

VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALLA ESPOSIZIONE A CIANOTOSSINE

Enzo Funari, Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'uomo può essere esposto alle cianotossine attraverso diverse vie, la principale delle quali è quella orale, a seguito dell'ingestione di alcuni alimenti (prodotti ittici, prodotti agricoli), di supplementi alimentari (capsule e pillole contenenti estratti/liofili di cianobatteri), di acque potabili o dell'ingestione accidentale o involontaria di acque ad uso ricreazionale. Tuttavia l'esposizione alle cianotossine può avvenire anche attraverso la via cutanea e inalatoria (attività ricreative e professionali in acque contaminate, uso domestico delle acque, es. doccia). Esiste poi la possibilità di esposizione attraverso la via parenterale, quando acque provenienti da corpi idrici superficiali vengono utilizzate per emodialisi: pur essendo meno frequente ed interessando un gruppo specifico e ristretto di individui (i pazienti sottoposti al trattamento terapeutico), questa via di esposizione rappresenta, per le sue caratteristiche, un rischio maggiore per i soggetti esposti.

Il processo di valutazione del rischio segue procedure consolidate e adottate dalle varie organizzazioni internazionali (Funari & Testai, 2007). In accordo a tali procedure, per valutare adeguatamente il rischio per la salute derivante dall'esposizione alle cianotossine è indispensabile disporre delle informazioni relative al loro profilo tossicologico, provenienti sia da studi su modelli animali che da dati sull'uomo, e da studi epidemiologici, oltre che di misure del livello di esposizione rappresentative e rilevanti per i vari scenari da considerare.

Proprietà tossicologiche delle cianotossine

Una visione sinottica delle principali caratteristiche tossicologiche delle varie cianotossine è presentata nelle Tabelle 1 e 2; per una descrizione dettagliata dei vari aspetti (meccanismo di azione, tossicocinetica, tossicità acuta e per dosi ripetute, genotossicità, cancerogenesi e tossicità dello sviluppo) si rimanda ad una rassegna recentemente pubblicata (Funari & Testai, 2008).

Dal punto di vista tossicologico le cianotossine più studiate sono sicuramente le microcistine (MC) e tra queste la maggior parte dei dati sono disponibili per uno dei 70 congeneri, la MC-LR, che sulla base dei risultati di tossicità acuta è uno dei più epatotossici. Per questo motivo, non avendo disponibili dati sugli altri congeneri e anche sulle nodularine (che condividono bersaglio e meccanismo di azione con le MC), spesso si parla di livelli espressi come MC-LR equivalenti, pensando all'applicazione di un approccio conservativo nei confronti della protezione della salute. È tuttavia ancora da dimostrare che il *ranking* di tossicità delle MC stabilito in base agli effetti acuti sia estrapolabile come tale anche agli effetti a breve e lungo termine.

Tabella 1. Caratteristiche tossicologiche delle principali cianotossine : tossicità acuta, meccanismo di azione e tossicocinetica*

Cianotossina	LD₅₀ i.p.** (µg/kg p.c.)	LD₅₀ orale (µg/kg p.c.)	Organo bersaglio e meccanismo di azione	Informazioni di tossicocinetica
Microcistine(MC)	50-1200 (in dipendenza del congenere)	5000	Fegato (inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2A. <i>dosi alte:</i> danni ai capillari sinusoidi ed emorragia intraepatica; <i>dosi basse:</i> induzione di proliferazione cellulare e ipertrofia epatica)	MC-LR: molto idrofila. Trasporto attivo sistema degli anioni organici (OATP) e degli acidi biliari Coniugazione con GSH nel fegato: i coniugati sono molto meno tossici del parentale Escrezione urinaria
Nodularine (NOD)	50	ND**	Fegato (inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2A)	Non ci sono informazioni specifiche (probabili similitudini con MC)
Cilindrospermopsina (CYN)	2100 (24 h) 200 (6 giorni)	4400-6900 (2-6 giorni)	Rene e Fegato (composto parentale: inibizione della sintesi proteica; Metaboliti: meccanismo diverso ma ancora non chiarito)	Molto idrofila. Trasporto attivo (sistema degli acidi biliari) ma anche passivo. Evidenze indirette di bioattivazione da citocromo P450. Escrezione urinaria
Anatossina-a (ATX-a)	375	5000	Sistema neuromuscolare (legame al recettore nicotinico Ach ed effetti depolarizzanti sulla membrana)	Assorbimento g.i. rapido, degradazione ed eliminazione rapide, limitato potenziale di bioaccumulo
Omoanatossina-a	330	ND	Simile alla anatossina-a	Simile alla anatossina-a
Anatossina a-(s)	20-40		Sistema nervoso periferico (inibizione della acetilcolinesterasi ed ipereccitabilità nervosa)	Nessuna informazione diretta, ma possibile assorbimento g.i.** rapido, degradazione ed eliminazione rapide
Saxitossine (STX)	10-20	263 (topo)	Sistema neuromuscolare (blocco dei canali ionici di membrana) Effetti acuti sull'uomo: 144-304 µg/persona: sintomi lievi 456-1200 µg/persona: sintomi da moderati a gravi (paralisi e decesso)	Assorbimento g.i. rapido, ampia distribuzione e passaggio della barriera emato-encefalica. Escrezione rapida. Indicazioni indirette di detossicazione Bioaccumulo elevato in crostacei e molluschi.
Endotossine LPS**	40-190 mg/kg pc	ND	Pelle e mucose (irritazione, effetti topici)	Non ci sono informazioni specifiche

*Le referenze bibliografiche sono rintracciabili in Funari & Testai,2008.

**i, p = intraperitoneale; ND= Non Determinato; g.i. =gastrointestinale; LPS=lipopolisaccaridiche

Tabella 2. Caratteristiche tossicologiche delle principali cianotossine: tossicità ripetuta, genotossicità, cancerogenesi e tossicità riproduttiva*

Cianotossina	NOEL** subcronico (µg/kg/g)	LOEL** (µg/kg/g)	ADI/TDI** (µg/kg/g)	Genotossicità/ Cancerogenesi	Tossicità riproduttiva e dello sviluppo
Microcistine (MC)	40 (MC-LR; topi; 13 settimane; gavaggio) 330 (MC-LR in estratti; topi; 13 settimane; orale-dieta)	200	0,04 (UF**=1000)	Non genotossica: risultati positivi secondari a citotossicità MC-LR: attività di promotore tumorale (categoria 2B secondo la IARC)	MC-LR pura: Non tossica per la riproduzione e lo sviluppo. Estratti: attività teratogena in rane
Nodularine (NOD)	ND** (possibile riferirsi alla MC-LR)	ND	-	Non ci sono informazioni specifiche Attività di promotore tumorale (dati non sufficienti alla classificazione secondo la IARC)	Non ci sono informazioni
Cilindrospermopsina (CYN)	30 (Topi; 11 settimane; gavaggio) Estratti di <i>C. raciborskii</i> più tossici della CYN pura	60	0,03 (UF=1000)	Tossina parentale: non genotossica: risultati positivi secondari a citotossicità Metaboliti: possibili effetti genotossici Cancerogenesi: non ci sono dati affidabili	Nessun effetto evidenziato al momento
Anatossina-a	>510 (Topi; 54 giorni; acqua potabile) Rischio cronico limitato	ND	0,51 (UF=1000)	Non ci sono informazioni	Non tossica per la riproduzione e lo sviluppo
Omoanatossina-a	Non esiste un NOEL Rischio cronico limitato	-	-	Non ci sono informazioni	Non ci sono informazioni
Anatossina a-(s)	Non esiste un NOEL Rischio cronico limitato	-	-	Non ci sono informazioni	Non ci sono informazioni
Saxitossine (STX)	Non esiste un NOEL Rischio acuto > cronico	-	-	Non ci sono informazioni	Attività teratogena in larve di pesce e anfibio. Nessuna informazione su mammiferi
Endotossine LPS	Non esiste un NOEL Rischio cronico limitato	-	-	Non ci sono informazioni	Non ci sono informazioni

*Le referenze bibliografiche sono rintracciabili in Funari & Testai, 2008.

**NOEL= No Observed Effect Level; LOEL = Low Observed Effect Level; ND= Non Determinato; UF= fattori di incertezza; ADI/TDI= dose giornaliera accettabile/tollerabile

Relativamente alla tossicità acuta questo approccio porta inevitabilmente ad una sovrastima della tossicità di miscele di MC e NOD; per una valutazione più realistica è stato perciò proposto (Wolf & Frank, 2002) di utilizzare un metodo simile a quello adottato per le miscele di PCB e diossine, che prevede il calcolo di un fattore noto come *Toxicity Equivalent Factor* (TEF) a partire dai dati tossicologici disponibili sui principali congeneri. Al congenere di riferimento, la 2,3,7,8-TCDD che è il più tossico all'interno del gruppo, viene per definizione assegnato un TEF=1; agli altri congeneri sarà assegnato un TEF (≤ 1) proporzionale al loro potenziale tossicologico nei confronti della 2,3,7,8-TCDD. Moltiplicando poi il TEF per la concentrazione dei corrispondenti congeneri presenti nella miscela e sommando i valori ottenuti si otterrà la tossicità della miscela.

La tossina di riferimento può essere considerata la MC-LR, cosicché il suo TEF è =1. Il TEF individuale di una tossina X può essere calcolato dal rapporto tra il valore di LD₅₀ della MC-LR e della tossina X, secondo l'equazione:

$$\text{TEFX} = \text{LD}_{50} \text{ MC-LR} / \text{LD}_{50} \text{ X}$$

Considerando di avere una miscela ipotetica composta da MC-LR (30 µg/L); MC-RR (100 µg/L) e MC-YR (15 µg/L) e NOD (20 µg/L), seguendo l'approccio conservativo, la tossicità della miscela sarebbe considerata equivalente a quella dovuta alla presenza di 165 µg/L di MC-LR. Se invece fosse applicato l'approccio descritto, il risultato indicherebbe una tossicità equivalente molto inferiore, come esemplificato in Tabella 3.

Tabella 3. Applicazione del TEF ad una miscela di MC e NOD secondo l'approccio proposto da Wolf & Frank (2002)

Tossina	Concentrazione (µg/L)	TEF	Equivalente di tossicità
MC-LR	30	1,0	30
MC-RR	100	0,1	10
MC-YR	15	1,0	15
NOD	20	1,0	20
Totale	165		75

Per quanto riguarda gli studi di tossicità per dosi ripetute, studi a lungo termine non sono disponibili per alcuna cianotossina; una delle ragioni principali sta nella difficoltà di disporre di quantità adeguate di cianotossine pure per i trattamenti previsti per un test secondo le linee guida OECD. Lavorare con gli estratti non sembra la soluzione più idonea, anche perché in molti casi gli estratti hanno mostrato un livello di tossicità maggiore rispetto alle cianotossine pure, suggerendo che possano esserci altre componenti della cellula cianobatterica corresponsabili degli effetti o in grado di interagire con le cianotossine, aumentandone la tossicità (Falconer, 2007).

Molta attenzione è stata dedicata anche a presunti effetti genotossici e cancerogeni delle cianotossine: in realtà, nella maggior parte dei casi gli effetti genotossici evidenziati in vivo ed in vitro solo ad elevate concentrazioni sia di MC che di cilindrospermopsina (CYN) sono secondari all'elevata citossicità. Tali effetti possono essere attribuiti alla attività di endonucleasi in grado di frammentare il DNA a seguito dei fenomeni di necrosi (Rao *et al.*, 1998; Zhan *et al.*, 2004; Humpage *et al.*, 2005). La loro rilevanza è quindi marginale. I risultati positivi ottenuti con estratti di cianobatteri ma non con la MC-LR purificata fanno ipotizzare che anche per gli effetti genotossici gli estratti possano contenere altre componenti attive, diverse dalle cianotossine (Ding *et al.*, 1999). L'unica eccezione è rappresentata dai metaboliti prodotti dalla bioattivazione P450-dipendente della CYN: in epatociti primari di topo metabolicamente

competenti sono stati ottenuti risultati positivi nel *comet assay* a dosi di CYN $\leq 0,05 \mu\text{M}$, che suggeriscono una possibile attività genotossicità non secondaria alla citotossicità (Humpage *et al.*, 2005). Dal momento che il test utilizzato dà indicazioni di lesioni pre-mutagene, non è possibile trarre conclusioni definitive sulla genotossicità della CYN. Tuttavia, questo è sicuramente uno dei settori nei quali è necessaria l'acquisizione di maggiori informazioni. Relativamente agli effetti cancerogeni, la MC-LR che non ha attività di iniziazione, ha però mostrato proprietà di promozione tumorale in modelli animali (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Wanght & Zhuth, 1996; Sekijima *et al.*, 1999), che hanno indotto la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) a classificare la MC-LR come un cancerogeno di classe 2B (IARC, 2006). I dati sulle nodularine e sulla CYN non sono sufficienti per trarre conclusioni relative alle attività cancerogene di queste tossine.

Un altro settore non sufficientemente esplorato è lo studio delle proprietà tossicologiche delle endotossine LPS (lipopolisaccaridiche). Gli effetti topici che sono stati associati a contatto diretto con le tossine LPS dei cianobatteri, tra cui irritazioni cutanee e oculari, problemi di tipo gastrointestinale e reazioni allergiche e infiammatorie, non sono mai stati dimostrati sperimentalmente. Tali effetti sono stati attribuiti alle LPS cianobatteriche in analogia a ciò che si verifica per contatto con le LPS presenti nella membrana dei batteri Gram negativi. Tuttavia l'entità dell'analogia strutturale non è ancora nota, soprattutto rispetto alla componente lipidica, che è responsabile del grado di tossicità nelle LPS batteriche.

Dati disponibili sull'uomo

L'uso di acque superficiali interessate da presenza di cianobatteri tossici per l'emodialisi rappresenta un rischio notevole per i pazienti sottoposti a questo trattamento: la via di esposizione di tipo parenterale aumenta notevolmente la possibile dose interna di tossine, che entrano direttamente in circolo.

L'episodio di maggiore rilevanza sanitaria è stato riportato in Brasile, dove sono deceduti 56 pazienti dei 130 sottoposti a dialisi con acqua risultata poi contaminata da microcistine (Jochimsen *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2002).

Acque potabili

In dipendenza dei livelli di cianotossine nelle acque grezze e dell'efficienza dei processi di trattamento delle acque per la rimozione di cianobatteri e cianotossine disciolte, nelle acque per uso umano può essere presente un ampio range di livelli di cianotossine. Alcuni episodi di intossicazioni acute per consumo di acque contaminate hanno chiaramente dimostrato la plausibilità di una tale eventualità (Tabella 4).

Relativamente al rischio cronico associato al consumo di acque contaminate, sono stati condotti alcuni studi epidemiologici, ma le informazioni sono limitate e non permettono di trarre alcuna conclusione. Infatti, in nessuno degli studi è stato possibile provare che le cianotossine fossero il vero agente causale degli effetti osservati, ma semplicemente uno dei più plausibili.

In alcune zone della Cina, in cui gli abitanti consumavano per uso potabile acqua di stagno o di canale non trattata, sono state esaminate le possibili cause della incidenza (doppia rispetto ad altre aree) di tumori primitivi del fegato (Ueno *et al.*, 1996).

Tabella 4. Segnalazioni di effetti sull'uomo dovuti al consumo ad uso potabile di acque contaminate in varie aree geografiche

Agente causale	Luogo	Effetti	Bibliografia
Fioritura di <i>Anabaena</i> e <i>Microcystis</i> spp.	Brasile	2000 casi di gastro-enteriti e 88 decessi in 42 giorni	Teixera <i>et al.</i> , 1993
Trattamento di una fioritura di <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> con solfato di rame	Australia	140 bambini e 10 adulti ospedalizzati per danni epatici e renali in 1 settimana. Recupero completo di tutti i pazienti	Byth, 1980; Hawkins & Griffiths, 1993
Fioriture di diversi cianobatteri	Australia, Austria	Danni epatici e gastroenteriti	Botes <i>et al.</i> , 1985; Fawell <i>et al.</i> , 1993; Zilberg, 1996; El Saadi <i>et al.</i> , 1995; Falconer, 1989, 1994

È comunque facile intuire che il consumo di acqua non potabilizzata proveniente direttamente da stagni e corpi idrici non controllati comporta la presenza di tanti e tali fattori di rischio microbiologico e chimico, che è pressoché impossibile trovare un nesso causale tra i due eventi. Inoltre il consumo da parte di quelle stesse popolazioni di cibi contaminati da aflatossina B1, potente epatocancerogeno, rappresenta un ulteriore fattore confondente.

In Florida è stato condotto uno studio ecologico per valutare l'associazione tra rischio di contrarre tumore epatico o coloretale e consumo di acque superficiali potenzialmente contaminate da microcistine, utilizzando come popolazioni di controllo quelle che vivono in aree contigue, dove si consuma acqua di pozzo, assumendo a priori similitudine per stile di vita e caratteristiche demografiche. I risultati ottenuti non hanno permesso di provare né di negare alcuna associazione eziologia (Fleming *et al.*, 2001, 2002).

Alla luce della scarsa qualità dei dati epidemiologici disponibili, la IARC (2006) ha concluso che non è possibile associare l'eccesso di rischio di tumori epatocellulari e coloretale, riportati in alcuni studi, con l'esposizione alle MC.

Integratori alimentari

Recentemente si è andato diffondendo nei paesi industrializzati l'uso come integratori alimentari di estratti di alghe verde-azzurre (*Blue Green Algae Supplements*, BGAS), in passato diffuse in paesi orientali come Cina e India (Carmichael *et al.*, 2000). Gli integratori, principalmente a base di *Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina* spp., vengono consumati per le loro presunte attività di migliorare l'umore, aiutare nella perdita di peso durante diete ipocaloriche e come fonte energetica (Jensen *et al.*, 2001) e sono anche somministrati a bambini in età scolare che soffrono di disturbi dell'attenzione e iperattività (sindrome della *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) come terapia alternativa. L'assunzione è strettamente dipendente da scelte individuali e può difficilmente essere controllata per la valutazione della esposizione.

Recentemente è stato pubblicato un caso di decesso in una donna 34enne per tossicità epatica. Sebbene una diretta relazione causa-effetto non sia ancora stata stabilita con certezza, la morte è stata correlata all'assunzione cronica di BGAS, di cui la paziente era abituale consumatrice, dal momento che: i) i prodotti in suo possesso sono risultati contaminati da MC

(2,62-4,06 µg MC-LR equivalenti/g di peso secco); ii) sezioni epatiche della paziente sono risultate positive ad analisi immunoistochimiche con anticorpi anti-MC; e iii) i danni epatici non sono risultati compatibili con cirrosi da consumo di alcol, ma tipici degli effetti prodotti da MC (Dietrich *et al.*, 2007).

Acque di balneazione

Per quanto riguarda il rischio associato alle attività ricreative in acque di balneazione, sembra opportuno premettere che in Paesi temperati, come il nostro, la stagione balneare è limitata ai 4-5 mesi più caldi dell'anno. Questo tipo di esposizione non ha pertanto le caratteristiche necessarie per prefigurare un rischio cronico.

È invece possibile che in certe situazioni l'esposizione a cianobatteri durante le attività ricreative dia luogo ad effetti a breve termine, che sono stati, infatti, riportati in alcune pubblicazioni scientifiche.

Un unico caso di decesso è stato a posteriori associato ad esposizione ad anatossina-a da un coronar nei Stati Uniti. Un ragazzo avrebbe ingerito involontariamente acqua contaminata da questa cianotossina in uno stagno di un campo da golf (la tossina era stata rilevata nel fegato). Tuttavia questa associazione è caratterizzata da rilevanti incertezze, soprattutto in relazione al lungo tempo di latenza tra esposizione e decesso (circa 48 ore), inconsistente con i tempi nettamente inferiori osservati negli animali di laboratorio (Stewart *et al.*, 2006b).

A seguito di esposizioni a cianobatteri nelle acque di balneazione sono stati riportati effetti sui bagnanti quali forti emicranie, polmoniti, febbre, mialgia, vertigini, formazione di vescicole (Dillenberg & Dehnelt, 1960; Carmichael *et al.*, 1985; Stewart *et al.*, 2006c, Turner *et al.*, 1990). In un episodio, 10 su 20 soldati esposti ad un'intensa, prolungata attività di nuoto e canottaggio in un invaso infestato da una fioritura di *Microcystis*, riportarono vari sintomi respiratori, inclusi due casi di polmonite (Turner *et al.*, 1990).

In uno studio epidemiologico condotto in Australia, non sono risultate significative le differenze nei sintomi tra esposti e non esposti a due giorni dall'esposizione mentre sono risultate significative dopo sette giorni dall'esposizione a densità di cianobatteri superiori a 5000 cellule/mL (Pilotto *et al.*, 1997). Tuttavia, questo studio mostra diverse limitazioni, come, ad esempio, il numero ridotto di individui esposti e non. È stato anche osservato che le reazioni allergiche ritardate attribuite all'esposizione ai cianobatteri, osservate dopo 7 giorni, non sarebbero compatibili con i tempi tipici di queste reazioni, generalmente 4-24 ore dall'esposizione (Stewart *et al.*, 2006b).

In tre studi analitici condotti nel Regno Unito su 6 corpi idrici, 5 dei quali infestati da fioriture di cianobatteri, è emerso un quadro abbastanza comune: gli effetti osservati in tutti i casi erano comunque riconducibili a forme minori di morbidità (Philipp, 1992; Philipp & Bates, 1992).

A seguito di un'estesa fioritura di *Anabaena circinalis* in un corpo idrico in Australia, è stato riportato un aumento significativo del rischio di disturbi gastrointestinali e dermatiti in persone che avevano utilizzato le acque grezze non trattate per uso domestico ma non in coloro (soltanto 50) che praticarono attività ricreative nel corpo idrico (El Saadi *et al.*, 1995).

In uno studio prospettico, 1331 persone furono reclutate per studiare possibili effetti associati all'esposizione ai cianobatteri in 19 corpi idrici utilizzati per attività ricreative in Australia e in Florida (Stewart *et al.*, 2006b). Fu osservato un aumento significativo del rischio di sintomi respiratori e altri sintomi minori tra i soggetti esposti ai livelli più elevati di cianobatteri. Una relazione simile ma non significativa fu osservata per sintomi come febbre, dermatiti e otiti. Soltanto raramente le cianotossine vennero rilevate nelle acque utilizzate per attività ricreative;

quando presenti i livelli di MC, CYN e anatoxina-a erano generalmente bassi (intorno ad 1 µg/L), molto inferiori ai valori in grado di causare effetti sistemici.

A proposito degli effetti cutanei riportati in diversi studi, sembra opportuno rilevare che questi sono fortemente suggestivi di reazioni allergiche e che almeno alcuni dei sintomi osservati (come riniti, asma, congiuntiviti e orticaria) indicano una risposta dovuta a ipersensibilità immediata, probabilmente attribuibile ad una cascata di azioni scatenate all'azione infiammatoria delle citochine, consistente con le reazioni infiammatorie attribuite alle endotossine LPS. Non è possibile tuttavia escludere il ruolo dei batteri Gram negativi, come agenti eziologici per questi effetti, poiché anch'essi sono produttori di queste tossine. Infine, sembra opportuno rilevare che sintomi come dermatiti ed effetti gastrointestinali possono essere erroneamente attribuiti all'esposizione alle cianotossine ma potrebbero essere causati anche da altri agenti, come ad esempio alcuni composti organici rilasciati dalla lisi delle cellule dei cianobatteri (aldeidi, terpenoidi, chetoni, ecc.) che hanno proprietà irritanti e sensibilizzanti e altri fattori di rischio presenti nelle acque interne come la cercaria avicola, altri batteri e/o virus, ecc. (Stewart *et al.*, 2006a).

Sulla base dei dati aneddotici, epidemiologici e tossicologici (come illustrato di seguito) disponibili, sembra possibile concludere che il rischio di effetti gravi per la salute dei bagnanti è posto dai cianobatteri soltanto quando sono presenti in forma di fioriture o schiume.

Non sono disponibili studi riguardanti i possibili effetti sulla salute umana associati ad altre fonti di esposizione (es. prodotti ittici).

In conclusione, i dati disponibili mostrano che l'esposizione ad elevati livelli di alcune cianotossine e/o altri prodotti dei cianobatteri è in grado di causare effetti gravi (anche molto gravi) alla salute delle persone esposte (es. emodialisi, acque potabili, balneazione, supplementi alimentari). Tuttavia, nel loro insieme, i dati sull'uomo sono molto carenti, certamente non sufficienti per una valutazione esauriente del rischio associato all'esposizione, in particolare cronica, alle cianotossine.

Queste carenze possono essere almeno in parte colmate utilizzando le conoscenze acquisite attraverso gli studi disponibili riguardanti le caratteristiche tossicologiche delle cianotossine. Sulla base di queste conoscenze sono possibili le seguenti valutazioni del rischio, in relazione alle diverse tipologie di esposizione note alle cianotossine.

Rischio cronico

Il valore di dose giornaliera accettabile/tollerabile per esposizioni a lungo termine (*Acceptable Daily Intake/Tolerable Daily Intake*, ADI/TDI), può essere ricavato seguendo l'approccio utilizzato a livello internazionale da varie organizzazioni (*U.S. Environmental Protection Agency*, EPA; Unione Europea) e seguito anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Generalmente il valore di TDI si ottiene dal rapporto tra il NOEL tossicologicamente rilevante e una serie di fattori di incertezza (*Uncertainty Factors*, UF) che tengano conto delle incertezze del dato sperimentale e dei possibili fattori di variabilità, utilizzando considerazioni di tipo conservativo per dare adeguati margini di sicurezza alla protezione della salute dell'uomo:

$$TDI = NO(A)EL / UF .$$

Di seguito viene effettuato il calcolo del valore di TDI per la MC-LR, la CYN e la ATX-a, per le altre tossine non esistono dati tali da poter ricavare una TDI:

– MC-LR

In assenza di uno studio di tossicità cronica, è stato considerato come valido il valore di NOEL (*No Observed Effect Level*) subcronico quello derivante dallo studio a 13 settimane sul topo pari a 40 µg/kg pc/giorno (Fawell *et al.*, 1999a). La scelta di questo NO(A)EL (*No Observed Adverse Effect Level*) rappresenta un esempio della applicazione dell'approccio conservativo; infatti è stato derivato da uno studio sul topo, che almeno rispetto agli effetti acuti della MC-LR si è dimostrato più sensibile rispetto al ratto; nello studio le dosi testate sono molto distanti e il LO(A)EL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) (dose immediatamente superiore al NOAEL) è 200 µg/kg pc/giorno con effetti molto leggeri e presenti solo in un numero limitato degli animali trattati, per cui il valore di NOAEL potrebbe essere verosimilmente più elevato di 40 µg/kg pc/giorno; infine la via di esposizione è il gavaggio piuttosto che la somministrazione attraverso la dieta. Quest'ultima modalità di trattamento è stata utilizzata in un altro studio subcronico che ha fornito un NOAEL più alto (300 µg/kg pc/giorno), sulla base del fatto che il gavaggio introduce una dose 'bolo' nel tratto gastrointestinale con il raggiungimento di dosi interne più elevate, mentre attraverso la dieta l'introduzione è graduale e i sistemi di detossificazione possono essere più efficienti.

Al valore del NOAEL si applica un fattore di incertezza di 1000 dovuto alla moltiplicazione di 3 fattori pari a 10 che tengono conto:

- 1) della variabilità interspecifica (i dati sono ottenuti su animali sperimentali e si considera, a scopo puramente cautelativo, che l'uomo possa essere più sensibile);
- 2) della variabilità intraspecifica (si considera che all'interno della popolazione umana possano essere presenti individui più suscettibili per età come bambini e anziani, stati fisio-patologici e per caratteristiche genetiche e/o acquisite);
- 3) della mancanza di dati di tossicità cronica (lo studio subcronico corrisponde a circa 1/6 dell'intero arco della vita del topo) e delle proprietà biologiche della tossina.

Dall'applicazione dei suddetti fattori di sicurezza si ottiene la TDI per la MC-LR di 0,04 µg/kg pc/giorno (quindi 2,4 µg per una persona di 60 kg di peso). Questo vuol dire che un'assunzione fino a 2,4 µg di MC-LR/persona ogni giorno per l'intero arco della vita non comporta un rischio sanitario apprezzabile.

– CYN

Anche in questo caso non esistono studi di tossicità cronica. Il valore di NOEL subcronico più rilevante è quello pari a 30 µg/kg pc/giorno, derivato da uno studio in cui l'effetto critico considerato è una variazione del peso del rene (Humpage & Falconer, 2003). A questo valore, analogamente a quanto descritto per la MC-LR, è applicato un fattore di incertezza di 1000 che tiene conto della variabilità inter- e intra-specifica e della mancanza di dati di tossicità cronica. Dall'applicazione dei suddetti fattori di sicurezza si ottiene la TDI di 0,03 µg/kg pc/giorno; quindi 1,8 µg per una persona di 60 kg di peso. Questo vuol dire che un adulto può assumere fino a 1,8 µg di CYN ogni giorno per l'intero arco della vita senza che tale ingestione comporti un rischio sanitario apprezzabile. Questo valore di TDI deve essere considerato provvisorio: infatti, nel momento in cui dovessero essere dimostrate proprietà mutagene e/o cancerogene della CYN, al momento non ancora chiare, si renderebbe necessario aggiornarlo.

– ATX-a

Sulla base degli studi disponibili, l'OMS ha considerato che i dati di tossicità ripetuta non sono sufficienti per calcolare una vera TDI (Falconer *et al.*, 1999b). Infatti, negli studi per via orale disponibili (durata 4-7 settimane) non sono mai stati evidenziati effetti tossici

anche alle dosi più alte saggiate (fino a 510 µg/kg pc/d) (Astrachan *et al.*, 1980): non è stato perciò possibile calcolare un vero e proprio NOEL, dal quale ricavare la TDI. Tuttavia, per le considerazioni sopra esposte, sembra ragionevole ipotizzare che gli effetti cronici per la salute umana siano meno rilevanti rispetto a quelli acuti. Prendendo come range di valori provvisori di NOAEL 120-510 µg/kg pc/d (pur sapendo che il valore reale è sicuramente più elevato e quindi assumendo un atteggiamento conservativo) e applicando un fattore di incertezza di 1000 (100 per la variabilità inter- e intraspecifica e altri 10 per la mancanza di dati di tossicità cronica) si otterrebbero TDI di 0,12-0,51 µg/kg pc al giorno.

In quei casi nei quali acque interessate da fioriture di cianobatteri in corpi idrici superficiali siano utilizzate a scopo potabile, può configurarsi un rischio da esposizione cronica alle cianotossine. Tuttavia i trattamenti di potabilizzazione ai quali sono sottoposte le acque superficiali prima della loro distribuzione dovrebbero essere condotti in modo da ottenere una forte riduzione dei livelli delle cellule dei cianobatteri e delle cianotossine disciolte (Dietrich & Hoeger, 2005). Ovviamente dovrebbero essere evitate le condizioni, come ad esempio l'uso di alcuni disinfettanti, in grado di causare la lisi cellulare con il conseguente rilascio delle tossine (Jones & Orr, 1994). I trattamenti di potabilizzazione sono oggi in grado di rimuovere >99% delle cellule e delle cianotossine disciolte nelle acque grezze, ma dovrebbero comunque essere calibrati sulla base delle conoscenze sul corpo idrico e in relazione al contenuto delle cianotossine totali e di quelle disciolte in acqua. La somma del contenuto intracellulare e delle cianotossine disciolte è generalmente l'indice di esposizione più rilevante nella valutazione del rischio, tuttavia in alcuni casi è necessario differenziare tra forma particolata e disciolta. Ad esempio, quando i processi di potabilizzazione in atto sono capaci di rimuovere efficacemente solo le cellule di cianobatteri, il livello di tossine disciolte diventa il parametro di esposizione umana più rilevante. Il contenuto intracellulare delle MC è generalmente più alto della concentrazione di tossine disciolte nell'ambiente circostante (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Ibelings & Chorus, 2007), dove sono solo parzialmente rilasciate attraverso processi di trasporto attivo (Rapala *et al.*, 1997). Al contrario la CYN spesso viene ritrovata in acqua a concentrazioni paragonabili e anche più elevate di quelle intracellulari (Rücker *et al.*, 2007); per le altre cianotossine non sono disponibili informazioni attendibili sulla proporzione relativa di tossina disciolta in acqua rispetto al totale. Quando le fioriture sono in fase di decadimento o in seguito all'uso di agenti lisanti, è possibile che le concentrazioni di tossine disciolte siano piuttosto elevate (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Jones & Orr, 1994): il fenomeno è comunque limitato nel tempo a causa della forte diluizione all'interno del corpo idrico, del rimescolamento operato dal vento e da fenomeni di adsorbimento ai sedimenti e di (bio)degradazione.

Acque potabili

La possibilità di esposizione umana a MC attraverso l'acqua potabile è stata considerata dalla OMS, che ha derivato a partire dalla TDI di 0,04 µg/kg pc/giorno relativa alla MC-LR, un valore guida (*Guidance Value*, GV) di 1 µg/L per la concentrazione della MC-LR, avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti l'80% della assunzione totale (*Allocation Factor*, AF) ed un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso.

$$GV = \frac{TDI \times \text{peso corporeo} \times AF}{\text{consumo giornaliero (C)}} = \frac{0,04 \mu\text{g/kg} \times 0,8 \times 60 \text{ kg}}{2 \text{ L}} \cong 1 \mu\text{g/L}$$

Non avendo a disposizione TDI relative agli altri congeneri, è stato proposto di estendere il GV al contenuto di MC totali (Chorus & Bartram, 1999). Considerando che la MC-LR è tra i congeneri più tossici, relativamente alla tossicità acuta, considerare che il livello di cianotossine totali sia espresso in equivalenti di MC-LR rappresenta un approccio conservativo per la protezione della salute.

L'OMS non ha definito GV per altre cianotossine. Tuttavia partendo dai dati tossicologici disponibili e utilizzando lo stesso tipo di approccio è possibile ricavare valori indicativi sia per la ATX-a e per la CYN.

Nel caso della ATX-a, pur non essendo stato identificato un NOEL per la tossicità subcronica, visto che nel range di concentrazioni 120-510 µg/kg pc/giorno non sono evidenziabili effetti (Astrachan *et al.*, 1980; Fawell *et al.*, 1999b), è possibile considerare il valore più alto saggiato come un NOEL, per ricavare una TDI provvisoria di 0,51 µg/kg pc/g, e un GV $\cong$ 12 µg/L (Duy *et al.*, 2000). Partendo da questo valore di TDI provvisoria, è stato proposto che un valore guida di 1 µg/L per la concentrazione massima nell'acqua potabile fornirebbe un margine di sicurezza adeguato alla protezione della salute di popolazioni potenzialmente esposte (Fawell *et al.*, 1999b).

Relativamente alla CYN, dal valore di TDI=0,03 µg/kg pc/giorno, calcolata sulla base del NO(A)EL subcronico (Humpage & Falconer, 2003), e considerando una percentuale di assunzione attraverso l'acqua da bere del 90% (dovuta essenzialmente alla carenza di informazioni su una possibile esposizione attraverso cibi contaminati o altre fonti) si può ricavare un GV= 0,81 µg/L, che può essere arrotondato a GV= 1 µg/L (Codd *et al.*, 2005).

Dieta

Un'altra fonte di esposizione cronica alle cianotossine è rappresentata dalla dieta: le cianotossine potrebbero essere ingerite attraverso:

- le carni e/o il latte degli animali che si siano abbeverati con acque contaminate;
- il consumo di vegetali irrigati con acque contaminate;
- il consumo di prodotti ittici.

Il rischio proveniente dal consumo di carni e latte non sembra essere significativo dai dati disponibili. Infatti, i risultati di studi su bovini trattati con MC o estratti di *M. aeruginosa* indicano l'assenza di residui nelle carni e nel latte (Orr *et al.*, 2001; Feitz *et al.*, 2002). Non sono disponibili dati per le altre cianotossine.

Il possibile accumulo di cianotossine in prodotti vegetali, specialmente a foglia larga, è stato inizialmente ipotizzato sulla base di un lavoro nel quale piante di lattuga erano irrigate con acque contenenti fioriture e schiume di *M. aeruginosa*. L'analisi dei liofilati del materiale ottenuto dalla fioritura indicavano la presenza di equivalenti di MC-LR fino a 3,23 µg/mg peso secco (Codd *et al.*, 1999). Dopo 10 giorni dall'ultima irrigazione, furono trovati in estratti delle foglie di lattuga non lavati livelli di MC-LR tra 0,094 e 2,487 µg/g peso secco, che gli stessi autori attribuiscono con buona probabilità al contenuto intracellulare di cellule di cianobatteri depositate sulle foglie. Anche se in questo specifico caso si può considerare che i cianobatteri possano venire facilmente rimossi con le semplici operazioni di lavaggio delle verdure prima del consumo, altri lavori si sono interessati al possibile assorbimento delle tossine disciolte da parte di piante. Estratti di piantine di rapa e riso esposte ad acque contenenti MC-LR equivalenti fino a 3 mg/L contenevano livelli di MC proporzionali ai livelli di esposizione con livelli massimi di 651 e 5,4 ng/g peso fresco rispettivamente di rapa e riso (Chen *et al.*, 2004). Lo studio quindi mostra che, seppur con marcate differenze di specie, alcuni vegetali possono trattenere MC presenti nelle acque di irrigazione.

Negli studi appena descritti vengono comunque utilizzate acque interessate da livelli di MC corrispondenti a fioriture sostenute e a schiume. Non solo questo non può che essere un evento episodico e di durata limitata per poter essere rilevante per un consumo cronico, ma quei livelli di MC sono in grado di inibire la crescita delle piante e di causare fenomeni visibili di fitotossicità (presenza di foglie gialle e brune), che ovviamente limitano la possibilità che tali prodotti possano venire consumati dalla popolazione (Chen *et al.*, 2004). Quando invece vegetali come i broccoli siano stati irrigati con acque contenenti livelli di MC tipicamente misurati in acque superficiali (1-10 µg/L), le tossine sono rilevabili solo nelle radici, a livelli che non corrispondono ad alcun rischio apprezzabile per la salute umana (Järvenpää *et al.*, 2007).

L'insieme dei dati disponibili indica che il consumo di prodotti vegetali non rappresenta un rischio per la salute, anche se sembra ragionevole sconsigliare l'uso irriguo per acque chiaramente interessate da forti fioriture e schiume per piante ad uso alimentare.

Le MC possono accumularsi negli organismi acquatici e il loro consumo può rappresentare un problema significativo per la salute umana (Duy *et al.*, 2000), anche in seguito alla possibilità di accumulare lungo la catena alimentare. Dall'analisi dei dati disponibili sono state rilevate le seguenti concentrazioni massime di MC nelle parti eduli di pesci, nei crostacei e nei mitili: 300, 2700 e 16000 µg/kg, rispettivamente (Dietrich & Hoeger, 2005). Recentemente un valore anche più alto di MC (370 µg/kg) è stato riportato come livello di contaminazione nella carpa (*bighead carp*) pescata in un lago cinese (Chen *et al.*, 2007). Per le altre cianotossine invece le informazioni sono molto carenti, ma, data l'instabilità delle anatoxine, è ragionevole pensare che un loro accumulo nei prodotti ittici sia altamente improbabile.

Gli organismi acquatici (pesci, molluschi bivalvi crostacei e altri macroinvertebrati) possono accumulare le cianotossine attraverso l'ingestione di cianobatteri e/o di cibo contaminato o assorbendo le tossine disciolte attraverso la via transdermica. Quest'ultima via di esposizione potrebbe essere particolarmente rilevante per la CYN, che si trova spesso preferenzialmente in forma disciolta piuttosto che localizzata all'interno delle cellule batteriche (Preussel *et al.*, 2006; Rücker *et al.*, 2007). Nel caso delle MC, sebbene concentrazioni elevate siano state misurate in acqua in seguito alla lisi di fioriture superficiali senescenti o per l'uso di agenti in grado di produrre lisi, può essere ragionevolmente assunto che l'esposizione del biota a livelli elevati di MC disciolte sia un evento poco frequente e comunque di durata molto limitata (Ozawa *et al.*, 2003). Di conseguenza l'ingestione di cibo contaminato da MC e/o di cianobatteri rappresenta la via di esposizione più rilevante per il biota. Recentemente è stata pubblicata una rassegna molto accurata, a cui si rimanda per i dettagli, sul *pattern* di bioaccumulo delle cianotossine negli organismi eduli di acqua dolce e sulla possibilità di bio-magnificazione confrontata con i processi di bio-diluizione nella catena trofica (Ibelings & Chorus, 2007).

Dai dati disponibili ad oggi è possibile concludere che la fonte più rilevante di ingestione di MC attraverso la dieta per l'uomo è rappresentata dal consumo dei prodotti ittici.

La valutazione del rischio tossicologico associato al consumo cronico di prodotti ittici può essere effettuata confrontando la TDI con i livelli di cianotossine assunte giornalmente. Per valutare l'assunzione di cianotossine con i prodotti ittici è necessario misurarne per un periodo congruo le concentrazioni nelle parti eduli delle specie più rappresentative per il loro consumo, in modo da poter avere una stima attendibile della loro ingestione media. Se, nel caso delle MC, i valori di assunzione non superano o eguagliano la TDI definita dall'OMS (0,04 µg/kg pc/giorno, corrispondenti a 2,4 µg/giorno per una persona adulta di 60 kg di peso corporeo), anche consumi protratti per l'intero arco della vita non comportano un rischio sanitario significativo.

L'identificazione del livello di esposizione è un aspetto cruciale nel processo di valutazione quantitativa del rischio. Nel caso del consumo di prodotti ittici per avere una stima attendibile dell'ingestione media di cianotossine, è necessario misurare il contenuto di cianotossine nelle

parti eduli delle specie consumate per un periodo di tempo sufficientemente lungo, tenendo nella dovuta considerazione le variazioni stagionali nella produzione di cianotossine. È pertanto necessario elaborare programmi di monitoraggio adeguati per il corpo idrico d'interesse. Una stima dell'esposizione non accurata non permette una valutazione del rischio attendibile.

In riferimento alla stima delle quantità di cianotossine ingerite attraverso il consumo di prodotti ittici, non è noto in primo luogo quale forma delle cianotossine (libera, coniugata, associata alle proteine) sia realmente biodisponibile e a quale forma riferiscono i livelli misurati nei tessuti. Le differenze osservate applicando metodi immunoenzimatici e di LC/MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) fanno ritenere che con i primi viene rilevata la somma di cianotossine in forma libera e coniugata e forse in parte legate alle proteine tissutali; con i secondi vengono rilevate le cianotossine in forma libera (anche se difficilmente sono determinate tutte le possibili varianti presenti), ma ovviamente dipende dal metodo utilizzato per trattare il tessuto prima della estrazione.

Molti dei dati disponibili sono stati ottenuti in prove di laboratorio; quando invece provengano da prove sul campo, sono il frutto di misure sporadiche (valori picco) e non di piani di monitoraggio adeguati allo scopo o ottenuti su specie non comunemente consumate dalla popolazione: conseguentemente, i dati a disposizione sono generalmente poco rappresentativi della reale esposizione cronica dell'uomo.

Pur con tutti i limiti appena esposti, non avendo a disposizione dati di consumo cronico attendibili, sono stati considerati validi i limiti del *range* di concentrazioni di MC nelle parti eduli di pesci (0,25-100 µg/kg). Assumendo, in uno scenario decisamente considerabile come un *worst case*, un consumo medio giornaliero per tutta la vita adulta di 200 g (equivalente al peso di un pesce da porzione, ma superiore di circa 3 volte al consumo di pesce giornaliero previsto dalla FAO, *Food and Agriculture Organization*, per la dieta del nostro Paese), possono essere calcolate ingestioni pari a 0,05-20 µg/persona al giorno. Il valore più basso è ben al di sotto il valore della TDI e quindi non c'è un rischio apprezzabile nel consumo di pesce; al contrario il valore più alto dell'intervallo è quasi 10 volte più alto della TDI, indicando chiaramente che l'ingestione cronica di pesce contaminato a quei livelli rappresenta un rischio sanitario da considerare.

Considerazioni simili potrebbero essere utilizzate per valutare il rischio conseguente all'ingestione di pesci contenenti altre cianotossine, ma il data set disponibile è talmente limitato che ad oggi sembra azzardato anche condurre una valutazione di rischio provvisorio.

Integratori alimentari

Un'altra possibile fonte di esposizione è costituita dagli integratori alimentari di estratti di alghe verde-azzurre, principalmente a base di *Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina* spp. Vengono consumati per le loro presunte attività benefiche e in virtù del loro essere 'prodotti naturali', anche in dosi relativamente elevate, fino a 20 g al giorno (Dietrich & Hoeger, 2005). Non essendo farmaci non esistono specifiche prescrizioni, l'assunzione è strettamente dipendente da scelte individuali e può difficilmente essere controllata per la valutazione della esposizione.

Alcuni studi hanno evidenziato recentemente la contaminazione di alcuni integratori da MC-LR, con livelli variabili fino ad un massimo di 35 µg/g, e comunque con una percentuale elevata di campioni con livelli superiori a 1 µg/g di peso secco (Dietrich & Hoeger, 2005).

Per valutare il rischio che deriva da un'assunzione molto prolungata nel tempo di prodotti contaminati da MC-LR, dovrà essere confrontato il valore di MC-LR presente nella quantità totale di integratore ingerito nell'arco di una giornata con il valore di TDI di 0,04 µg/kg pc/g: valori inferiori o uguali alla TDI non comportano un rischio apprezzabile per la salute anche in

caso di consumo per l'intero arco della vita. Nel caso peggiore (*worst case*) in cui un adulto consumi 20 g di integratore al giorno (il livello più alto di consumo riportato in letteratura) contaminati da 35 µg/g di peso secco di MC-LR (il livello massimo determinato), si avrebbe una ingestione di 700 µg/persona/giorno con superamento significativo ($\cong 250$ volte) della TDI totale (che per un adulto di 60 kg è 2,4 µg/persona al giorno). Considerando scenari più realistici del sopradescritto *worst case*, potremmo assumere un consumo medio di 4 g di BGAS giornalieri (che da una indagine molto preliminare sui prodotti disponibili sul mercato corrispondono a 4-8 capsule) e un livello di contaminazione di 1 µg MC/g: si avrebbe una assunzione totale di 4 µg MC/persona al giorno, con un superamento della TDI che potrebbe configurare una situazione di rischio cronico per un adulto. Visto che una buona percentuale (>60%) dei campioni analizzati fino ad oggi conteneva livelli superiori a 1 µg/g di peso secco, appare evidente come il superamento della TDI possa verificarsi frequentemente.

Alcuni autori (Gilroy *et al.*, 2000) hanno proposto un valore limite provvisorio per gli integratori di 1 µg MC/g di peso secco, ottenuto utilizzando un approccio simile a quello usato dall'OMS per la determinazione del GV per l'acqua potabile. Tuttavia, come appena evidenziato, con tale contaminazione è sufficiente un consumo di 4 g giornalieri di BGAS per porre problemi alla salute umana a seguito di un consumo cronico per un adulto. Questo valore porrebbe comunque rischi non trascurabili per la salute dei bambini, per i quali è stato descritto il consumo di tali prodotti anche in tenera età come terapia 'alternativa' per la ADHD, in considerazione del loro minore peso corporeo. Infatti per un bambino in età scolare del peso di circa 30 kg, la TDI risulterebbe di circa 1,2 µg MC al giorno e con un livello di contaminazione pari a 1 µg di MC/g di integratore il consumo verosimile di circa 1 g al giorno (equivalente a 1-2 capsule) porterebbe ad una ingestione simile a quella della TDI.

La presenza di cianotossine come contaminanti di integratori alimentari a base di alghe verde-azzurre non può essere trascurato e presuppone una attenzione particolare da parte delle Autorità sanitarie che nella impossibilità di bandire tali prodotti dal mercato dovrebbero porre limiti precisi e cautelativi per la popolazione per autorizzare la loro immissione in commercio.

Rischio subacuto/subcronico

Una delle possibili obiezioni alla conduzione di una valutazione di rischio associata ad un consumo cronico sia di prodotti ittici che di integratori alimentari è legato all'adozione di scenari di esposizione poco realistici.

È, infatti, estremamente poco probabile che un individuo consumi pesce contaminato da cianotossine tutti i giorni della propria vita. Appare molto più realistico pensare che tale eventualità possa ragionevolmente verificarsi per un periodo di tempo limitato ma discreto, ad esempio in relazione alla stagione di fioritura dei cianobatteri nel corpo idrico di interesse. Questo scenario di esposizione configurerebbe un rischio associato ad un'esposizione sub-cronica e potrebbe essere considerato più rappresentativo delle reali condizioni di esposizione umana. Questa situazione nell'ambito della valutazione del rischio per il consumatore associato alla sicurezza d'uso dei prodotti fitosanitari, si traduce nella derivazione della dose acuta di riferimento (*Acute Reference Dose*, ARfD), allo scopo di proteggere gruppi di popolazione che consumino elevati livelli di una derrata contenente residui di prodotti fitosanitari dotati di una elevata tossicità acuta, soprattutto se si tratti di neurotossicità, come nel caso delle cianotossine.

La ARfD viene calcolata sulla base del NO(A)EL subacuto/subcronico, al quale vengono applicati gli opportuni fattori di incertezza (UF). Per la MC-LR un UF = 100, che copra le differenze inter- e intra-specifiche è considerato sufficiente; il risultato è una ARfD = 0,4 µg/kg al giorno, corrispondente a 24 µg/persona al giorno per un adulto di 60 kg. Il confronto della

ARfD con i valori di *intake* calcolati assumendo un consumo medio di 200 g di prodotto ittico e l'intervallo dei valori medi di contaminazione da MC (0,05-20 µg/persona adulta al giorno), evidenzia che, mentre nella parte bassa dell'intervallo, non si corrono rischi per la salute, il valore più alto dell'intervallo è molto vicino al valore di riferimento e di conseguenza è consigliabile un atteggiamento di attenzione da parte delle Autorità locali sia nel seguire attentamente i livelli di contaminazione, sia raffinando la valutazione del rischio attraverso la considerazione delle altre possibili fonti di esposizione, che potrebbe portare come rischio cumulativo ad una situazione di preoccupazione per la salute.

Una considerazione analoga può essere fatta anche per gli integratori alimentari, che possono essere assunti continuativamente ma per periodi relativamente brevi (qualche mese, ad esempio in concomitanza con una dieta dimagrante). Anche in questo caso si può considerare la dose acuta di riferimento ARfD per la MC-LR (0,4 µg/kg pc/g, corrispondente a 24 µg al giorno per una persona adulta di 60 kg), con la quale dovrebbero essere confrontati i dati sul contenuto di cianotossina negli integratori, per valutare i rischi di parte della popolazione che per un certo periodo ne abbia fatto uso. Nel *worst case* descritto per l'esposizione cronica (consumo massimo di 20 g giornalieri e livello massimo di contaminazione di 35 µg/g) la dose ingerita (700 µg) risulterebbe quasi 30 volte superiore alla ARfD per un adulto di 60 kg, ponendo un serio rischio per la salute.

Volendo analizzare scenari più realistici, visto che livelli di MC superiori a 10 µg/g sono una eccezione, ma che una buona percentuale (>60%) dei campioni analizzati conteneva livelli superiori a 1 µg/g di peso secco, possiamo assumere 5 µg/g come un livello medio di contaminazione: in questo caso con un consumo di 4 g giornalieri (corrispondenti a 4-8 capsule), comporterebbe una assunzione di MC molto vicina al valore di riferimento della ARfD per cui sarebbe necessario condurre una valutazione del rischio considerando anche le altre possibili fonti di esposizione (dieta, acqua potabile, attività ricreative), che potrebbe portare come rischio cumulativo ad una situazione di preoccupazione per la salute.

A maggior ragione una situazione del genere, porrebbe rischi non trascurabili per la salute dei bambini, in considerazione del loro minore peso corporeo.

Rischio acuto

La valutazione del rischio acuto può essere condotta considerando che sono disponibili alcuni studi di tossicità acuta i.p. su topo che permettono di stabilire un NOEL acuto, vale a dire una dose alla quale non si osservano effetti di alcun genere, in particolar modo nel fegato, che rappresenta l'organo bersaglio maggiormente sensibile ai danni indotti dalla MC-LR (Fromme *et al.*, 2000; Dietrich & Hoeger, 2005). Tale NOEL si colloca in un intervallo di valori tra 25 e 50 µg/kg p.c. Dagli studi di tossicità acuta per via orale disponibili non è possibile ricavare un NOEL acuto perché alla dose più bassa testata (500 µg/kg p.c.) sono presenti segni di sofferenza epatica. I dati di tossicità acuta per via i.p. possono essere utilizzati per l'extrapolazione alla via orale moltiplicando il valore più basso dell'intervallo (25 µg/kg p.c.) per un fattore 10; si utilizza così un approccio conservativo, visto che i dati sperimentali indicano che le differenze tra le due vie di somministrazione sono più elevate (30-100 volte). Analogamente a quanto descritto per il rischio cronico, per estrapolare il dato ottenuto all'uomo è necessario applicare un fattore di sicurezza pari a 100, che tenga conto della variabilità inter- e intra-specifica: si ottiene un valore di dose acuta senza effetto = 2,5 µg/kg p.c., che per un uomo di 60 kg equivale all'ingestione di 150 µg di MC-LR. Essendo la MC-LR la più tossica tra i vari congeneri, considerare tale valore valido per l'ingestione di MC totali dovrebbe assicurare un adeguato margine di protezione. Tuttavia, in considerazione della ripidezza della curva dose-risposta

osservata è opportuno utilizzare questa soglia soprattutto per promuovere le più adeguate misure per prevenire esposizioni pericolose.

Acque potabili

Per quanto riguarda le acque potabili, è possibile che vengano raggiunti livelli di esposizione alle cianotossine in grado di dar luogo ad effetti acuti. Questi superamenti sono possibili quando il corpo idrico superficiale utilizzato per l'approvvigionamento idropotabile è interessato da fioriture di cianobatteri o da schiume, che contengono livelli particolarmente elevati di cianotossine, anche di decine di mg/L (Chorus & Bartram, 1999). Se queste acque vengono usate tal quali per scopo potabile, le quantità di cianotossine presenti in un volume d'acqua ridotto, come quello di un comune bicchiere da tavola, possono essere sufficienti per causare effetti di tipo acuto. Nel caso delle MC, in un volume di acqua di 100 mL, il valore di dose acuta (150 µg per un adulto di 60 kg di peso) viene superato a partire da concentrazioni di microcistine di 1,5 mg/L. In relazione alle altre cianotossine, i dati tossicologici disponibili non consentono di derivare valori di sicurezza in relazione ad esposizioni acute. Tuttavia, non sembra improbabile che, analogamente alle MC, elevate densità dei cianobatteri che le producono possano dar luogo ad effetti acuti/a breve termine. Ad esempio, per l'anatossina-a(S) sono stati riportati livelli in Danimarca fino a circa 3,3 mg/g (Henriksen, 1997); per la CYN in Australia sono state rilevate concentrazioni comprese tra 0,2 e 10,1 mg/L, con un valore massimo di 589 mg/L (Sivonen & Jones, 1999).

Ovviamente queste esposizioni si possono verificare soltanto nelle seguenti situazioni: acque grezze non sottoposte a trattamenti di potabilizzazione; avarie al sistema di potabilizzazione; utilizzo di agenti di disinfezione che causano il rilascio di grandi quantità di cianotossine intracellulari non intercettate successivamente. In paesi come il nostro, con conoscenze e tecnologie avanzate nel settore della potabilizzazione delle acque per uso umano, questo rischio dovrebbe essere assai remoto. Infatti, con semplici trattamenti delle acque grezze è possibile ottenere una riduzione anche superiore al 99% del numero di cellule di cianobatteri; con trattamenti specifici è possibile ridurre notevolmente i livelli delle tossine disciolte (Jones & Orr, 1994; Dietrich & Hoeger, 2005).

Per quanto riguarda le cianotossine disciolte in acqua, è improbabile ma non impossibile che siano raggiunte concentrazioni in grado di causare effetti acuti/a breve termine. Le concentrazioni di MC disciolte in acqua risultano, infatti, in genere nettamente inferiori rispetto a quelle intracellulari (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Ibelings & Chorus, 2007). Notevoli quantità di MC, come di altre cianotossine, possono tuttavia essere rilasciate a seguito del decadimento di una fioritura/schiuma o al loro trattamento con algheicidi. Questa situazione è circoscritta e le concentrazioni delle cianotossine disciolte diminuiscono in genere rapidamente per i processi di diluizione, adsorbimento ai sedimenti, degradazione, trasporto lungo la catena trofica. In Germania sono stati rilevati livelli di MC disciolte a valori nettamente inferiori rispetto a quelle intracellulari; tuttavia sono stati riportati valori massimi fino ad alcune centinaia di µg/L, con un picco di 1.800 µg/L a seguito del decadimento di un'estesa fioritura (Sivonen & Jones, 1999). A queste concentrazioni le microcistine potrebbero, in effetti, causare effetti acuti. Ma valgono le considerazioni sopra accennate in riferimento alla permanenza di valori così elevati di concentrazione e ai sistemi di potabilizzazione.

Contrariamente alle MC, la CYN disciolta in acqua può essere rilevata a livelli più alti di quella intracellulare. In Germania, questa tossina è stata rilevata in 19 dei 21 laghi analizzati; dei complessivi 115 campioni, la CYN è risultata presente in 45 campioni soltanto nella forma particolata e in 57 sia disciolta in acqua che in forma particolata (Rücker *et al.*, 2007). Sono state riportate concentrazioni di 0,002-0,484 µg/L per la forma particolata e di 0,08-11,75 µg/L

per la forma disciolta. Per la CYN, non sono disponibili dati tossicologici per derivare una dose acuta senza effetto. Tuttavia, le concentrazioni appena riportate non sembrano essere particolarmente elevate, tali da comportare un reale rischio acuto per la popolazione.

Per le altre cianotossine non risultano disponibili dati sulle concentrazioni raggiunte in acqua dalle forme disciolte.

Prodotti ittici

Relativamente alla dieta, il consumo di prodotti ittici costituisce una fonte di esposizione in grado di comportare un possibile rischio acuto. Infatti, nelle viscere di pesci (fegato e intestino) sono stati riportati livelli medi di MC = 13,4 mg/kg, con un valore massimo di 478 mg/kg; nelle parti eduli dei pesci sono stati determinati valori fino a 370 µg /kg (nelle carpe). Assumendo un consumo episodico di 300 g di pesce con questo livello di contaminazione (caso peggiore) si assumerebbe una quantità di MC anche superiore a 100 µg /per una persona adulta. Questa dose è piuttosto vicina alla dose di sicurezza da effetti acuti e richiederebbe un atteggiamento di cautela in considerazione della ripidezza della curva dose/risposta. Questo scenario è assai improbabile, ma poiché è possibile si ritiene necessario che nei corpi idrici interessati da presenza a densità elevate di cianobatteri tossici vengano condotte attività di monitoraggio adeguate per controllare questo tipo di rischio. In relazione al consumo di viscere, visto i livelli più elevati di contaminazione, il rischio di effetti acuti può essere elevato anche con consumi di 100 g. Il consumo di viscere non rientra nelle comuni abitudini alimentari, tuttavia, sulla base dei dati analitici disponibili, potrebbe essere opportuno sconsigliarlo esplicitamente con un'adeguata informazione ai cittadini.

Acque di balneazione

In riferimento alla balneazione, lo svolgimento di attività ricreative in acque infestate da elevate densità di cianobatteri tossici (fioriture o schiume) potrebbe dar luogo ad effetti acuti/a breve termine. In effetti, se si considera che nel corso di una nuotata possono essere ingeriti involontariamente/accidentalmente 100 mL di acqua, in questo volume potrebbero essere presenti dosi in grado di causare effetti acuti. Questo rischio non dovrebbe riguardare le persone adulte, ovviamente non attratte da un corpo idrico interessato dalla presenza di fioriture o schiume, ma non può essere escluso per i bambini. Per questa ragione è importante che in prossimità di corpi idrici dove vengono svolte attività ricreative siano predisposte le più opportune segnalazioni di esposizioni pericolose in situazioni di presenza di elevate densità di cianobatteri.

Supplementi alimentari

Per quanto riguarda i supplementi alimentari a base di cianobatteri, considerando i livelli più elevati di MC riscontrati in questi prodotti e di consumo (rispettivamente di 35 µg/g e 20 g/persona/giorno) risulterebbe un'assunzione in grado di causare effetti acuti (700 µg/persona adulta >> 150 µg). Ovviamente quello stesso livello di contaminazione particolarmente elevato di 35 µg/g, nel caso di un bambino di 30 kg di peso costituirebbe un rischio di danno acuto anche a seguito di un consumo contenuto di BGAS (pari a circa 2 g).

Bibliografia

- Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. Evaluation of the sub-acute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18: 684-8.
- Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002;181-182:441-6.
- Byth S. Palm Island mystery disease. *Med J Austr* 1980;2:40-2.
- Carmichael WW, Drapeau C, Anderson DM. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. and Flah. var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J Appl Phycol* 2000;12:585-95.
- Carmichael WW, Jonesm CLA, Mahomood NA, Theiss WC. Algal toxins and water-based diseases. *CRC Crit Rev Environ Cont* 1985;15:275-313.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. Effects of micricystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica rapus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) *Toxicon* 2004;43:393-400.
- Chen J, Xie P, Zhang D, Lei H. *In situ* studies on the distribution pattern and dynamics of microcystins in a biomanupaltion fish-bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environ Pollution* 2007;147:150-7.
- Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon; 1999.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 1999;37:1181-6.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.
- Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:273-89.
- Dietrich DR, Ernst B, Day BW. Human consumer death and algal supplement consumption: a post mortem assessment of potential microcystin-intoxication via microcystin immunoistochemical (MC-ICH) analyses. In: 7th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC), Brazil, 2007. p. 132.
- Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan. *Can Med Assoc* 1960;83:1151-4.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Re* 1999;442:69-77.
- Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000;163:113-86.
- El Saadi OE, Esterman AJ, Cameron S, Roder DM. Murray River water, raised cyanobacterial cell counts, and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med J Aust* 1995;162:122-5.
- Falconer IR Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. *Tox Assess* 1989;4:175-84.
- Falconer IR, Bartram J, Chorus I, Kuiper-Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd GA. Safe levels and safe practices. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon; 1999b. p. 155-78.
- Falconer IR. Cyanobacterial toxins present in *Mycrocystis aeruginosa* extracts-More than microcystins! *Toxicon* 2007;50:585-8.
- Falconer IR. Health problems from exposure to cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Ed.). *Detection Methods for Cyanobacterial Toxin*. London: Royal Society of Chemistry; 1994. p.3-10.

- Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *J Environ Toxicol Water Qual* 1991;6:177-84.
- Fawell JK. *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR. Microcystin-LR: 13 week oral (gavage) toxicity study in the mouse (final report)*. Volume 4. Medmenham, UK: Water Research Centre; 1993.
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Exp Toxicol* 1999a;18:162-67.
- Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Human Exp Toxicol* 1999b;18:168-73.
- Feitz AJ, Lukondeh T, Moffitt MC, Burns BP, Naido D, Vedova JD, Golden JM, Neilan BA. Absence of detectable levels of cyanobacterial toxin (microcystin-LR) carry-over into milk. *Toxicon* 2002;40:1173-80.
- Fleming LE, Rivero C, Burns J, Williams C, Bean JA, Shea KA, Stinn J. Blue-green algal (Cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae* 2002;1:157-68.
- Fleming LE, Rivero C, Burns J, Williams C. *Final Report. Blue green algal exposure, drinking water and colorectal cancer study*. St. Petersburg, Florida: The Florida Harmful Algal Bloom Taskforce; 2001.
- Fromme H, Koehler A, Krause R, Fuehring D. Occurrence of cyanobacterial toxins –microcystins and anatoxin-a – in Berlin water bodies with implications to human health and regulation. *Environ Toxicol* 2000;15:120-30.
- Funari E, Testai E. Cianobatteri nelle acque superficiali: valutazione del rischio sanitario associato alla esposizione alle cianotossine *Notiziario Istituto Superiore di Sanità* 2007;20:11-7.
- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
- Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in bluegreen algae dietary supplements. *Environ Health Perspect* 2000;108:435-9.
- Hawkins PR, Griffiths DJ. Artificial destratification of a small tropical reservoir: effects upon the phytoplankton. *Hydrobiologia* 1993;254:169-81.
- Henriksen P, Carmichael WW, An J, Moestrup O. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 1997;35:901-13.
- Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of No Observed Adverse Effect level for deriving a Drinking Water Guideline Value *Environ Toxicol* 2003;18:94-103.
- Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health Part A* 2005;68:739-53.
- IARC. Cyanobacterial peptide toxins. In: *Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins*. Vol. 94. International Agency for Research on Cancer; 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-cyanobacterial.pdf> 2006; ultima consultazione 30/12/2007.
- Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater 'seafood' and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 2007;150:177-92.
- Järvenpää S, Lundberg-Niinistö C, Spoof L, Sjövall O, Tyystjärvi E, Meriluoto J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 2007;49:865-74.

- Jensen GS, Ginsberg DI, Drapeau C. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *JAMA* 2001;3:24-30.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MBDeC, De Filho MDA, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to Microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998;338:873-8.
- Jones GJ, Orr PT. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res* 1994;28:871-6.
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;118:420-4.
- Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, De Paoli DA, Orr CLA. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* 2001;39:1847-54.
- Ozawa K, Yokoyama A, Ishikawa K, Kumagai M, Watanabe MF, Park HD. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology* 2003;4:131-8.
- Philipp R, Bate AJ. Health-risks assessment of dinghy sailing in Avon and exposure to cyanobacteria (blue-green algae). *J Inst Water Environ Management* 1992;6:613-20.
- Philipp R, Brown M, Bell R, Francis F. Health risks associated with recreational exposure to blue-green algae (cyanobacteria) when windsurfing and fishing. *Health Hyg* 1992;13:115-9.
- Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust N Z J Public Health* 1997;21:562-6.
- Preussel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 2006;47:156-62.
- Rao PVL, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bhaskar ASB. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;5:1-6.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemelä SI. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* 1997;64:2206-12.
- Rücker J, Stüken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon* – dominated temperate lakes. *Toxicon* 2007;50:800-9.
- Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, Chen G, Yu S, Ueno Y. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* 1999;20:161-5.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; 1999. p. 41-111.
- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Fleming LE, Burns JW, Gantar M, Backer LC, Shaw GR. Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria- an international prospective cohort study. *BMC Public Health* 2006b;6:93.
- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review *Environ Health* 2006c;24(5):7.

- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health* 2006a;24(5):6.
- Teixera MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil *Bull Pan Am Health Organ* 1993;27:244-53.
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br Med J* 1990;300:1440-1.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Yu SH. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996;17:1317-21.
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:7-60.
- Wangth HB, Zhuth HG. Promoting activity of microcystins extracted from waterblooms in SHE cell transformation assay. *Biomed Environ Sci* 1996;9:46-51.
- Wolf HU, Frank C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixtures. *Environ Toxicol* 2002;17:395-9.
- Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu D-S, Zhang L-S, Suzuki T, Hayashi M, Honma M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res* 2004;557:1-6.
- Zielberg B. Gastroenteritis in Salisbury European children-a five year study. *Centr Afr J Med* 1996;12:164-8.