

# **Il rischio associato alle alghe tossiche marine**

**R. Poletti**

**LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER LE BIOTOSSINE MARINE  
NATIONAL REFERENCE LABORATORY ON MARINE BIOTOXINS**

**(G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)**

**V.le A. Vespucci, 2 - 47042 - CESENATICO (FC) ITALY**

**Tel +39 0547 80278 Fax + 39 0547 75094**

**e – mail: [cerimarine@tin.it](mailto:cerimarine@tin.it)**



# HAB (Harmful Algal Bloom)

Sono circa 5.000 le specie algali identificate, 300 possono essere presenti a concentrazioni tali da colorare l'acqua e 75 possono produrre molecole biologicamente attive (tossine) (Andersen, 1996). Le fioriture algali di specie tossiche vengono comunemente chiamate “maree rosse” o “red tide”.

La comunità scientifica preferisce usare il termine “harmful algal bloom” (HAB), cioè fioritura algale dannosa, per definire i fenomeni associati alla presenza di alghe tossiche e/o dannose (Anderson, 1994; Hallegraeff, 1995). Queste, molte volte, raggiungono densità non superiori alle 100.000 cellule per litro e quindi non in grado di colorare l'acqua.

Le fioriture di alghe tossiche, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate in (Andersen, 1996):

- a. fioriture di specie che provocano soltanto una colorazione dell'acqua con diminuzione della visibilità e della qualità estetica, ed eventualmente morie di pesci e invertebrati acquatici a causa delle conseguenti condizioni di ipossia. Appartengono a questo gruppo soprattutto specie di Dinoflagellati e Diatomee;
- b. fioriture di specie che producono potenti tossine che si accumulano nella catena alimentare che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori). Si tratta per lo più di Dinoflagellate appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum* e di diatomee del genere *Nitzschia*;
- c. fioriture di specie che, nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo ma risultano dannose in vario modo per pesci ed invertebrati. Esempi di queste specie sono: *Gyrodinium aureolum*, *Chaetoceros convolutus*, *Nodularia spumigena*, *Chattonella antiqua*;
- d. fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa (ad esempio, *Gymnodinium breve*).

# **Le Biotossine Marine**

**Le conoscenze acquisite in questi ultimi anni inducono a ritenere che la sintesi delle biotossine marine, chimicamente definite, ha come origine il fitoplancton, il fitobentos ma anche i batteri che attualmente rappresentano uno degli aspetti più importanti e discussi sull'origine di queste molecole. Queste biomolecole manifestano il loro effetto come tali o attraverso le trasformazioni metaboliche che si possono verificare nei vari passaggi della catena alimentare. Le biotossine prodotte dalle alghe (ficotossine) sono quelle numericamente più importanti.**

**Molti ricercatori hanno indirizzato le loro ricerche sulle biotossine marine, non soltanto in quanto rappresentano un serio pericolo per la salute dei consumatori, ma anche attratti dalla straordinaria bioattività:**

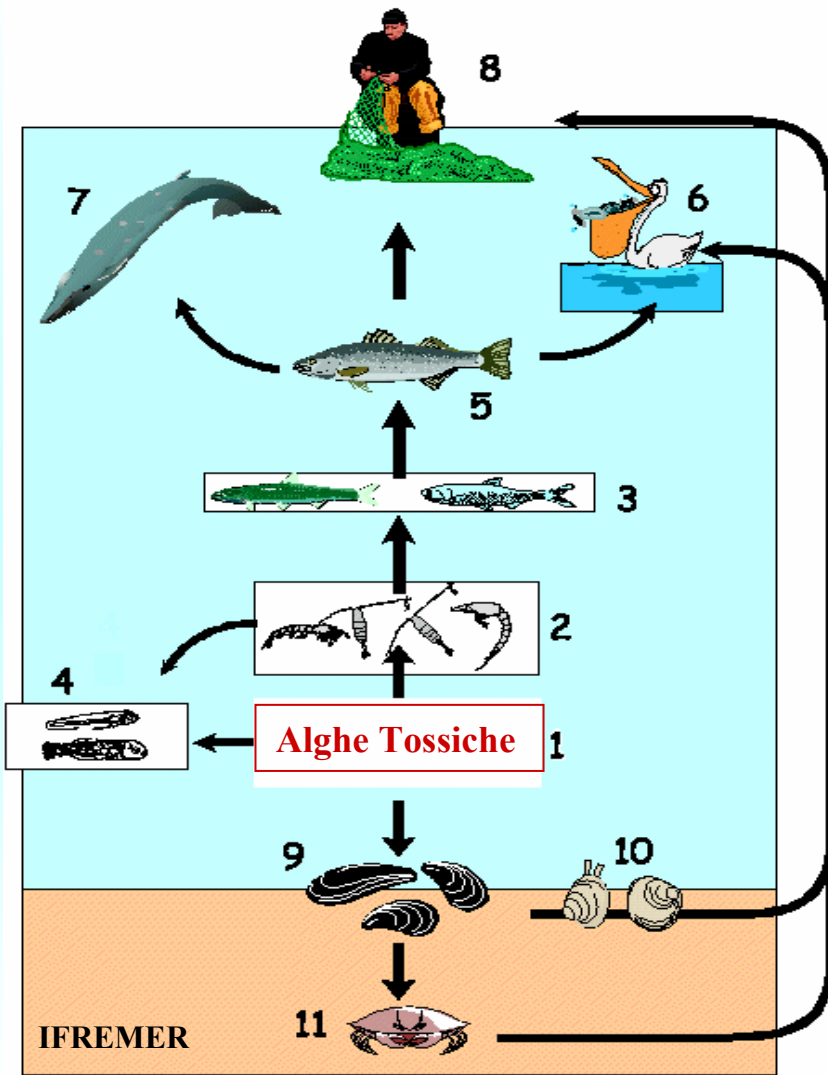
- Il chimico trova in queste molecolari strutture originali e uniche;**
- Il farmacologo per la loro attività citotossica, antitumorale, antifungicida, antibiotica, ecc..;**
- Il biochimico perché vede in questi composti delle importanti chiavi metaboliche utilizzabili per studiare e comprendere meglio le complesse funzioni cellulari con importanti ricadute sulla qualità della vita umana.**

**Le Biotossine Marine sono un gruppo eterogeneo di composti strutturalmente diversi che possono essere raggruppati in relazione alla loro struttura chimica:**

- a) Amminoacidi simili ( ac. domoico ed analoghi);**
- b) Purine derivati (sxitossine ed analoghi);**
- c) Imine cicliche (spirolidi, gymnodimine e pinnatoxin A)**
- d) Polieteri lineari e macrociclici non contenenti azoto (ac. okadaico ed analoghi, pectenotossine, azaspiracido, primnesine);**
- e) Polieteri transfusi (Brevetossine, yessotossine, ciguatossine).**

**Un'ulteriore suddivisione di queste biotossine, molto più grossolana, si basa sulla loro solubilità ai solventi:**

- 1) Biotossine idrosolubili;**
- 2) Bitossine liposolubili.**

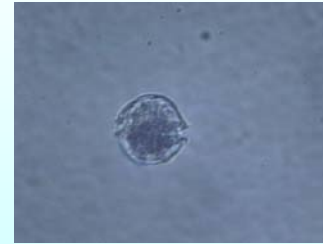


# Biotossine marine

## Produttori

### 1) Tossine idrosolubili

- **PSP** (Paralytic Shellfish Poisoning)



*Alexandrium minutum*  
Halim



*Alexandrium catenella*  
(Whedon & Kofoid) Balech

- **ASP** (Amnesic Shellfish Poisoning)



*Pseudo-nitzschia pungens* Hasle

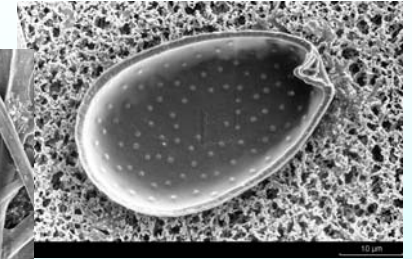
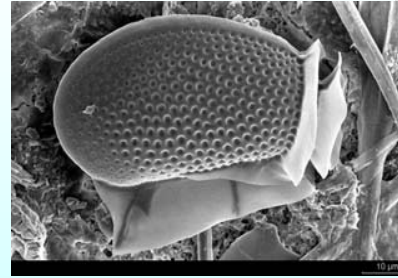
- **TTX** (Sindrome neurotossica da pesce palla)

*Vibrio*  
*Bacillus*  
*Moraxella*

## 2) Tossine liposolubili

## Produttori

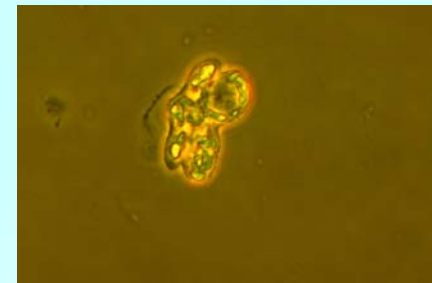
DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning)



*Prorocentrum lima*  
(Ehrenberg) Dodge

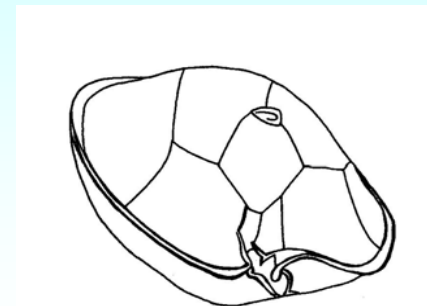
*Dinophysis fortii* Pavillard

NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning)



*Gymnodinium breve* Davis

Ciguatera o CFP



*Gambierdiscus toxicus* Adachi & Fukuyo

• Le biotossine marine, in base alla loro struttura chimica, sono classificate in 8 gruppi (FAO/WHO/IOC workshop, 2004):

- Azaspiracido e AZAs
- Acido Okadaico e DTXs
- Pectenotossina e PTXs
- Brevetossina (NSP- PbTXs)
- Yessotossina e YTXs
- Imine cicliche ●
- Acido Domoico (DA)
- Saxitossina (STX)

- Ciguatossina
- Tetrodotossina
- Palitossina ●



tossine recenti  
ritrovate in Adriatico

# **I Regolamenti CE in applicazione dal 1° gennaio 2006, sono:**

1. **Regolamento (CE) 178/2002** del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare;
2. **Regolamento (CE) 852/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio sull'igiene dei prodotti alimentari;
3. **Regolamento (CE) 853/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale;
4. **Regolamento (CE) 854/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano;
5. **Regolamento (CE) 882/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali;
6. **Regolamento (CE) n. 2074/2005** recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al reg. (CE) n. 853/2004 e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei reg.(CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al reg. (CE) n. 852/2004 e modifica dei reg.(CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004;
7. **Regolamento (CE) n. 2076/2005** che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei regg. (CE) n. 853/2004, (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 e che modifica i regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004.
8. **Regulation (EC) No 1664/2006 of 6 November 2006** amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures.

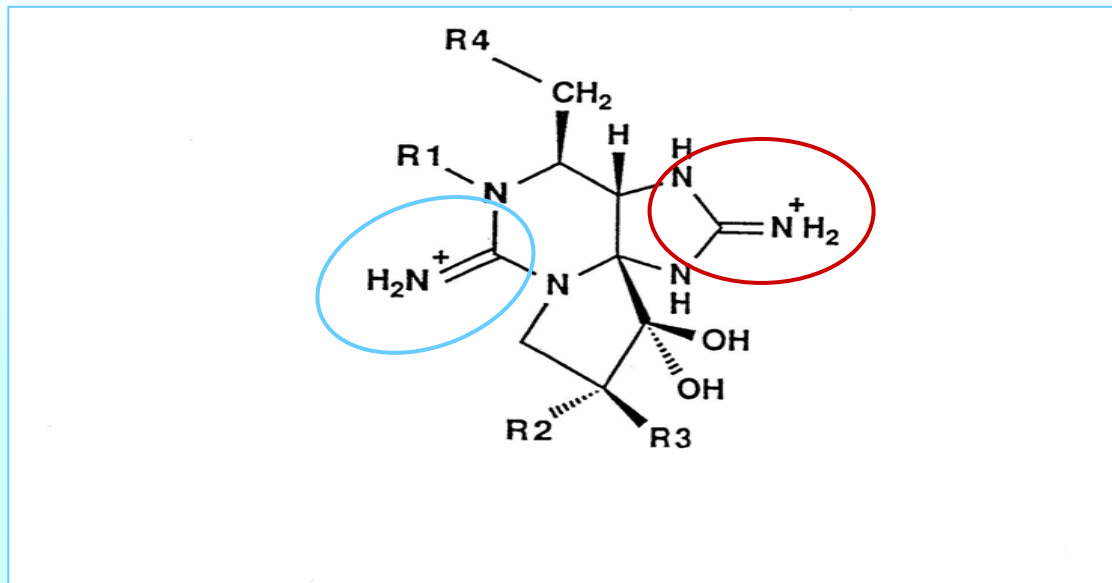
# PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

La Paralytic Shellfish Poisoning è una delle sindromi più studiate e conosciute per le gravi conseguenze che produce nei consumatori di molluschi bivalvi. Le microalghe sono principalmente responsabili di questa sindrome ed appartengono quasi esclusivamente alle Dinoflagellate, ma è documentata anche una origine derivante da batteri simbiotici. I sintomi dell'avvelenamento sono di natura neurologica e nei casi più gravi si arriva alla paralisi respiratoria e alla morte.

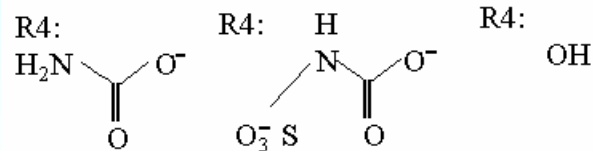
La tossina, che causava la sindrome da PSP, è chiamata saxitossina (STX), nome derivato dalla specie del mollusco bivalve (*Saxidomus giganteus*) dal quale è stata per la prima volta estratta .

# PSP (STXs)

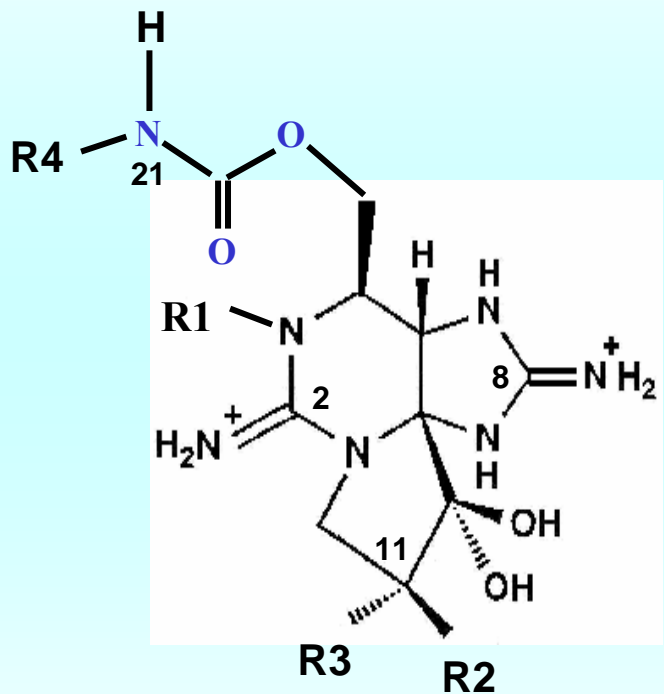
## Struttura chimica delle saxitossine (PSP)



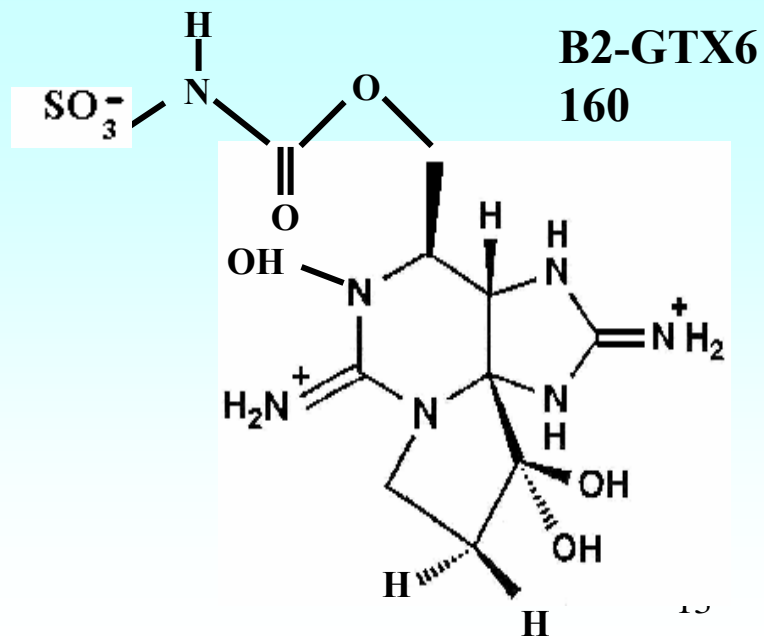
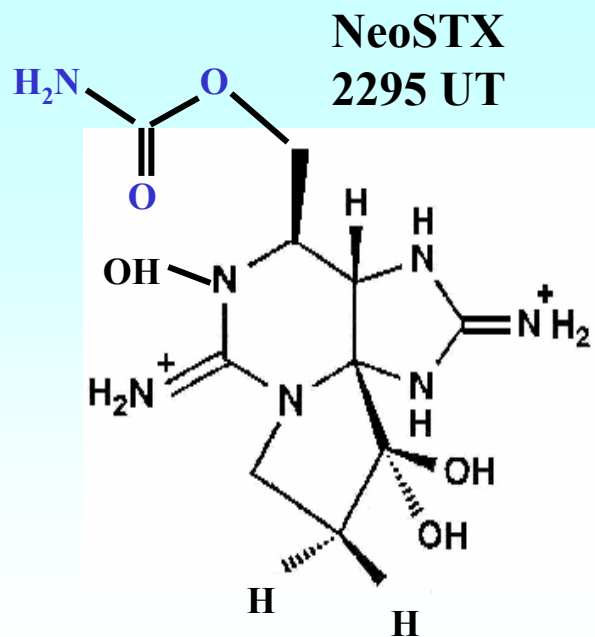
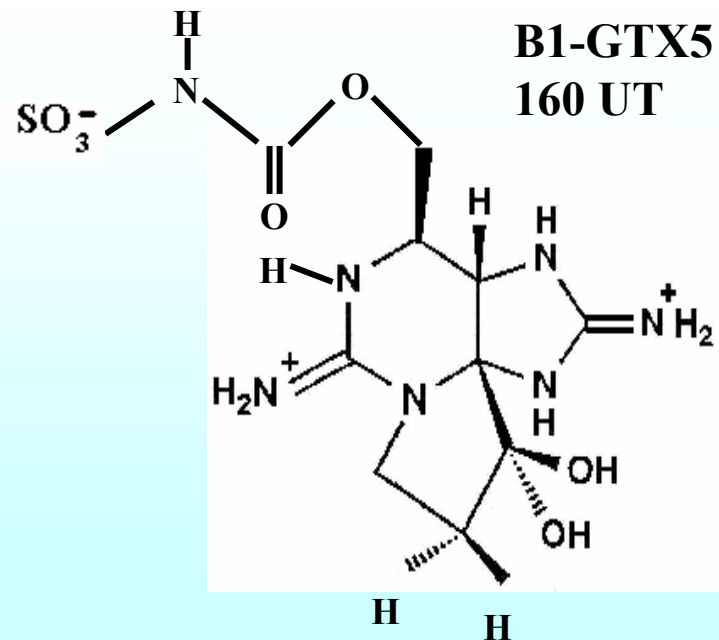
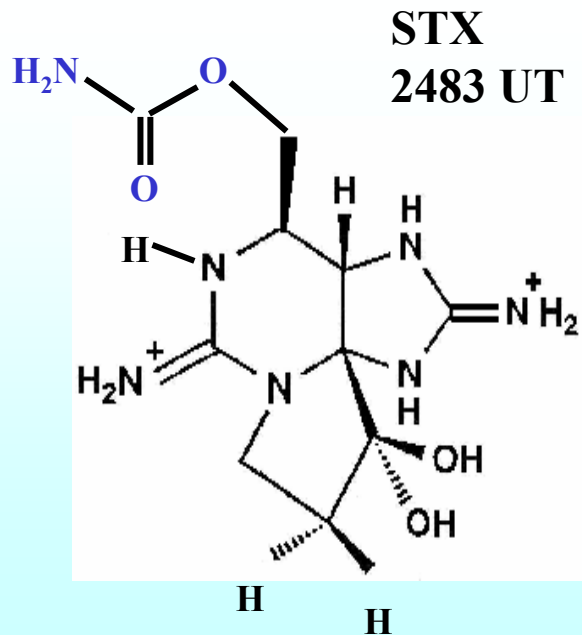
R1	R2	R3	Carbammate	Sulfocarbammate	Decarbammate
H	H	H	STX	B1	dc-STX
OH	H	H	NEO	B2	dc-NEO
OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GTX I	C3	dc-GTX I
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	GTX II	C1	dc-GTX II
H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX III	C2	dc-GTX III
OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX IV	C4	dc-GTX IV



# Saxitossina e analoghi (STXs)



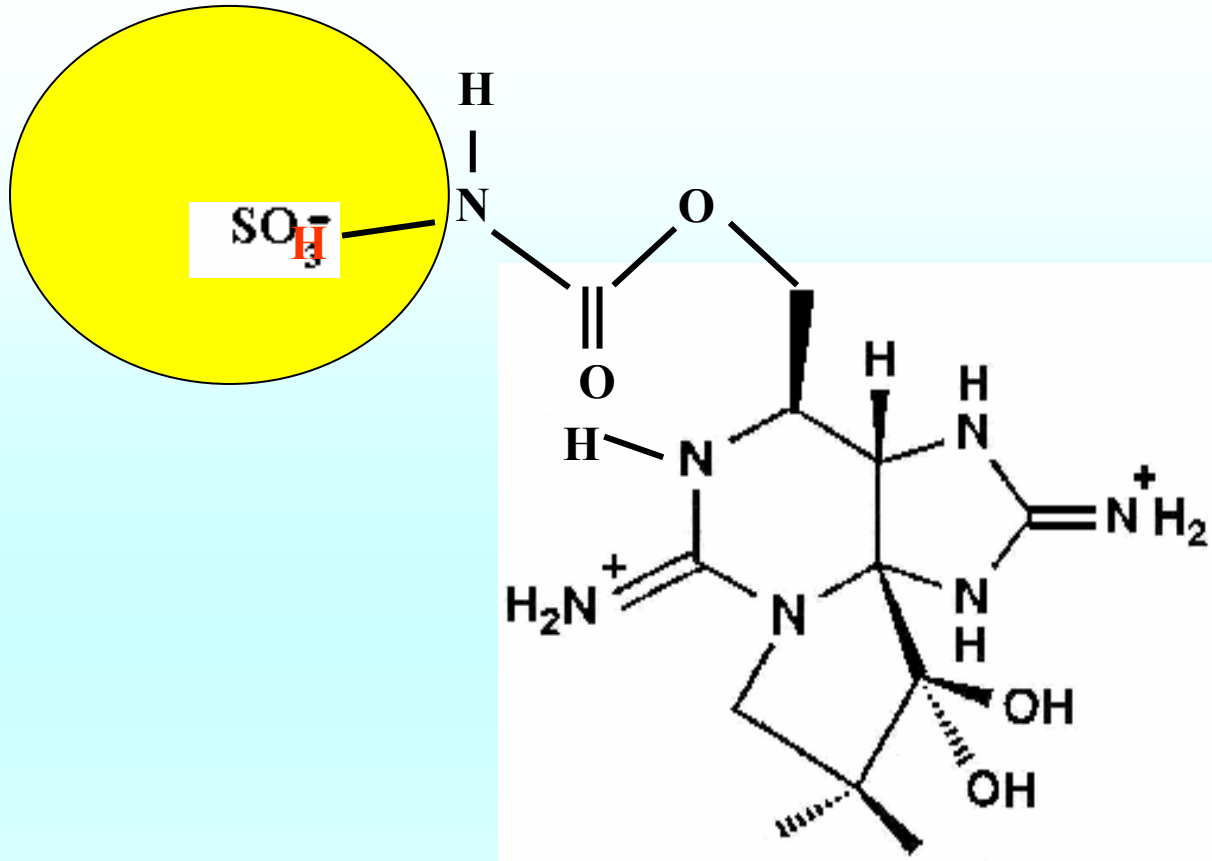
	R1	R2	R3	R4		T.R
1	H	H	H	H	STX	<b>1.000</b>
2	H	H	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	B1	0.064
3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	GTX2	0.359
4	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C1	0.006
5	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX3	0.638
6	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C2	0.096
7	OH	H	H	H	NEO	<b>0.924</b>
8	OH	H	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	B2	0.064
9	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	GTX1	<b>0.994</b>
10	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C3	0.013
11	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	GTX4	0.726
12	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C4	0.057



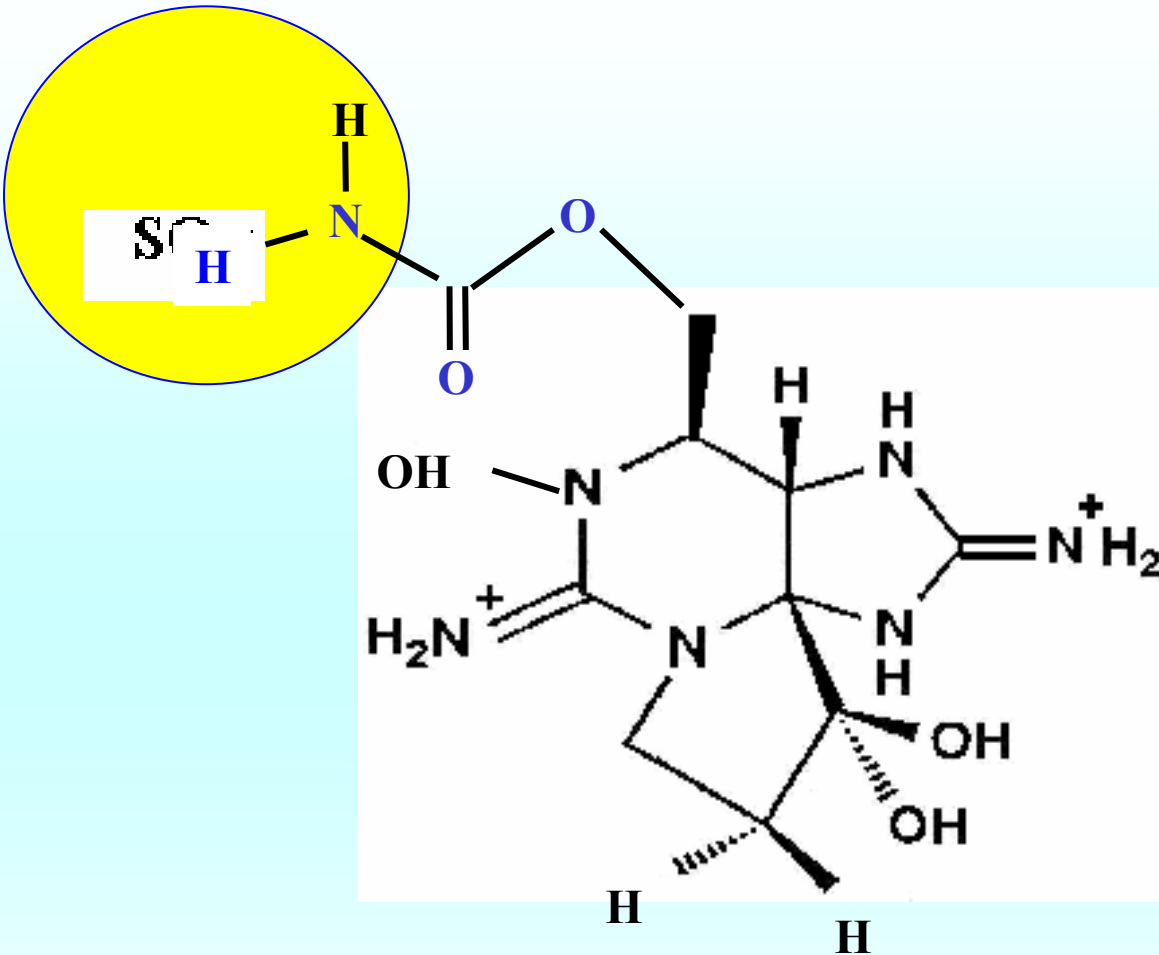
← **Molluschi bivalvi**

**Microalge**

←

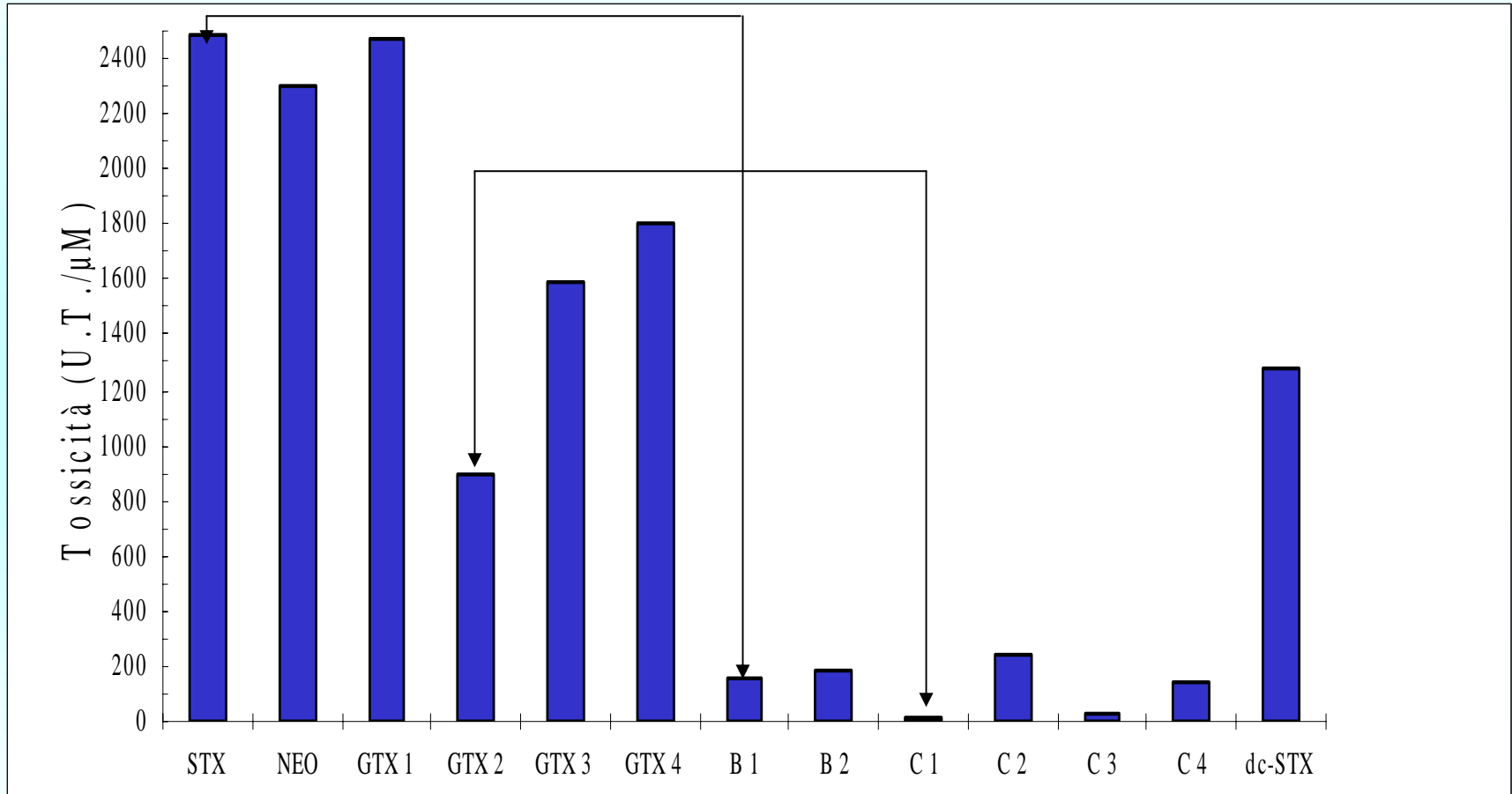


B1-GTX**STX**  
 160 U**2483** UT

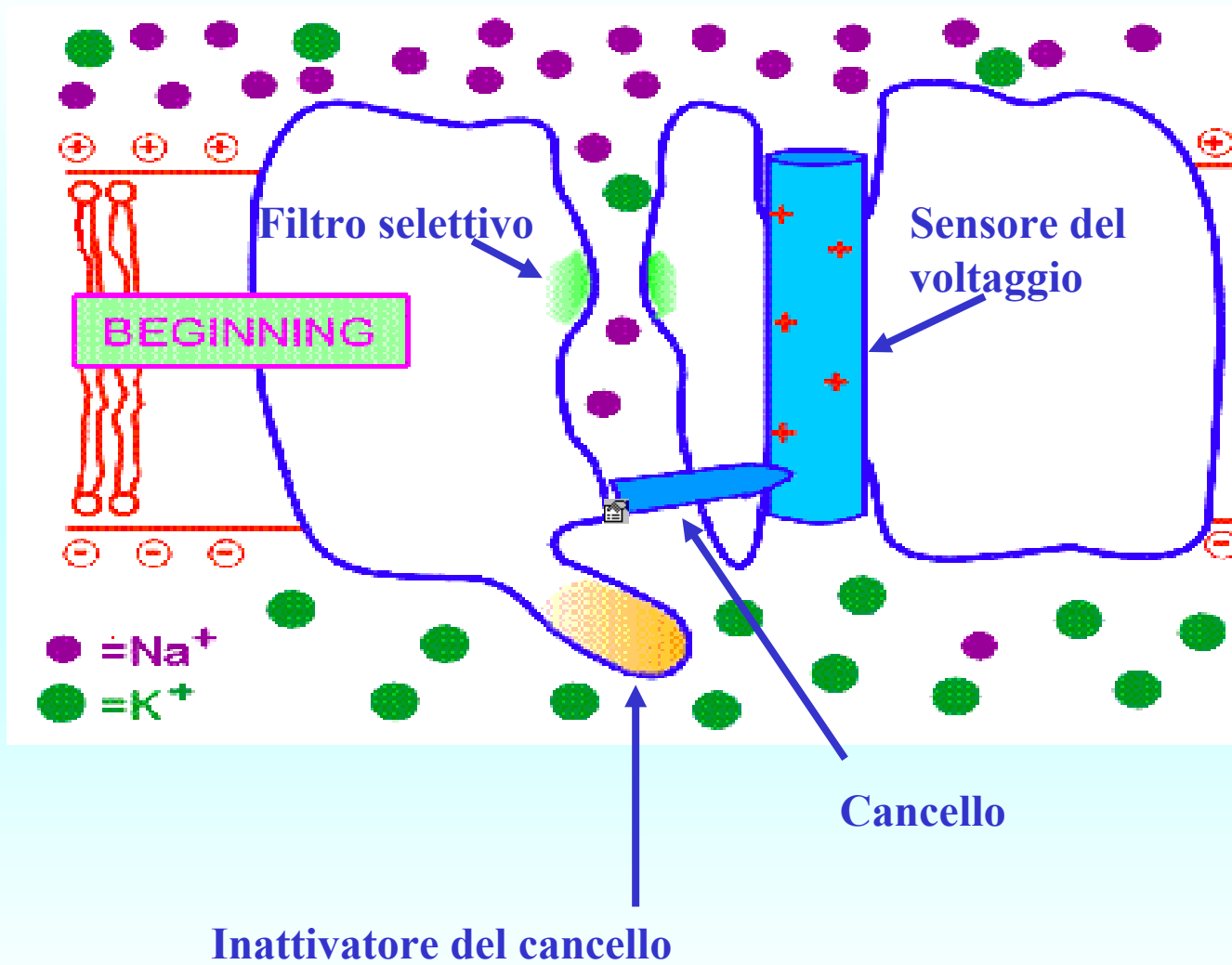


**N B2-GTX6**  
**2 180 UT**

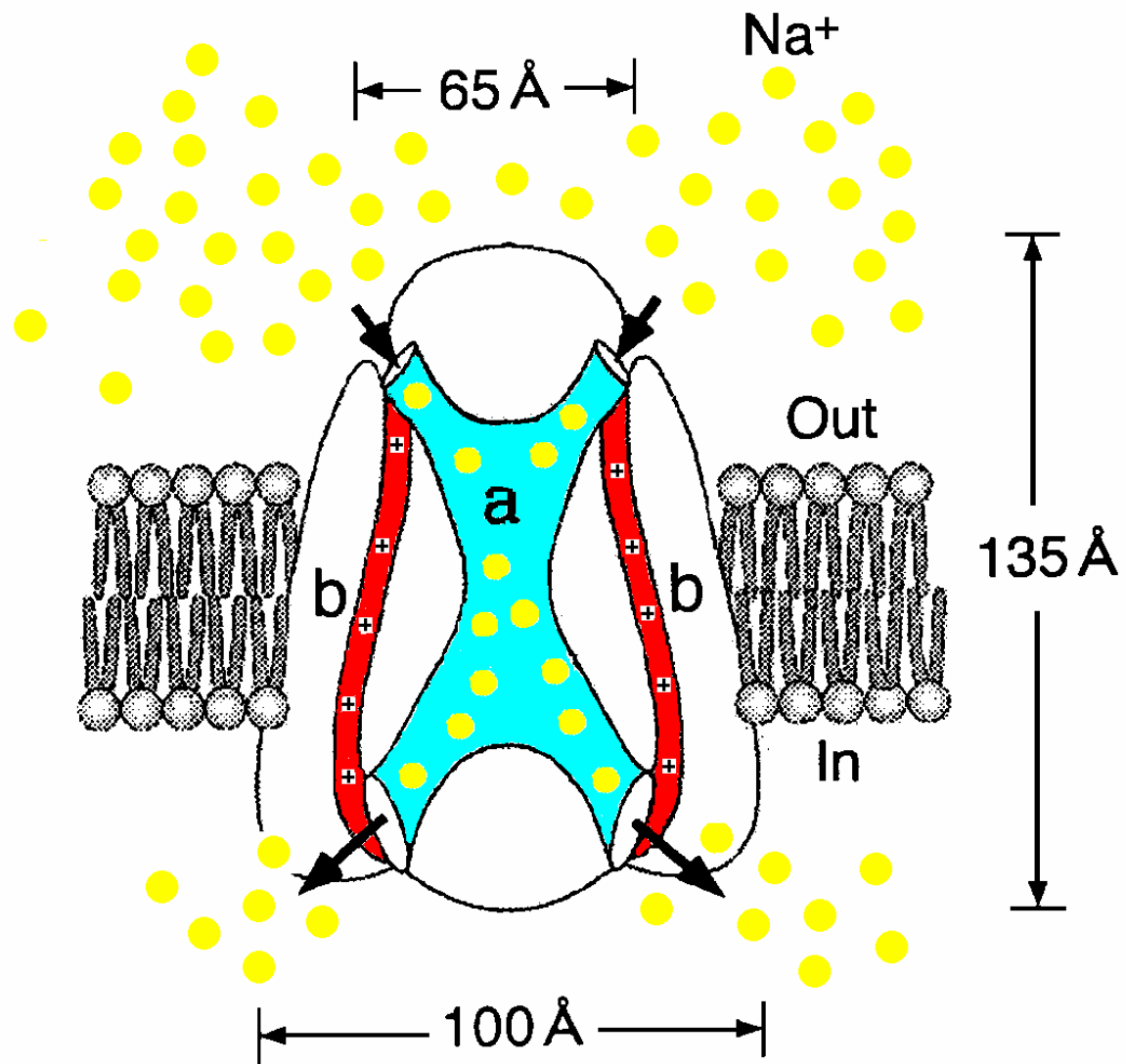
**Tossicità specifica di varie tossine.**  
**Unità Topo (U.T.) è la quantità di**  
**tossina che uccide un topo di 20 g in 15 minuti .**  
**1 UT= 0,18 µg STX**



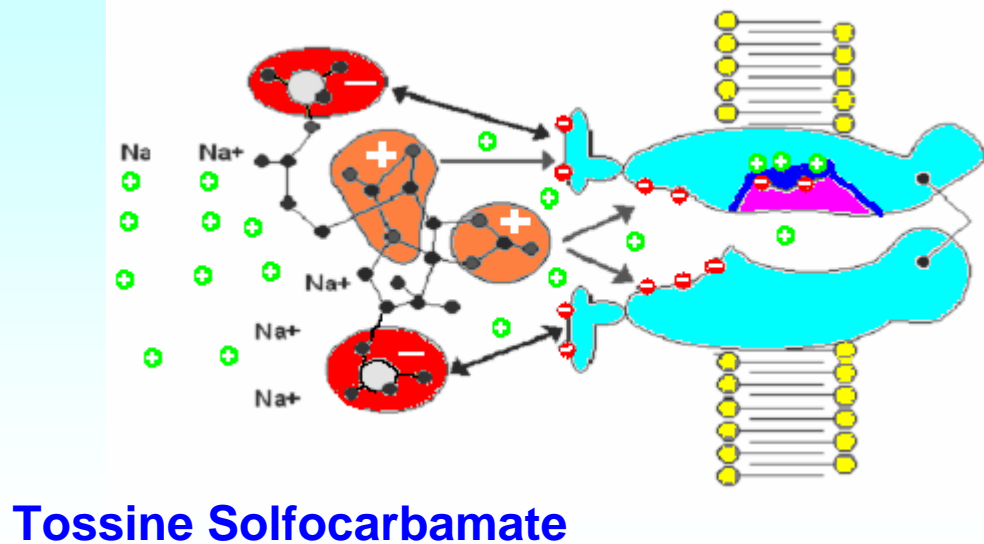
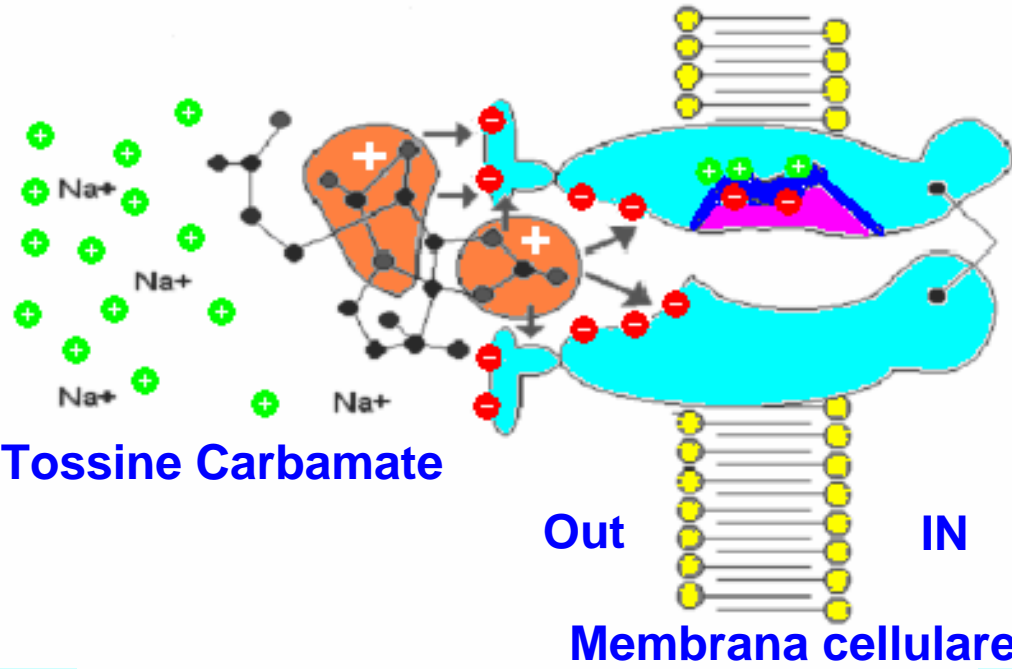
# Canale del Na<sup>+</sup>





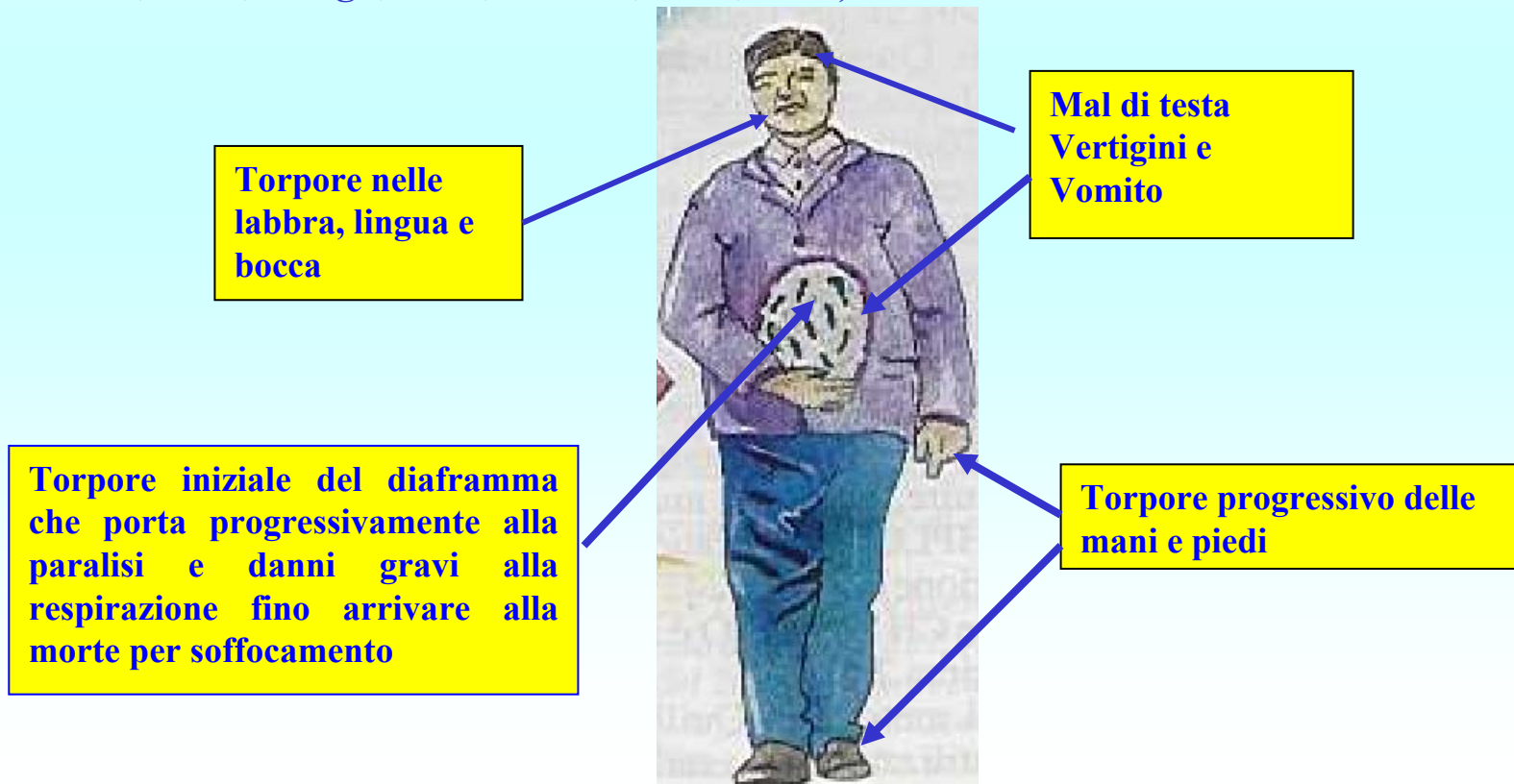


# NECCANISMO D'AZIONE PSP



## Epidemiologia

In certe aree costiere i mitili, altri molluschi bivalvi e anche crostacei e pesci planctofagi diventano tossici sporadicamente o costantemente in alcuni mesi dell'anno e producono nell'uomo una sindrome neurotossica, conosciuta come PSP. I sintomi da PSP di solito insorgono nei 30 minuti che seguono l'ingestione di molluschi bivalvi con parestesie alla bocca, labbra, lingua, all'estremità degli arti, profonda astenia muscolare, impossibilità a mantenere la stazione eretta, andatura atassica, perdita dell'equilibrio. Nei casi fatali la morte avviene dopo 3-12 ore per paralisi respiratoria. I pazienti che superano le prime 12 ore di solito si riprendono rapidamente senza effetti secondari (Steidinger e Baden, 1984; WHO, 1984; Krogh, 1987; Viviani, 1981, 1992).



## I sintomi da PSP rilevati in Alaska su 143 casi, dal 1973 al 1994,

Sintomi	N°persone	%
<b>Parestesia facciale (formicolio della pelle)</b>	<b>113</b>	<b>79</b>
<b>Torpore delle labbra</b>	<b>64</b>	<b>45</b>
<b>Formicolio delle labbra</b>	<b>61</b>	<b>43</b>
<b>Nausea</b>	<b>45</b>	<b>31</b>
<b>Torpore nelle estremità degli arti</b>	<b>43</b>	<b>30</b>
<b>Formicolio nelle estremità degli arti</b>	<b>39</b>	<b>27</b>
<b>Vomito</b>	<b>34</b>	<b>24</b>
<b>Debolezza</b>	<b>33</b>	<b>23</b>
<b>Atassia (immobilità)</b>	<b>32</b>	<b>22</b>
<b>Respiro breve</b>	<b>29</b>	<b>20</b>
<b>Vertigini</b>	<b>28</b>	<b>20</b>
<b>Sensazione di volare</b>	<b>24</b>	<b>17</b>
<b>Secchezza della bocca</b>	<b>23</b>	<b>16</b>
<b>Diplopia (visione doppia)</b>	<b>19</b>	<b>13</b>
<b>Disartria (difficoltà nel parlare)</b>	<b>16</b>	<b>11</b>
<b>Diarrea</b>	<b>10</b>	<b>7</b>
<b>Disfagia (difficoltà a deglutire)</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>Paralisi degli arti</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

# Tossicità acuta in animali

## Somministrazione della tossina

Nel TOPO	LD <sub>50</sub> µg /kg di p.c.
Orale	250 – 263
Intraperitoneale	9,0 - 11,6
Intravenosa	2,4 - 3,4

## Somministrazione orale

Ratto	192 – 212
Scimmia	277 - 800
Gatto	254 - 280
Coniglio	181 - 200
Cane	180 - 200
Guinea pig	128 – 135
Piccione	91 - 100

## **Tossicità umana**

**I primi casi europei di sindrome paralitica da bivalvi furono descritti nel 1885 (Salkowski, 1885). Dal 1920 al 1984 in Europa sono stati diagnosticati 238 casi di PSP con 5 morti. Gli episodi più gravi si sono manifestati nel Regno Unito (78 casi) nel 1968 (Krogh, 1987), nel 1976 in Spagna ed Europa occidentale, di cui 38 in Italia per cozze spagnole importate dai Rias della Galizia (Viviani e coll., 1977; Viviani e coll., 1978 a; Lüthy, 1979).**

## Casi di avvelenamento

I casi di avvelenamento registrati in Europa si sono verificati con concentrazioni di tossina variabili da **144 a 1600**  $\mu\text{g}$  di STX eq./persona, mentre quelli mortali dai **300 ai 1660**  $\mu\text{g}$  di STX eq./persona.

In Canada persone accusavano sintomi con **360**  $\mu\text{g}$  STX eq./persona, mentre altre, nello stesso momento, pur avendo ingerito **2340**  $\mu\text{g}$  STX eq./persona non accusavano nessun sintomo.

Il LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) è stimato per un adulto (60 kg) in circa **120**  $\mu\text{g}$ .

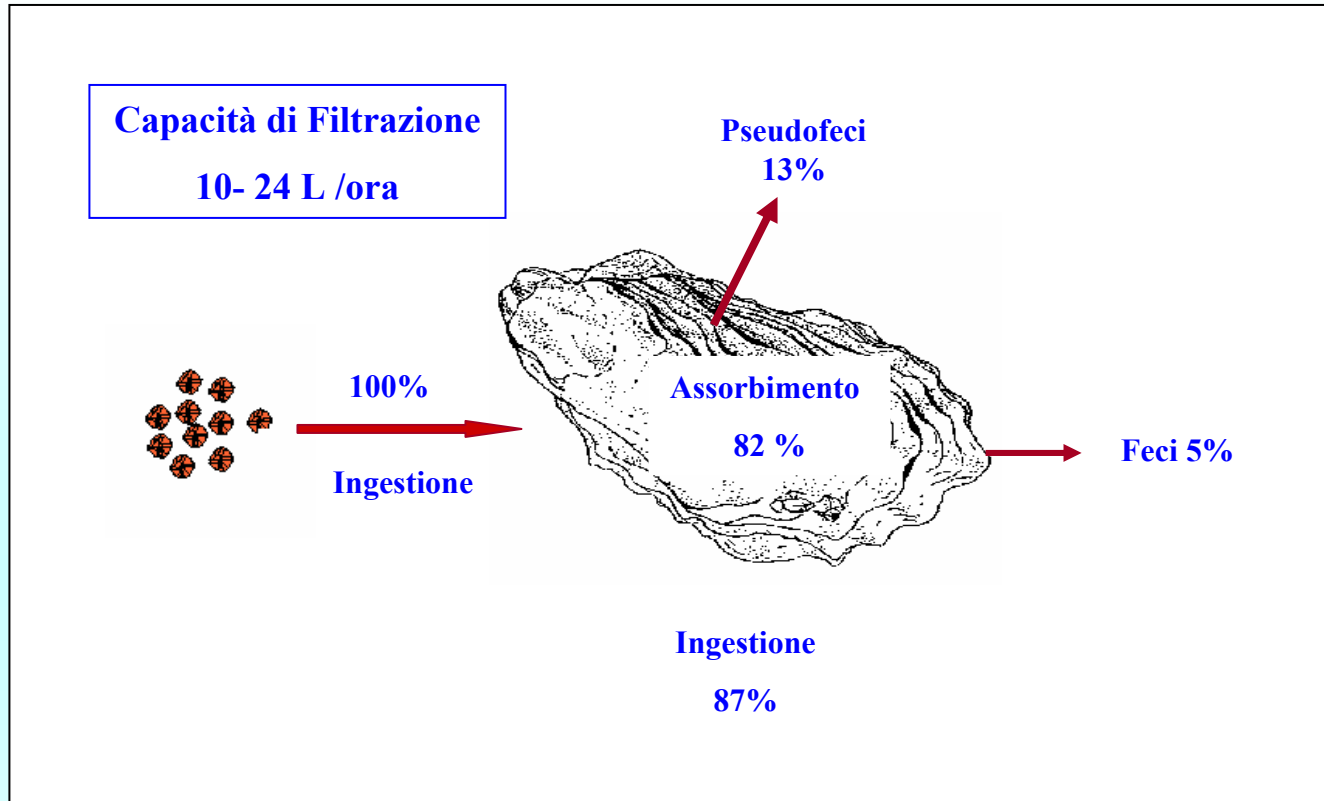
## STX

**Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**

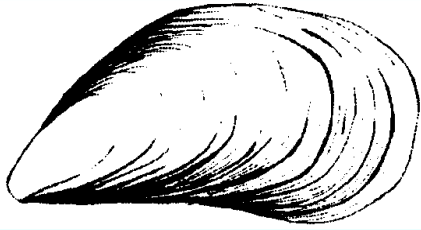
Sulla base del LOAEL di 2 µg STX /kg p.c., utilizzando un fattore di sicurezza di 3 l'ARfD è stata calcolata in 0,7 µg/Kg p.c. (42 µg/Persona)

### Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

<b>Grammi di Parte edibile assunta</b>	<b>Limite Guida µg/kg p.e.</b>	<b>Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>420</b>	<b>800</b>
<b>250</b>	<b>170</b>	
<b>380</b>	<b>110</b>	

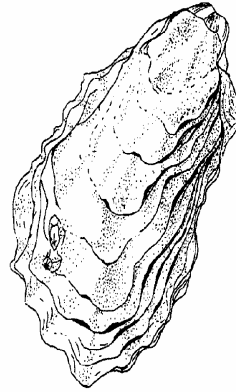


Durante una fioritura di alghe tossiche un Mitile può accumulare  
9.000  $\mu\text{g}$  di STX



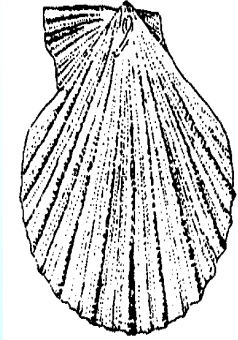
*Mytilus edulis*

20.000  $\mu\text{g}$  STX/100g p.e.



*Crassostrea gigas*

910  $\mu\text{g}$  STX/100g p.e.



*Chlamis*

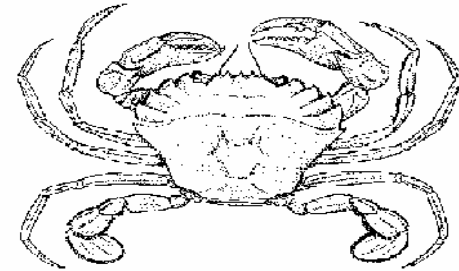
11.945  $\mu\text{g}$  STX/100g p.e.



*Buccinum undatum*

*Ghiandola digestiva* 77.840  $\mu\text{g}$ /Kg p.e.

*Altri tessuti* 400  $\mu\text{g}$ /Kg p.e.



*Zosimus aeneus*

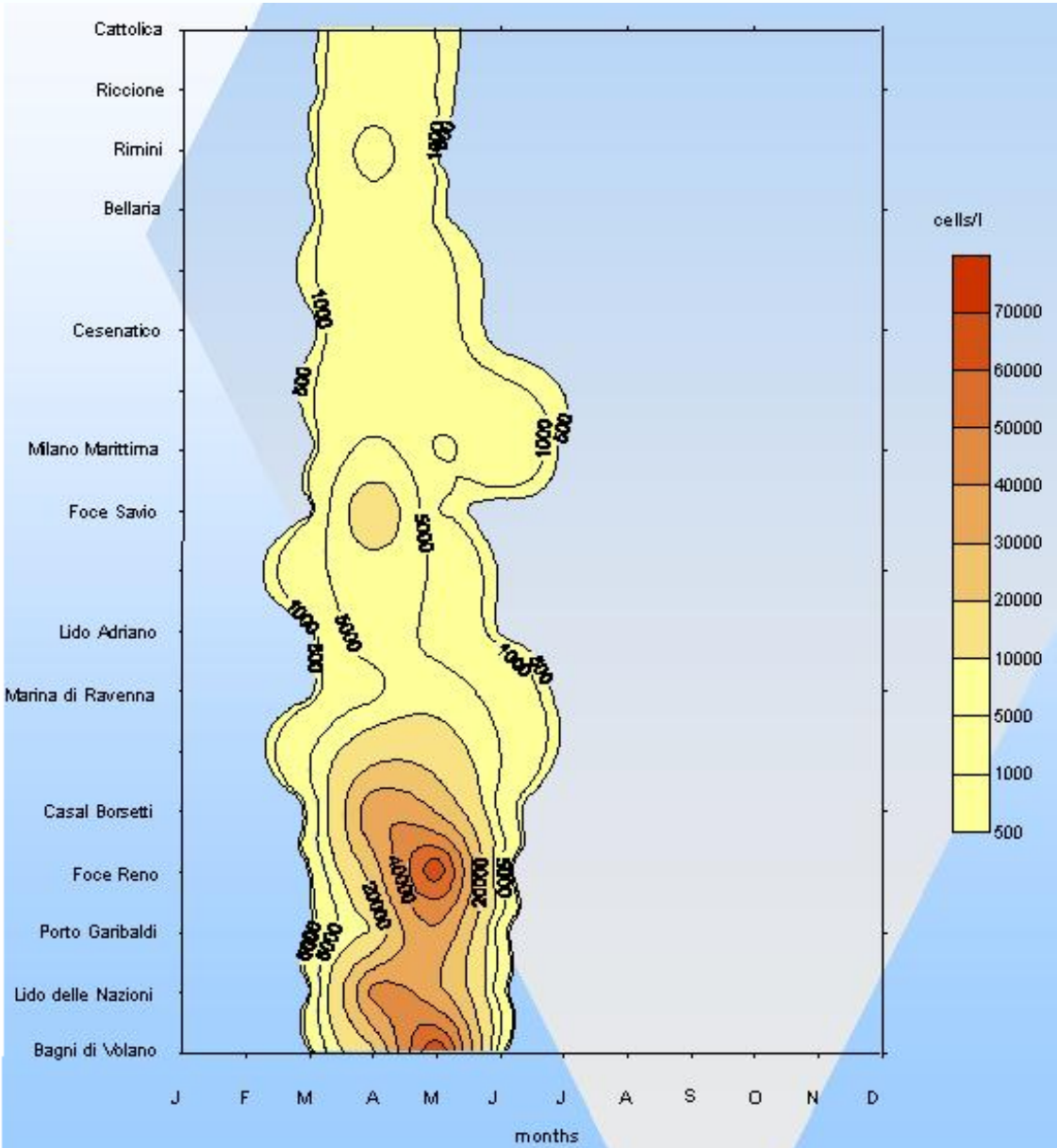
2.970  $\mu\text{g}$  STX/g p.e.

PSP MESI POTENZIALMENTE A RISCHIO	
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	● ● ●
Maggio	● ● ● ●
Giugno	● ● ●
Luglio	● ●
Agosto	●
Settembre	●
Ottobre	●
Novembre	●
Dicembre	●

## Capacità fisiologica di accumulo delle biotossine marine PSP

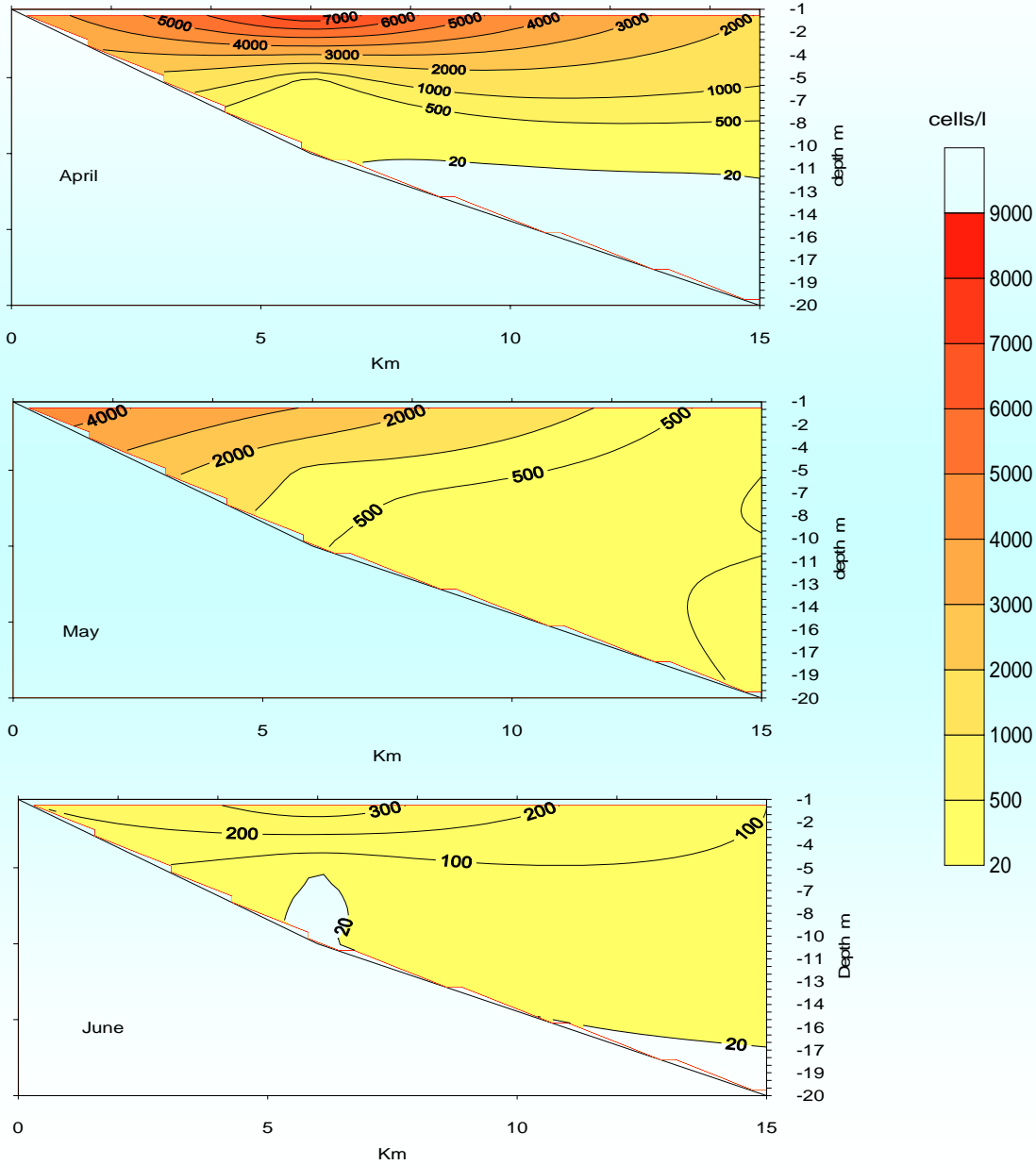
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	● ● ● ● ●
<i>Donax trunculus</i>	● ● ●
<i>Tapes philippinarum</i>	● ●
<i>Callista chione</i>	●
<i>Cardium sp.</i>	●
<i>Chamelea gallina</i>	●
<i>Chlamys sp.</i>	●
<i>Crassostrea gigas</i>	●
<i>Pecten jacobaeus</i>	●

Seasonal trend of *Alexandrium* spp. (cells/L) along the Emilia- Romagna coast (Adriatic Sea)  
1994

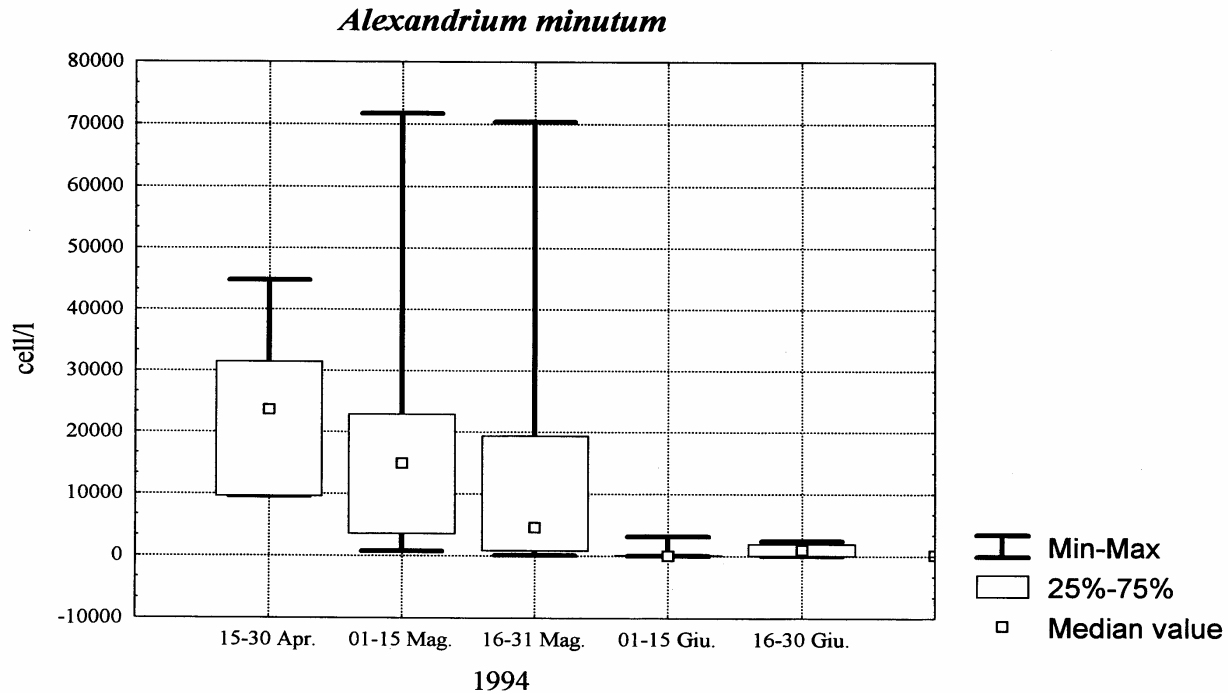


# Vertical distribution of *Alexandrium* spp. (cells/L) along transect of Adriatic Sea (Emilia-Romagna coast)

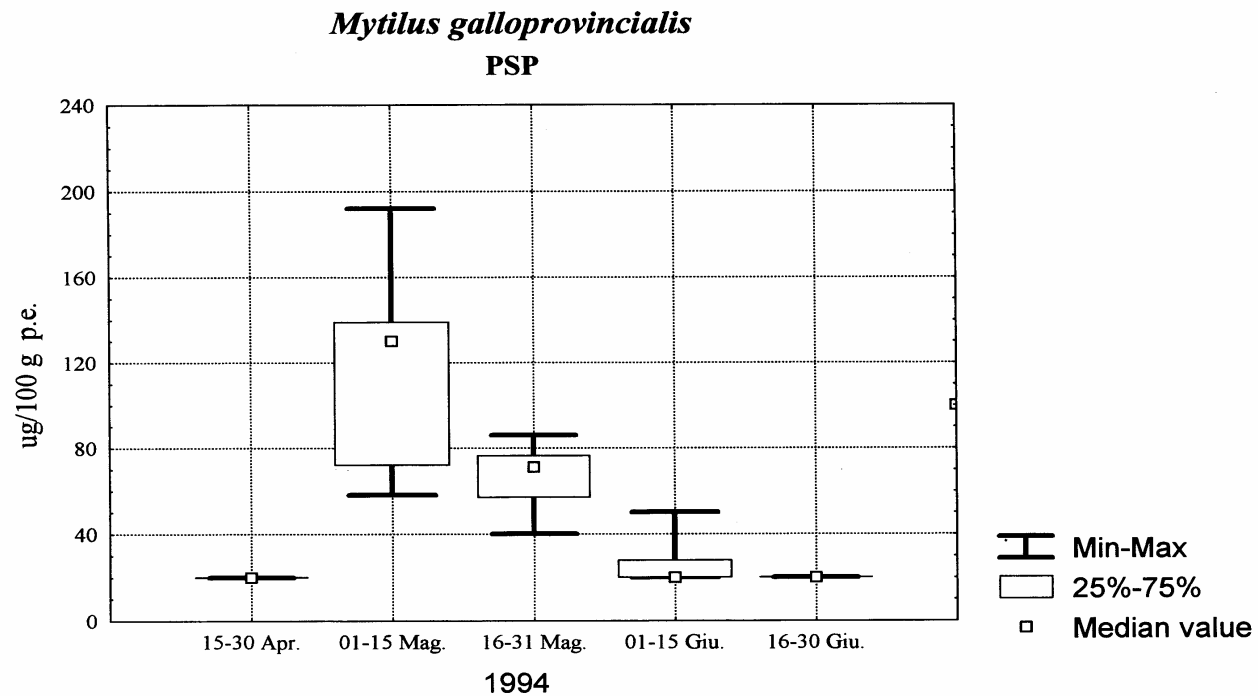
1994



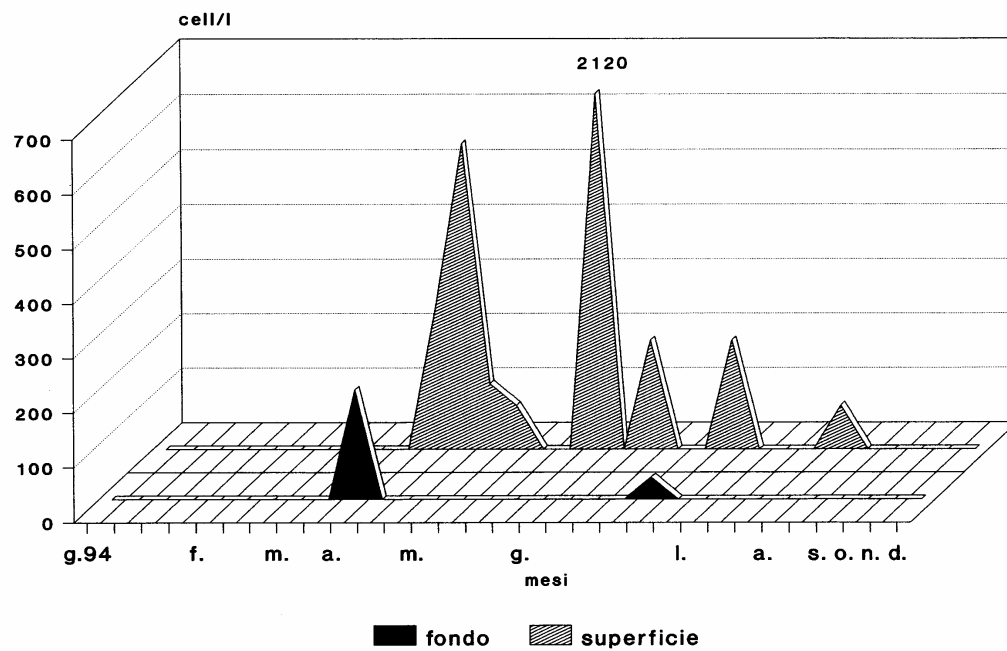
# Primo caso di PSP: costa dell'Emilia-Romagna 1994



# Primo caso di PSP: costa dell'Emilia-Romagna 1994

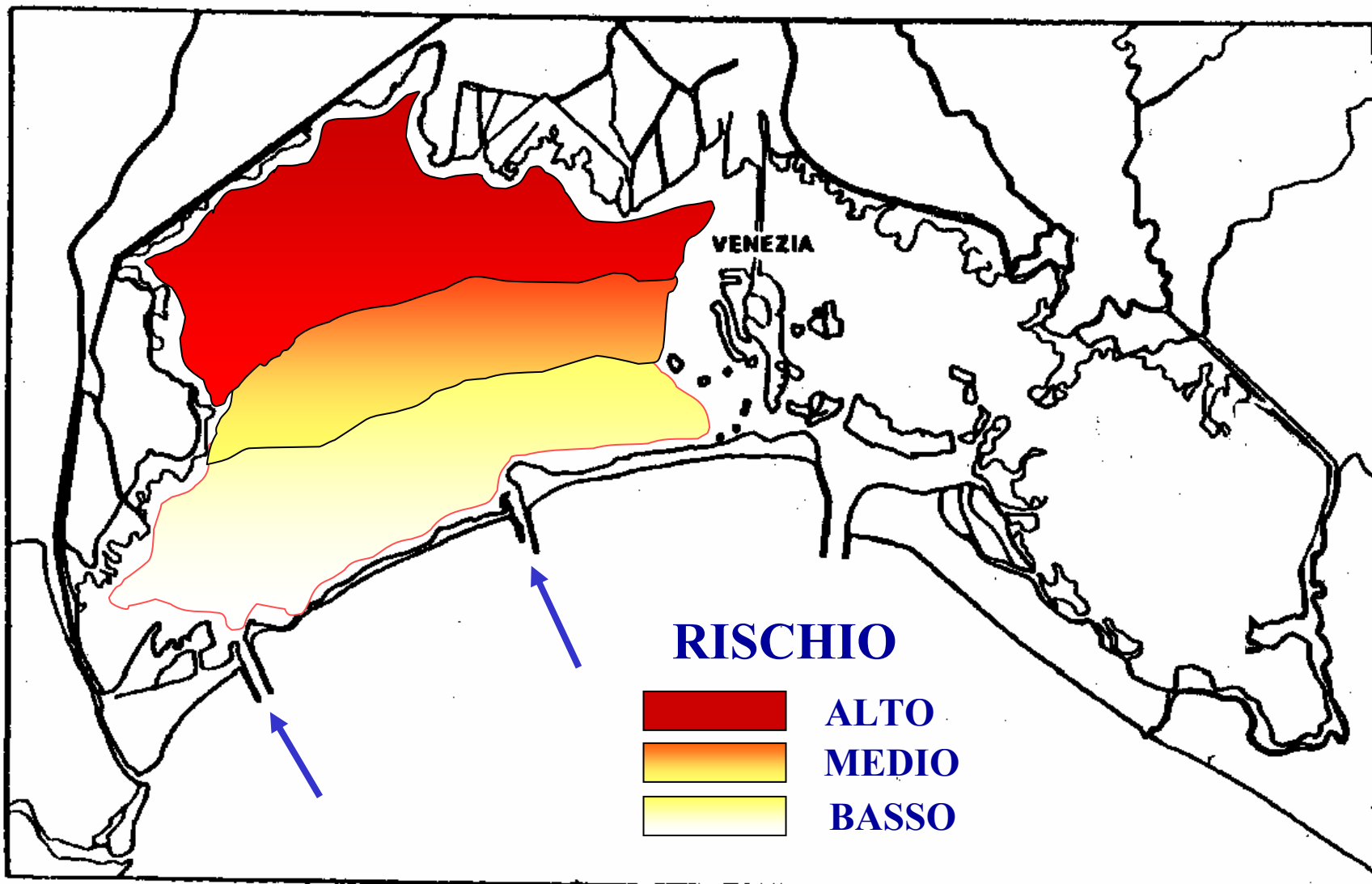


# Alexandrium spp

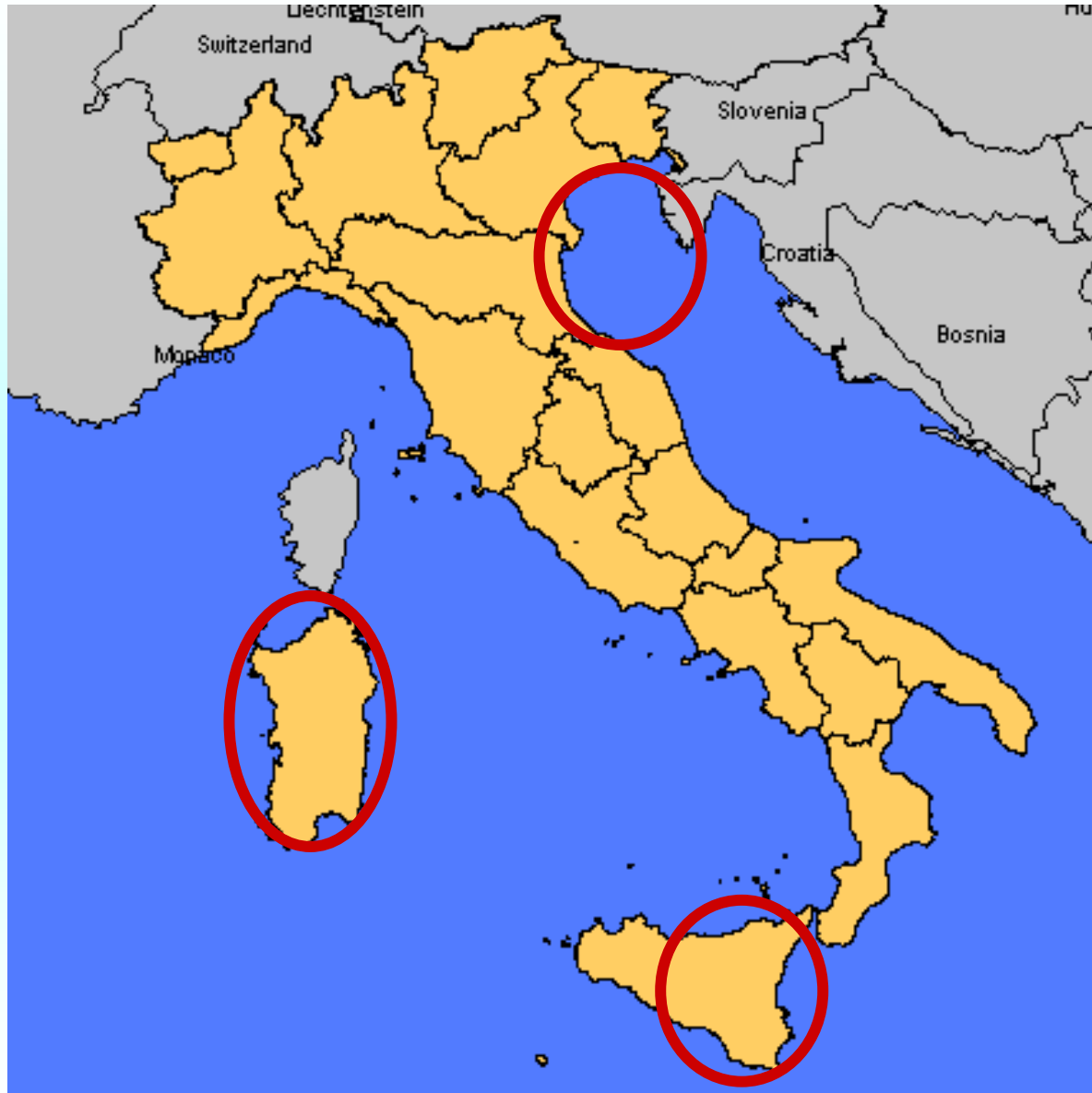


# ALLEVAMENTI DI MITILI IN LAGUNA: POTENZIALE RISCHIO

PSP



## PSP: aree ad alto rischio potenziale



# PSP in Mediterraneo

## Contaminazione di molluschi per bloom di: *Gymnodinium catenatum*

- nel Mare di Alboran (Spagna) 1987
- in Marocco 1994

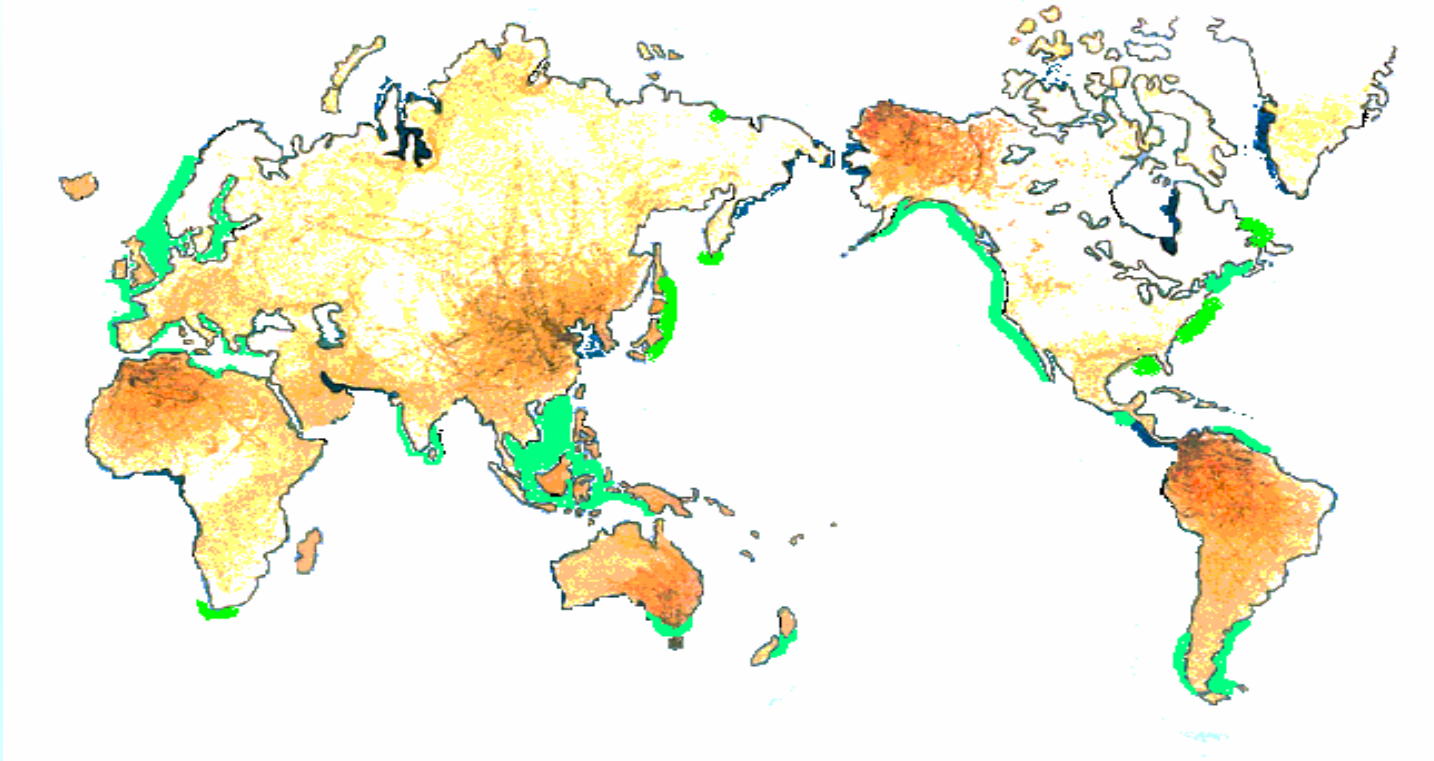
### *Alexandrium minutum*

- coste spagnole 1989
- Baia di Tolone 1990
- Emilia Romagna 1994
- Albania 1994
- Croazia 1995

### *Alexandrium catenella*

- Laguna di Thau (Francia)
- Olbia (Sardegna) dal 2002
- Oristano (Sardegna) dal 2006
- Sicilia dal 2007

# Incidenti di PSP



**Dal 1976 al 1983 sono stati registrati nel mondo più di 400 casi di PSP, 27 sono stati i casi mortali.**

**Venezuela 1977 : persone intossicate 256 con 10 casi mortali**

**Guatemala 1987 : persone intossicate 187 con 26 casi mortali**

**Patagonia 2002: due pescatori sono morti entro le 4 ore per aver mangiato 7-8 Mitili**

**SUBSECRETARIA DE SALUD**

El Cólera ingresó al país.  
Durante un año evitamos que llegara  
a Tierra del Fuego.

**Colabore para mantenernos libres  
de Cólera.**

La higiene es la mejor defensa.  
Ante la presencia de diarrea consulte  
inmediatamente al médico, en:

**HOSPITAL REGIONAL USHUAIA**  
12 de Octubre y Maipú — Tel. 21441  
**HOSPITAL REGIONAL RIO GRANDE**  
Belgrano 350 — Tel. 23222

Cholera is now in Argentina.  
It was possible to keep it out of  
Tierra del Fuego for a year.

**We need your help to keep  
our province free of cholera.**

Hygiene is the best defense.  
In case of diarrhoea see a doctor  
immediately in:

**HOSPITAL REGIONAL USHUAIA**  
12 de Octubre st. and Maipú Ave. Tel. 21441  
**HOSPITAL REGIONAL RIO GRANDE**  
350 Belgrano st Tel. 23222

**PROVINCIA DE TIERRA DEL FUEGO**

# ¡ALERTA!

## Zona de Marea Roja

Está prohibida la recolección de moluscos  
bivalvos (mejillones, berberechos, ostras,  
vieyras, cholgas, etc.), caracoles  
marinos y picorocos.

**ESTAN CONTAMINADOS**

**Provocan intoxicación mortal en pocos  
minutos.**

# ¡WARNING!

**RED TIDE  
PARALYSING SEA POISON  
(P.S.P.)**

It is prohibited collecting bivalve mollusks  
(common mussels, oysters, large mussels, etc.)  
whelk and great barnacle.

**CONSUMPTION CAUSES LETHAL  
INTOXICATION IN A FEW MINUTES**

## ASP (Amnesic Shellfish Poisoning)

Nel 1987 a Prince Edward Island, in Canada, si manifestarono 250 casi di intossicazione, di cui quattro mortali, dovuta alla ingestione di mitili tossici (*Mytilus edulis*) durante una fioritura di Diatomee (*Nitzschia pungens* Grunow forma *multiseries*). I sintomi della biointossicazione includevano:

- Nausea 77%;
- Vomito 76%;
- Crampi addominali 50%;
- Diarrea 42%;
- Mal di testa 43%;
- Perdita della memoria 25%.

Nei casi più gravi:

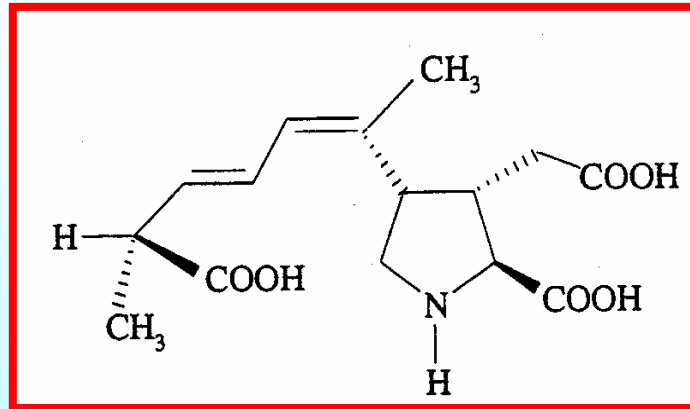
- Confusione e Disorientamento 100 %;
- Mutismo 92 %;
- Coma 75 %.

Per questa nuova tossina contenuta nei molluschi bivalvi fu proposto il termine di Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). La tossina presente nei molluschi bivalvi era l'acido domoico, un amminoacido, neuroeccitatore, relativamente raro che agisce sui siti della memoria (ippocampo).

Il maggior costituente dell'ASP è l'acido domoico, un amminoacido tricarbossilico isolato per la prima volta negli anni 50' *Chondria armata* macroalga rossa. L'acido domoico è solubile in acqua, in acidi e alcali diluiti, scarsamente solubile in metanolo ed etanolo, insolubile in etere di petrolio e benzene.



# ASP (ADs)



**Distribuzione**

L'acido domoico è stato trovato in microalghe e molluschi bivalvi in: Asia, Europa, Nord e Sud america, Oceania.

**Assorbimento**

La dose di AD assorbita è il 5-10% di quella ingerita.

**Distribuzione**

La massima penetrazione è nel sangue, c'è scarsa

**Metabolismo**

penetrazione, in condizioni normali, della barriera

**Escrezione**

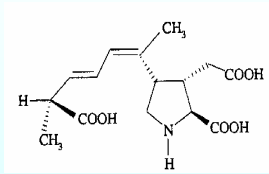
emato-encefalica. AD non sembra essere metabolizzato

e la secrezione avviene prevalentemente attraverso le

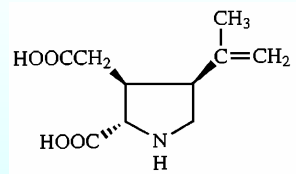
urine. Il tempo di dimezzamento della tossina in

scimmie è di 20-140 minuti.

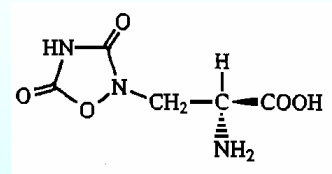
## AGONISTI SELETTIVI



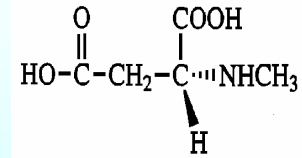
Acido domoico



Kainato

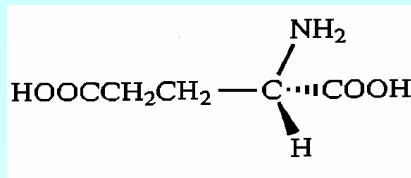


Quisqualato

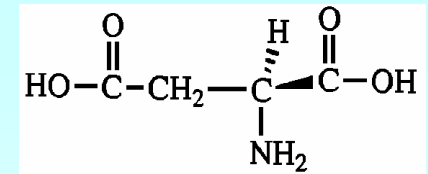


N-metil-D-Aspartato (NMDA)

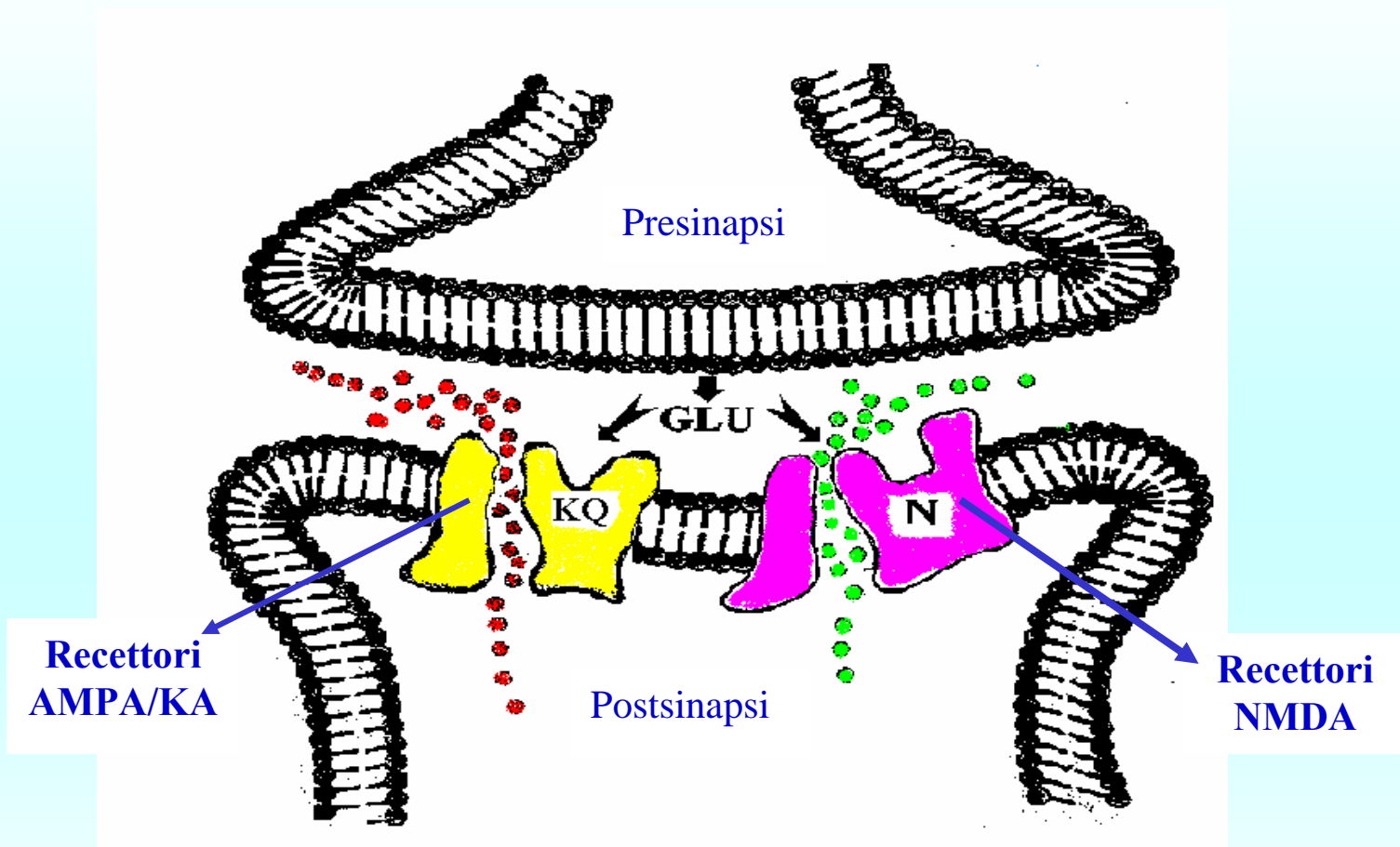
## AGONISTI ENDOGENI



L-glutammato



L- aspartato

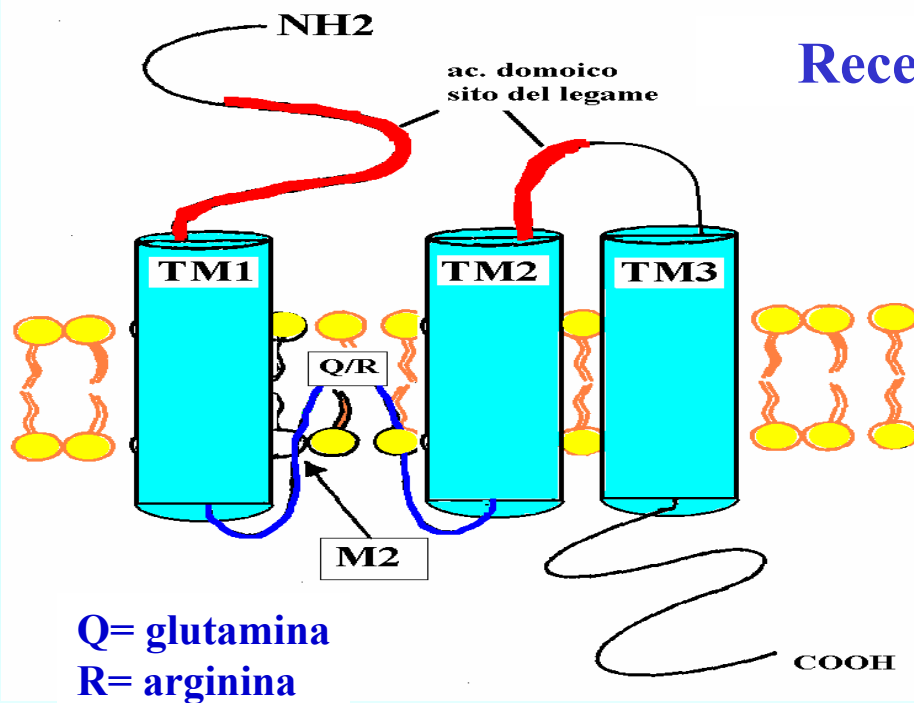


**N= NMDA**

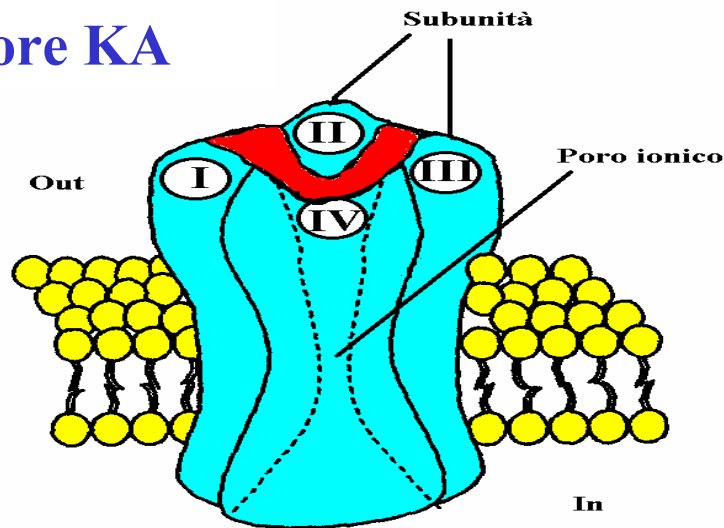
**KQ= Kainato e Quisqualato**

## Meccanismo d'azione

L'AD è un amminoacido eccitatorio, simile al glutammato, aspartato e kainato, interviene su alcuni recettori (Kainato) delle sinapsi, aumentando la penetrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula sino a portarla alla morte.



## Recettore KA



## Tossicità in animali

Dipende dalla specie e dall'età. Non sono osservati effetti di tossicità con dosi di AD < 0,5 mg/kg p.c..

# ASP

## Tossicità umana

Effetto acuto disturbi gastrointestinali, diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, perdita della memoria breve (60-110mg di AD) e sintomi neurologici più gravi con dosi di 270-290 mg di AD. Sulla base dei dati epidemiologici è stato indicato un LOAEL di 1,0 mg/kg p.c..

**Nausea**  
**Vomito**  
**Crampi addominali**



**Mal di Testa**  
**Perdita della memoria breve**  
**Lesioni gravi ai neuroni dell'ippocampo e coma**

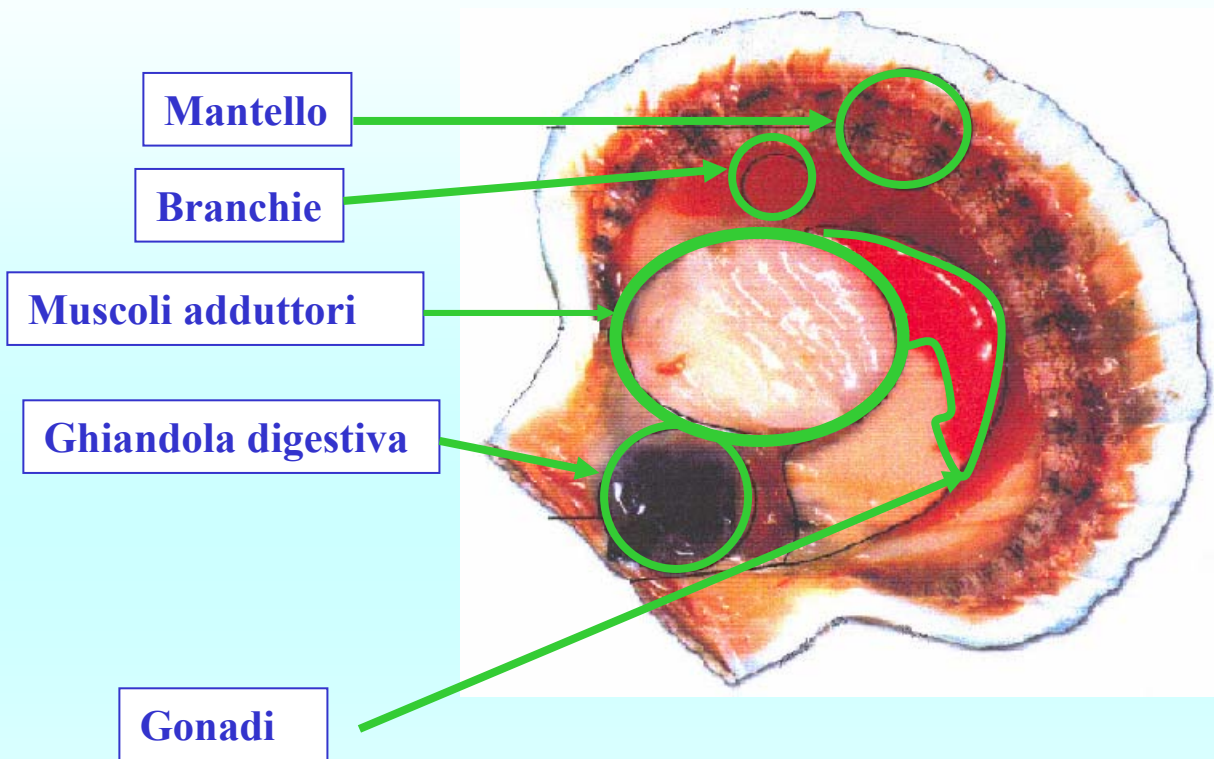
**Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**

**Sulla base del LOAEL di 1,0 mg AD/kg p.c. ed utilizzando un fattore di sicurezza di 3, la ARfD è stata calcolata in 0,1 mg/Kg p.c. ( 6 mg/Persona)**

**Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta**

<b>g. Parte Edibile</b>	<b>Limite Guida mg/kg p.e.</b>	<b>Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>60</b>	<b>20</b>
<b>250</b>	<b>24</b>	
<b>380</b>	<b>16</b>	

# *Pecten maximus*



## Distribuzione dell'acido domoico

- ghiandola digestiva 98%;
- muscoli 1 %
- gonadi 0,5 %
- altri 0,5%

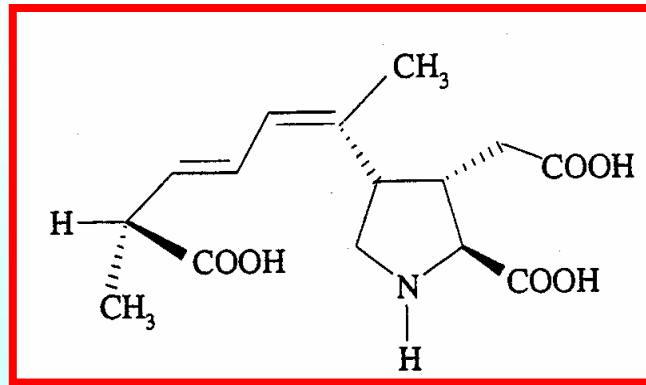
ASP

## Un nuovo problema per l'Adriatico?

La presenza di cellule appartenenti al genere *Pseudonitzschia* non ha per ora messo in evidenza la presenza di ac. Domoico nelle alghe. Nei molluschi bivalvi, invece, in alcuni mesi dell'anno si possono riscontrare concentrazioni di ac. domoico inferiori a 3 mg/kg p.e..

Ac. domoico è stato dal CRM trovato a concentrazioni notevolmente superiori al limite di legge in molluschi bivalvi (*Pecten maximus*) importati dalle coste francesi e spagnole dell'Atlantico e più recentemente sempre in *Pecten maximus*, freschi e congelati, di provenienza scozzese.

## ASP (ADs)



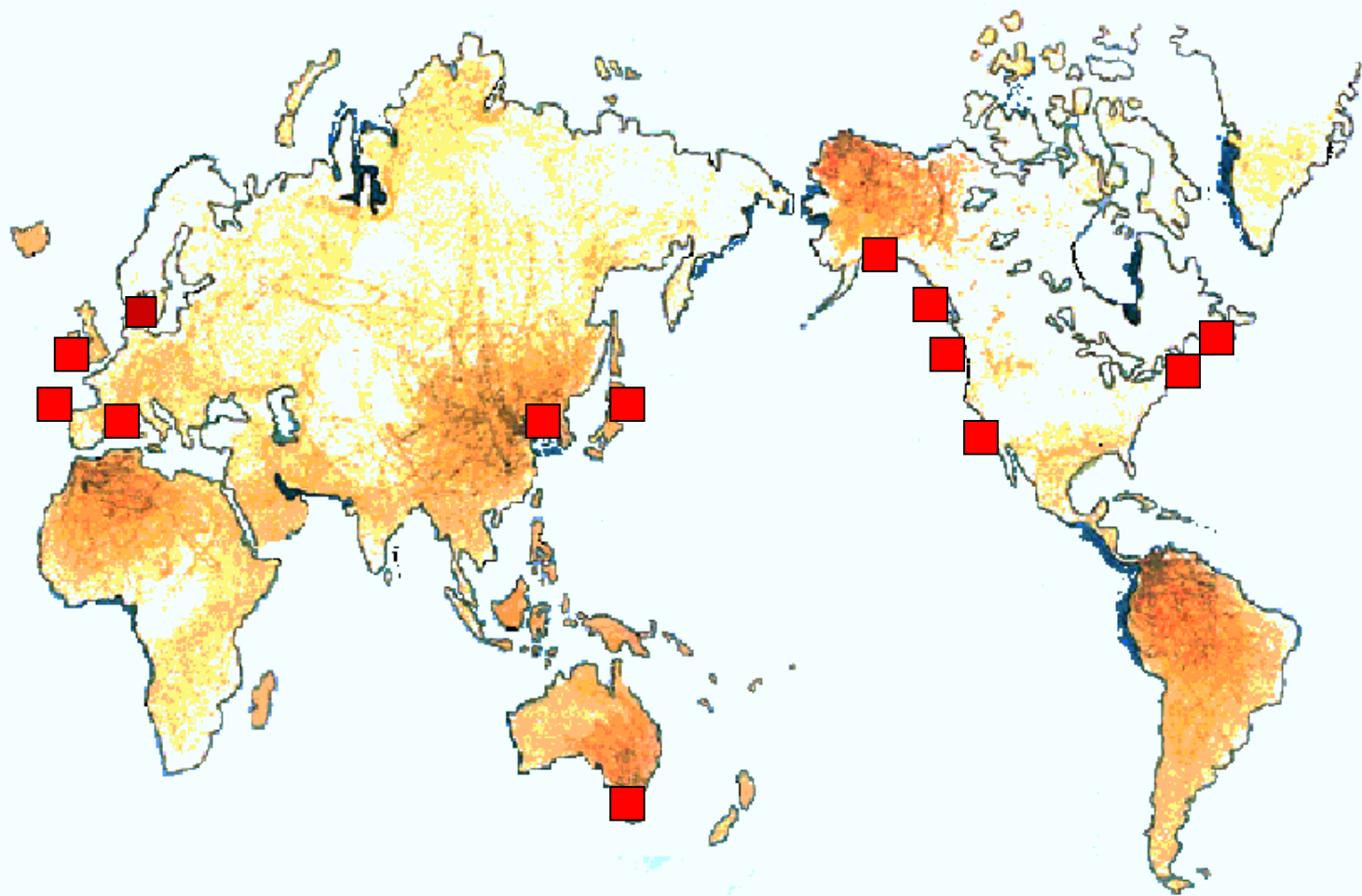
**Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**

Sulla base del LOAEL di 1,0 mg AD/kg p.c. ed utilizzando un fattore di sicurezza di 3, la ARfD è stata calcolata in 0,1 mg/Kg p.c. ( 6 mg/Persona)

**Limiti Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta**

<b>g. Parte Edibile</b>	<b>Limite Guida mg/kg p.e.</b>	<b>Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>60</b>	<b>20</b>
<b>250</b>	<b>24</b>	
<b>380</b>	<b>16</b>	

## Distribuzione di ASP



## Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

La sindrome diarroica da molluschi bivalvi, Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), è una definizione proposta da Yasumoto e collaboratori (1978) per una intossicazione nettamente diversa da quella da PSP e NSP sia per sintomatologia che per eziologia.

La natura tossico-algale di questa sindrome è stata definita da Yasumoto e coll. (1980) dopo numerosi casi diarroici a elevata morbosità che si sono verificati in Giappone alla fine degli anni settanta. Altri casi diarroici per consumo di mitili erano riportati in Europa negli anni sessanta. Le tossine DSP, ac. okadaico e i suoi derivati, implicate in questa sindrome erano isolati per la prima volta da alcune spugne *Halichondria okadai* e *Pandaros acanthifolium*, ma la vera origine dell'ac. okadaico e derivati era per la prima volta trovata in una dinoflagellata, bentica ed epifita, il *Prorocentrum lima* (Murakami e coll. 1982). Successive ricerche dimostrarono che la fonte maggiore di ac. okadaico e derivati erano delle dinoflagellate rappresentate dalle *Dinophysis* (Yasumoto e coll., 1980; Lee e coll., 1989).

# **DSP (Diarrethic Schellfish Poisoning)**

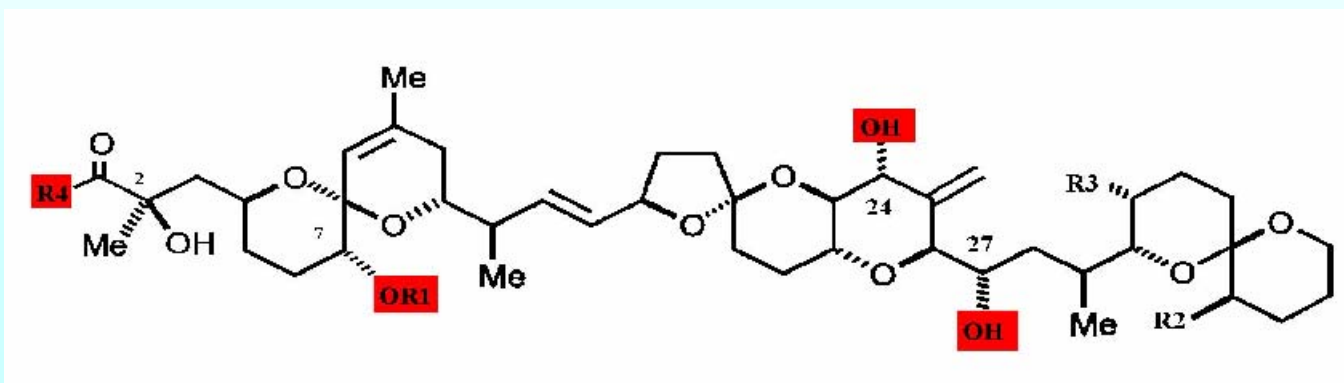
**e**

## **Tossine Lipofile**

**Le DSP sono divise in quattro classi strutturali completamente diverse per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e lesioni biochimiche:**

- ❖ acido okadaico e derivati (OAs);**
- ❖ pectenotossine (PTXs);**
- ❖ yessotossina e derivati (YTXs);**
- ❖ azaspiracido e derivati (AZA).**

## Acido Okadaico e derivati



		R1	R2	R3	R4	R5	PM
Acido okadaico	(AO)	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	-	804,46
Dinophysitossina 1	(DTX1)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-	818,48
Dinophysitossina 2	(DTX2)	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	-	804,46
Dinophysitossina 3	(DTX3)	Acile	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-	
7-0-acil-acido okadaico	(Acil AO)	Acile	CH <sub>3</sub>	H	OH	-	
7-0-acil-dinophysitossina 1	(AcilDTX1)	Acile	H	CH <sub>3</sub>	OH	-	
Dinophysitossina 4	(DTX4)	H	CH <sub>3</sub>	H	X	Y	
Dinophysitossina 5	(DTX5)	H	CH <sub>3</sub>	H	X	Z	
Diol Estere	(DioloA)	H	CH <sub>3</sub>	H	X	OH	

La sindrome diarroica da molluschi bivalvi, Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), è una definizione proposta da Yasumoto e collaboratori (1978) per una intossicazione nettamente diversa da quella da PSP e NSP sia per sintomatologia che per eziologia.

La natura tossico-algale di questa sindrome era definita da Yasumoto e coll. (1980) dopo numerosi casi diarroici a elevata morbosità che si erano verificati in Giappone alla fine degli anni settanta. Altri casi diarroici per consumo di mitili erano riportati in Europa negli anni sessanta. Le tossine DSP, ac. okadaico e i suoi derivati, erano isolati per la prima volta da alcune spugne *Halichondria okadai* e *Pandaros acanthifolium*. La vera origine dell'ac. okadaico e derivati era trovata, per la prima volta, in una dinoflagellata bentica ed epifita, il *Prorocentrum lima* (Murakami e coll. 1982). Successive ricerche dimostrarono che la fonte maggiore di ac. okadaico e derivati erano delle dinoflagellate rappresentate dalle *Dinophysis* ( Yasumoto e coll., 1980; Lee e coll., 1989).

## BIOINTOSSICAZIONI

Le biointossicazioni da DSP oltre a creare problemi sanitari in Giappone dal 1977 e a partire dal 1980 nei paesi della CE che si affacciano sull'Atlantico e Mare del Nord ha iniziato a crearne anche in Adriatico alla fine degli anni 80'.

Nel giugno 1989, infatti, la presenza di cellule di *Dinophysis fortii* nell'epatopancreas di mitili raccolti nella fascia costiera dell'Emilia Romagna consentirono di dimostrare che diversi casi di disturbi diarroici in consumatori (**circa 100 persone**) di molluschi non erano imputabili a virus o a batteri ma alla biointossicazione del tipo DSP.

Tale fenomeno si estese anche alle aree costiere delle Marche dell'Abruzzo, Veneto e Friuli Venezia Giulia.

# Sintomi DSP

Si manifesta dopo il consumo di molluschi che hanno accumulato tossine da diverse specie di Dinoflagellati. Pur non essendo letale, rappresenta un importante problema sanitario. La natura dei sintomi è di tipo gastrointestinale:

- 1) Diarrea 92 %;
- 2) Nausea 80 %;
- 3) Vomito 79 %;
- 4) Dolori addominali 53 %.

**Mal di testa**



**Nausea  
Vomito  
Diarrea  
Dolori addominali  
Tumori nel tratto digestivo**

**Il periodo d'incubazione varia dai 30 minuti alle 7 ore, con una media di circa 4 ore nel 70% dei casi. Raramente supera le 12 ore.**

**La Tossina DSP, inizialmente individuata, era la DTX1 e la tossicità era quantificata in Unità Topo (UT).**

**Per UT s'intende la più piccola concentrazione di tossina che uccide il topo per iniezione intraperitoneale (i.p.) nelle 24 ore.**

# Potere Diarroico (accumulo di fluidi nell'intestino)

## Test con topi neonatali (con sonda)

Accumulo di fluidi nell'intestino si verificano con OA e DTX1 ad una concentrazione 0.4 µg OA/Topo, mentre per DTX3 con 0.25 µg OA/Topo (Hamano e coll., 1986).

## Per Via Orale in topi adulti

OA 75 µg/Kg induce un trascurabile accumulo di fluidi nell'intestino.

Questo valore era utilizzato come LAEL (Lowest Adverse Effect Level).

Attraverso la sperimentazione animale il LAEL nell'uomo era stimato in:

**43.2 µg per DTX1**

**48 µg per OA**

## Danni Istopatologici nel topo

Per **via intraperitoneale** la tossina provoca cambiamenti principalmente nell' **intestino tenue** (Terao e coll.1986, Ito e coll. Manoscritto)

Per **via orale** OA, DTX1 e DTX3 producono una marcata distruzione dell'epitelio dei villi intestinali.

**OA dopo 5 minuti** dalla somministrazione è ritrovato nei **polmoni, fegato, cuore, reni e nell'intestino tenue e crasso.**

Nel fegato e nei vasi sanguigni è ritrovato ancora per due settimane dopo la somministrazione, nell'intestino anche dopo 4 settimane.

## **Promotore di tumore** (Jujiki H. e coll. 1989, Fujiki H. e coll. 1997)

**Esperimenti condotti con agenti tumorali e OA hanno portato ai seguenti risultati:**

Agente tumorale N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG)	= 46,4 %
Agente tumorale (MNNG) + OA	= 76,0 %
OA	= 0 %

**OA alla concentrazione di 14.29 µg/Kg con MNNG produceva neoplasie.**

**OA somministrato alla concentrazione di 14.29 µg/Kg per 72 settimane in ratti non produceva ritardi nella crescita e neppure neoplasie. Questa concentrazione di OA era utilizzata come NOAEL.**

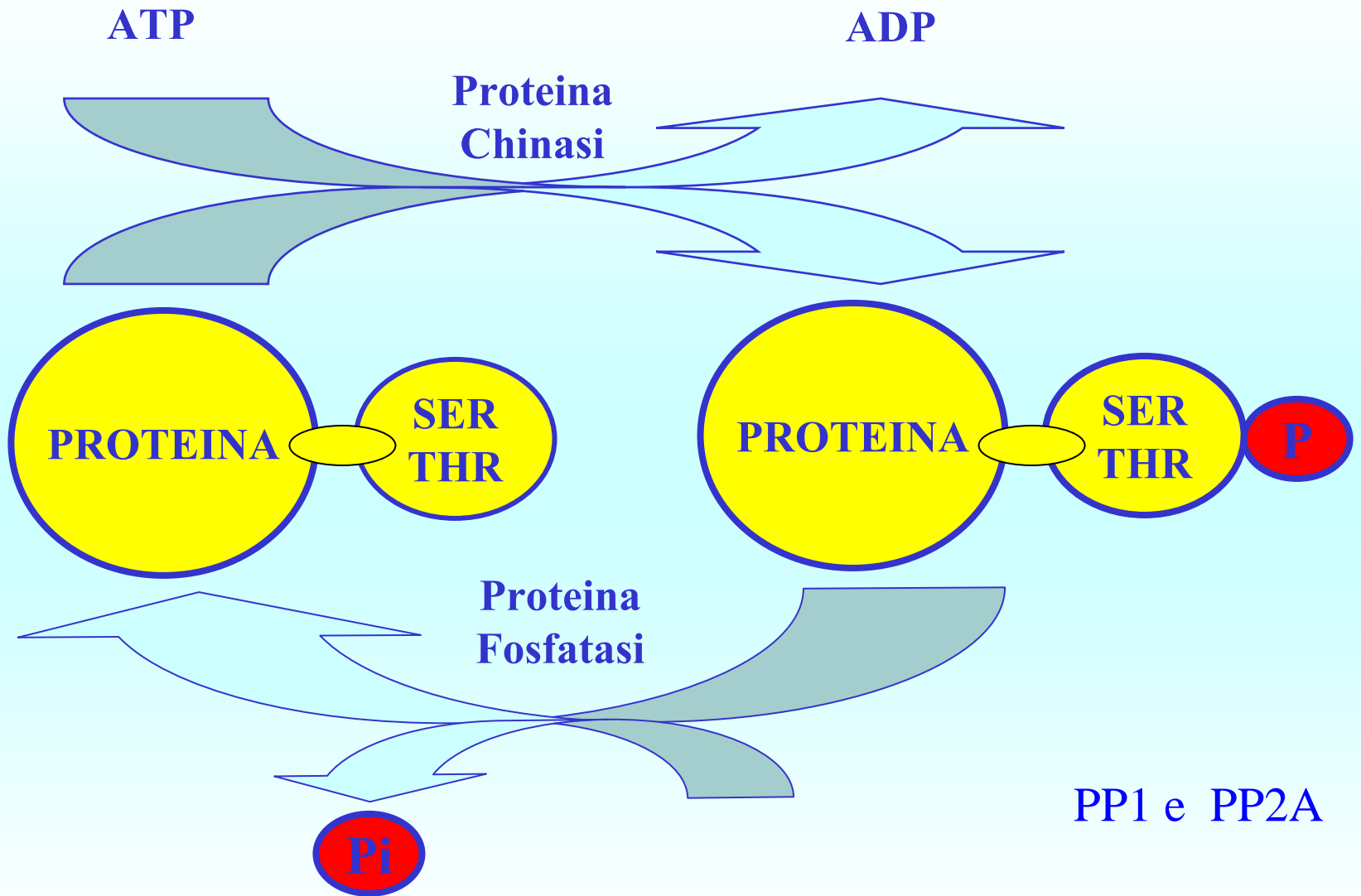
**OA alla concentrazione di 28.57 µg/Kg produceva un ritardo nella crescita ma non neoplasie (LOAEL).**

## Altri Effetti

OA,DTX1,DTX2 inibiscono selettivamente le **Proteine Fosfatasi** con particolare riferimento alla PP2A (Takai e coll. 1992, Takai e coll.1995).

DTX3 non inibisce la PP2A.

Tutte le tossine dell'OA sono citotossiche per molte linee cellulari. Le tossine OAs **inibiscono la polimerizzazione dell'actina** che supporta la struttura cellulare. Questo è un effetto conseguente all'inibizione dalla PP2A in quanto l'estere fosfato nella proteina non può essere idrolizzato dalla fosfatasi.



## DSP (AOs)

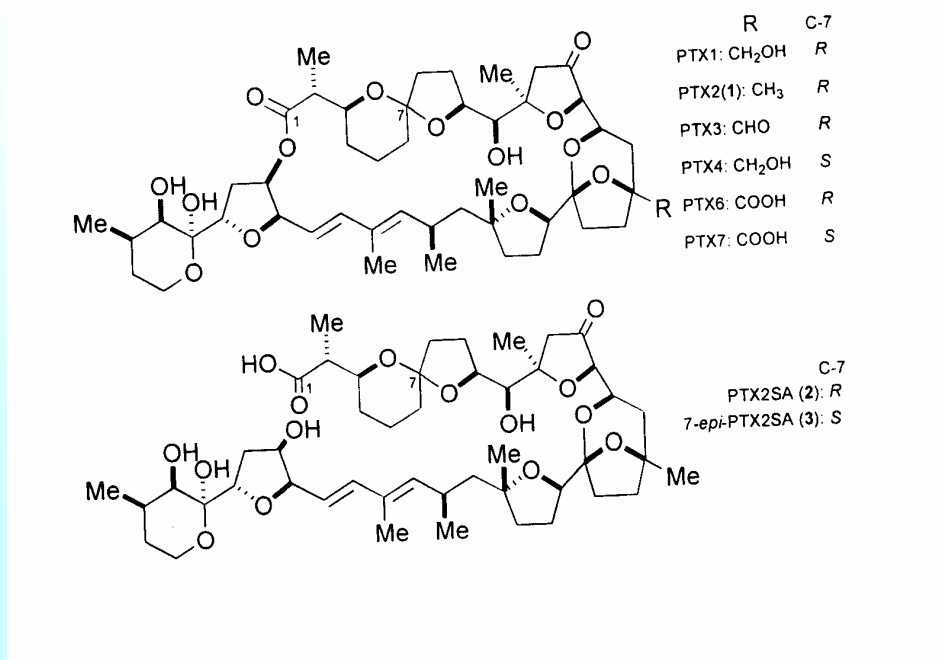
**Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**

Sulla base del LOAEL di 1,0 µg/kg p.c. ed utilizzando un fattore di sicurezza di 3, l' ARfD è stata calcolata in 0,333 µg eq. di AO/Kg p.c. (20 µg/Persona).

### Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

<b>Grammi di Parte Edibile Assunta</b>	<b>Limite Guida µg/kg p.e.</b>	<b>Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>200</b>	<b>160</b>
<b>250</b>	<b>80</b>	
<b>380</b>	<b>50</b>	

# Pectenossine (PTXs)



Tossina	Massa molecolare	Tossicità (topo i.p.) µg/kg	Effetto patologico
PTX1	874	250	epatotossico
PTX2	858	230	epatotossico
PTX3	872	350	epatotossico
PTX6	888	500	epatotossico

<b>Distribuzione</b>	<b>Le PTXs sono state trovata in microalghe e molluschi bivalvi in: Italia, Norvegia, Portogallo, Spagna, Australia, Giappone, Nuova Zelanda.</b>
<b>Assorbimento</b>	
<b>Distribuzione</b>	<b>Non ci sono dati.</b>
<b>Metabolismo</b>	
<b>Escrezione</b>	
<b>Meccanismo d'azione</b>	<b>Non ci sono dati.</b>
<b>Tossicità in animali (topo)</b>	<b>Parecchie pectenotossine, compreso PTX-1, PTX-2, PTX-3, PTX-4, PTX-6 e PTX-11, sono tossiche agli animali per iniezione intraperitoneale. Le pectenotossine sono molto meno tossiche per os.</b>

## **Tossicità in animali (topo)**

In uno studio della nuova Zelanda in cui topi sono stati alimentati oralmente con PTX-2 o PTX-11 alla dose di 5000 µg/kg pc non si è osservata diarrea o qualunque altro effetto tossico. Tuttavia in recenti studi giapponesi PTX-2 pura data tramite alimentazione con sonda gastrica a 2000 µg/kg pc ha causato la diarrea nei topi. I cambiamenti istologici sono stati visti nello stomaco, nei polmoni, nel fegato, nei reni e negli intestini. L'accumulazione fluida nel tratto gastrointestinale inoltre è stata registrata ai dose-livelli più bassi di PTX-2. Il NOAEL era peso corporeo di 300 µg/kg.

## **Tossicità umana**

In Australia alcuni casi di intossicazione umana (disturbi gastrointestinali) sono stati inizialmente attribuiti a PTXs poi, in un secondo tempo, agli esteri dell'acido okadaico (DTX3).

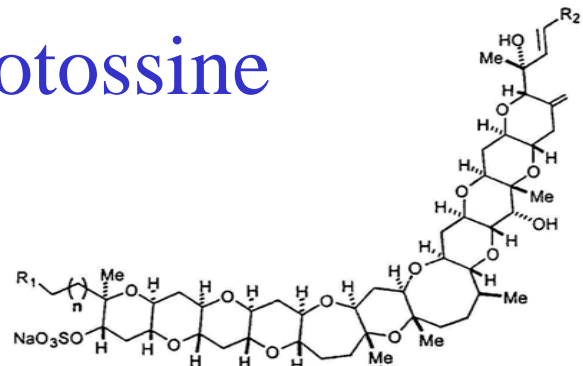
**Dose Acuta di  
Riferimento  
(ARfD)**

**Sulla base del NOAEL di 300 µg/kg di pc,  
applicando un fattore di 100, l' ARfD è stata  
calcolata in 3 µg equi. di PTX/Kg p.c. (180  
µg/Persona).**

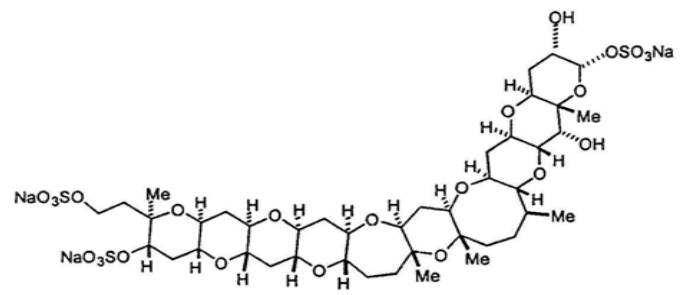
## **Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta**

<b>Grammi di parte edibile assunta</b>	<b>Limite Guida µg/kg p.e.</b>	<b>Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>1800</b>	<b>160</b>
<b>250</b>	<b>720</b>	
<b>380</b>	<b>474</b>	

# Yessotossine



	R1	R2	n
Yessotoxin(YTX)	OSO <sub>3</sub> Na		1
45-YTX	OSO <sub>3</sub> Na		1
45, 46, 47-norYTX	OSO <sub>3</sub> Na		1
2 -homoYTX	OSO <sub>3</sub> Na		2
2-homo-45-OHYTX	OSO <sub>3</sub> Na		2
44-COOH YTX	OSO <sub>3</sub> Na		1
1-desulfoYTX	OH		1



Adriatoxin(ATX)

## Struttura Chimica

Tossina	Formula	Peso Molecolare	Tossicità mg/Kg Nel topo i.p.	Sorgente
YTX	$C_{55}H_{80}Na_2O_{21}S_2$	1186	0.1	Molluschi e Dinoflagellate
HydroxyYTX	$C_{55}H_{80}Na_2O_{22}S_2$	1202	0.5	Molluschi
DesulfoYTX	$C_{55}H_{81}NaO_{19}S$	1084	0.5	Molluschi
HomoYTX	$C_{56}H_{82}Na_2O_{21}S_2$	1200	0.1	Molluschi e Dinoflagellate
Hydroxy homoYTX	$C_{56}H_{82}Na_2O_{22}S_2$	1216	0.5	Molluschi
NorYTX	$C_{52}H_{76}Na_2O_{21}S_2$	1146	0.22	Molluschi e Dinoflagellate
CarboxyYTX	$C_{55}H_{80}Na_2O_{24}S_3$	1218	0.5	Molluschi
ATX	$C_{42}H_{63}Na_3O_{24}S_3$	1116	> 0.1	Molluschi

Il nome di Yessotossina (YTX) deriva dal pettine *Patinopecten yessoensis* dal quale la tossina è stata isolata per la prima volta (Murata e coll.,1987). Gli studi successivi hanno rivelato la presenza di un certo numero di omologhi. Strutturalmente le YTXs assomigliano alla brevetossina (BTX) e a ciguatossina (CTX), coinvolte rispettivamente nelle sindromi NSP e avvelenamento da pesci ciguatera (CFP). Questa struttura ha in un primo tempo richiamato all'attenzione la possibilità che la yessotossina funzionasse a livello dei canali del sodio alla stessa stregua della brevetossina e della ciguatossina, e cioè facilitando l'entrata degli ioni Na<sup>+</sup>. Questo effetto, tuttavia, non è stato possibile metterlo in evidenza (Aune 1988). Le YTXs possiedono più di un solfato nella molecola. La presenza di questo gruppo riduce l'assorbimento del composto nell'apparato digerente. Questa è la causa principale tra la disparità della tossicità per iniezione intraperitoneale e per somministrazione orale.

Studi condotti su pettinidi e mitili indicano che le YTXs sono accumulate in prevalenza nell'epatopancreas del mollusco. Una ricerca condotta in Norvegia in mitili raccolti durante il periodo invernale, mostrava livelli significativi di YTX anche in altre parti del mollusco.

## **Epidemiologia**

**Attualmente non si conoscono segnalazioni d'intossicazioni umana causate da YTXs per l'ingestione di molluschi.**

## **Dati tossicologici**

**Tossicità al topo per via intraperitoneo:**

- 1) la yessotossina come tale ha come organo bersaglio il cuore;**
- 1) la yessotossina desolfatata presenta i suoi effetti nel fegato (steatosi epatica con un aumento di 60 volte dei trigliceridi e di 2 volte dei fosfolipidi) e nel pancreas.**

**Pertanto la causa di morte del topo (0.100 mg/Kg) ad opera della yessotossina è un'acuta insufficienza cardiaca, mentre quella della yessotossina desolfatata è un'alterazione patologica del fegato e del pancreas.**

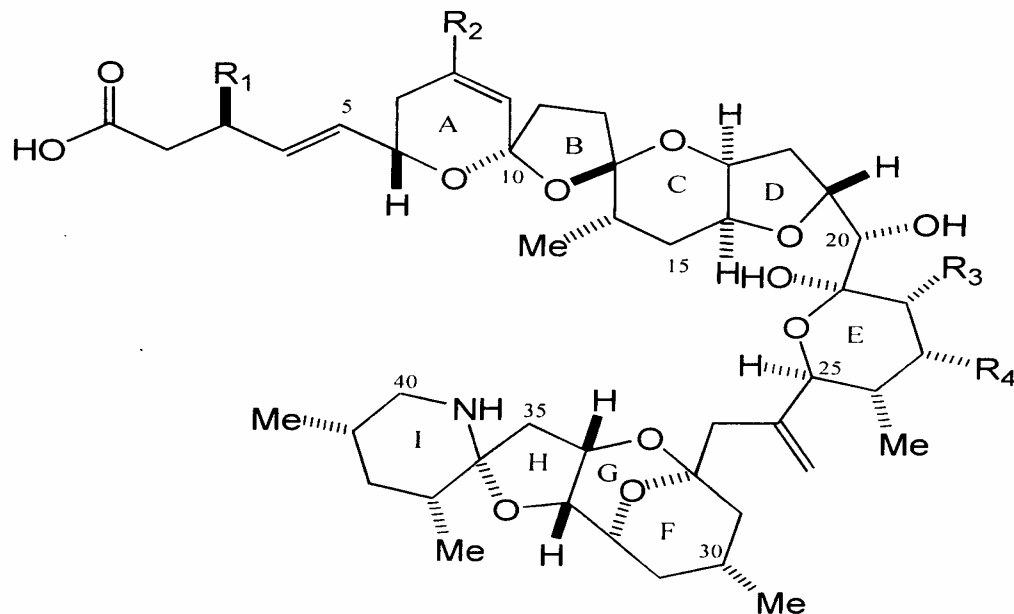
## Yessotossine (YTXs)

<b>Tossicità umana</b>	<b>Non sono mai stati riportati casi di intossicazione.</b>
<b>Dose Acuta di Riferimento (ARfD)</b>	<b>Sulla base del NOAEL di 5 mg/kg p.c. ed utilizzando un fattore di sicurezza di 100, l'ARfD è stata calcolata in 50 µg YTX/Kg p.c. (3 mg/Persona)</b>

### Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta

<b>Grammi di Parte Edibile Assunta</b>	<b>Limite Guida mg/kg p.e.</b>	<b>Limite mg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>30</b>	<b>1</b>
<b>250</b>	<b>12</b>	
<b>380</b>	<b>8</b>	

# Azaspiracid (AZA)



Tosina	R1	R2	R3	R4	Tossicità nel topo mg/kg i.p.
AZA	H	H	Me	H	0.20
AZA2	H	Me	Me	H	0.11
AZA3	H	H	H	H	1.14
AZA4	OH	H	H	H	0.47
AZA5	H	H	H	OH	1.00

# Epidemiologia

Il primo episodio di AZA era riportato da McMahon e Silke nel 1995, mitili raccolti nella baia di Killary in Irlanda causarono forti diarree in consumatori dei Paesi Bassi. La struttura della tossina era individuata in Giappone ed era chiamata inizialmente KT3 e poi azaspiracido in riferimento all'esistenza nella molecola di un unico azaspiro ring e un acido carbossilico. L'avvelenamento era chiamato AZP.

Dal 1996 diversi incidenti di AZA sono stati segnalati in Irlanda ed altri paesi dell'Europa, Italia compresa, per mitili provenienti dall'Irlanda.

Oltre all'AZA sono stati isolati altri quattro strutture di omologhi da AZA2 ad AZA5.

Attualmente si può ipotizzare che AZA a AZA3 sono prodotti dalle Dinoflagellate.

La tossina è termostabile.

**L'AZA provoca gravi danni al:**

**fegato, pancreas, timo, tessuti linfoidei e tratto digestivo.**

**In un recente esperimento, nel topo, la somministrazione per via orale di tossina ad alte concentrazioni (300-400µg/Kg) ha dimostrato, anche dopo tre mesi dalla somministrazione, erosioni nello stomaco e deformazione dei villi nell'intestino tenue.**

**La somministrazione per via orale di basse concentrazioni di tossina (1,5,20,50 µg/Kg), ripetute nel tempo e su diversi lotti di topi, mostrava:**

- 1) perdita di peso e debolezza in diversi topi, tanto da essere tolti dall'esperimento prima della fine;**
- 2) morte di diversi topi;**
- 3) accorciamento dei villi intestinali;**
- 4) tumore nei polmoni e nel fegato;**
- 5) iperplasia delle cellule epiteliali nello stomaco;**
- 6) mitosi al fegato.**

## **Altre proprietà tossiche di AZA**

**AZA è citotossico** in cellule di P388 ma la sua potenza è molto meno evidente rispetto nelle cellule di KB (Satake e Ofuji comunicazione personale).

Uno studio in vitro eseguito su cellule umane di donatori sani suggerisce che la soglia per AZA ed omologhi, in grado di cambiare alcune funzioni cellulari, è di **24 µg per una persona di 60 Kg.**

**AZA non inibisce la PP2A.**

## **Dati tossicologici**

**I dati epidemiologici accertati in Irlanda, sui casi di avvelenamento umano, hanno evidenziato un livello di assunzione di tossina molto variabile:**

- 23 µg AZA/ Persona nel 5% dei casi**
- 86 µg AZA/Persona nel 95% dei casi**

**Per il calcolo del NOEL era utilizzato un fattore di 3 al LOEL.**

## Azospiracidi (AZAs)

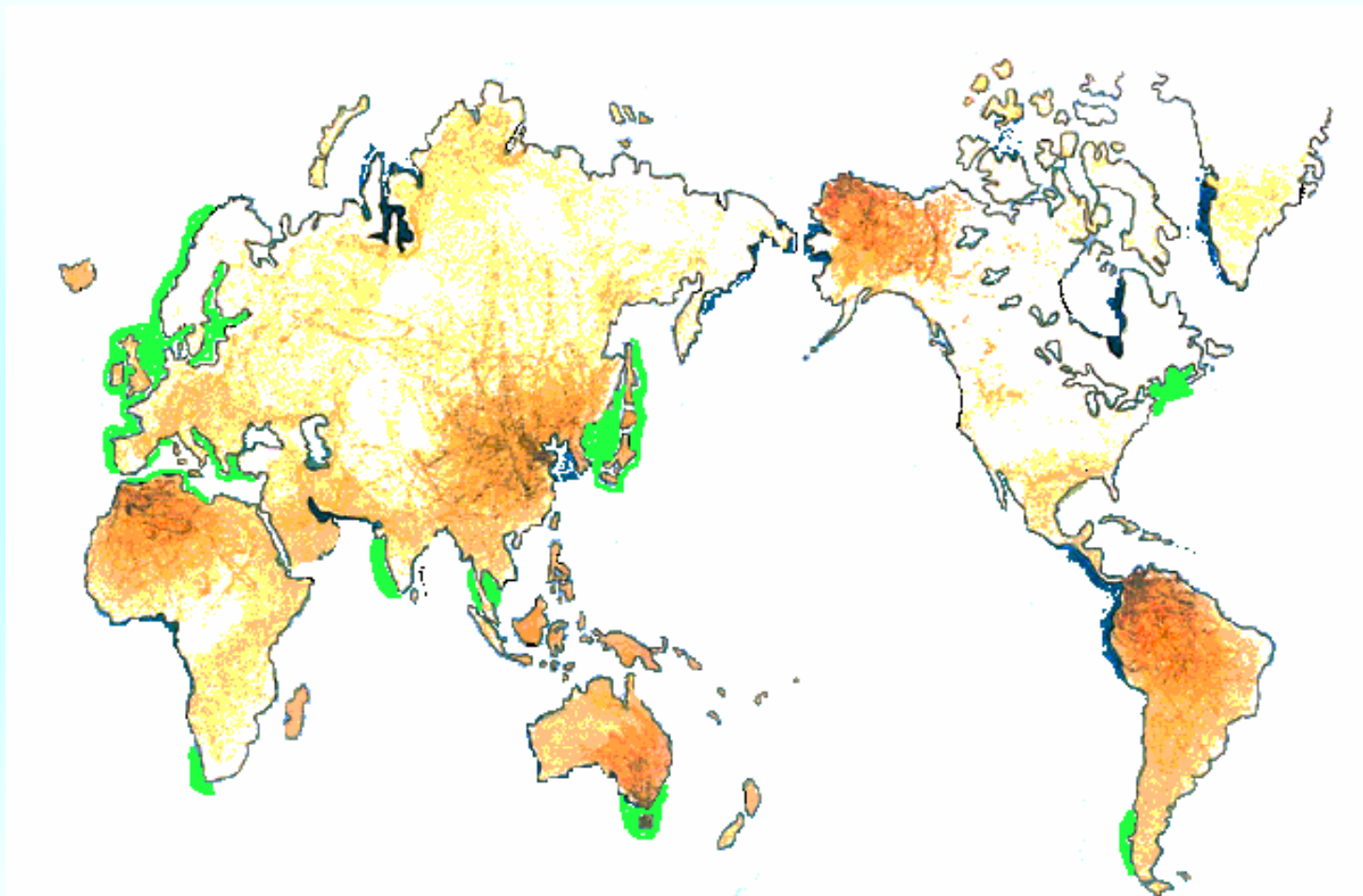
**Dose Acuta di Riferimento (ARfD)**

**Il gruppo di esperti dell'Ue nel 2001 ha usato il valore più basso del LOAEL ed ha applicato un fattore di sicurezza di 3, ottenendo un ARfD di 0,127 µg/kg pc.**

### **Limite Guida in Relazione alla Parte Edibile Assunta**

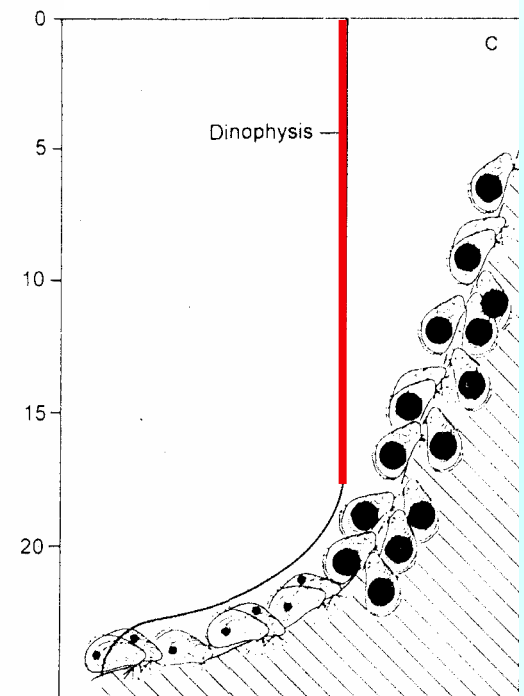
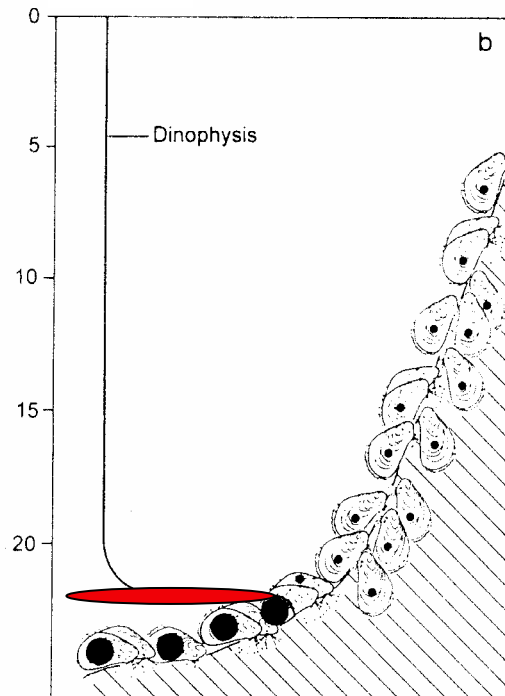
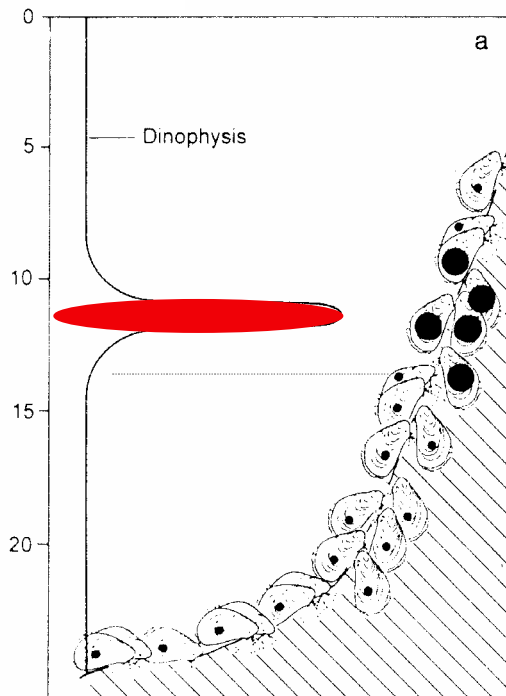
<b>Grammi di parte edibile assunta</b>	<b>Limite Guida µg/kg p.e.</b>	<b>Limite µg/kg p.e. (Reg.853 CE)</b>
<b>100</b>	<b>76</b>	<b>160</b>
<b>250</b>	<b>32</b>	
<b>380</b>	<b>20</b>	

## Incidenti di DSP



# Distribuzione verticale/migrazioni del fitoplancton e relativa tossicità in molluschi bivalvi

Profondità



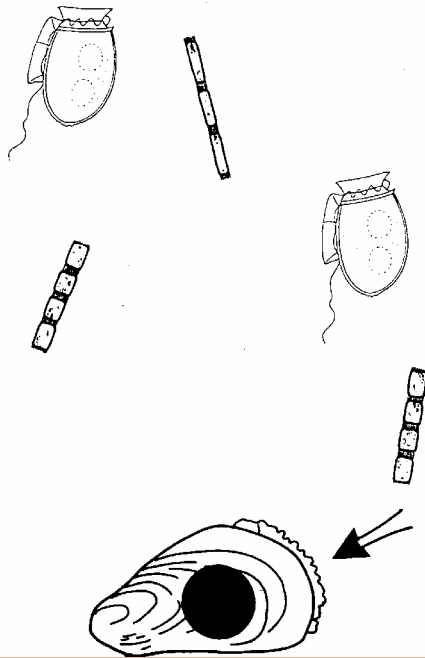
From Per Andersen, Bio/consult Ltd.

# L'abbondanza del fitoplancton influisce sulla quantità di acqua filtrata e sulla tossicità

F = 100 l per day

a

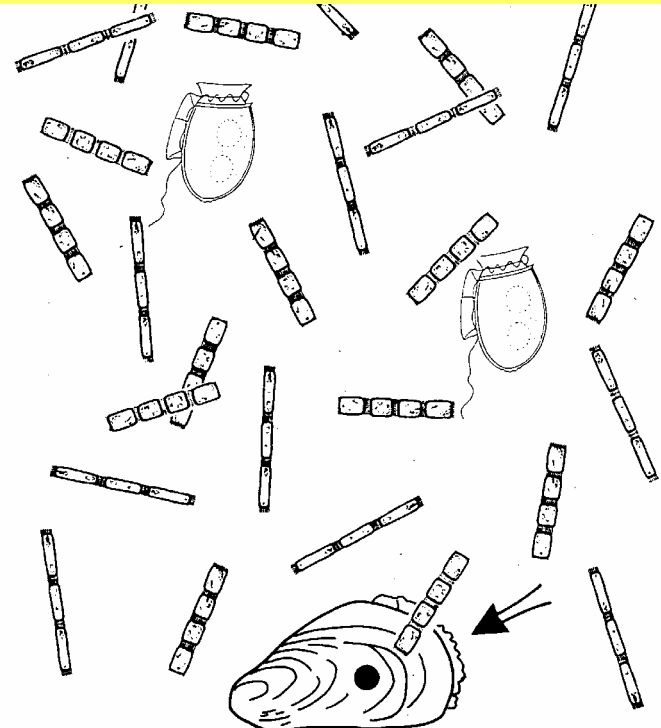
Le stesse concentrazioni di *Dinophysis* possono causare tossicità nei mitili in alcune circostanze, ma non in altre.



**Esempio 1.** In questa situazione il mollusco ingerisce  $200 \times 100 = 20000$  cellule di *Dinophysis* al giorno

F = 20 l per day

b



**Esempio 2.** In queste situazione il mollusco ingerisce  $200 \times 20 = 4000$  cellule di *Dinophysis* al giorno

## Mesi Potenzialmente a Rischio

	DSP
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	●
Maggio	●
Giugno	● ● ●
Luglio	● ● ● ●
Agosto	● ● ● ●
Settembre	● ● ● ●
Ottobre	● ● ● ●
Novembre	● ●
Dicembre	●

## Capacità fisiologica di accumulo delle biotossine marine

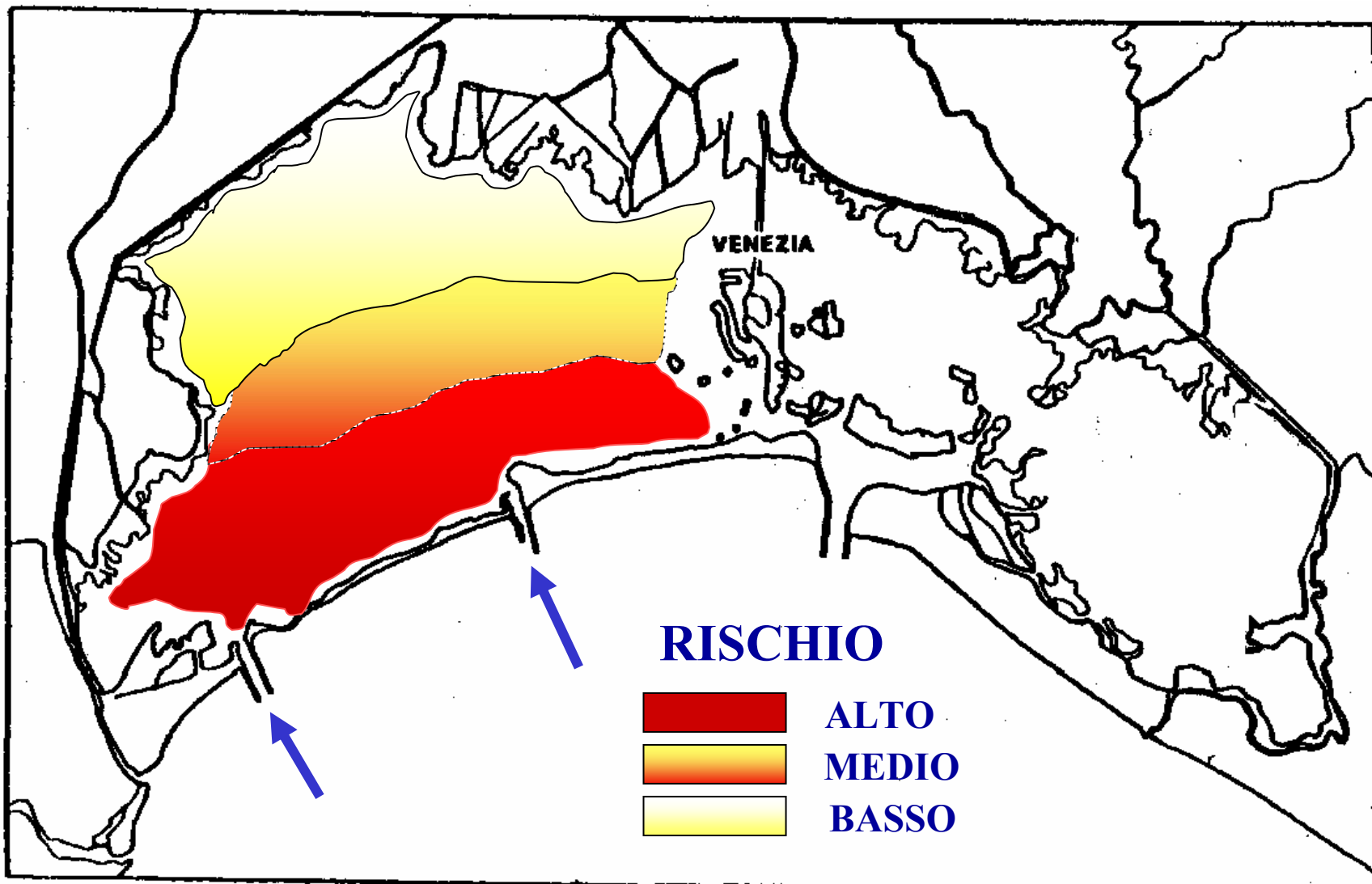
	DSP
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	●●●●●
<i>Tapes philippinarum</i>	●●
<i>Callista chione</i>	●
<i>Cardium sp.</i>	●
<i>Chamelea gallina</i>	●
<i>Chlamys sp.</i>	●
<i>Crassostrea gigas</i>	●
<i>Pecten jacobaeus</i>	●

## Tossicità DSP in *M. galloprovincialis*

	Long line	Fondo
Mare aperto	●●●●●	●●●
Laguna	●●	●
“Vallette”	●	●

# ALLEVAMENTI DI MITILI IN LAGUNA: POTENZIALE RISCHIO

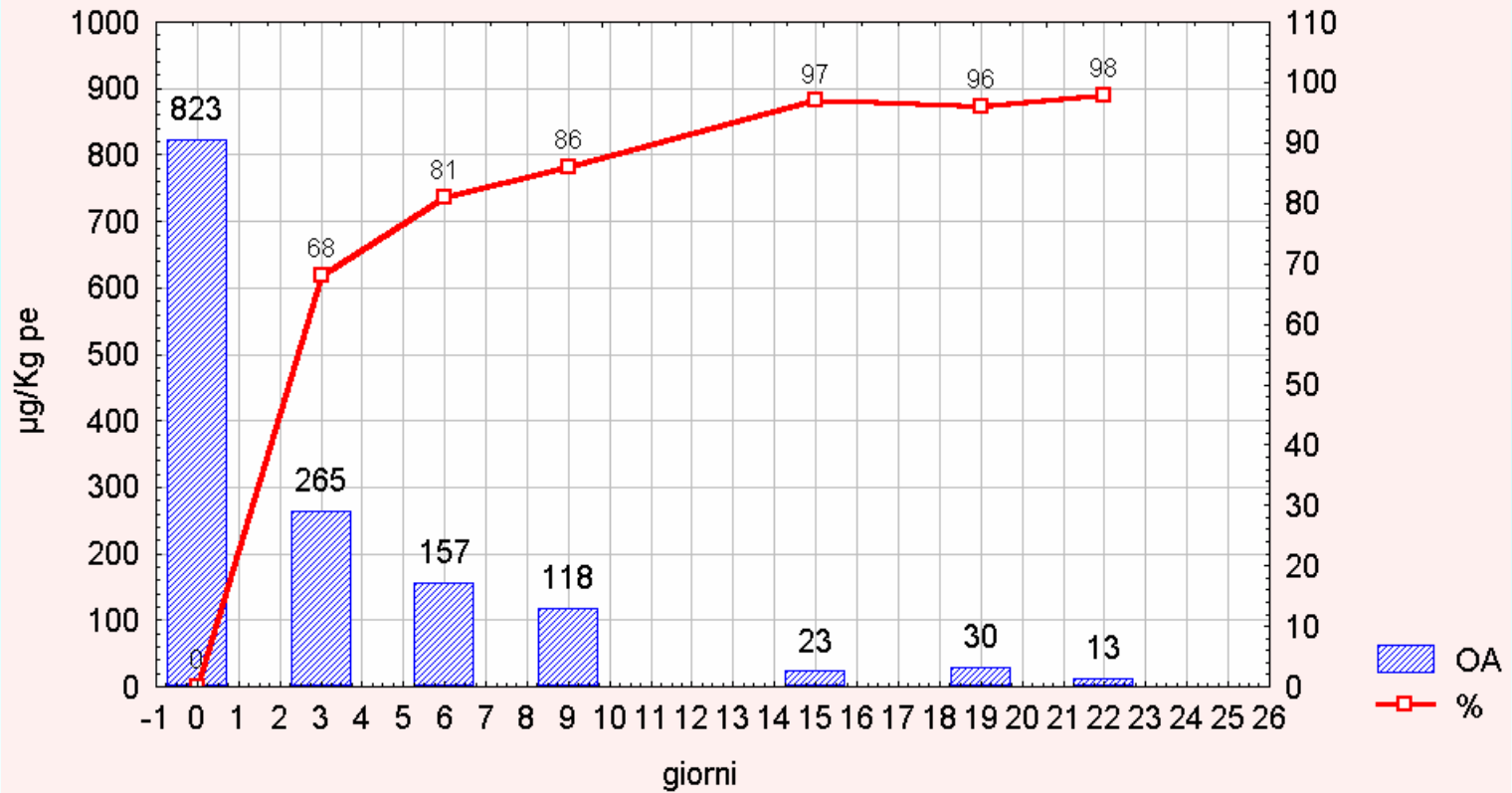
DSP



# *Mytilus galloprovincialis*

D.S.P. (Acido Okadaico)

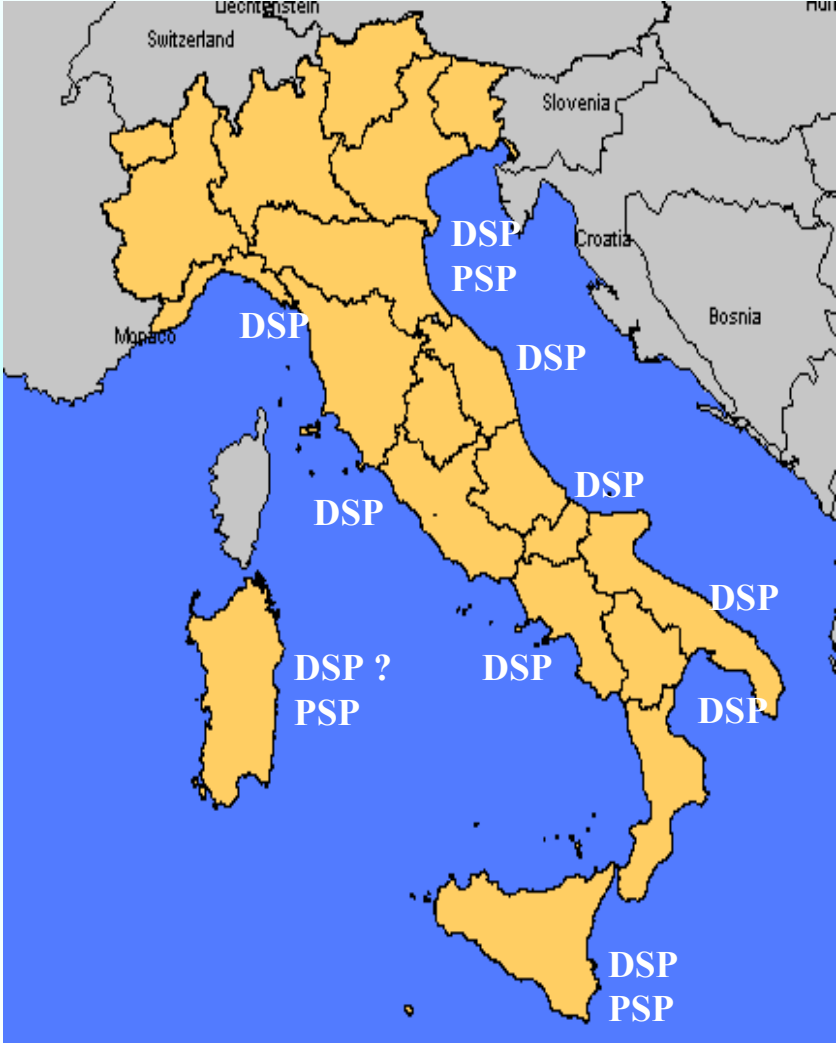
dal 24 agosto al 15 settembre



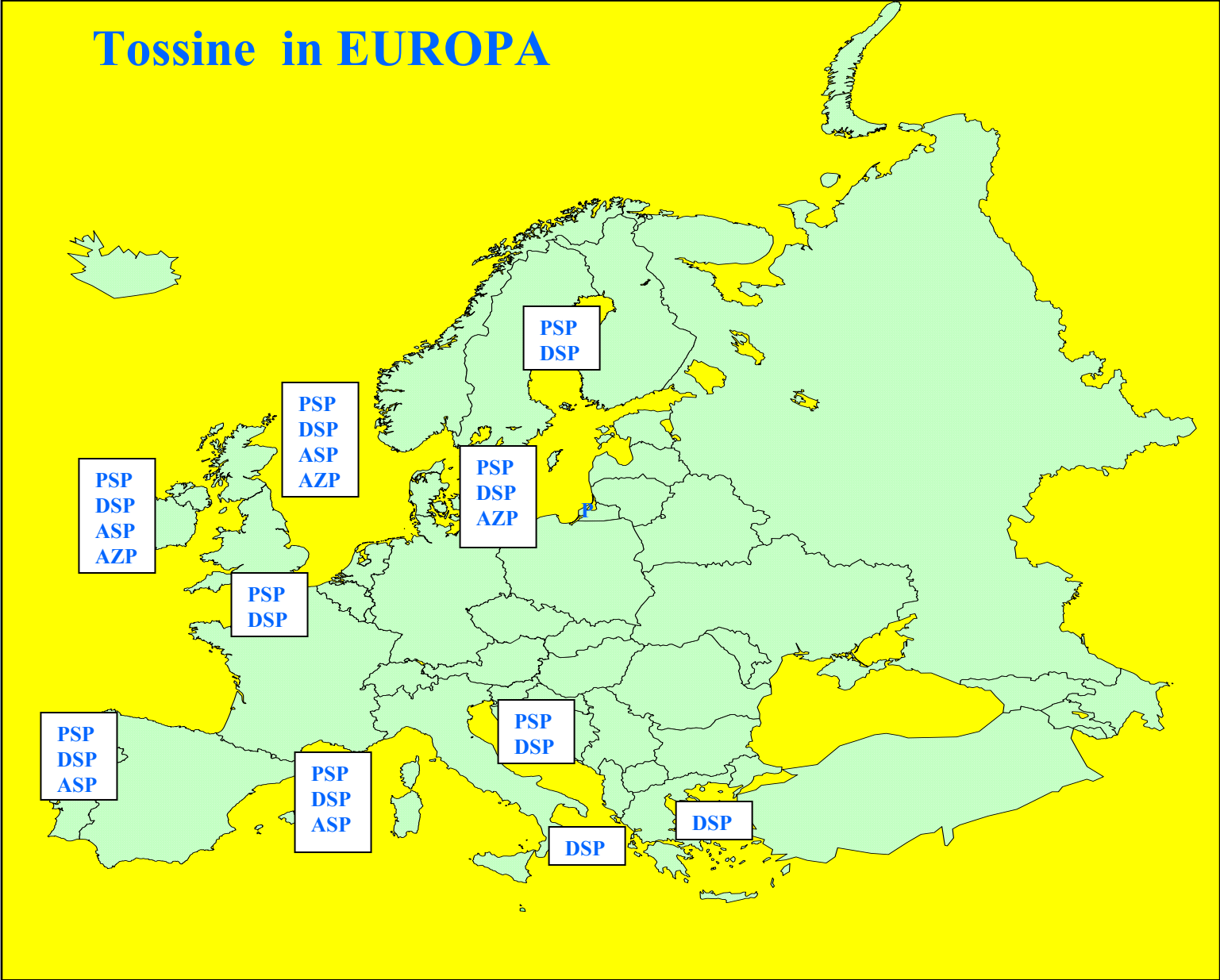
# Distribuzione Biotossine al 2004



# Distribuzione Biotossine 2007



# Tossine in EUROPA





**NATIONAL REFERENCE LABORATORY ON MARINE BIOTOXINS  
(G.U.C.E. L 120/37 DEL 8/05/99)**

**V.le A. Vespucci, 2 - 47042 - CESENATICO (FC) ITALY**

**Tel +39 0547 80278 Fax + 39 0547 75094**

**e – mail [cerimarine@tin.it](mailto:cerimarine@tin.it)**

**<http://www.regione.emilia-romagna.it/crm>**

**Grazie per l'attenzione**