A3. EFFETTI SULL'UOMO ASSOCIATI AD ESPOSIZIONE A CIANOBATTERI E CIANOTOSSINE

Emanuela Testai*, Franca M. Buratti
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
**emanuela.testai@iss.it*

A3.1. Introduzione

L'uomo può essere esposto alle cianotossine attraverso diverse vie, caratteristiche per ciascuno scenario di esposizione (1). Escludendo l'esposizione per via parenterale, possibile a seguito dell'uso per l'emodialisi di acqua superficiale proveniente da corpi idrici contaminati da cianobatteri e non opportunamente purificata (2-4), l'uso ricreativo delle acque comporta l'esposizione, anche contemporanea, attraverso le altre tre principali vie: orale, cutanea e inalatoria. Ovviamente l'esposizione può avvenire anche attraverso usi diversi dell'acqua e di altri prodotti contaminati. Infatti l'esposizione orale può derivare dal consumo di acqua e cibo contaminati, dall'uso di integratori alimentari a base di liofili o estratti cianobatterici. Inoltre l'ingestione accidentale o involontaria di acqua può avvenire durante le attività balneari e ricreative,per esempio. nuotando, cadendo inaspettatamente da imbarcazioni o durante la pratica di sport acquatici e nel caso di bambini, giocando sul bagnasciuga e/o mettendo in bocca le mani dopo avere avuto contatto con l'acqua. D'altro canto nello svolgimento delle suddette attività ricreative, sportive o anche professionali (es. per pescatori e bagnini), l'esposizione cutanea per contatto diretto e quella per via inalatoria sono sicuramente rilevanti. La via inalatoria può essere considerata rilevante non solo per chi svolge attività in acqua ma anche per chi staziona sulla spiaggia o nelle zone prospicienti alla zona interessata dalla fioritura, inclusi i mesi più freddi, non compresi nella stagione balneare vera e propria. D'altra parte la possibilità di inalazione dopo formazione di materiale derivato da schiume seccatesi sulla riva fa pensare a possibili implicazioni per la salute, in analogia a quanto osservato a seguito del ritrovamento di Microcistine (MC) nelle croste desertiche (5).

Ovviamente lo scenario e la via espositiva influenzano la potenzialità di indurre effetti locali al punto di contatto (es. pelle, occhi, epitelio gastro-intestinale e delle vie respiratorie) e la biodisponibilità che determina la dose interna di cianotossina dalla quale dipendono gli effetti tossici sistemici.

Di seguito verranno sinteticamente presentate le varie segnalazioni riportate in letteratura e gli studi epidemiologici che hanno evidenziato effetti sulla salute dell'uomo a seguito di esposizione a cianobatteri e/o cianotossine a seguito di i) attività ricreative e balneari, ii) emodialisi, iii) consumo di acqua potabile e cibo contaminati.

A3.2. Attività balneari e ricreative

Considerando la stagionalità della fioritura delle diverse specie di cianobatteri da un lato e il periodo limitato nel quale è praticata la balneazione nelle zone a clima temperato come il nostro Paese, gli scenari espositivi legati alle attività ricreative in corpo idrici risultano più associabili ad un rischio a breve termine (sub-cronico) piuttosto che ad una esposizione giornaliera molto

prolungata nel tempo (rischio cronico). Lo svolgimento di attività ricreative in acque infestate da elevate densità di cianobatteri tossici (fioriture o schiume) potrebbe dar luogo ad effetti acuti. In effetti, sono stati descritti tre casi: un solo caso di decesso, negli USA ed effetti acuti risoltisi dopo le opportune cure mediche dopo alcuni giorni. Il decesso, attribuito a posteriori da un *coroner*, è stato associato all'esposizione di un adolescente ad anatossina-a (ATX-a), a seguito di caduta accidentale in uno stagno di un campo da golf (e conseguentemente ad ingestione involontaria). La tossina fu infatti ritrovata *post-mortem* nel sangue e nelle feci del ragazzo. Ci sono comunque alcune incertezze su tale associazione per la latenza tra esposizione e morte (48 h) che non concorda con il tempo di letalità che si osserva negli studi sperimentali sugli animali relativamente all'attività neurotossica della tossina che è di poche ore (6).

Un altro caso legato alla ingestione involontaria di acqua (si stima di circa 240 mL) a seguito di caduta accidentale in acqua è stato documentato in un lago canadese: il soggetto adulto dopo poche ore ha sviluppato un disturbo gastroenterico acuto, progredito successivamente in una sintomatologia simil-influenzale, caratterizzata da febbre, forte mal di testa, dolori articolari e mialgia (7). In entrambi i casi l'ingestione è stata determinata dallo stimolo del cosiddetto riflesso immersione-deglutizione, che ha una probabilità maggiore di essere indotto quando la temperatura dell'acqua è inferiore ai 25°C (8). Quindi cadute accidentali o immersioni in acque relativamente fredde rappresentano un rischio maggiore di ingestione rispetto alle acque tiepide delle stagioni calde.

Recentemente è stato riportato un caso-studio di intossicazione acuta durante un'attività sportiva balneare di un giovane in Argentina, accidentalmente caduto in acqua dove è rimasto immerso per circa 2 ore. Il lago era affetto da una forte fioritura di *Microcystis* spp. nell'acqua sono stati trovati 48,6 μg/L di MC-LR disciolta. Quattro ore dopo l'esposizione, che comprendeva contatto diretto, ingestione e inalazione, il ragazzo cominciò ad avere nausea, dolore addominale e febbre. Nei giorni successivi i disturbi progredirono con segnalazione di dispnea e difficoltà respiratoria con diagnosi ospedaliera di una polmonite atipica che escludeva altri agenti eziologici come batteri, virus e funghi ma non altre tossine presenti nell'acqua. Infine a una settimana dall'esposizione il giovane sviluppò una epato-tossicosi con un significativo incremento dei biomarker di danno epatico (Alanina aminotransferasi, ALT, Aspartato aminotransferasi, AST e γ-glutamiltransferasi, γGT). Il completo recupero degli effetti avvenne entro 20 giorni (9).

Effetti acuti simili a quelli dovuti alle cianotossine dopo esposizione balneare, ma con un grado di gravità molto maggiore, sono stati descritti per esposizione alla debromoaplysiatossina e alla lyngbyatossina, tossine prodotte durante la fioritura di *Lyngbya majuscula,* un cianobatterio marino, diffuso nel mondo in più di 98 località con climi tropicali, sub tropicali e temperati (10); nonostante la sua presenza sia stata segnalata in Francia, attualmente non sembra essere rilevante alle nostre latitudini. Gli effetti più frequentemente descritti sono le reazioni dermatologiche di chi si trova a contatto con l'acqua, con lesioni acute cutanee più o meno serie specialmente nelle zone coperte dal costume (10,11). Vengono riportati anche irritazione oculare e delle vie respiratorie ed effetti gastroenterici dopo ingestione (12), verosimilmente legati ad azione locale con fenomeni di forte irritazione della mucosa gastrointestinale, compatibili con il meccanismo di azione di queste tossine.

I vari dati disponibili fino al 2006 relativi sia a segnalazioni e report di tipo aneddotico che a studi epidemiologici sugli effetti sulla salute a seguito di attività di balneazione sono stati esaurientemente descritti in una rassegna (13): i risultati dell'analisi evidenziavano un range di sintomi diversificati associati a questa via espositiva, anche se in nessun caso la valutazione dell'esposizione (quando presente) è sufficiente per definire valori soglia per l'induzione di tali effetti.

Tre studi analitici trasversali (14-16) sono stati condotti nel Regno Unito sui frequentatori di sei bacini interni, 5 dei quali infestati dalle fioriture di cianobatteri, evidenziando similitudine negli effetti riportati indipendentemente dai siti. Nella maggior parte dei casi sono stati segnalati sintomi gastro-intestinali (nausea, vomito, gastroenteriti), dermatologici (arrossamento cutaneo, irritazione cutanea e oculare e delle mucose), sintomi respiratori, generalmente non gravi. Tuttavia in alcuni casi sono stati anche riportati alcuni malesseri acuti seri come polmonite, febbre, mialgia, vertigine e forte mal di testa, e presenza di vesciche e ulcerazioni alla mucosa buccale (7,17-19).

Sono riportate anche se non frequentemente (20) evidenze di risposte allergiche, spesso collegate agli effetti cutanei osservati, legate a sintomi come riniti, congiuntiviti, asma e orticaria, indice di risposte mediate da ipersensibilità. Il quadro sintomatologico legato agli effetti infiammatori/allergici è compatibile con il profilo tossicologico delle endotossine lipopolisaccaridiche (LPS), visto che le altre tossine, testate come molecole pure su modelli animali, hanno mostrato di non avere (MC) o di avere solo un debole potenziale (Cilindrospermopsina, CYN) per l'induzione di effetti di sensibilizzazione (21,22), al contrario degli estratti cianobatterici. Uno studio è stato condotto su una popolazione di 259 soggetti (età 7-78 anni) affetti da rinite allergica e perciò sottoposti a un test allergologico (*skin-prick testing*): utilizzando come possibile allergene preparati cianobatterici privi di tossine, lo studio ha evidenziato che circa il 30% degli individui è risultato positivo ad almeno una delle specie testate. La severità della risposta e il numero di specie in grado di elicitare una risposta erano molto strettamente correlate. Lo studio dimostra chiaramente che l'allergenicità associata ad esposizione a cianobatteri è legata a componenti di questi organismi diversi dalle tossine prodotte (23), ulteriormente avvalorando l'ipotesi che il ruolo principale possa essere svolto dalle tossine LPS.

Inoltre, deve essere tenuto conto che i) durante le fioriture dei cianobatteri altri composti organici come aldeidi, terpenoidi e chetoni possono essere dissolti nell'acqua e alcuni di loro mostrano proprietà irritanti e sensibilizzanti quindi non può essere escluso il loro contributo negli effetti evidenziati (1); e ii) uno studio recente ha suggerito che la comunità batterica associata ai cianobatteri, particolarmente i ceppi di *Aeromonas*, può contribuire significativamente, se non essere responsabile dei sintomi gastrointestinali riportati a seguito di esposizione a fioriture cianobatteriche durante le attività ricreazionali (24).

A seguito di una estesa fioritura di *Anabaena circinalis* in un fiume australiano, fu condotto uno studio caso-controllo (25): un significativo aumento del rischio di effetti gastro-intestinali (GI) e di patologie dermatologiche fu trovato nei partecipanti che avevano usato l'acqua non trattata per usi domestici e non per il sottogruppo (50 soggetti) che avevano praticato attività ricreative.

Lo studio epidemiologico relativo ad attività ricreative più citato è stato condotto in Australia nel 1997 (26): sui risultati descritti nello studio sono basate in gran parte le linee guida sulle acque di balneazione dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) (27) per prevenire il rischio di irritazioni e di effetti più severi causati da MC (senza tenere conto di altre possibili tossine). Lo studio prospettico riporta che persone esposte per più di 1 ora durante le attività ricreative in acque contenenti elevate concentrazioni di cianobatteri (>5.000 cellule/mL) più facilmente riportavano nei successivi 7 giorni almeno un sintomo rispetto a chi era stato esposto ad acqua non contaminata, mentre non risultavano significative le differenze nei sintomi tra esposti e non esposti a due giorni dall'esposizione. Questo studio mostra diverse limitazioni commentate anche da altri autori (1, 13), tra cui il numero ridotto di individui esposti e non (93 soggetti esposti e 43 non esposti); la mancata correlazione con i livelli di MC, che fa presupporre che l'agente etiologico non sia legato alla produzione di tali tossine; il fatto 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.

Più recentemente è stato condotto uno studio prospettico di coorte più accurato, che ha reclutato 1.331 soggetti da 19 bacini con strutture ricreative nell'est dell'Australia e nella Florida centrale e del nord-est (6). Nello studio i controlli erano gruppi di bagnanti in laghi localizzati nei pressi di quelli scelti per il reclutamento dei casi ma non affetti da fioriture di cianobatteri. Questa caratteristica rende lo studio qualitativamente migliore rispetto a quello del 1997, nel quale i controlli erano persone che non avevano avuto contatto con l'acqua. Le categorie di esposizione livello basso, medio ed elevato di cianobatteri, furono stabilite considerando la superficie cellulare, piuttosto che la densità espressa in n. cell/mL. La scelta fu determinata dal fatto che in molti casi i laghi oggetto di studio erano dominati da picoplankton come *Aphanocapsa* spp. and *Merismopedia* spp.con diametro ≤1μm, mentre gli altri cianobatteri come *A. circinalis* hanno un diametro medio di circa 6-8,5 μm (28): la conta cellulare avrebbe portato quindi ad una sovrastima della biomassa. È stata preferita la superficie cellulare alla misura del biovolume in quanto il picoplankton ha un elevato rapporto superficie/volume, e il biovolume avrebbe portato ad una sottostima dell'esposizione alle cellule più piccole e soprattutto per il contatto diretto la superficie è ritenuta un parametro importante. Per derivare questa grandezza è stata presa come struttura rappresentativa una cellula sferica di 6,2 μm di diametro (tipica di *Microcystis aeruginosa* o *A. circinalis*), per cui 20.000 cell/mL corrispondono ad una superficie cellulare di 2,4 mm^2/mL e 100.000 cell/mL a 12,0 mm^2/mL. Anche questo metodo ha qualche limitazione, in quanto i) prende in considerazione solo cellule sferiche o cilindriche, escludendo altre forme (es. ellissoidali); ii) non tiene conto di aggregati cellulari in cui la superficie cellulare disponibile al contatto con la pelle è decisamente inferiore rispetto a quella di cellule singole.

Un confronto della diversa allocazione nei tre gruppi espositivi dei soggetti arruolati utilizzando i tre modi per misurare l'esposizione (che in ogni caso sono stime in quanto i prelievi dei campioni di acqua non sono stati fatti contestualmente al contatto degli individui arruolati, secondo il disegno dello studio prospettico) è riportata nella Figura A3.1. È evidente che utilizzando la densità cellulare un numero maggiore di individui è incluso nel gruppo ad elevata esposizione.

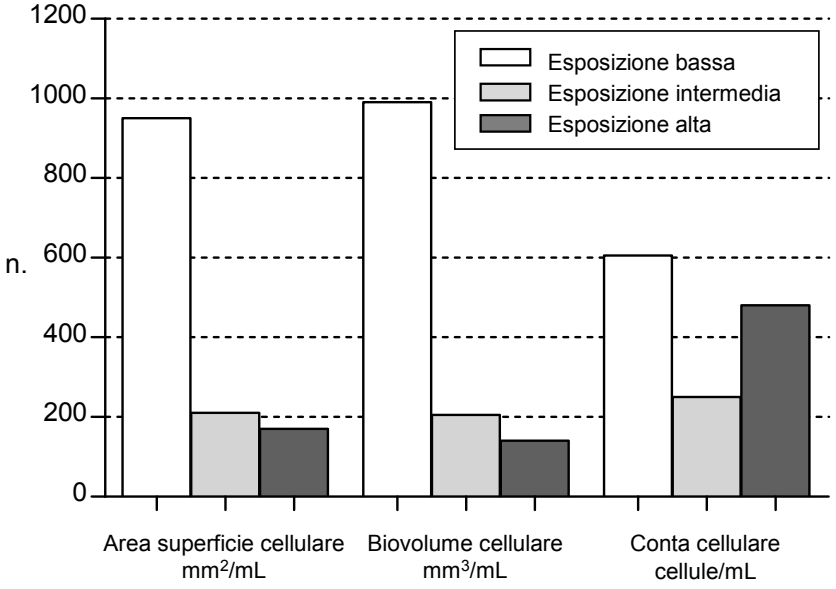

Figura A3.1. Allocazione dei tre gruppi espositivi in base a differenti parametri per misurare la presenza dei cianobatteri cellulari

Lo studio ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei sintomi respiratori e di altri blandi sintomi generici tra i partecipanti esposti a densità elevate di cianobatteri (>12 mm^2/mL). È interessante notare che le persone che avevano usato moto d'acqua nei laghi con alta concentrazione di cianobatteri (superficie cellulare >12,0 mm^2/mL) riportavano sintomi, in particolare respiratori, in maniera doppia delle persone che avevano fatto la stessa attività in laghi dove la concentrazione di cianobatteri era bassa (superficie cellulare<2,4 mm^2/mL). Una correlazione positiva ai livelli elevati di esposizione, anche se non statisticamente significativa, fu trovata anche per i sottogruppi con sintomi cutanei, ma poiché spesso tali sintomi sono non specifici e con regressione spontanea tale da non richieder assistenza medica, potrebbero essere stati largamente sottostimati dai partecipanti. D'altro canto i sintomi GI e le dermatiti possono anche essere erroneamente associati all'esposizione a cianobatteri, perché questi disturbi possono essere causati da altre sostanze disciolte in acqua durante la fioritura e/o alla possibile presenza di altri agenti eziologici come batteri, virus o stimoli fisici che possono provocare orticaria non allergica (6).

Studi relativi ad esposizione ricreazionale (attività di sci d'acqua o su imbarcazioni) sono stati condotti in California, prendendo in considerazione come parametro espositivo la presenza di tossina in aerosol (<0,1 ng MC/m^3) o tamponi nasali, per considerare quantitativamente l'eventuale esposizione per inalazione (29,30) e nel sangue dei soggetti esposti. Nello studio caso-controllo (30) 81 persone tra adulti e bambini (casi) furono reclutate tra quelle che frequentavano due laghi con fioriture di *M. aeruginosa* e altre 7 che frequentavano un lago non contaminato (controlli). La concentrazione totale di MC nell'acqua del lago risultava tra 15-350 µg/L, con la MC-LA come congenere dominante, mentre la concentrazione nell'aerosol (campionato utilizzando campionatori personali per circa 2 ore) era mediamente 0,052 ng MC/m^3 con valori fino 2,89 ng/m^3. La stima dell'esposizione inalatoria risultava molto variabile sia per l'andamento bimodale della dimensione della particelle dell'aerosol (0,23 mm e 2,64 mm), sia per l'interferenza della matrice nel saggio ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) per la quantificazione delle MC dai tamponi nasali pre- e post esposizione (30). Nel plasma dei soggetti non fu mai determinata tossina superiore al limite di determinazione (*Limit of Detection*, LoD) (1 µg/L). Questo risultato pone alcuni dubbi sulla reale biodisponibilità della tossina MC-LR e sulla possibilità di assorbimento a seguito di inalazione tale da dar luogo ad effetti sistemici. D'altra parte gli stessi autori, pur ipotizzando la possibilità dell'esposizione inalatoria, ritengono che i sintomi riportati dalle persone considerati 'casi' avessero valore limitato sia per la scarsa numerosità degli individui arruolati, specie dei controlli, che non permette di evidenziare la possibile differenza tra gruppo esposto e controllo, sia perché i sintomi respiratori e dermatologici riportati potevano essere dovuti anche all'esposizione ad altri contaminanti (30).

Relativamente all'esposizione per inalazione, uno studio recente ha determinato livelli in aria di 16,2 pg/m^3 di nodularina (NOD) e 1,8 pg/m^3 di MC utilizzando per 4, 12 and 24 h campionatori ad alto volume in due laghi in Nuova Zelanda durante una fioritura ed è stato valutato se tali concentrazioni potessero rappresentare un rischio per la popolazione (31). Assumendo il limite della MC per l'acqua potabile definito dall'OMS (1 µg/L), il consumo di 2 litri d'acqua e una biodisponibilità per la via inalatoria 10 volte più alta rispetto alla via orale (sulla base di studi che mostrano che gli effetti acuti della MC-LR somministrata per deposizione intratracheale sono paragonabili a quelli ip nel topo), la concentrazione massima inalabile giornalmente sarebbe circa 200 ng per un uomo di 60 kg. Quindi assumendo una ventilazione media di 30,3 L/min per 24 h, la concentrazione della tossina nell'aerosol non dovrebbe superare i 4,58 ng MC-LR/m^3. È pur vero che differenti tipi di attività corrispondono a velocità di inalazione diverse; quindi è stata presa in considerazione un'attività pesante in base alla quale le tossine potenzialmente inalate dalla popolazione prospiciente ai laghi in 24 ore raggiungevano valori massimi di 1,7 ng e 0,18 ng

per la NOD e la MC, rispettivamente. Quindi la quantità delle due cianotossine aerosolizzate misurate nei due laghi neozelandesi non poneva nessun rischio associato ad inalazione prolungata nella popolazione esposta (31), e a maggior ragione nemmeno un rischio acuto. Considerando il valore limite nell'aerosol stimato sulla base della TDI (*Tolerable Daily Intake*) come derivato dallo studio sopra citato (31), anche il valore più elevato di 2,89 ng MC /m^3 di aerosol, descritto in lavori precedenti (29, 30), non configurerebbe rischi per la salute.

D'altro canto più recentemente è stata riportata la presenza di MC nelle polveri desertiche in Qatar a livelli di 1,5-53,7 ng/g (5). Gli autori ipotizzano che la quantità inalata da una persona potrebbe superare il valore di TDI di 1-2 ng/kg pc al giorno per un adulto di 60 kg (basato sul NOAEL inalatorio di 3 µg/kg pc nel topo definito precedentemente (32). Secondo gli autori quantità al di sotto di 5-10 pg/L non rappresenterebbero un rischio inaccettabile per la salute.

Recentemente è stato pubblicato un report dei *Centers for Disease Control and prevention* (CDC) degli USA che raccoglie i dati di sorveglianza sanitaria su malattie trasmesse dall'acqua ricreazionale per gli anni 2009-2010 (33).

Nel biennio, degli 81 *outbreak*, 24 (30%) sono stati associati all'uso ricreazionale di acque non trattate, il 96% delle quali era relativo a bacini di acqua dolce. In 11 casi (46% del totale) l'agente eziologico 'cianobatteri' fu confermato (attraverso la determinazione di fioriture con ≥20 µg/L MC nei campioni di acqua prelevati durante o al massimo entro 24 h dall'esposizione) o sospetto (MC <20 µg/L; determinazione di altre tossine indipendentemente dal loro livello). Le cianotossine rilevate principalmente furono MC, CYN, ATX-a, e saxitossina (STX) ma in alcuni casi è stata riportata co-presenza di più cianotossine. L'83% degli eventi fu registrato durante giugno, luglio e agosto (il 79% dei 14 eventi riportati dal 1978 al 2008, indicando un incremento notevole del fenomeno negli anni). Gli *outbreak* confermati hanno coinvolto almeno 61 persone (2 ospedalizzati; 7 visitati in una struttura di pronto soccorso e 34 ricorsi comunque a cure mediche), per lo più (66%) con età inferiore ai 19 anni. Gli 11 eventi hanno avuto una durata media di 9 giorni (*range*: 0-44 gg) con il manifestarsi dei sintomi riportato entro poche ore del giorno di esposizione fini a 2 giorni dopo.

Le esposizioni durante le attività ricreazionali furono sia per contatto che per ingestione e inalazione di aerosol. Più del 70% degli effetti era associato alla via espositiva. Gli effetti evidenziati furono dermatologici come *rash* cutaneo, irritazione di pelle e occhi, gonfiore e ulcerazioni (essenzialmente a seguito di contatto diretto); sintomi gastrointestinali (crampi addominali, nausea, vomito, diarrea) quando era riportata ingestione di acqua; e respiratori (tosse, congestione nasale, difficoltà respiratorie), a seguito di inalazione. Febbre, mal di testa, otiti e segni neurologici (tra cui anche stato confusionale, disturbi alla vista) sono stati riportati nel 75% dei casi in cui i campioni di acqua contenevano anche ATX-a e STX. Considerando che le persone colpite in maggioranza avevano un' età inferiore o uguale a 19 anni, i bambini potrebbero avere un rischio più alto di effetti sulla salute associati alle fioriture algali per la maggiore frequenza di esposizione e la più grande quantità di acqua ingerita durante le attività balneari (33).

Nel report non sono indicate le densità cellulari associate ai diversi *outbreak*, ma in 8 casi sono state misurate le concentrazioni di cianotossine: le MC erano sempre presenti, anche se solo in 4 casi superavano i 20 µg/L indicati come soglia dalle linee guida OMS per un rischio moderato per la salute (27) (Tabella A3.1).

È evidente dalla tabella che nell'*outbreak* 8 che ha i livelli più alti di MC-LReq (>2.000 µg/L) e la presenza contemporanea di altre tossine si è segnalato uno dei due casi di ospedalizzazione; non sono riportate informazioni sui livelli presenti nell'*outbreak* 11, che ha dato luogo all'altro caso di ricovero. È anche evidente che nell'*outbreak* 5 (dove la concentrazione di MC-LReq era >1.000 µg/L) si è verificata la segnalazione del numero più alto dei casi sintomatici. Al momento non sono stabiliti limiti per le altre cianotossine nelle acque di balneazione, nè informazioni riguardanti possibili interazioni.

Tabella A3.1. Tipo di esposizione, assistenza sanitaria fornita e indicatori di qualità delle acque relativi agli *outbreak* associati a cianobatteri negli Stati Uniti per gli anni 2009-2010

***Outbreak*/ Stato**	**Casi**	**Tipo di assistenza sanitaria[a]**			**Tipo di esposizione**	**Indicatori di qualità delle acque[b]**				
		MF	**PS**	**H**		**CYAN**	**ATX-a** (µg/L)	**CYN** (µg/L)	**MC** (µg/L)	**STX** (µg/L)
1 New York	2	1	0	0	Contatto	X	_	_	112,5	_
2 New York	2[c]	0	0	0	Contatto	_	_	_	_	_
3 New York	2	0	0	0	Contatto	X[g]	_	_	_	_
4 Ohio	3	1	0	0	Contatto, ingestione, inalazione	_	0,05-0,1	NR	4,6	NR
5 Ohio	19	19	0	0	Contatto, ingestione, inalazione	_	_	_	>1000	_
6 Ohio[ef]	7[d]	2	0	0	Contatto, ingestione, inalazione	X[h]	NR	NR	0,2	0,03
7 Ohio[f]	9	3	2	0	Contatto	_	_	NR	20,8	NR
8 Ohio[ef]	8	5	5	1	Contatto, ingestione, inalazione	_	15,0	9,0	>2000	0,09
9 Ohio	2	0	0	0	Contatto, ingestione	_	0,2	0,3	0,3	NR
10 Washington	3	2	0	0	Ignota	_	_	_	<6,0[i]	_
11 Washington	4	1	0	1	Ingestione	_	_	_	_	_

Modificato da (33)

MF: Medico di famiglia; PS: Pronto soccorso; H: ospedalizzati
CYAN: Cianobatteri
NR= non rilevato (tossine nei campioni al di sotto del LoD).

a. Differenti livelli di assistenza sanitaria a cui le persone hanno avuto accesso. Nessun decesso
b. L'identificazione dei livelli di *E. coli* non è stata riportata (analisi fatte entro il giorno 1 dopo il periodo di esposizione).
c. Informazioni sull'assistenza sanitaria non note per entrambi i casi.
d. Informazioni sull'assistenza sanitaria non note per un caso.
e. Sono stati riportati malesseri e decessi di cani e pesci (nel caso dell'*outbreak* 8 anche di uccelli).
f. Esposizione è avvenuta nei pressi del lago che era anche fonte di acqua potabile. Nei campioni di acqua dopo trattamento la concentrazione di cianotossine era sotto il LoD).
g. Entrambe le esposizioni sono di un singolo giorno. *Microcystis* fu identificata per microscopia 3 giorni dopo la data di esposizione.
h. Fioritura mista di cianobatteri tossicogenici in successione: inizialmente *Anabaena* spp., poi *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon* spp. e *Planktolyngbya limnetica*. 4 giorni dopo la data dell'ultima esposizione MC non è stata rilevata, STX misurata a 0,05 µg/L e ATX-a è stata misurata a 0,05-0,1 µg/L.
i. MC fu >6 µg/L durante la settimana prima dell'outbreak

Lo studio prospettico più recente riguarda 466 residenti sulle rive di 3 laghi canadesi, sotto osservazione per un periodo di 8 settimane. Uno dei laghi, Lake Champlain's Missisquoi Bay (MB), fornisce acqua potabile dopo trattamento (34), per cui i dati dello studio non sono limitati

ad esposizione per uso ricreativo, ma almeno per una parte dei partecipanti, rappresentano una esposizione mista, che comprende l'uso domestico e potabile dell'acqua. Uno degli altri due laghi, Lake William (LW), inoltre ha mostrato una presenza di cianobatteri significativamente inferiore agli altri due (densità più alta circa 50.000 cell/L, contro $>>10^6$ negli altri due laghi), dando luogo ad un sottogruppo di residenti esposti a livelli più bassi. La concentrazione di MC nel campionamento vicino alla riva del lago LW era nella maggior parte dei casi sotto il limite di determinazione, con un valore massimo di 0,63 µg/L; nel lago Roxton (LR) era nel range: 0,008–108,8 µg/L con 16% dei campioni >1 µg/L e 2% >20 µg/L; nel lago MB il range era da non determinabile a 773 µg/L con il 44% e il 10% dei valori superiori, rispettivamente a 1 e 20 µg/L. I sintomi valutati andavano da quelli gastrointestinali, a quelli cutanei e respiratori, otiti e congiuntiviti, dolori muscolari, mal di testa. Solo i sintomi gastrointestinali furono associati al contatto ricreazionale. Il rischio relativo (RR) di avere sintomi gastrointestinali era correlato alla densità dei cianobatteri (<20.000 cell/mL: RR=1,52, Intervallo di Confidenza (IC) 95%=0,65-3,51; 20.000-100.000 cell/mL: RR=2,71, IC 95%=1,02-7,16; >100.000 cell/mL: RR=3,28, IC 95%=1,69-6,37; significatività dell'incremento: p-trend=0,001). Curiosamente i sintomi GI erano correlati positivamente solo per gli individui che riportavano un contatto limitato con l'acqua, e non c'era correlazione in caso di contatto completo. Gli autori spiegano tale anomalia con la consapevolezza dei partecipanti allo studio di possibili implicazioni sanitarie associate alla balneazione in caso di fioriture, che li hanno portati ad evitare il contatto diretto completo. Tuttavia la concentrazione di MC non sembra essere associata con la frequenza dei sintomi registrati; tuttavia è da notare che sintomi dopo contatto sono stati registrati anche a concentrazioni di 7,65 µg/L, più bassa rispetto al limite di riferimento di 20 µg/L (35, 36). Tuttavia gli stessi autori non escludono la presenza di altri agenti eziologici come altre cianotossine o le comunità batteriche associate ai cianobatteri (24).

A3.3. Emodialisi

La possibilità di esposizione attraverso la via parenterale si verifica quando acque provenienti da corpi idrici superficiali vengono utilizzate per emodialisi. Questa via espositiva rappresenta un notevole rischio per l'uomo poiché la via parenterale rende immediatamente e totalmente biodisponibile la dose interna di tossine introdotta in circolo. Inoltre interessando un gruppo specifico di individui (i pazienti sottoposti al trattamento terapeutico) con stato di salute già parzialmente compromesso, questa via di esposizione rappresenta, per le sue caratteristiche, un rischio maggiore per i soggetti esposti. L'episodio di maggiore rilevanza sanitaria più importante si è verificato in Brasile nel 1996 dove 131 pazienti furono sottoposti a emodialisi con acqua contaminata da MC presenti nel bacino idrico usato per l'approvvigionamento. Centodieci pazienti svilupparono danni epatici acuti, causa di 56 decessi (3, 37).

Le Autorità sanitarie brasiliane hanno reso obbligatorio l'uso di filtri ad osmosi inversa, ma questo sistema senza una manutenzione e un controllo adeguati non garantisce per sé la sicurezza delle acque con esso preparate (38). Infatti in Brasile nel 2001 è stata riscontrata una contaminazione dell'acqua usata per la dialisi a livelli di 0,4 µg/L e di 0,32 µg/L nel filtro di carbone attivo usato nel passaggio intermedio di trattamento per la dialisi. Su 44 pazienti, 13 avevano nel sangue concentrazioni di MC-LR equivalenti superiori al LoD e furono reclutati per un follow-up (4). La concentrazione media nel plasma era di 0,33 ng/mL con un massimo di 0,61 ng/mL; i livelli erano molto più bassi di quelli dei pazienti dell'incidente del 1996 dove la concentrazione stimata di esposizione fu 19,5 ng/mL. Una correlazione negativa e significativa è stata identificata tra i parametri di coagulazione sanguigna (es. tempo di protrombina), che aumentano in presenza di danno epatico, e il massimo di concentrazione circolante delle MC. In

generale i parametri biochimici ed ematologici dei pazienti indicavano la presenza di danni epatici misti. Seppur questo tipo di pazienti siano eparinizzati, a causa della loro terapia cronica, ciò non ha influito sui risultati, ma d'altro canto l'interpretazione di dati relativi a pazienti con patologia non è semplice, in quanto che possono avere risposte ad eventuali danni epatici diversi dalla popolazione generale.

Una limitazione dello studio è relativa alla quantificazione della MC sierica, determinata col metodo ELISA che quantifica solo la tossina libera (trascurando una frazione che potrebbe essere consistente di MC legate alle proteine) per cui la concentrazione misurata non rappresenta la reale dose di esposizione. Il livello circolante di MC persiste a lungo durante il follow-up; ciò era stato notato anche dopo l'episodio di intossicazione del 1996, con MC nel siero determinata anche almeno 90 giorni dopo l'esposizione. Non è chiaro se questo dato sia coerente con il metabolismo delle MC, ma soprattutto se i livelli siano mantenuti da qualche sorgente di esposizione al momento non considerata dopo quella iniziale (4).

A3.4. Acqua potabile

Effetti acuti o a breve termine associati con il consumo di acqua contaminata possono derivare dall'inefficienza dei processi di trattamento delle acque per la rimozione di cianobatteri e cianotossine disciolte; livelli significativi di cianotossine disciolte nelle acque grezze possono essere dovuti sia alla naturale lisi cellulare legata alla senescenza della fioritura che a lisi artificiale dovuta ad inappropriati trattamenti di purificazione. In dipendenza di questi fattori nelle acque per uso umano può essere presente un ampio *range* di livelli di cianotossine e alcuni episodi di intossicazioni acute per consumo di acque contaminate hanno chiaramente dimostrato la plausibilità di una tale eventualità.

Tra gli episodi descritti è stata riportata in Brasile una epidemia con 2000 casi di gastroenteriti e 88 morti in un periodo di 42 giorni attribuita alla fioritura di *Anabaena* e *Microcystis* (39). In Australia a causa del trattamento della fioritura di cianobatteri con solfato di rame si causò lisi cellulare e 140 bambini e 10 adulti furono ricoverati in una settimana in ospedale con danni epatici e renali fortunatamente recuperabili dopo opportuno trattamento terapeutico (40). Successivamente l'intossicazione fu imputata alla *Cylindrospermopsis raciborskii* (41). Sono stati riportati anche diversi altri episodi di gastroenteriti e danni epatici potenzialmente associati con acqua da bere contaminata (25, 42-44).

A causa dei trattamenti a cui le acque destinate al consumo umano sono sottoposte nei Paesi industrializzati questo scenario di esposizione è quello più ragionevolmente legato ad un eventuale rischio cronico. In proposito sono stati condotti in passato alcuni studi epidemiologici, ma le informazioni in genere 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 (45-47).

L'associazione tra l'alta incidenza di tumori epatici nella popolazione cinese e il consumo di acqua non trattata contenente MC (45) è infatti fortemente questionabile per il fatto che l'acqua proveniente direttamente da stagni e corpi idrici non controllati poteva presentare contaminazioni chimiche e microbiologiche non limitate alle cianotossine (e non considerate dagli autori). Inoltre il concomitante consumo di cibo contenente aflatossina B1, un noto cancerogeno epatico, inficia la validità dello studio essendo un fattore confondente molto rilevante.

Analogamente nessuna conclusione può essere tratta da due studi circa la possibile associazione in Florida tra tumori epatici e colon-rettali e consumo di acqua potenzialmente contaminata con cianotossine (46, 47). Alla luce della qualità dei dati epidemiologici disponibili

la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (48) ha concluso che non è possibile associare la maggiore incidenza di carcinoma epatico e cancro colon-rettale in maniera specifica con l'esposizione a MC, indicando anche una assenza di informazioni che dimostrino una attività genotossica, ma ha comunque classificato la MC-LR in categoria 2B, a causa dei dati disponibili su modelli animali che indicano chiaramente un meccanismo di promozione tumorale.

È proprio a questo tipo di attività che potrebbe essere attribuito il risultato ottenuto da uno studio epidemiologico in Serbia, Paese in cui circa l'80% dei bacini idrici, utilizzati come fonte di approvvigionamento di acque destinate al consumo umano, nei passati 80 anni sono stati affetti da fioriture di cianobatteri. I livelli di MC-LR erano fino a 650 µg/L nelle acque grezze e di 2,5 µg/L nell'acqua potabile (49,50), livello più che doppio rispetto alla linea guida indicata dall'OMS (51). Lo studio ha mostrato negli ultimi 10 anni un aumento significativo di cancro epatico primario (*Primary Liver Cancer*, PLC), specialmente in quei distretti dove l'acqua potabile consumata dalle popolazioni proviene da *reservoir* interessati da fioriture, rispetto a regioni come la Vojvodina che si approvvigionano essenzialmente con acque sotterranee (50). Non è stata trovata alcuna correlazione tra incidenza di PLC e altri fattori di rischio rilevanti quali la cirrosi e virus dell'epatite.

Come mostra la Figura A3.2, nella regione della Vojvodina a nord della Serbia centrale l'incidenza di PLC nel periodo 1999-2008 è risultata di 7,2 per 100.000 abitanti ed è rimasta più o meno costante nel tempo; nella Serbia centrale, l'incidenza è più elevata, 14 per 100.000, ma possono essere identificate due regioni in cui l'incidenza di PLC sale a 27. Nella figura sono evidenziati i corpi idrici maggiormente affetti da fioriture e utilizzati come fonte di acqua potabile: come si può vedere le aree coincidono.

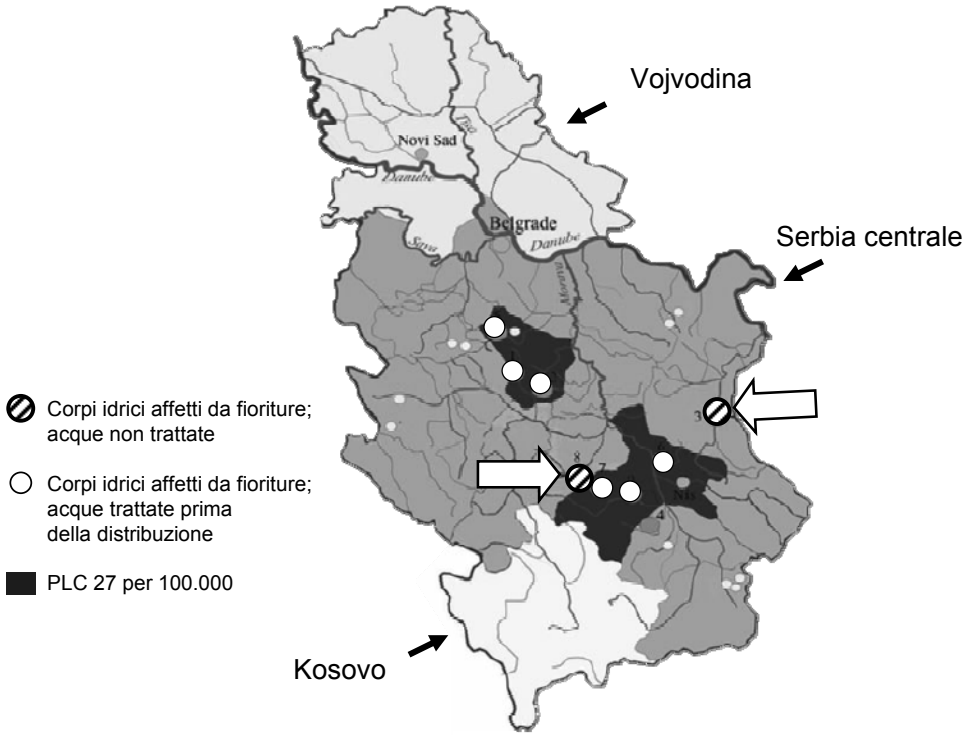

Figura A3.2. Incidenza di PLC (*Primary Liver Cancer*) nelle varie aree della Serbia e indicazione dei corpi idrici maggiormente affetti da fioriture di cianobatteri

È interessante notare che i due cerchi indicati dalle frecce bianche che si trovano al di fuori delle aree a maggior incidenza di PLC corrispondono a due corpi idrici le cui acque sono trattate con procedure di ozonizzazione prima di essere distribuite alla popolazione (50). Essendo le MC in grado di causare danni epatici ed essere dei promotori tumorali, è ben probabile che possano agire sinergicamente con altri fattori di rischio per il tumore epatico, facilitando l'insorgenza di PLC diminuendo i tempi di latenza e aumentando la progressione della patologia, determinando un problema sanitario di notevole rilevanza.

A3.5. Esposizione attraverso la dieta

La dieta rappresenta per l'uomo un'altra possibile fonte di esposizione cronica alle cianotossine che 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 consumo di integratori alimentari.

I dati relativi alla contaminazione di carni e latte sono molto limitati e si riferiscono solo alla MC-LR. I risultati di studi su bovini trattati con MC o estratti di *M. aeruginosa* indicano l'assenza di residui nelle carni e nel latte (52, 53), compatibilmente con le caratteristiche di idrosolubilità della molecola. Tuttavia non sono disponibili dati per le altre cianotossine, inclusi i congeneri lipofili delle MC.

È stata documentata la presenza di cianotossine in prodotti vegetali, specialmente a foglia larga, a seguito di irrigazione con acque contenenti cianobatteri. Ciò è stato attribuito inizialmente al contenuto intracellulare di cellule di cianobatteri depositate sulle foglie (54), ma successivamente sono stati prodotti dati relativi al possibile assorbimento delle tossine disciolte da parte di piante eduli, tra cui rapa e riso, se esposte ad acque contenenti MC-LR equivalenti fino a 3 mg/L contenevano livelli massimi di 651 e 5,4 ng/g peso fresco (55). Anche nei legumi, mais, grano, alfalfa (56) e crucifere (*Brassica* spp., *Sinapsis alba*), queste ultime capaci di accumulare 10-21% della CYN somministrata assorbita attraverso le radici, si sono raggiunti livelli di 49 μg/g (peso fresco) nelle foglie (57).

Deve essere tuttavia notato che negli studi descritti sono state utilizzate acque interessate da livelli di cianotossine corrispondenti a fioriture sostenute e a schiume. Non solo questa condizione non può che essere un evento episodico e di durata limitata per poter essere rilevante per un consumo cronico, ma è stato riportato che in alcuni casi 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 (55). Quando vegetali come i broccoli sono stati irrigati con acque contenenti livelli di MC comparabili a quelli 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 (58).

Rispetto alle tossine prodotte da alghe tossiche in acque salmastre, il bioaccumulo delle tossine cianobatteriche nella catena alimentare e le relative conseguenze per la salute umana sono stati molto meno studiati. Una delle ragioni più plausibili è che fino ad oggi non sono stati documentati casi di intossicazione umana (o di animali domestici) attribuibile a consumo di cibi contaminati da tossine cianobatteriche. D'altra parte i prodotti ittici d'acqua dolce, vale a dire il tipo di alimento finora più studiato al riguardo, rappresentano una piccola percentuale del pescato consumato: la FAO (*Food and Agriculture Organization*) ha stimato che nel 2008 a

livello globale siano state consumate 90 milioni di tonnellate di pescato, di cui solo 10 milioni provenienti da acque interne (59). La quantità di prodotti ittici di acqua dolce non è tuttavia certo trascurabile e un numero crescente di dati è stato pubblicato negli ultimi anni a testimonianza della presenza di tossine cianobatteriche a vari livelli trofici, sia nei muscoli che nelle viscere di molluschi e pesci, incluse specie consumate direttamente dall'uomo.

Una recente rassegna (60) riporta tutti i dati ad oggi disponibili, dai quali è evidente che le MC (sia come MC-LR o MC-LRequivalenti) sono quelle più frequentemente ritrovate, a livelli generalmente bassi (nell'ordine dei nanogrammi per grammo) ma con punte di 0,337 μg/g e 0,867 μg/g in due pesci commestibili (Tilapia e *Goodea* sp., rispettivamente). Sono state ritrovate anche ATX-a a livelli di 23,6 μg/g in avannotti di trota e 0,205 μg/g di CYN in alcune specie di gamberetti.

Data la idrosolubilità della maggior parte delle cianotossine, non è chiaro quale sia il meccanismo di accumulo nei tessuti dei prodotti ittici e per questo è stato ipotizzato che queste tossine lungo la catena trofica seguano più un percorso di bio-diluizione piuttosto che di bio-magnificazione (60-63). D'altra parte la presenza di cianotossine in specie direttamente consumate dall'uomo dimostra che anche in assenza di biomagnificazione l'esposizione umana attraverso questa via è comunque plausibile.

I fattori che maggiormente influiscono sul trasferimento nella catena trofica e quindi sulla reale esposizione umana sono la selezione, la biodisponibilità e la cinetica delle tossine nelle diverse specie, che determina il livello e la durata della contaminazione.

La selezione è il fattore che probabilmente limita inizialmente il consumo di cellule di cianobatteri da parte delle specie che si nutrono di plankton (60), così come la selettività del consumo umano, che preferisce specie ittiche marine, e nel caso in cui scelga specie di acqua dolce preferisce quelle di livello trofico superiore, generalmente scartando i visceri, dove sono stati misurati i livelli più elevati di cianotossine. Le informazioni sulla biodisponibilità, il secondo fattore, sono estremamente carenti. Generalmente ci si riferisce al contenuto di tossina libera presente nei tessuti dei pesci, senza considerare che per esempio le MC hanno la possibilità di legarsi covalentemente alle proteine (ad esempio, attraverso il legame tra Mdha, N-metildeidroalanina, e i residui proteici di cisteina), tanto che solo circa il 24% di MC somministrata ip a salmoni si recupera in forma libera con i classici metodi di estrazione con solventi (64, 65) e anche nel plasma umano al massimo il 50% si trova in forma libera (66).

Se la porzione di tossina legata sia o meno biodisponibile per l'organismo e possa rappresentare una fonte di tossina nel tempo, non è noto. Sono disponibili solo alcuni studi non conclusivi sul ruolo di alcuni enzimi digestivi, della temperatura e delle modalità di conservazione e cottura (67-70).

Le uniche informazioni disponibili relative ad effetti legati al consumo di cibo contaminato da MC sono state ottenute su popolazioni cinesi. È stata determinata nel siero di 35 pescatori cinesi la presenza di MC-LReq a livelli medi di 0,39 ng/mL. Erano residenti sulle rive di laghi interessati da fioriture di cianobatteri con un'esposizione giornaliera cronica, dovuta a consumo di prodotti ittici e uccelli acquatici ma anche acqua, stimata nel range di 2,2–3,9 μg MC-LReq. La concentrazione circolante di MC-LReq in 11 pescatori su 35 (31%) correlava positivamente con biomarker di danno epatico (ALT, AST, lattato deidrogenasi LDH e fosfatasi alcalina ALP). Seppur più del 90% dei pescatori era negativo agli anticorpi dell'epatite altri fattori confondenti non sono stati considerati (71).

Sempre riguardo l'esposizione cronica a MC, uno studio ha preso in considerazione 1.322 bambini cinesi tra i 7 e i 15 anni che consumavano acqua e cibo (pesce e anatra) da due laghi e 4 pozzi. I bambini sono stati divisi in tre gruppi, in dipendenza dei livelli di esposizione: non esposti (11% del totale); esposti a basse (14%) e ad alte dosi (75%). Considerando la media di concentrazione di MC determinata nell'acqua dei due laghi nell'arco di 5 anni e il consumo di

cibo è stato stimato un intake di 0,36 e 2,03 µg giornalieri, rispettivamente, per il gruppo a bassa e alta esposizione. In 50 partecipanti per gruppo, per confermare l'esposizione, fu dosata la MC nel siero: la MC circolante aveva livelli medi di 0,4 µg e 1,3 µg MC-LReq/L per i gruppi di bassa e alta esposizione, rispettivamente. I valori medi di AST e ALP erano più alti nei bambini esposti anche tenendo conto di fattori interferenti come le infezioni da epatite B e l'uso di farmaci epatotossici (72).

Il fatto che le tossine PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), tra cui le STX, siano prodotte da organismi marini e che possano bioaccumulare in crostacei e molluschi implica la possibilità di alti livelli di esposizione tra i predatori, compreso l'uomo, sia sicuramente maggiore rispetto a tutte le altre cianotossine. Attraverso le informazioni raccolte a causa dei numerosi casi di intossicazione riportati è stato possibile, seppur con un certo grado di incertezza, ricavare valori di riferimento per la protezione della popolazione.

Le STX sono facilmente assorbibili dal tratto GI, sono distribuite largamente ai vari distretti corporei, diffondono attraverso la barriera ematoencefalica e sono escrete principalmente nelle urine. Studi sul loro metabolismo sono molto scarsi, comunque l'osservazione clinica per 24 h di pazienti sopravvissuti ad intossicazioni suggerisce che le PSP subiscono una rapida eliminazione dovuta sia ad escrezione che a metabolismo di ossidazione e successiva glucoronidazione. Sono state descritte alcune interconversioni sia di natura enzimatica che semplicemente per idrolisi acida in ambiente gastrico tra diversi congeneri con tossicità diversa (*vedi* capitolo A2.2.5). Questo è quindi un aspetto da tener presente nella valutazione del rischio per l'uomo: anche se il prodotto ittico dovesse contenere tossine N-sulfocarbamoiliche debolmente tossiche, queste ultime possono dar luogo a episodi di avvelenamento severo dopo ingestione e idrolisi acida nello stomaco.

I livelli a cui avvengono le intossicazioni da tossine PSP nell'uomo variano considerevolmente, infatti un consumo orale di circa 300 µg di PST per persona in un caso è stato riportato come non tossico, mentre in un altro è stato addirittura fatale. In accordo con il report FAO del 2004 (73), una ingestione totale acuta nel range di 0,144-1,66 mg STXeq per persona induce principalmente sintomi blandi mentre per consumi in un range sovrapponibile di dosi (0,456-12,4 mg STXeq per persona) è stato descritto un ampio spettro di effetti dai sintomi moderati alla paralisi e morte. Questa alta variabilità può essere attribuita ai differenti approcci e metodi applicati per quantificare il reale livello di esposizione, come anche le differenze nella suscettibilità individuale. Ciò che determina la severità degli effetti sono la specifica tossicità della PSP nel cibo ingerito, la quantità di cibo e la velocità di eliminazione della tossina dal corpo e la diversa sensibilità dei canali del Na^+. Quando i sintomi vanno dal blando al moderato il recupero da una intossicazione da STX è di solito completo. Nei casi fatali la paralisi respiratoria avviene tra le 2 e le12 ore dopo l'assunzione del cibo contaminato.

L'EFSA nel 2009 ha usato i dati disponibili su intossicazioni umane dovuti a STX di fitoplankton marino comprendenti più di 500 individui, per calcolare un LOAEL (*Lowest Adverse Effect Level*) per la tossicità acuta pari a 1,5 µg STXeq/kg pc. Poiché molti individui non mostrarono effetti avversi ad intake più alti si è pensato che questo valore fosse vicino alla soglia degli effetti per gli individui più sensibili e fosse perciò considerabile come un LOAEL. Perciò l'EFSA ha deciso di applicare un ulteriore fattore 3 di incertezza nella valutazione del rischio (74).

Recentemente si è andato diffondendo nei Paesi industrializzati l'uso come integratori alimentari di estratti di alghe verde-azzurre (*Blue Green Algae Supplements*, BGAS), principalmente a base di *Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina* spp., in passato diffuse in Paesi orientali come Cina e India (75). Di solito sono ottenuti per raccolta in ambienti naturali, dove potenzialmente sono presenti anche cianobatteri tossici e in effetti sono stati riportati molti

lavori che dimostrano una contaminazione da parte di vari congeneri di MC, inclusa la MC-LR, a livelli molto variabili fino a 35 µg/g di peso secco (76-79).

Gli integratori vengono consumati per le loro presunte attività di migliorare l'umore, aiutare nella perdita di peso durante diete ipocaloriche e come fonte energetica (80) e sono anche somministrati a bambini in età scolare che soffrono di disturbi dell'attenzione e iperattività (sindrome dell'*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.

È stato pubblicato un caso di decesso in una donna 34enne per tossicità epatica. Sebbene una diretta relazione causa-effetto non sia ancora stata stabilità 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-LReq/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 (81).

A3.6. Un caso particolare: cianotossine e malattie neurodegenerative

Un cluster di alta incidenza della malattia neurodegenerativa atipica definita "complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica-Parkinson Demenza" (SLA-PDC) è rappresentato dalla popolazione Chamorro dell'isola di Guam, dove l'insorgenza della patologia è stata messa in relazione al consumo di pipistrelli capaci di bioaccumulare l'aminoacido potenzialmente neurotossico β-metilamminoalanina (BMAA) (82). Questa molecola è prodotta da cianobatteri del genere *Nostoc,* simbionti delle radici della C*ycas circinalis*, dei cui semi si nutrono i pipistrelli e in letteratura sono disponibili altri esempi che indicano che pur essendo generalmente autotrofi, i cianobatteri possono comportarsi come eterotrofi e simbionti con vari organismi. Tuttavia altri autori criticano l'ipotesi del ruolo della BMAA nella SLA/PDC e nell'Alzheimer a causa della alte dosi che devono essere somministrate ai primati per indurre effetti degenerativi e che corrispondono ad un consumo non realistico di cibo contaminato nell'uomo. In aggiunta la somministrazione di BMAA non è stata associata con effetti neurotossici in vivo nel topo (83) e inoltre per indurre morte neuronale *in vitro* sono necessarie alte concentrazioni di BMAA (1-3 mM) (84) (*vedi* capitolo A2.2.6).

È stata anche formulata una ipotesi alternativa che lega la SLA ai cianobatteri, basata sulla osservazione che alcuni studi in ambito neuro-epidemiologico hanno mostrato un'incidenza della SLA più alta tra agricoltori e allevatori e individui soggetti a prolungato esercizio fisico/traumi, come i giocatori di baseball e football negli USA e i calciatori in Italia (85). Uno dei fattori che sembra accomunare queste categorie è il manto erboso: considerando che l'irrigazione dei campi di calcio (e non solo) viene effettuata spesso con acque superficiali, che possono essere interessate dalla presenza di cianobatteri.Questi ultimi potrebbero essere 'internalizzati' attraverso varie vie infettando soggetti esposti geneticamente o immunologicamente sensibili, spiegando il comportamento epidemiologico della SLA (86). Questa ipotesi, per il momento né smentita né confermata, sembra avere una plausibilità, considerando che recentemente è stata dimostrata la capacità per un ceppo di *M. aeruginosa* di sopravvivere e crescere mantenendo le caratteristiche genetiche per la produzione della tossina in condizioni che mimano alcune caratteristiche del microambiente del lume gastro-intestinale (87).

Il dibattito a livello scientifico è ancora aperto, con produzione di molti dati discordanti tra loro, anche attribuibili a problemi di tipo metodologico nella determinazione delle tossine in matrici complesse (88,89). La presenza di BMAA fino a 6 μg/g in encefali di pazienti affetti da SLA-PDC e demenza di Alzheimer (90) in Canada, quindi lontano da Guam, l'assenza in campioni di pazienti deceduti per altre malattie neurodegerative strettamente ereditarie come l'Huntington (89) e la possibilità che la BMAA possa essere prodotta da vari cianobatteri, hanno supportato l'ipotesi che l'esposizione a questa tossina, ma anche altre cianotossine dotate di attività neurotossica (inclusi alcuni congeneri di MC tra cui la MC-LR e la MC-LF), possa avere un ruolo nella eziopatogenesi della SLA. A supporto di questa ipotesi è stato dimostrato che la BMAA viene erroneamente incorporata nelle proteine neuronali attraverso il sistema L-serina t-RNA-sintetasi (92,93); sono stati descritti cluster di SLA in zone soggette a fioriture di cianobatteri in varie regioni del mondo (942); è stato riportato un aumento significativo di incidenza di SLA (2,3 volte) in soggetti residenti entro mezzo miglio da un lago del New Hampshire affetto da forti fioriture (95) ed è stata ipotizzata nei veterani della Guerra del Golfo una associazione tra SLA ed esposizione a BMAA prodotta dai cianobatteri nella polvere del deserto (96).

Molto recentemente è stato utilizzato un approccio di modellistica eco-epidemiologica per caratterizzare la relazione spaziale tra alcune aree del New England, in cui l'incidenza di SLA è più elevato dell'atteso, e la qualità delle acque lacustri delle stesse zone (circa 6 ettari), attraverso *remote sensing* (considerando parametri generici di qualità delle acque come: clorofilla-a, trasparenza con disco di Secchi e azoto totale). Gli autori concludono che una scarsa qualità delle acque è significativamente associata all'aumento dell'incidenza di SLA della zona, anche se la semplice qualità delle acque non può essere direttamente e unicamente associata alla presenza di cianobatteri e cianotossine (94).

A3.7. Conclusioni

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, legato anche alla stagionalità delle fioriture, ha pertanto le caratteristiche necessarie per prefigurare un rischio subcronico, piuttosto che una esposizione continuativa per tutta la vita. Tuttavia, considerando la possibilità di svolgere attività sportive e/o professionali anche al di fuori della balneazione in corpi idrici potenzialmente interessati da fioriture di cianobatteri diversi nei vari periodi dell'anno, la possibilità di avere specifiche esposizioni prolungate, dovute all'uso ricreativo delle acque, non può essere esclusa, anche se la stagionalità delle fioriture ne limita fortemente la probabilità.

I dati epidemiologici disponibili danno spesso quantificazioni dell'esposizione insufficienti alla identificazione di valori di riferimento, anche perché spesso come categorie espositive vengono indicate quelle definite nelle linee guida dell'OMS (27) (*vedi* capitolo A4). Tuttavia l'analisi dei sintomi indica chiaramente che tutte e tre le vie di esposizione (cutanea, orale e inalatoria) sono rilevanti; in particolare la via inalatoria può esserlo anche per coloro che risiedono nei pressi del corpo idrico e svolgono attività senza avere contatto diretto con l'acqua. Relativamente a quest'ultima via, molti dei sintomi descritti possono essere attribuiti ad un effetto locale sulla mucosa delle vie aeree superiori. Al momento non si conosce la dinamica di formazione dell'aerosol (es. condizioni ambientali e climatiche o attività da svolgere in acqua necessarie perché si abbia formazione significativa di aerosol), anche se può essere ipotizzato che vento forte e elevato idrodinamismo, sia dovuto alle condizioni climatiche che alla presenza

di navigazione di imbarcazioni a motore e ad attività sportive come sci d'acqua e canoa, che comportano un notevole spostamento di masse d'acqua, possano essere condizioni in grado di favorire formazione di aerosol. D'altro canto, non è nota nemmeno l'eventuale biodisponibilità delle tossine a dar luogo ad effetti sistemici dopo inalazione. Considerando l'estrapolazione di uno studio recente (*vedi* paragrafo A3.2) (31), sulla base della TDI è possibile stabilire un valore limite per le MCs nell'aerosol di 4,58 ng MC-LR/m^3 al di sotto del quale non si hanno rischi per la salute da inalazione cronica.

I dati nel loro insieme sembrano confermare che fino a 100.000 cell/mL (secondo le linee guida dell'OMS) (51) gli effetti eventualmente prodotti sono reversibili e di lieve entità, dovuti ad effetti locali (pelle, occhi e mucosa gastrointestinale e delle vie aeree superiori) tali da non richiedere il ricorso a cure mediche. È inoltre evidente dal Report dei CDC (33) che il gruppo maggiormente a rischio è costituito da bambini e adolescenti (età inferiore ai 19 anni), per i quali è necessaria un'attenzione specifica. Le linee guida OMS danno come corrispondenza di 100.000 cell/mL con 20 μg di MCeq/L: è importante notare che per gli effetti locali al punto di contatto (che corrispondono ai sintomi sia dermatologici, che GI e respiratori descritti) le MC non sembrano avere un ruolo determinante, dal momento che studi specifici indicano attività irritanti/infiammatorie/allergizzanti) a componenti cellulari diversi dalle tossine. Queste ultime sono invece il parametro più rilevante per gli effetti sistemici a seguito di ingestione involontaria di acqua contaminata. Non si hanno al momento informazioni utili per la via respiratoria. E in effetti, al superamento del suddetto limite si sono invece verificati anche casi più gravi, che hanno necessitato di ospedalizzazione. È importante che non ci si riferisca solo al numero delle cellule perché ad esempio quando le fioriture sono in fase di decadimento è possibile che le concentrazioni di tossine disciolte siano piuttosto elevate (97,98) a fronte di un numero di cellule basso. 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.

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. 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. 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, per evitare di superare il valore identificato dalle linee guida dell'OMS per le acque potabili, e di conseguenza i possibili rischi per la salute umana che lo studio in Serbia ha mostrato.

La possibilità di avere esposizioni continuate non solo attraverso la via orale da varie fonti (acqua potabile, dieta nei suoi vari componenti e ingestione involontaria durante le attività ricreative), ma anche attraverso le altre vie, in particolare quella inalatoria, sottolinea però la necessità di procedere alla valutazione di esposizioni cumulative specialmente per alcuni gruppi di popolazione potenzialmente più esposti (bambini e adolescenti, esposti professionalmente, residenti nei pressi del corpo idrico che consumano prodotti locali). Al momento tuttavia, esiste ancora un notevole margine di incertezza e sono necessarie ricerche specifiche che possano supportare con una solida base scientifica le varie valutazioni di rischio.

Bibliografia

1. Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
2. Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* 2001;109:663-8.
3. Azevedo SM, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicol* 2002;181:441-6.
4. Hilborn ED, Soares RM, Servaites JC, Delgado AG, Magalhães VF, Charmichael WW, Avezedo SMFO. Sublethal microcystin exposure and biochemical outcomes among hemodialysis patients. *PLoS ONE* 2013;8: Available at: e69518. doi: 10.1371/journal.pone.0069518.
5. Metcalf JS, Richer R, Cox PA, Codd GA. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci Total Envirom* 2012;421-422:118-23.
6. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Fleming LE, Burns JW, Gantar M, Backe LC, Shaw GR. Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria- an international prospective cohort study. *BMC Public Health* 2006;6:93.
7. Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan. *Can Med Assoc* 1960;83:1151-4.
8. Stewart I, Charmichael WW, Sadler R, McGregor GB, Reardon K, Eaglesham GK, Wickramasinghe WA, Seawright AA, Shaw GR. Occupational and environmental hazard assessments for the isolation, purification and toxicity testing of cyanobacterial toxins. *Environ Health* 2009;8:1-12.
9. Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R, Andrinolo D. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs* 2011;9:2164-75.
10. Taylor MS, Stahl-Timmins W, Redshaw CH, Osborne NJ. Toxic alkaloids in Lyngbya majuscula and related tropical marine cyanobacteria. *Harm Algae* 2014;31:1-8.
11. Werner KA, Marquart L, Norton SA. Lyngbya dermatitis (toxic seaweed dermatitis). *Int J Dermatol* 2012;51:59-62.
12. Osborne NJ, Shaw GR, Webb PM. Health effects of recreational exposure to Moreton Bay, Australia waters during a Lyngbya majuscula bloom. *Environ Int* 2007;33:309-314.
13. 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 Glob Acc Sci Source* 2006;5:6.
14. Philipp R. Health risk associated with recreational exposure to blue-green algae (cyanobacteria) when dinghy sailing. *Health Hyg* 1992;13:110-4.
15. Philipp R, Bate AJ. Health-risks assessment of dinghy sailing in Avon and exposure to cyanobacteria (blue-green algae). *J Inst Water Environ Manag*1992;6:613-20.
16. 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.
17. Charmichael WW, Jones CLA, Mahomood NA, Theiss WC. Algal toxins and water-based diseases. *CRC Crit Rev Environ Cont* 1985;15:275-313.
18. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ Health Glob Acc SciSource* 2006;5:7.
19. Turner PC, Gammie AJ, Hollirake K, Codd GA. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br Med J* 1990;139:231-250.
20. Stewart I, Robertson IM, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cutaneous hypersensitivity reactions to freshwater cyanobacteria--human volunteer studies. *BMC Dermatol* 2006;6:1-9.

21. Torokne A, Palovics A, Banckine M. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria – experimenatl evidence. *Environ Toxicol* 2001;32:512-6.

22. Stewart I, Seawright AA, Schluter PJ, Shaw GR. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. *BMC Dermatol* 2014;6:1-12.

23. Bernstein JA, Ghosh D, Levin LS, Zheng S, Charmichael W, Lummus Z, Bernstein IL. Cyanobacteria: an unrecognized ubiquitous sensitizing allergen? *Allergy Asthma Proc* 2011;32:106-10.

24. Berg KA, Lyra C, Niemi M, Heens R, Hoppu K, Erkomaa K, Sivonen K, Rapala J. Virulence genes of Aeromonas isolates, bacterial endotoxins and cyanobacterial toxins from recreational water samples associated with human health symptoms. *J Water Health* 2011;670-8.

25. 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.

26. 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-gree algae) during recreational water-related activities. *Aust N Z J Public Health* 1997;21:562-6.

27. WHO. *Coastal and fresh waters. Guidelines for safe recreational water environment*. Geneva: World Health Organization; 2003.

28. Stewart I. *Recreational exposure to freshwater cyanobacteria: epidemiology, dermal toxicity and biological activity of cyanobacterial lipopolysaccharides*. Brisbane: University of Queensland; 2004.

29. Backer LC, Carmichael W, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational exposure to microcystins during a *Microcystis aeruginosa* bloom in a small lake. *Mar Drugs* 2008;6:389-406.

30. Backer LC, McNeel SV, Barber T, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, Aubel M, LePrell L, Chapman A, Foss A, Corum S, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* 2010;55:909-21.

31. Wood SA, Dietrich DR. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *J Environ Monit* 2011;13:1617-24.

32. Benson JM, Hutt JA, Rein K, Boggs SE, Barr EB, Fleming LE. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. *Toxicon* 2005;45:691-8.

33. Hilborn ED, Roberts VA, Backer L, Deconno E, Egan JS, Hyde JB, Nicholas DC, Wiegert EJ, Billing LM., Diorio M, Mohr MC, Hardy JF, Wade TJ, Yoder JS, and Hlavsa MC. Algal bloom-associated disease outbreaks among users of freshwater lakes--United States, 2009-2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63(1):11-5.

34. Lévesque B, Gervais M-C, Chevalier P, Gauvinb D, Anassour-Laouan-Sidi E, Gingras S, Fortind N, Brisson G, Greer C, Bird D. Prospective study of acute health effects in relation to exposure to cyanobacteria. *SciTotal Environ* 2014; 66-467:397-403.

35. Health Canada (HC). *Guidelines for Canadian recreational water quality. 3rd ed*. Ottawa, Ontario: Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada; 2012.

36. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).

37. Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MB DeC, De Filho MDA, Lyra TM, Barreto VST, Avezedo SMFO, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to Microcystin at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998;338:873-8.

38. Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, Hilborn ED, Charmichael WW, Azevedo SMFO. Sub-lethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro - Brazil. *Environ Toxicol* 2006;21:95-103.

39. Teixera MGLC., Costa MNC, 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.

40. Byth S. Palm Island mystery disease. *Med J Austr* 1980;2:40-2.

41. Hawkins PR, Griffiths DJ. Artificial destratification of a small tropical reservoir: effects upon the phytoplankton. *Hydrobiol* 1993;254:169-81.

42. Botes DP, Wessels PL, Kruger H, Runnegar MTC, Santikarn S, Smith RJ, Barna JCJ, Williams DH. Structural studies on cyanoginosins-LR, YR, YA, and -YM peptide toxins of *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Society Perkin Trans* 1985;1:2742-8.

43. Falconer IR. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. *Tox Assess* 1989;4:175-84.

44. Zielberg B. Gastroenteritis in Salisbury European children-a five year study. *Centr Afr J Med* 1996;12:164-8.

45. 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. *Carcinogen*1996;17:1317-21.

46. Fleming LE, Rivero C, Stephan WB, Burns J, Williams C. *Blue green algal exposure, drinking water and colorectal cancer study. The Florida Harmful Algal Bloom Taskforce Final Report*. St. Petersburg, Florida; 2001.

47. 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. *Harm Algae* 2002;1:157-68.

48. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2010;94:v-vii, 1-412.

49. Svircev Z, Krstic S, Miladinov-Mikov M, Baltic V, Vidovic M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J Environ Sci and Health, Part C* 2009;27:36-55.

50. Svircev Z, Drobac D, Tokodi N, Vidovic M, Simeunovic J, Miladinov-Mikov M, Baltic V. Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci and Health, Part C: Environ Carcinogen Ecotoxicol Rev* 2013;31:181-200.

51. WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. 3nd ed. Geneva: World Health Organization; 2008.

52. 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.

53. Feitz AJ, Lukondeh T, Moffitt MC, Burns BP, Naidoo 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.

54. Codd GA, Metcalf J, 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.

55. Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. Effects of micricystin on the growth nd the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica rapus* L.) and rice (*Oriza sativa* L.). *Toxicon* 2004;43:393-400.
56. Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S. Uptake of microcystins-LR and-LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ Toxicol* 2007;22:436-42.
57. Kittler K, Schreiner M, Krumbein A, Manzei S, Sascha R, Maul R. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem* 2012;133:875-9.
58. 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.
59. Food and Agriculture Organization. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO, Fisheries and Aquaculture Department; 2010.
60. Berry J. Cyanobacterial toxins in food-webs: implications for human and environmental health. *Current Topics in Public Health* 2013;536-89.
61. Ibelings BW, Bruning K, De Jonge J, Wolfstein K, Pires L, Postma J, Burger T. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microb Ecol* 2005;49:487-500.
62. 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.
63. Kozlowsky-Suzuki B, Wilson AE, Ferrao-Filho A. Biomagnification or biodilution of microcystins in aquatic food-webs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harm Algae* 2012;18:47-55.
64. Williams DE, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Craig M, Holmes CF. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* 1997;35:1617-1625.
65. Williams DE, Craig M, McCready M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CF, Andersen RJ. Evidence for covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. *Chem Res Toxicol* 1997;10:463-9.
66. Hilborn ED, Carmichael WW, Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Barton HA, Azevedo SMFO. Serologic evaluation of human microcystin exposure. *Environ Toxicol* 2007;22:459-63.
67. Smith JL, Schulz KL, Zimba PV, Boyer, G L. Possible mechanism for the foodweb transfer of covalently bound microcystins. *Ecotoxicol Environ Safety* 2010;73:757-761.
68. Morais J, Augusto M, Carvalho AP, Vale M, Vasconcelos VM. Cyanobacteria hepatotoxins, microcystins: bioavailability in contaminated mussels exposed to different environmental conditions. *Eur Food Res Technol* 2008;227:949-952.
69. Zhang D, Xie P, Chen J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *Bull Environ Contam Toxicol* 2010;84:202-7.
70. Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Camean AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol* 2013;53:139-52.
71. Chen J, Xie P, Li L, Xu J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol Sci* 2009;108:81-9.
72. Li Y, Chen J, Zhao Q, Pu C, Qiu Z, Zhang R, Shu W. A Cross-Sectional Investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the three Gorges Reservoir Region, China. *Environ Health Perspect* 2011;119:1483-8.

73. Food and Agriculture Organization of the United Nations/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO/World Health Organization (Ed.). *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs.* Oslo, Norway, September 26-30, 2004.

74. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group *EFSA Journal* 2009;1019:1-76.

75. Charmichael 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.

76. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in bluegreen algae dietary. *Environ Health Perspect* 2000;108:435-9.

77. Saker ML, Jungblut A-D, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM. Detection of microcystin synthase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae. Toxicon* 2005;46:555-62.

78. 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.

79. Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem Toxicol* 2012;50:4493-9.

80. Jensen GS, Ginsberg DJ, Drapeau C. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *JAMA* 2001;3:24-30.

81. Dietrich DR, Ernst B, De Koe WJ. 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, August 5-12,2007. p. 132.

82. Cox PA, Banak SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13380-3.

83. Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84:294-9.

84. Ross SM, Seelig M, Spencer PS. Specific antagonism of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res* 1987;425:120-127.

85. Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 2005;128:472-6.

86. Stipa G, Taiuti R, de Scisciolo G, Arnetoli G, Tredici MR, Biondi N, Barsanti L, Lolli F. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypoth* 2006;67:1363-71.

87. Stefanelli M, Vichi S, Stipa G, Funari E, Testai E, Scardala S, Manganelli M. Survival, growth and toxicity of Microcystis aeruginosa PCC 7806 in experimental conditions mimicking some features of the human gastro-intestinal environment. *Chem Biol Interact* 2014;215:54-61.

88. Montine TJ, Li K, Perl DP, Galasko D. Lack of beta-methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorros with PDC. *Neurol* 2005; 65: 768-9.

89. Snyder LR, Cruz-Aguado R, Sadilek M, Galasko D, Shaw CA, Montine TJ. Lack of cerebral bmaa in human cerebral cortex. *Neurol* 2009;72:1360-1.

90. Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;1:12228-31.

91. Pablo J, Banack SA, Cox PA, Papapetropoulos S, Bradley WG, Buck A, Mash DC. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009; 120:216-25.

92. Dunlop R, Rodgers K. Proteins containing BMAA form autofluorescent aggregates and induce cell death. *Amyotroph Lateral Scler.* 2011;12:156.

93. Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ. The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS ONE* 2013;8:1-8.

94. Torbick N, Hession S, Stommel E, Caller T. Mapping amyotrophic lateral sclerosis lake risk factors across northern New England. *Int J Health Geographics* 2014;13:1-14.

95. Caller TA, Doolin JW, Haney JF, Murby AJ, West KG, Farrar HE, Ball A, Harris BT, Stommel EW. A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: A possible role for toxic cyanobacteria blooms. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10 (Suppl. 2):101-8.

96. Cox PA, Richer R, Metcalf JS, Banack SA, Codd GA, Bradley WG. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(suppl 2):109-17.

97. van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:7-60.

98. 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.