concomitanza al campionamento dell'aerosol marino, i tecnici dell'ARPA Puglia hanno effettuato prelievi su colonna d'acqua e sul fondo al fine di poter stabilire le concentrazioni di *Ostreopsis ovata* nelle 4 giornate di campionamento (tabella 3).

Date di campionamento	Concentrazione di <i>Ostreopsis ovata</i> (cellule/litro)	
	Fondo	Colonna d'acqua
18/09/09	5.792.000	23.520
02/10/09	3.685.000	25.600
20/10/09	20.500	240
19/11/09	6.700	120

Tab.3: valori di concentrazione di *Ostreopsis ovata* (cellule/litro) su fondo e colonna d'acqua.

Nel corso delle attività, mediante l'uso di una stazione barometrica (mod. DO 9847) ed una stazione anemometrica (mod. Tor Ann), entrambe portatili, sono stati inoltre acquisiti per ogni ora una serie di parametri meteo-marini i cui valori medi sono riportati in tabella 4.

Parametri	18/09/09	02/10/09	20/10/09	19/11/09
Pressione atmosferica (millibar)	1011.75	1015.4	1027.5	1015.6
Umidità relativa (%)	69.7	63.9	81.5	66.9
Temperatura aria (°C)	25.6	25.6	14.3	14.8
Irraggiamento solare (watt/m ²)	609.6	576	61.4	349
Direzione vento (N, NW, NE, E)	251.2 NW	138N	191NE	65NE
Intensità vento (m/s)	0.3	0.9	0.15	2.2
Copertura cielo (ottavi)	4	2	8	2

Tab.4: valori medi parametri meteo-marini.

Il dispositivo in vetro borosilicato, la membrana filtrante in fibra di quarzo e la fiala contenente schiuma poliuretanic purificata (PUF) sono stati poi consegnati al Centro d'Eccellenza in Tossicologia Alimentare (CETA) dell'ARPACAL il quale ha proceduto all'esecuzione delle prove analitiche (acido domoico, acido okadaico, yessotossina e palitossina).

3. Determinazioni analitiche su bioaerosol

3.1 Reattivi, solventi e standard

Tutti i solventi sono stati di grado idoneo al tipo di analisi ed acquistati da Carlo Erba, l'acido domoico e l'acido okadaico sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich, la palitossina dallo Wako-chemicals (Germany) e la yessotossina dalla Labservice Instruments.

I reattivi dove non specificato sono stati tutti acquistati dalla Sigma Aldrich

Per lo studio in vivo la palitossina è stata solubilizzata in 5 ml di soluzione fisiologica 0.9%.

3.2 Preparazione dei campioni

In seguito alle attività di campionamento si è proceduto alle determinazioni analitiche su:

1. Membrana filtrante in fibra di quarzo da Air FlowPUF;
2. Fiala contenente schiuma poliuretanic purificata (PUF) da Air FlowPUF;
3. Liquido di gorgogliamento/campionamento da dispositivo in vetro borosilicato Biosampler.

Il solvente utilizzato nel processo di estrazione è stato il metanolo (Ciminiello et al., 2006). La metodica ha richiesto:

- 50 ml di MeOH per i filtri a membrana sottoposti poi a sonicazione (1 min per 3 volte);
- 100 ml di MeOH per i PUF;
- 10 ml di MeOH per il dispositivo in vetro borosilicato.

I campioni sono stati portati al volume di 2 ml, centrifugati a 14.500 rpm, filtrati e analizzati mediante LC-MS.

3.3 Cromatografia

Le prove analitiche sono state effettuate mediante cromatografo LXQ – Thermofisher dotato di colonna del tipo Hypersil gold Thermmofisher (50mm x 2.1mm 1.9µm) termostata a 30°C. La fase mobile per la determinazione dell'acido domoico, acido okadaico e della yessotossina è stata costituita da H₂O e ACN addizionati di acido formico e formiato d'ammonio rispettivamente alla concentrazione di 50 mM e 2 mM. L'eluizione è stata condotta in gradiente (come riportato in figura 5), il flusso è stato pari a 200 µl/min.

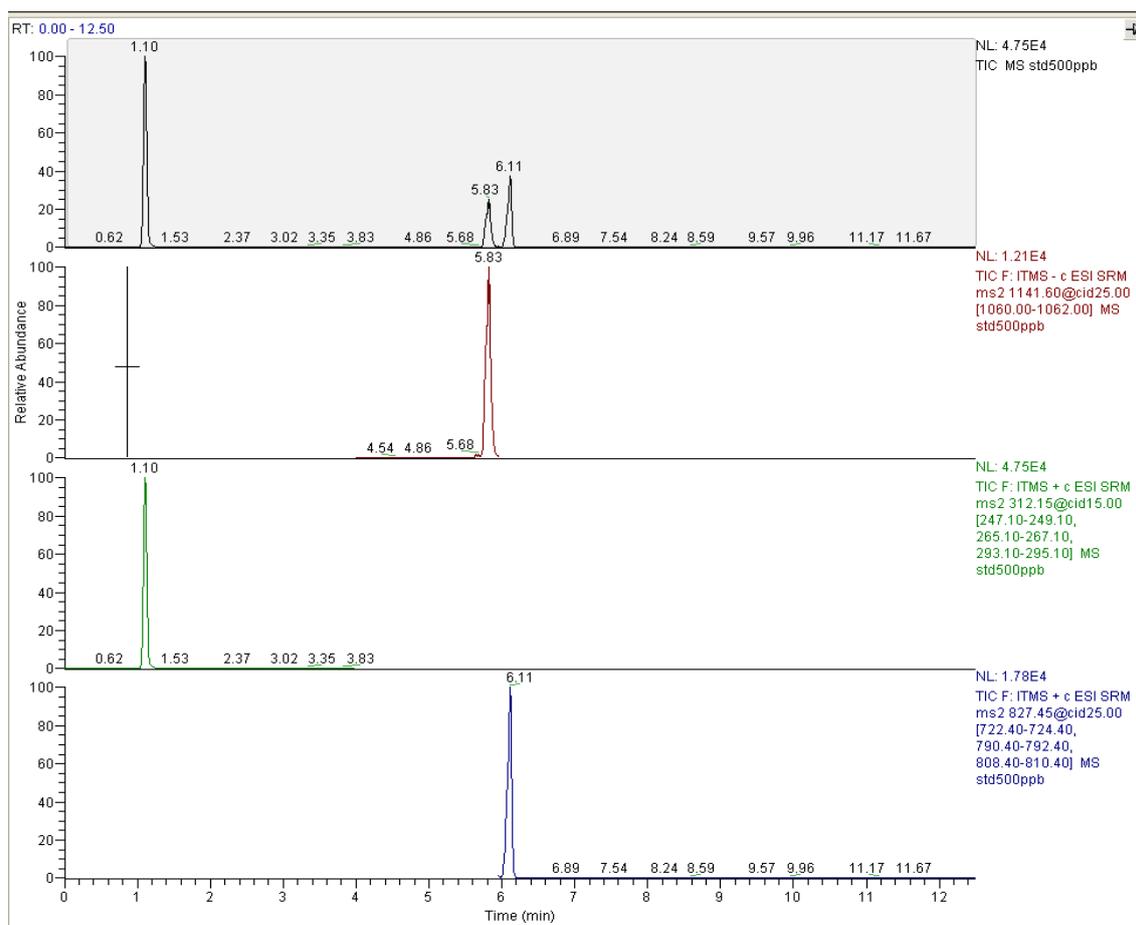


Fig.5: Cromatogramma di un multistandard (500ppb) di acido domoico, acido okadaico e yessotossina con estrapolazione delle transizioni relative alle tre molecole in esame.

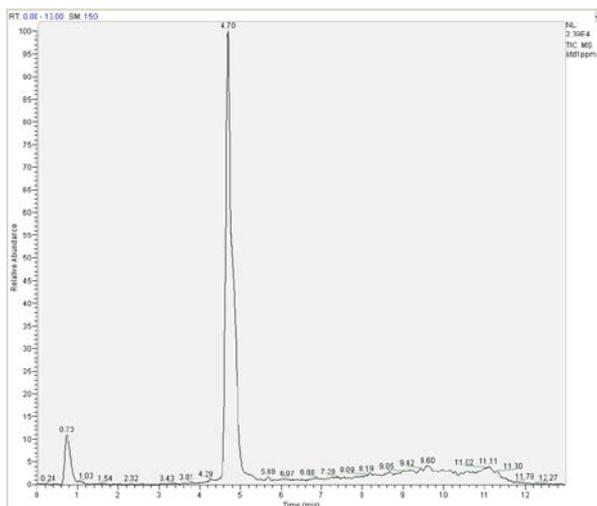


Fig.6: Cromatogramma di palitossina 1ppm

Per la determinazione della palitossina è stata usata una colonna Hypersil gold - ThermoFisher (50mm x 2.1mm 1.9µm) termostata a 30°C ed una fase mobile costituita da H₂O e ACN addizionati di LiCl alla concentrazione di 100 ppb. L'eluizione è stata condotta in gradiente secondo quanto riportato in figura 6, il flusso utilizzato è stato pari a 200 µl/min.

3.4 Spettrometria di massa

Gli esperimenti di spettrometria di massa sono stati effettuati mediante una trappola ionica lineare LXQ-IT ThermoFisher con sorgente ESI. La determinazione è stata condotta mediante metodica MS-MS, in positivo, per acido domoico, okadaico ed, in negativo, per la yessotossina. Sono state ricercate le seguenti transizioni:

Acido domoico m/z 312,5 [M+H]⁺ → m/z 248,10; 265,10; 294,10 (energia di collisione 15%; activation time 30ms);

Acido okadaico m/z 827,45[M+H]⁺ → m/z 723,4 ; 791,4; 809,4(energia di collisione 25%; activation time 30ms);

Yessotossina m/z 1141,60 [MH]⁻ → m/z 1061,00 [MH-SO₃]⁻ (energia di collisione 25%; activation time 20ms).

La palitossina è stata determinata monitorando i seguenti cluster ionici: m/z 906,5±4; 916,7±4; 1351,8±2; 1363,0±2 (SIM).

3.5 Validazione del metodo

Per la validazione del metodo sono state costruite le rette di calibrazione di seguito riportate e per ogni molecola è stato determinato il LOD. Sono state effettuate, inoltre, le prove di recupero a diversi livelli di concentrazione utilizzando e provando diverse miscele di estrazione.

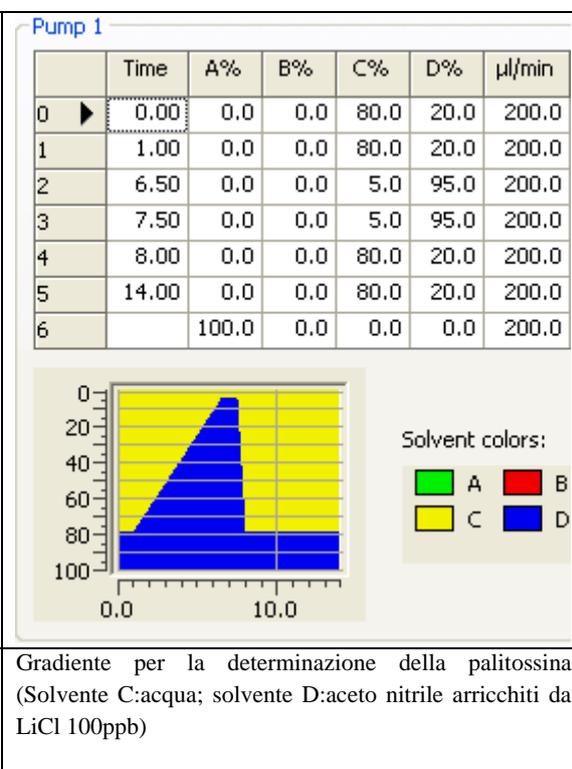
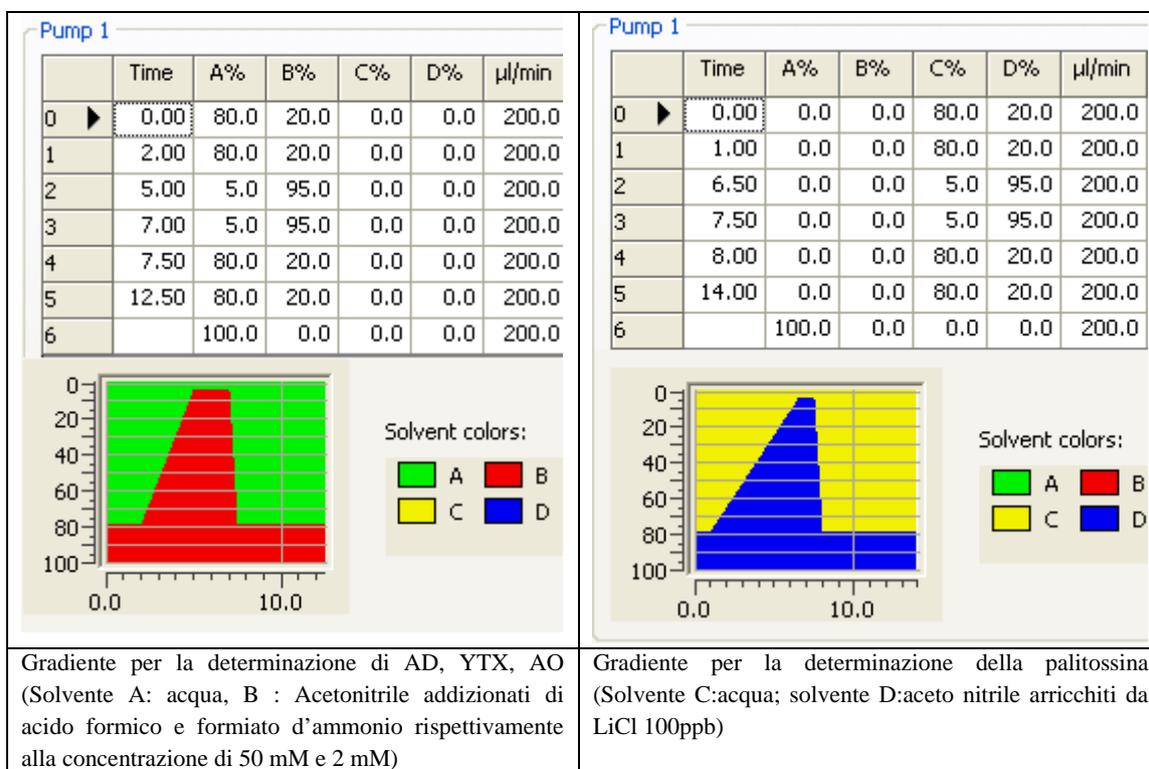


Fig.7: Gradiente

	Acido domoico	Yessotossina	Acido okadaico	Palitossina
LOD	5ppb	25ppb	15ppb	25ppb

Tab-5: Limiti di rilevabilità

Il recupero è stato determinato a diversi livelli di concentrazione di pali tossina: 50, 100 e 200 ppb. Le estrazioni eseguite secondo quanto riportato in letteratura (Ciminiello et al, 2006) hanno consentito un recupero pari al 60% circa. Ulteriori prove hanno dimostrato che la migliore miscela di estrazione è costituita da MeOH: H₂O in rapporto 80:20. Sono state effettuate anche estrazioni in acetonitrile:acqua; questa miscela consente rese più alte ma anche maggiori interferenze nell'analisi cromatografica.

Recupero palitossina 50- ppb	MeOH 100%
Filtro	58±2,8%

Tab 6: Recupero a 50 ppb

Recupero palitossina 100- ppb	MeOH 100%	MeOH-H2O 90-10%	MeOH-H2O 80-20%	ACN-H2O 80-20%
Filtro	61±1,5%	70±1,5%	78±1,5%	85±1,5%*

Tab-7: Recupero a 100 ppb con diverse miscele

Recupero palitossina 200- ppb	MeOH 100%
Filtro	63±0,7%

Tab 8: Recupero a 200 ppb

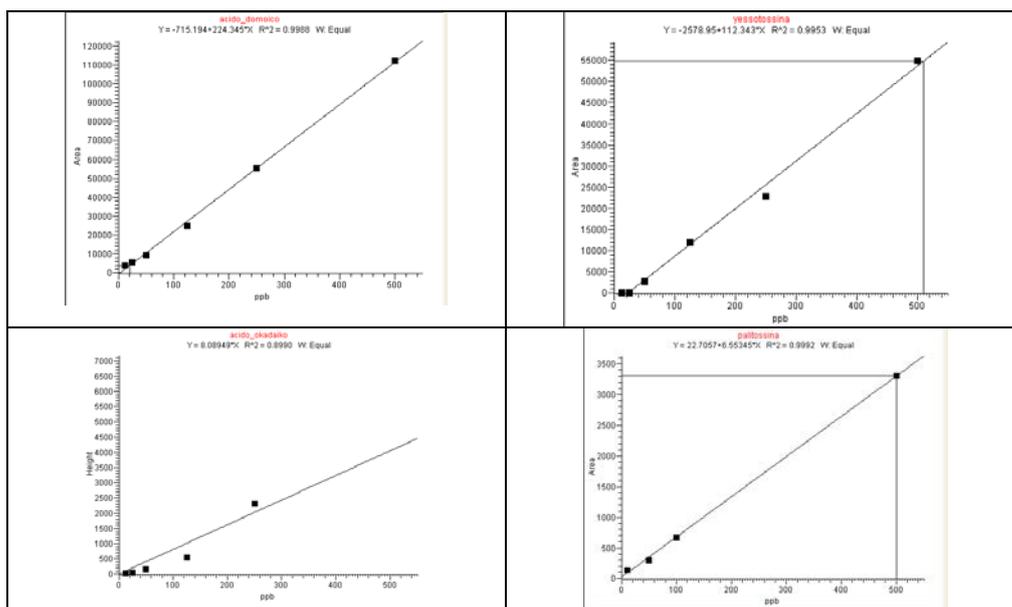


Fig 8: Curve di Calibrazione.

4. Studi *in vivo*

4.1 Animali

Lo studio è stato condotto su topi maschi CD1 (n=30) del peso di 18-20 gr. mantenuti nelle stesse condizioni di temperatura (21°C), umidità (60±5%), ciclo buio luce e con libero accesso al mangime e all'acqua, in accordo con le norme del Ministero della Salute in materia di stabulazione degli animali da laboratorio.

In accordo con le linee guida OECD per TGN°O 403 Acute inhalation toxicity è stata utilizzata una camera in plexiglas a cui è stato collegato un sistema aerosol di tipo pneumatico.

4.2 Trattamento

Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi (n=10): al primo è stata somministrata via aerosol soluzione fisiologica (NaCl 0,9%); al secondo ed al terzo è stata somministrata palitossina rispettivamente nelle dosi di 450 e 900 ng/Kg. Per ogni singolo dosaggio sono stati posti 5 animali in camera di plexiglass, lasciati per 1 ora circa, e poi trattati per 30 min. con palitossina. Durante il trattamento con NaCl 0,9% non sono stati osservati modificazioni comportamentali o alterazioni dello stato di benessere animale.

Durante il trattamento con 450 ng/Kg sono stati osservati: miosi, agitazione iniziale seguita da totale immobilità, tremori e posizione di difesa; a 6 ore dal trattamento immobilità e tremori diffusi. Gli animali dopo la sesta ora hanno presentato scarsa reattività, non hanno manifestato alcun segno clinico alle 24 ore mentre dopo 72 è stata evidenziata difficoltà respiratoria, piloerezione. Al settimo giorno sono deceduti.

Durante il trattamento con palitossina alla dose di 900 ng/Kg gli animali hanno risposto con: miosi, agitazione iniziale seguita da totale immobilità; tremori e posizione di difesa; ad 1 ora dal trattamento immobilità e tremori diffusi. Dopo 6 ore tremori diffusi. Dopo 12 ore sono stati osservati 2 decessi e tremori nei rimanenti animali. Dopo 18 ore si è verificata la morte dell'intera popolazione.

4.3 Analisi western-blotting

Trascorse le 18 h gli animali (n=5) appartenenti ai primi due gruppi, sono stati sacrificati ed i polmoni espianati, pesati e congelati rapidamente in azoto liquido. Quelli appartenenti al terzo gruppo sono stati sacrificati entro la 18° ora prima che si verificasse l'evento letale.

Ad ogni grammo di campione è stato quindi aggiunto 1 ml di RIPA (Tris-HCl pH 7.4 1M; EDTA pH 8 0,5M; Triton X-100 ; NaF 1M, Na₄P₂O₇ 100mM; SDS 10%; DOC; Na₃VO₄ 200mM e PMSF 100mM). Si è passato, dunque, alla sonicazione del tessuto con Bondelin electronic. L'omogenato è stato centrifugato per 30 minuti a 13.000 g ed è stata determinata la concentrazione della proteina nel surnatante (micro-BCA protein assay, Pierce Chemical CO., Roxiford, IL, USA).

Il lisato cellulare (30 µg/µl di proteina) è stato bollito per 5 minuti in tampone semplice e risolto attraverso SDS-PAGE 10%. Le proteine sono state poi elettroassorbite su filtri di nitrocellulosa (GE Healthcare) con pori da 0,45 µm. I filtri sono stati colorati con lo 0,2% di rosso Ponceau al fine di verificare il corretto caricamento e la corsa, lavati con TBST (20mM Tris-HCl a pH 8.0; 0.9% NaCl; 0.1% Tween 20), bloccati per 2 h con BSA (5%) in TBST (0,1%) ed incubati *over night* a 4°C con l' anticorpo specifico per COX-2 (1:500 in TBST all'1% di BSA, Cayman Chemical). I filtri di nitrocellulosa sono stati lavati (4 volte x 15 min) con TBST ed incubati per 1 h con anti-rabbit IgG marcato con perossidasi (1:30.000 in TBST all'1% di BSA, GE Healthcare).

Infine, le bande sono state sviluppate usando un sistema di detezione della chemoluminescenza (ECL, Pierce), e l'intensità della banda relativa alla proteina è stata analizzata attraverso l'MSF-300G Scanner.

Le stesse membrane sono state successivamente incubate per 2 h con l'anticorpo monoclonale specifico per la β -Actina (Sigma-Aldrich) utilizzato come "housekeeping gene" e per 1 h con l'anticorpo anti-mouse IgG (1:30.000 in TBST all'1% di BSA) coniugato con perossidasi (GE Healthcare). Le bande sono state sviluppate utilizzando un sistema di detezione della chemoluminescenza (ECL, Pierce), e l'intensità della banda relativa alla proteina è stata analizzata attraverso l'MSF-300G Scanner.

4.4 Morfologia

Dopo aver sottoposto gli animali alle procedure sperimentali sopra citate, è stata eseguita la perfusione degli stessi mediante infusione di PBS e, successivamente, di formalina al 4% tramite il ventricolo sinistro al fine di lavare e fissare i tessuti. Quindi si è proceduto all'espianto del polmone. Il tessuto espantato è stato disidratato immergendolo in una soluzione di saccarosio al 20% per 24h e successivamente tagliato al criostato in fettine di 20 μ m.

Le sezioni trasversali sono state disposte su vetrini polilisinati e colorati con il metodo ematossilina/eosina in modo da evidenziare i tipi cellulari. Le sezioni istologiche sono state trasformate in immagini digitali mediante telecamera (Leica DM 200) e software specifico; successivamente è stata effettuata l'analisi morfometrica mediante un sistema computerizzato di analisi di immagine.

5. Risultati

5.1 Analisi dei campioni di bioaerosol marino

Vengono di seguito riportati i risultati relativi alla determinazione analitica di acido domoico, okadaiko, yessotossina e palitossina nei quattro campionamenti:

Biotossina	Bioaerosol	Filtro	PUF
AD	< LRM	< LRM	< LRM
AO	< LRM	< LRM	< LRM
YTX –like	43,2 ppb	65,4 ppb	80 ppb
PTX	< LRM	< LRM	< LRM

LRM: Limite di rilevabilità del metodo

Tab. 9: Campionamento del 18-09-2009

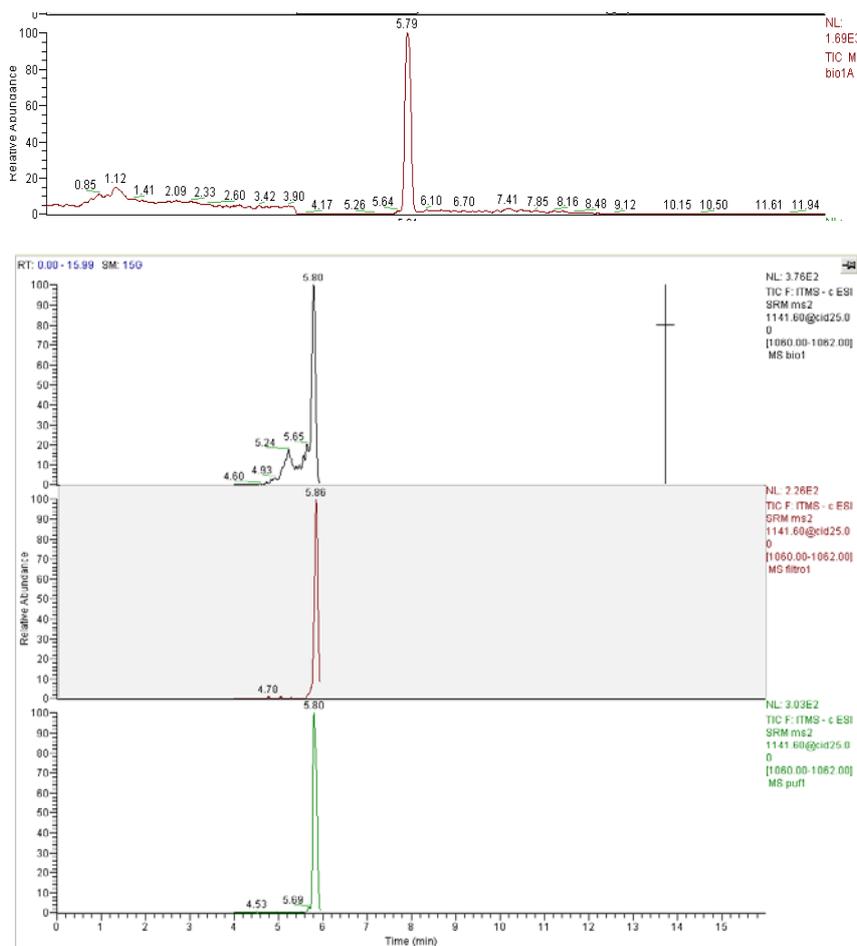


Fig.10: Cromatogrammi relativi al campionamento del 18-09-09

Biotossina	Bioaerosol	Filtro	PUF
AD	< LRM	< LRM	< LRM
AO	< LRM	< LRM	< LRM
YTX	< LRM	< LRM	< LRM
PTX	< LRM	< LRM	< LRM
LRM: Limite di rilevabilità del metodo			

Tab. 10: Campionamento del 2-10-2009

Biotossina	Bioaerosol	Filtro	PUF
AD	< LRM	< LRM	< LRM
AO	< LRM	< LRM	< LRM
YTX	< LRM	< LRM	< LRM
PTX	< LRM	< LRM	< LRM
LRM: Limite di rilevabilità del metodo			

Tab. 11: Campionamento del 20-10-2009

Biotossina	Bioaerosol	Filtro	PUF
AD	< LRM	< LRM	< LRM
AO	< LRM	< LRM	< LRM
YTX	< LRM	< LRM	< LRM
PTX	< LRM	< LRM	< LRM
LRM: Limite di rilevabilità del metodo			

Tab. 12: Campionamento del 19-11-2009

Come si evince dalla Tabella 9 l'unica biotossina determinata risulta una yessotossina-like. Essa risulta strettamente correlata alla cooliatossina in quanto presenta le stesse transizioni di massa (Holmes MJ et al, 1995). La sua presenza è stata riscontrata nel solo campionamento effettuato in data 18.09.09 ed in tutti i sistemi di captazione del bioaerosol marino (membrana filtrante in fibra di quarzo da Air FlowPUF / fiala contenente schiuma poliuretanic purificata (PUF) / liquido di gorgogliamento/campionamento ottenuto da dispositivo in vetro borosilicato Biosampler).

Si ritiene di poter escludere che si tratti della yessotossina dal momento che la microalga elettiva produttrice della biotossina (*Prorocentrum lima*) è risultata assente nei campionamenti effettuati in colonna d'acqua e sul fondo.

Merita attenzione invece il riscontro qualitativo, anche se in modeste concentrazioni, sulla presenza di *Coolia monotis* nei campioni esaminati.

5.2 Risultati degli studi *in vivo*

La palitossina (450-900ng/kg) somministrata via aerosol ha provocato, nella maggior parte degli animali, significativi cambiamenti comportamentali e motori.

Gli esperimenti effettuati nel corso dello studio sperimentale, dopo trattamento di tossina al dosaggio più basso, hanno evidenziato negli animali trattati (10 animali per ciascun esperimento), miosi, spasmi muscolari cui ha fatto seguito la totale immobilità. Tali comportamenti sono stati osservati anche dopo 6 ore dalla somministrazione.

Il gruppo di animali trattati con la dose più alta della tossina presentavano già durante le prime fasi di osservazione miosi, tremori e posizione di difesa, convulsioni tonico-cloniche e totale immobilità (n=10). La mortalità, 12 ore dopo la somministrazione, è stata pari al 50% della popolazione. Gli animali sopravvissuti manifestavano un aumento dell'attività motoria e movimenti stereotipati. La mortalità, 24 ore dopo la somministrazione, è stata del 100%.

La somministrazione di un uguale volume di veicolo (NaCl 0,9%) non ha provocato alcuna modificazione comportamentale e sintomatologica in nessuno degli animali di controllo (n=10); Negli animali sopravvissuti a 18 ore, si è proceduto ad una valutazione anatomo-patologica, eseguita presso l'Università degli Studi Magna Graecia (CZ), che ha documentato, negli animali trattati ai diversi dosaggi una marcata iperemia a livello polmonare di tipo dose dipendente (vedi fig.9), mentre negli animali controllo non è stato evidenziato alcun danno polmonare. Inoltre, è stata osservata stasi ematica a livello epatico e cardiaco; da ciò si deduce che diverse popolazioni cellulari risultano sensibili alla palitossina.



CTRL

Palitossina
450ng/kg

Palitossina
900 ng/kg

Fig 10: Analisi anatomo-patologica degli animali (controllo e trattamento con palitossina alla dose di 450 e 900ng/Kg).

Per confermare ulteriormente i nostri dati sperimentali, sui tessuti polmonari espuntati sono stati eseguiti studi di morfologia (colorazione eosina/ematossilina) che hanno evidenziato a livello polmonare una marcata infiltrazione ematica dose dipendente rispetto al controllo.

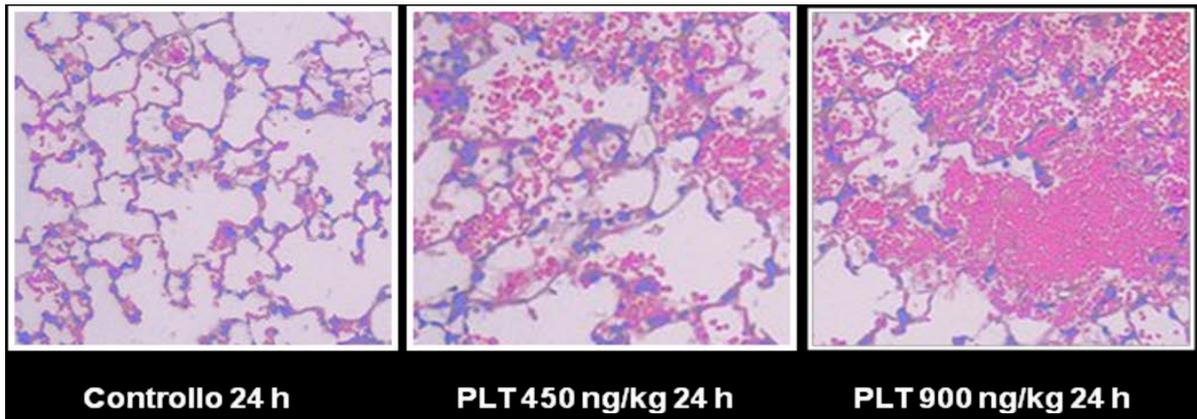


Fig 11: Esame istologico delle sezioni polmonari degli animali trattati con veicolo (A), palitossina alla dose di 450ng/kg (B), palitossina alla dose di 900ng/kg (C).

Al fine di valutare l'entità del processo infiammatorio sono stati eseguiti esperimenti di western-blotting per determinare quantitativamente la COX-2, proteina la cui espressione è indotta nel fenomeno infiammatorio. I dati ottenuti dimostrano come vi sia un significativo aumento dell'espressione della COX-2 a livello dei polmoni dei topi trattati con palitossina. In particolare le analisi mediante western-blotting, riportate in fig.11, documentano come la palitossina sia in grado di determinare un aumento dose dipendente dell'espressione di tale proteina.

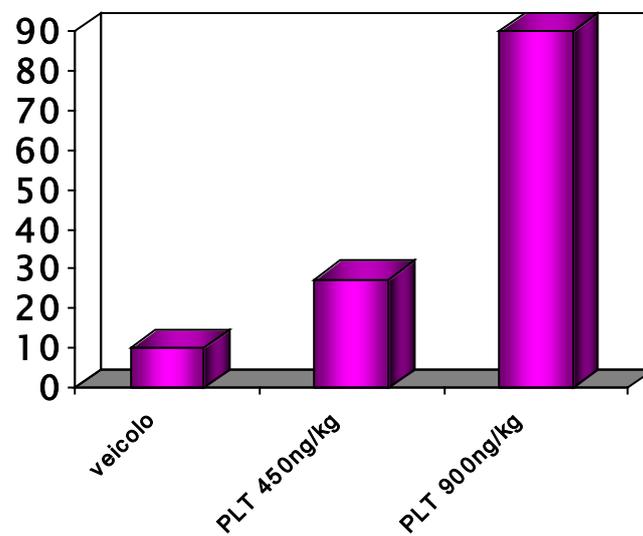
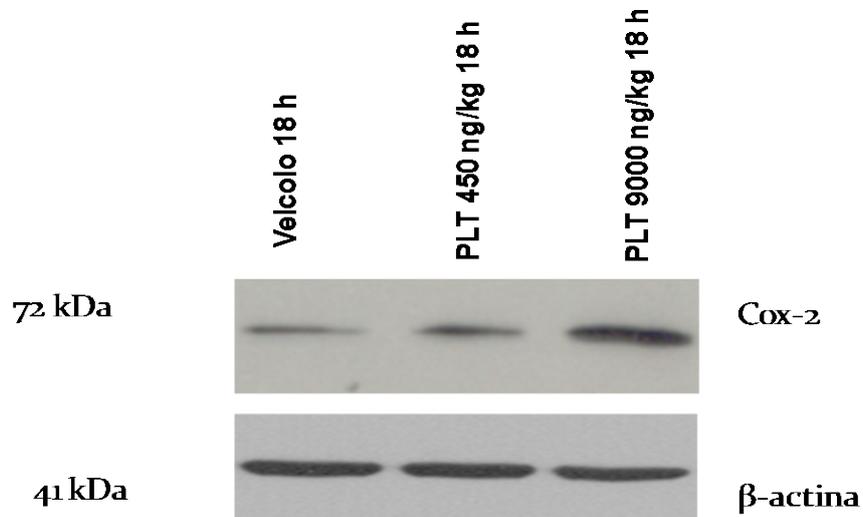


Fig 12: Analisi mediante western-blotting dell'espressione della COX-2

6. Discussioni e conclusioni

I risultati dello studio consentono di poter affermare che:

- Entrambi i sistemi di campionamento utilizzati sono risultati efficaci per il campionamento del bioaerosol marino.
- Il sistema BioSampler in associazione con AirCube COM2, seppur concepito per campionamenti in ambienti *indoor*, bene si presta in condizioni *outdoor* ed è da ritenere preferibile in quanto:
 - la matrice ottenuta, oltre che risultare meno complessa, richiede volumi inferiori di solvente per l'estrazione (in pieno accordo con i principi della green chemistry);
 - il dispositivo risulta di ridotte dimensioni e pertanto di facile trasportabilità e montaggio.
- L'unica biotossina determinata è stata una molecola yessotossina-like. La molecola potrebbe essere la cooliatossina, strettamente correlata alla yessotossina. La presenza di quest'ultima è stata esclusa in quanto non era presente *Prorocentrum lima*, la microalga responsabile della sua produzione, mentre è stata riscontrata la *Coolia monotis*, produttrice appunto di cooliatossina (*Holmes et al 1995*).
- La yessotossina-like è stata determinata in tutte e tre le tipologie di campioni derivanti dai due sistemi di campionamento ma solo relativamente al campione del 18-09-09, in cui è stata riscontrata la maggiore concentrazione di *Ostreopsis ovata* (circa 6.000.000 cell/L).
- Gli studi *in vivo* hanno permesso di documentare in maniera evidente la tossicità a livello polmonare della palitossina somministrata via aerosol: in particolare, l'analisi anatomo-patologica effettuata sugli animali trattati ha mostrato una marcata iperemia a livello polmonare confermata nell'esame istologico da un'elevata infiltrazione ematica; l'analisi mediante western-blotting, ha rivelato come la palitossina sia stata in grado di provocare un aumento dose-dipendente dell'espressione della COX-2, marker di infiammazione.
- Il mancato riscontro analitico di acido domoico, acido okadaiko e palitossina nei campioni analizzati non ci consente di escluderne la presenza; è ipotizzabile che, sperimentando l'uso di una strumentazione analitica differente (rivelatore di massa tipo orbitrap), si potrebbe aumentare di molto la sensibilità del metodo consentendo pertanto determinazioni di biotossine a concentrazioni anche molto basse.
- Il gruppo di lavoro ritiene verosimile che durante il processo di campionamento le molecole possano danneggiarsi e deteriorarsi; sperimentare un processo di campionamento da effettuare ad intervalli regolari ridurrebbe significativamente il possibile stress termico e meccanico delle molecole.
- E' ipotizzabile che l'aver eseguito i campionamenti nel periodo settembre/novembre abbia ridotto la possibilità di riscontro quali-quantitativo delle biotossine rispetto al periodo luglio/settembre in cui, invece, statisticamente si osservano le massime concentrazioni microalgali.
- Di sicuro interesse potrebbero risultare futuri campionamenti in cui si verificano congiuntamente condizioni di forte mareggiata, elevata formazione di bioaerosol e piena fioritura di microalghe tossiche. Ciò al fine di poter espletare ulteriori prove di conferma ed approfondimenti di indagine.

7. Bibliografia

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2008 Jan; 19(1):111-20. Epub 2007 Nov 7.

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Quilliam MA, Tubaro A, Poletti R. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19(14):2030-8.

Fusetani N, Kem W. Marine toxins: an overview *Prog Mol Subcell Biol.* 2009; 46:1-44.

Holmes MJ, Lewis RJ, Jones A, Hoy AW. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae) *Nat Toxins.* 1995; 3(5): 355-62.

Icardi G., Marenzi L. Aspetti epidemiologici – Seminario internazionale “*Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?*” Genova 5 dicembre 2005.

Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobò P., Vernesi C. Characterization of *Ostreopsis ovata* and *Coolia* (dinophyceae) isolates in the western mediterranean sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J. Phycol.* 2005; 41: 212-225.

Poletti R, Milandri A, Pompei M. Algal biotoxins of marine origin: new indications from the European Union. *Vet Res Commun.* 2003 Sep; 27 Suppl 1:173-82.

Linee guida OECD per TGN°O 403 Acute inalation toxicity

Villar-González A, Rodríguez-Velasco ML, Ben-Gigirey B, Botana LM. Toxicon. Lipophilic toxin profile in Galicia (Spain): 2005 toxic episode. 2007 Jun 15; 49(8): 1129-34. Epub 2007 Feb 16.



Gruppo di lavoro:

Dott. Emilio Cellini (Responsabile di progetto)

Dipartimento Provinciale ARPACAL di Crotona – Servizio Laboratoristico Biotossicologico - Via Enrico Fermi snc, loc. Passovecchio – 88900 CROTONE Tel 0962-1875201 Fax 0962 21526 e-mail e.cellini@arpacal.it

Dott.ssa Domenica Ventrice (Coordinatore delle attività di analisi e di ricerca svolte presso il CETA)

Centro d'Eccellenza in Tossicologia Alimentare (CETA) Complesso Nini Barbieri 88021 Roccelletta di Borgia tel 0961-391235 fax 0961-391237 e-mail d.ventrice@arpacal.it

Dott.ssa Francesca Stefanizzi (Responsabile attività di campionamento)

Dipartimento Provinciale ARPACAL di Crotona – Servizio Laboratoristico Biotossicologico - Via Enrico Fermi snc, loc. Passovecchio – 88900 CROTONE Tel 0962-18752100 Fax 0962 21526 e-mail f.stefanizzi@arpacal.it

Dott. Emanuele Vizza (Responsabile attività analitiche)

Centro d'Eccellenza in Tossicologia Alimentare (CETA) Complesso Nini Barbieri 88021 Roccelletta di Borgia tel 0961-391235 fax 0961-391237 e-mail e.vizza@arpacal.it

Dott.ssa Iolanda Sacco (Responsabile studio *in vivo*)

Centro d'Eccellenza in Tossicologia Alimentare (CETA) Complesso Nini Barbieri 88021 Roccelletta di Borgia tel 0961-391235 fax 0961-391237 e-mail i.sacco@arpacal.it

Dott. ssa Valeria Visalli (Responsabile saggi *in vitro*)

Centro d'Eccellenza in Tossicologia Alimentare (CETA) Complesso Nini Barbieri 88021 Roccelletta di Borgia tel 0961-391235 fax 0961-391237 e-mail v.visalli@arpacal.it

Dott.ssa Serafina Oliverio (Predisposizione dei sistemi di campionamento)

Dipartimento Provinciale ARPACAL di Crotona – Servizio Laboratoristico Biotossicologico - Via Enrico Fermi snc, loc. Passovecchio – 88900 CROTONE Tel 0962-18752100 Fax 0962 21526 e-mail s.oliverio@arpacal.it