



Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana: metodi di rilevazione e analisi



10/23

ISSN 1123-3117



M. Bruno, P. Gallo, P. Ferranti, V. Messineo, S. Melchiorre

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana: metodi di rilevazione e analisi

Milena Bruno (a), Pasquale Gallo (b), Pasquale Ferranti (c), Valentina Messineo (a), Serena Melchiorre (a)

> (b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli
> (c) Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli
> (a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

> > Rapporti ISTISAN 10/23

Istituto Superiore di Sanità **Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana. Metodi di rilevazione e analisi.** Milena Bruno, Pasquale Gallo, Pasquale Ferranti, Valentina Messineo, Serena Melchiorre 2010, iv, 30 p. Rapporti ISTISAN 10/23

Le cianotossine sono contaminanti ambientali prodotti durante le fioriture dei cianobatteri nelle acque dolci e salmastre. Tra le cianotossine riscontrate in Italia sono di particolare interesse le microcistine, biotossine epatossiche, e la cilindrospermopsina, nefrotossica ed epatotossica; queste sostanze rappresentano un rischio per l'uomo e gli animali, a causa degli effetti acuti e cronici. La disponibilità di metodi di prova rapidi e accurati, nonché di strategie analitiche efficaci per caratterizzare la presenza di queste biotossine, rappresenta uno strumento essenziale per valutare eventuali rischi per la sicurezza alimentare dei consumatori, a seguito della contaminazione ambientale di acque potabili e prodotti ittici. A questo scopo quattro diversi kit immunochimici ELISA e tecniche analitiche LC-MS/MS con trappola ionica, MALDI-ToF/MS e LC-Q-ToF-MS/MS sono stati impiegati per sviluppare metodi di analisi di matrici ambientali e tessuti animali contenenti microcistine e cilindrospermopsina.

Parole chiave: Cianotossine, Ambiente, Fauna ittica, Rilevazione, ELISA, LC-MS

Istituto Superiore di Sanità

Algal toxin contamination in Italian ichthyic fauna. Analytical methods for detection. Milena Bruno, Pasquale Gallo, Pasquale Ferranti, Valentina Messineo, Serena Melchiorre 2010, iv, 30 p. Rapporti ISTISAN 10/2 (in Italian)

Cyanotoxins are environmental contaminants produced during cyanobacterial blooms in lakes and brackish waters. The hepatotoxic microcystins, and cylindrospermopsin, nephrotoxic and hepatotoxic biotoxin, are the most frequently detected cyanotoxins in Italy; these compounds represent a risk to animals and humans, because of their acute and chronic effects. The availability of sensitive and reliable analytical methods and effective strategies to investigate the presence of these toxins represent an essential tool to evaluate safety food and risks to consumers, as a consequence of environmental contamination of drinking water and ichthyic food. For this purpose, four different ELISA immunoassay kits, ion trap LC-MS/MS, MALDI-ToF/MS and LC-Q-ToF-MS/MS were employed to develop test methods to analyse environmental matrices and animal tissues containing microcystins and cylindrospermopsin.

Key words: Cyanotoxins, Environment, Ichthyic fauna, Detection, ELISA, LC-MS

Per informazioni su questo documento scrivere a: milena.bruno@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bruno M, Gallo P, Ferranti P, Messineo V, Melchiorre S. Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana. Metodi di rilevazione e analisi. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/23).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci* Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1º marzo 1988

Redazione: Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

INDICE

Glossario	ii
Premessa	iii
Tossine maggiormente individuate	1
Microcistine	1
Cianopeptidi	2
Cilindrospermopsina	3
Metodologie utilizzate	6
Estrazione della cilindrospermopsina da tessuti ittici	7
Analisi della cilindrospermopsina mediante ELISA	7
Estrazione delle microcistine da tessuti ittici	7
Metodo con SPE C18	7
Metodo con SPE HLB Oasis (Waters)	8
Analisi delle microcistine mediante ELISA	8
Purificazione delle microcistine da campioni di acqua per analisi	
mediante spettrometria di massa	9
Purificazione delle microcistine da tessuto ittico per analisi mediante spettrometria di massa	9
Analisi di microcistine mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica	9
Analisi di microcistine mediante spettrometria MALDI-ToF/MS	10
Analisi di microcistine mediante LC/ESI-Q-ToF-MS/MS	11
Dati di specificità, recupero e precisione	11
Purificazione della CYN da campioni di acqua per analisi mediante spettrometria di massa	12
Purificazione della CYN da campioni di alghe per analisi mediante spettrometria di massa	13
Purificazione della CYN da campioni di tessuto muscolare di pesce per analisi mediante	
spettrometria di massa	13
Analisi di cilindrospermopsina mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica	13
Analisi di CYN mediante MALDI-ToF/MS	15
Analisi di CYN mediante LC/ESI-Q-ToF-MS/MS	15
Dati di specificità, recupero e precisione	15
Risultati ottenuti	17
Le prestazioni del metodo per l'analisi della CYN in acqua dolce	21
Le prestazioni del metodo per l'analisi della CYN in muscolo di pesce	22
Considerazioni conclusive	23
Bibliografia	26

GLOSSARIO

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
SPE C18	Solid Phase Extraction 18 atoms carbon chain
SPE HLB	Solid Phase Extraction Hydrophilic Lipophilic Balance sorbent
LC/ESI-MS/MS	Liquid Chromatography/ Electrospray ionisation tandem Mass Spectrometry
MALDI-ToF/MS	Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry
LC/ESI-Q-ToF-MS/MS	Liquid Chromatography/Electrospray ionisation-Quadrupole-Time of Flight/ hybrid Mass Spectrometers
CYN	cilindrospermopsina
TFA	acido trifluoroacetico

PREMESSA

La produzione di pesce d'acqua dolce in Italia è stimata in 32.000 tonnellate/anno (7% della produzione totale di pesce, anno 2005). Gran parte della produzione avviene estensivamente, ripopolando invasi naturali o artificiali con avannotti; questa pratica è stimata produrre la parte più pregiata del pescato d'acqua dolce, per l'alimentazione e le condizioni di vita naturali in cui si svolge la crescita dei pesci.

Su questo segmento di produzione si proiettano le conseguenze negative dell'eutrofizzazione tossica, legata alla cattiva tutela della qualità delle acque. In questo caso lo sviluppo di specie tossiche di cianobatteri in un lago è l'inevitabile punto di arrivo dell'apporto eccessivo di nutrienti, e la causa di contaminazione ed accumulo di tossine algali nella fauna ittica presente al momento della fioritura algale. Questa particolare contaminazione viene ormai rilevata in tutto il mondo, in piccole acquacolture e grandi corpi d'acqua, delineando una nuova classe di rischio per i consumatori.

In generale, la contaminazione da cianobatteri è un esempio di come un problema ambientale diventi anche un problema di sicurezza alimentare, sia per la presenza delle cianotossine nell'acqua potabile, sia per la loro bio-magnificazione negli alimenti.

La contaminazione da microcistine in tessuti ittici è un esempio di recente rilevazione in laghi italiani, il cui controllo richiede tecniche di analisi efficienti, facili da espletare e capaci di dare informazioni dettagliate in tempi rapidi.

In anni recenti diversi studi sono stati effettuati per valutare l'impatto delle tossine cianobatteriche sugli organismi acquatici. Variazioni stagionali nella concentrazione di equivalenti di microcistina -LR sono state rilevate nei tessuti di *Tilapia rendalli* della laguna di Jacarepaguaò in Brasile, *Oreochromis niloticus* da un'acquacoltura egiziana e *Carassius gibelio* dal lago Pamvotis in Grecia. Inoltre le microcistine possono essere accumulate in molluschi marini allevati alla foce di fiumi eutrofizzati; il tempo di depurazione per questi è attestato intorno ad 11 giorni, con la tossina localizzata primariamente nel tratto digestivo.

Le microcistine influenzano lo sviluppo e la vitalità degli stadi giovanili nei pesci, e sono direttamente tossiche negli stadi adulti tramite intossicazione epatica e danneggiamento dei meccanismi di trasporto delle cellule branchiali, in particolare le pompe di membrana Na+/K+ e Mg^2 +/HCO₃-. Quest'ultimo dato porta come conseguenza la morte non solo per intossicazione epatica, ma anche per asfissia da distruzione del tessuto respiratorio branchiale. Le cilindrospermopsine deprimono crescita, riproduzione e capacità di nutrimento in diversi organismi zooplanktonici, inoltre possono accumularsi in granchi, pesci e molluschi d'acqua dolce.

Finora tre studi hanno rivelato contaminazioni da cianotossine in pesce d'acqua dolce italiano (Bogialli *et al.*, 2005; Messineo *et al.*, 2008; Bruno *et al.*, 2008), con livelli di concentrazione a volte medio-alti.

TOSSINE MAGGIORMENTE INDIVIDUATE

Microcistine

Le tossine contaminanti di più frequente rivelazione nella fauna ittica sono le microcistine, una famiglia di più di 90 varianti tossiche (Welker e Von Döhren, 2006) prodotte da numerose specie cianobatteriche (Chorus e Bartram, 1999); esse sono inibitori delle PPasi 1 e 2A, e noti epatotossici (Codd, 1995; Dawson, 1998), promotori tumorali (Nishiwaki-Matsushima, 1991, 1992) e probabili cancerogeni umani (Grosse, 2006) (Figura 1).

Quando le microcistine sono rilasciate in acqua durante il decadimento delle fioriture, un'ampia gamma di organismi acquatici è direttamente esposta alle tossine in soluzione.

Episodi di morie ittiche su vasta scala sono stati associati a presenze massicce di cianobatteri nei corpi d'acqua (Zimba, 2001, 2006; Jewel, 2003). Gli studi sulle contaminazioni ittiche hanno dimostrato sensibilità specie-specifiche alle microcistine; l'assunzione di queste cianotossine nei pesci avviene principalmente come ingestione orale, e in misura minore come assorbimento attraverso l'epitelio branchiale (Ernst, 2006).

Le microcistine possono concentrarsi in diversi tessuti ittici (Xie, 2005): patologie del fegato, dei reni e delle branchie sono presenti nei pesci esposti, a causa dell'inibizione specifica delle proteinfosfatasi e di altri effetti a cascata, come l'aumento dei valori degli enzimi epatici nel siero. Diminuzione dello sviluppo negli stadi giovanili (Malbrouck e Kestermont, 2006) e cambiamenti comportamentali (Baganz, 2004) sono stati osservati dopo immersione dei pesci in acqua contenente microcistine, con quest'ultimo effetto probabilmente dovuto all'abilità di queste tossine di attraversare la barriera emato-encefalica, veicolate da polipeptidi trasportatori di anioni (Fischer, 2005; Cazenave, 2006).

La tossicità delle microcistine nei pesci dipende dall'equilibrio tra accumulo e metabolismo (Ito, 2002), e le sensibilità specie-specifiche osservate sono state interpretate come il risultato di differenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali tra i vari ordini ittici (Tencalla e Dietrich, 1997; Fischer e Dietrich, 2000); anche le capacità di disintossicazione attraverso la via della glutatione-S-transferasi dipendono da differenze specie-specifiche (Cazenave, 2006). È stato osservato che i livelli intracellulari di glutatione diminuiscono negli epatociti di ratto a causa dell'esposizione alla microcistina-LR, determinando un aumento delle specie di ossigeno reattivo e della perossidazione lipidica (Bouaicha e Maatouk 2004). Un aumento della perossidazione lipidica è stato rilevato a livelli sub-citotossici delle tossine investigate (microcistina–LR). La perossidazione lipidica ha come risultato la formazione di dialdeide malonica, che ha un potenziale di modificazione delle basi del DNA (Chung, 1996).

In passato il rischio dei consumatori di pesce eviscerato era tradizionalmente ritenuto basso, perchè si pensava che le microcistine si accumulassero principalmente nel fegato dei pesci. Recenti studi tuttavia hanno rivelato concentrazioni di microcistine fino a 337,3 µg/kg (*Tilapia rendalli*, Magalhaes, 2001), 102 µg/kg (*Oreochromis niloticus*, Mohamed, 2003), 96,5 µg/kg (*Hypophthalmichthys molitrix*, Chen, 2006) e 28 µg/kg (*Oncorhynchus mykiss*, Wood, 2006) nel tessuto muscolare di pesce selvatico o allevato (livello provvisorio raccomandato dall'OMS nel 1998: TDI 0.04 µg/kg peso umano/ giorno), indicando che anche il consumo del muscolo di pesce potrebbe costituire una minaccia per la salute umana. Questo rischio potenziale ha portato allo sviluppo di differenti metodi di estrazione e analisi per rivelare le microcistine nei tessuti ittici.

Nella letteratura internazionale sono stati descritti diversi metodi di rilevazione, basati sul biosaggio di inibizione delle protein-fosfatasi, su immunosaggi (ELISA), sul test in topo, su cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelazione UV.

Tuttavia, questi metodi hanno mostrato alcune limitazioni, poichè mancano di selettività nell'identificazione delle singole cianotossine nel campione, e talvolta possono anche essere influenzati dalla presenza di attività endogene (come nel caso del biosaggio di inibizione delle protein-fosfatasi). D'altra parte, la sensibilità dei metodi HPLC è riconosciuta come non adeguata per determinare bassi livelli di contaminazione da cianotossine.

Benchè l'ELISA basato su anticorpi policionali o monocionali sia risultato sensibile e affidabile, le tecniche analitiche basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) sono tutt'oggi considerate la scelta migliore per un moderno studio della contaminazione da cianotossine, sia in acqua che nei tessuti animali. Queste tecniche possono essere usate sia per lo screening che per conferma, permettendo di identificare in maniera univoca i singoli composti fino a livello di parti per miliardo (ppb) o sub-parti per miliardo; per questi motivi, l'analisi in LC-MS è adatta sia allo scopo del controllo ufficiale che al monitoraggio per valutare la sicurezza del cibo e la protezione dl consumatore (per una valida rassegna vedere Lawton ed Edwards, 2008).

Notevoli sforzi sono stati compiuti per sviluppare varie tecniche che permettessero di analizzare in spettrometria di massa le microcistine presenti nei cianobatteri e nell'acqua, ma malgrado ciò rimangono da risolvere problemi importanti nella rilevazione e quantificazione delle microcistine nei campioni di tessuti animali: le basse concentrazioni degli analiti, le matrici complesse per gli alti quantitativi di proteine e altre macromolecole, i legami covalenti degli analiti con le proteine (Hilbom, 2005; Soares, 2006; Yuan, 2006). Ad esempio, diversi picchi interferenti possono essere osservati nello spettro di massa tandem (MS/MS) di campioni di siero umano, e anche l'intensità degli ioni frammento ha bassa riproducibilità in confronto con lo standard puro (Yuan, 2006).

Cianopeptidi

I metodi di analisi delle cianotossine basati sulla tecnica *matrix-assisted laser desorption ionization* con rivelazione in spettrometria di massa a tempo di volo (MALDI-ToF/MS, Erhard, 1997) si sono dimostrati uno strumento sensibile ed efficiente per esaminare il contenuto di peptidi non-ribosomiali nei cianobatteri; col tempo divenne sempre più evidente che, in aggiunta a microcistine e nodularine, i cianobatteri contengono un'ampia gamma di peptidi. Questi, similmente alle microcistine, sono sintetizzati mediante la sintesi peptidica non-ribosomiale.

Poichè esiste un certo dibattito sulla classificazione di questi cianopeptidi come metaboliti primari o secondari, un argomento per classificarli come metaboliti secondari è che i genotipi di una specie che differisce significativamente nella presenza/assenza di una specifica classe peptidica non mostrano un vantaggio/svantaggio selettivo di chiara evidenza per l'organismo producente (Welker e von Döhren 2006).

I cianopeptidi sono classificati in distinte classi peptidiche, le anabaenopeptine, le aeruginosine, le cianopeptoline e le microginine (Figura 1); ognuna è caratterizzata da una struttura molecolare conservata con un certo numero di posizioni aminoacidiche variabili, generanti numerose varianti per ogni classe peptidica (Welker & von Döhren 2006).

Molti cianopeptidi mostrano bioattività, ad esempio come inibitori di specifici enzimi *in vitro*. La tossicità delle microcistine verso i vertebrati e i crostacei è ben nota, e rimane incerto se la loro produzione è stata evoluta per conseguire il vantaggio competitivo della tossicità verso gli animali. Malgrado una quantità di ipotesi sia stata sviluppata, in particolare per le microcistine, la funzione biologica della produzione di cianopeptidi per le stesse cellule rimane indecifrata. Esperimenti con cianopeptidi non-microcistine da ceppi di laboratorio hanno mostrato varie attività biologiche (Czarnecki, 2006). Vengono limitate una varietà di enzimi come la tripsinasi, la trombina, la

plasmina, la chimotripsina, l'elastasi, la papaina, l'enzima convertitore dell'angiotensina, la leucinoaminopeptidasi e la carbossipeptidasi; alcuni cianopeptidi sono tossici per le cellule leucemiche. Le attività biologiche identificate includono quelle con potenziale applicazione farmaceutica, ad esempio nel trattamento dell'ipertensione mediante sostanze vasoattive (come le microginine) o delle condizioni come asma e infezioni virali tramite gli inibitori della serin-proteasi (come le cianopeptoline), e quelle con proprietà tossiche come gli inibitori delle protein-fosfatasi (ad es. le anabaenopeptine), o i letali inibitori della muta nella *Daphnia* (ad es. la microviridina J, Rohrlack, 2004).

Molti cianopeptidi sono inibitori delle proteasi, come la tripsina/chemotripsina inibita dall'aeruginosina (Kodani, 1998), dalle cianopeptoline (Jakobi, 1995) e dalle microviridine (Shin, 1996).

Gli esami di tossicità degli estratti cellulari algali non purificati mostrano tossicità più alte di quelle attese per la presenza di microcistine (Jungmann & Benndorf 1994, Keil, 2002). Recentemente sono stati scoperti oligopeptidi con tossicità verso i crostacei acquatici (oscillapeptina, microviridina J) paragonabile a quella delle microcistine (Agrawal, 2001, Blom, 2003, Rohrlack, 2003).

Le anabaenopeptine sono un gruppo di cianotossine esapeptidiche meno tossiche delle microcistine. La loro struttura generale è ciclo(Phe(1)–MeAla(2)–HTyr(3)–Val(4)–Lys(5))–CO–L–X(6); HTyr è l'omotirosina, MeAla è la N-metilalanina, CO è un gruppo carbonilico a ponte e L–X in posizione 6, legato all'anello peptidico, è un L-aminoacido variabile (usualmente Tirosina, Arginina, Lisina o Fenilalanina).

La struttura dell'anabaenopeptina B mostra un residuo di arginina in posizione 6, mentre l'anabaenopeptina F è caratterizzata dalla presenza di isoleucina in posizione 4 e arginina in posizione 6 (Erhard, 1999).

Cilindrospermopsina

La cilindrospermopsina (CYN), la seconda cianotossina per frequenza di rilevazione in Italia, è stata oggetto di particolare interesse scientifico nell'ultima decade a causa del suo diffondersi dalle aree tropicali a quelle temperate, in apparente accordo con il manifestarsi dei fenomeni legati al *global warming*.

La cilindrospermopsina (Figura 1) è un alcaloide solfato-guanidinico nefrotossico, timotossico ed epatotossica, con un radicale 5-sostituito-2,4-di-ossipirimidina (uracile), per un peso molecolare di 415 g/mol (Banker, 1997).

Oltre che sul fegato, a seguito di avvelenamento da CYN sono stati descritti anche effetti tossici su reni, polmoni, cuore e timo (Terao, 1994). Nel topo sono state dimostrate reazioni di sensibilizzazione cutanea prodotte dalla tossina pura o da sospensioni acquose di *C. raciborskii* contenenti CYN (Stewart, 2006) oltre a tossicità fetale dopo esposizione in gestazione avanzata (Rogers, 2007).

La mutagenicità di CYN e stata recentemente dimostrata *in vitro* ed esiste forte evidenza anche per la sua cancerogenicità *in vivo*: frammentazione e modificazione del DNA (Shen, 2002; Shaw, 2000) sono state osservate nei fegati di topi trattati, mentre tutta una gamma di anomalie citogenetiche sono state osservate in cellule linfoblastoidi umane esposte a CYN, con formazione di micronuclei centromero-negativi indicanti rottura del DNA a doppia elica (Humpage, 2000). L'attività genotossica è causata dall'abilità della tossina di indurre rotture dell'elica del DNA, con perdita di interi cromosomi per i danni alla funzione centromero/cinetocore. Inoltre, la CYN induce risposte da stress in fibroblasti umani coltivati e cellule HepG2, che causano l'attivazione del fattore di trascrizione p53 (Bain, 2007).



Figura 1. Struttura delle cianotossine più comuni in Italia e dei cianopeptidi di recente acquisizione

A basse dosi la CYN sopprime la sintesi proteica glutatione-coniugata, probabilmente inibendo la traduzione ribosomiale attraverso il legame ad una proteina associata con il sistema di traduzione eucariotico (Froscio, 2001, 2008); ma a maggiori concentrazioni domina un processo più rapidamente tossico, metabolismo-dipendente: la sua tossicità acuta sembra essere mediata da metaboliti citocromo p 450-generati (Humpage, 2005).

Il primo episodio di avvelenamento umano da acqua potabile contaminata venne registrato a Palm Island (Australia) nel novembre 1979, quando una comunità aborigena fu interessata da un'epidemia di epatoenterite (Griffiths, 2003).

La CYN è stata provata avere tossicità ambientale verso gli anfibi (Kinnear, 2007) e attività antibatterica (Rasmussen, 2008). Recenti evidenze hanno provato che anche la crescita e il metabolismo dei vegetali (Vasas, 2002) come anche la germinazione del polline (Metcalf, 2004) sono inibiti dalla CYN, con implicazioni negative per le attuali pratiche di irrigazione a getto.

Sono state isolate due varianti strutturali della CYN, la 7-epicilindrospermopsina (Banker, 1997) e la deossi-cilindrospermopsina (Norris, 1999), la seconda quasi priva di attività tossica.

La CYN è prodotta da Cylindrospermopsis raciborski (Hawkins, 1985, 1997), Umezakia natans (Harada, 1994), Aphanizomenon ovalisporum (Banker, 1997), Anabaena bergii (Schembri, 2001), Raphidiopsis curvata (Li, 2001), Aphanizomenon flos-aquae (Preußel, 2006), Anabaena lapponica (Spoof, 2006), Lyngbya wollei (Seifert, 2007) e Aphanizomenon gracile (Rücker, 2007).

Ci sono a tutt'oggi pochi studi sull'accumulazione di CYN nella fauna ittica: la CYN è stata provata contaminare gamberi (*Cherax quadricarinatus*, fino a 4,3 μ g/g) e pesci (*Melanotaenia eachamensis*, fino a 1,2 μ g/g) di un piccolo laghetto di acquacoltura australiano (Saker, 1999), e molluschi d'acqua dolce (*Anodonta cygnea*, fino a 2,52 μ g/g) in uno studio di esposizione per 16 giorni (Saker, 2003).

La presenza di cilindrospermopsina fu rilevata per la prima volta in Europa nel 2002 (Kiss, 2002) e in Italia nel 2004 (Manti, 2005).

METODOLOGIE UTILIZZATE

L'IZS del Mezzogiorno, l'Istituto Superiore di Sanità e la Facoltà di Agraria dell'Università Federico II, a Portici, hanno creato un "*network*" di laboratori competenti per lo sviluppo di metodi di *screening* (ELISA) e di conferma per l'identificazione di cianotossine in estratti da cianobatteri, acqua, pesci e molluschi. In particolare, per le analisi di conferma sono state utilizzate tecniche strumentali basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), impiegando diversi rivelatori di uso comune, come triplo quadrupolo e trappola ionica, ma anche più sofisticati come il MALDI-ToF (*Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight*), e soprattutto un cosiddetto spettrometro ibrido, il Q-ToF (*Quadrupole-Time of Flight*). Le analisi MALDI-ToF/MS e LC-Q-ToF/MS/MS sono risultate particolarmente efficaci nell'individuare i profili di contaminazione da cianotossine, permettendo di individuare simultaneamente biotossine appartenenti a diverse classi. Mediante la combinazione di queste tecniche, sono state identificate biotossine prodotte da cianobatteri presenti tra l'altro nei laghi d'Averno (microcistine, CYN, aeruginosine, aeruginosidi), Vico (microcistine), Pergusa (CYN).

Complessivamente sono stati individuati diversi tipi di microcistine; la tecnica LC-Q-ToF/MS/MS si è dimostrata di particolare efficacia per l'analisi qualitativa e quantitativa, ed ha consentito di caratterizzare la struttura molecolare di una nuova variante della MC-RR mai descritta in precedenza, identificata nel lago d'Averno (acetil-Adda-MC-RR). Inoltre, è stata confermata mediante spettrometria di massa la presenza della cilindrospermopsina (CYN) in alcuni laghi italiani.

Per effettuare una corretta valutazione dei rischi per i consumatori è necessario individuare le sostanze prodotte durante le fioriture, determinare la loro eventuale concentrazione e seguire la persistenza nel tempo sia in acqua che nei prodotti ittici.

Con tale obiettivo è stata sviluppata una metodologia operativa che mira inizialmente a caratterizzare le cianotossine prodotte nell'ambito della fioritura analizzando un estratto della massa cianobatterica mediante ELISA e MALDI-ToF/MS; in questo modo sono state individuate le microcistine prodotte e le loro eventuali varianti (forme de-metilate, acetilate) (Ferranti, 2008).

La presenza di microcistine poco comuni o non ancora descritte in letteratura è stata studiata mediante LC-Q-ToF/MS/MS, che permette un'analisi qualitativa e quantitativa più accurata; l'identificazione e quantificazione delle singole microcistine è necessaria per valutare il rischio di intossicazione sulla base della loro tossicità relativa.

La presenza delle microcistine può essere quindi determinata in modo mirato nell'acqua e nei prodotti ittici del corpo idrico contaminato, impiegando LC-MS/MS con rivelatore a triplo quadrupolo o a trappola ionica; inoltre, la permanenza di queste biotossine può essere monitorata nel tempo, usando anche i metodi di *screening* ELISA, fino ad osservare la scomparsa della contaminazione e la deplezione dai tessuti dei prodotti ittici. La strategia analitica e i metodi di prova sviluppati rappresentano uno strumento diagnostico rapido ed efficace per caratterizzare il tipo e l'entità della contaminazione, e per adottare le misure di prevenzione necessarie a ridurre i rischi per il consumatore.

I 180 pesci analizzati appartenevano a diverse specie che popolano abitualmente i laghi italiani, tra cui la carpa (*Cyprinus carpio*), il coregone (*Coregonus lavaretus*), la tinca (*Tinca tinca*), il luccio (*Esox lucius*), il latterino (*Atherina boyeri*), il persico sole (*Lepomis gibbosus*), il cefalo (*Mugil cephalus*), il cavedano (*Leuciscus cephalus*), il carassio (*Carassius carassius*) e la trota (*Salmo trutta*). È stato analizzato anche il gambero americano (*Procambarus clarkii*).

Campioni di acqua sono stati analizzati direttamente anche con kit ELISA per la ricerca delle microcistine e della cilindrospermopsina.

La scelta dei sistemi per estrarre le tossine dalle diverse matrici riveste grande importanza, anche in relazione ai limiti da considerare per gli effetti tossici. Un metodo estrattivo deve essere infatti, oltre che rapido, anche efficiente al maggior grado possibile. I passaggi in cui si ottiene la disrupzione cellulare ad esempio devono essere seguiti attentamente per assicurare la rottura delle cellule senza danneggiare le tossine extracellulari o intracellulari, cosa che porterebbe ad una sottostima della loro concentrazione e quindi della tossicità totale. Analoga attenzione deve essere posta nella procedura di purificazione, perché sia minimizzata la perdita di tossine nei vari passaggi.

A questo scopo nella purificazione di microcistine da matrice tissutale è stata paragonata l'efficienza di recupero di due diverse colonne per estrazione in fase solida (SPE): la SPE C18, utilizzata da questo gruppo in precedenti lavori (Bruno, 2009), e la HLB SPE Waters Oasis, citata recentemente in letteratura (Yuan, 2006).

Estrazione della cilindrospermopsina da tessuti ittici

L'estrazione di cilindrospermopsina da campioni di tessuto di due pesci (*Salmo trutta*) è stata effettuata secondo Saker *et al.* (1999) e Saker *et al.*, (2003), ovvero: 5 g di tessuto (fegato o muscolo) in 10 mL di metanolo (MeOH) sono stati omogenati per 15 min. utilizzando un omogenizzatore tipo Potter (Polytron, Inc.), e poi ultrasonicati per 60 sec. a temperatura ambiente. Il campione è stato poi centrifugato per 5 min. a 5000 g e il supernatante filtrato (1). La procedura dall'omogenizzazione alla centrifugazione è stata ripetuta e il supernatante filtrato sullo stesso filtro usato nel passaggio (1). Il filtro e il contenitore sono stati lavati tre volte con piccoli volumi di MeOH; l'estratto è stato portato a secco al rotovapor, risospeso in 2 mL di acqua distillata e conservato a -30° C fino all'analisi.

Analisi della cilindrospermopsina mediante ELISA

I campioni di acqua e gli estratti tissutali sono stati analizzati con l'Abraxis Cylindrospermopsin Elisa Microtiter Plate immunoassay (Abraxis Bioscience, Inc. CA, USA).

I saggi ELISA sono stati effettuati in accordo con le istruzioni della ditta produttrice, usando gli standard forniti dal kit.

L'immunosaggio Abraxis ha un limite di rivelazione di 0,04 μ g/kg (ppb), con coefficiente di variazione relativa per gli standard sotto il 10%, e per i campioni sotto il 15%.

Le concentrazioni dei campioni sono state determinate per interpolazione della curva assorbanza vs log(concentrazione) degli standard, calcolata per ogni sessione di lavoro.

Estrazione delle microcistine da tessuti ittici

Metodo con SPE C18

5 g di tessuto omogeneo (muscolo, visceri o uova, laddove presenti) sono stati omogenati con Polytron a 20000 giri in 10 mL di metanolo per 5 minuti e poi centrifugati (5 minuti a 5000

giri); il surnatante è stato filtrato e raccolto in un pallone per rotovapor, la stessa procedura è stata ripetuta sul residuo solido e i due filtrati sono stati riuniti.

L'estratto in metanolo è stato trasferito in matraccio tarato, e portato a 25 mL con metanolo; sono stati prelevati, quindi, 5 mL (corrispondenti a 1 g di tessuto), diluendoli 1:1 in acqua bidistillata e sottoponendoli ad estrazione: l'estratto (acqua/metanolo 1/1) è stato caricato su cartuccia SPE C18 precedentemente attivata (20 mL metanolo, 20 mL acqua/metanolo 1/1 e 20 mL di acqua); dopo lavaggio con 30 mL di acqua e 30 mL di acqua:metanolo 50%, la colonna è stata eluita con 50 mL di metanolo.

Il campione, portato a secco e ripreso con 2 mL di acqua bidistillata, è stato analizzato con kit ELISA EnviroGard[®] Microcystins Plate Kit (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE, USA). Questo è un kit per ELISA diretto competitivo, per la rivelazione quantitativa di microcistine e nodularine (limite di quantificazione 0.1 ppb). Esso non differenzia tra microcistina-LR e altre varianti di microcistine, ma ne rivela la presenza a differenti concentrazioni, in funzione delle rispettive cross-reattività. Le concentrazioni al 50% di inibizione (50% B_o) per questi composti (ppb) sono: microcistina-LR 0,31 ppb, microcistina-RR 0,32 ppb, microcistina-YR 0,38 ppb.

Le assorbanze della soluzione della reazione finale sono state misurate a 450 nm con uno spettrofotometro Anthos 2010 (Anthos – Labtech, Salzburg, Austria).

Metodo con SPE HLB Oasis (Waters)

5 g di tessuto omogeneo (muscolo, fegato intero, visceri, uova laddove presenti) precedentemente sminuzzato e triturato, sono stati estratti con 10 mL di metanolo, omogenando per 15 minuti in Polytron; il campione è stato poi centrifugato per 5 minuti a 5000 giri.

Il surnatante è stato filtrato su filtro a pieghe e lasciato percolare su pallone per rotovapor da 100 mL; sul residuo solido è stata ripetuta l'estrazione con 10 mL di metanolo per 15 minuti in Polytron. Il campione è stato poi direttamente filtrato sullo stesso filtro usato prima, e lasciato percolare sul pallone da 100 mL per rotovapor, già ospitante i precedenti 10 mL.

Il filtro è stato poi lavato con 5 mL di metanolo per 3 volte (in totale 15 mL) e l'estratto metanolico portato a piccolo volume (circa 1-2 mL dai 35 mL iniziali) in rotovapor e trasferito quantitativamente in matraccio tarato da 5 mL, lavando il pallone del rotovapor con piccole quantità di metanolo.

Il matraccio tarato è stato poi portato a volume (5 mL) con metanolo; 1 mL di estratto (equivalente ad 1 g di tessuto) è stato poi diluito in 1 mL di acqua bidistillata (totale 2 mL metanolo/acqua 1/1) e caricato su cartuccia HLB SPE Waters OASIS, condizionata con 1 mL di metanolo e 1 mL di acqua bidistillata

La colonna SPE è stata lavata con 1 mL di metanolo/acqua 5/95, e il campione eluito con 1 mL di metanolo.

Quest'ultima frazione è stata portata a secco in rotovapor e ripresa con 2 mL di acqua bidistillata, quindi analizzata con kit ELISA (Envirogard[®]).

Analisi delle microcistine mediante ELISA

I campioni di acqua e di tessuti sono stati analizzati utilizzando tre diversi kit immunochimici ELISA, secondo le istruzioni delle ditte produttrici.

Il kit immunochimico per le microcistine Envirogard (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE, USA) è un ELISA a competizione diretta per la rivelazione quantitativa delle microcistine e delle nodularine (limite di quantificazione 0,1 ppb). Il metodo non differenzia tra microcistina-

LR e altre varianti ma rileva la loro presenza a diverse concentrazioni. Le concentrazioni di inibizione al 50% (50% Bo) per questi composti in ppb sono: microcistina-LR 0,31, microcistina-RR 0,32, microcistina-YR 0,38.

Il kit Envirologix QuantiPlate (Envirologix Inc., Portland, ME, USA) è un ELISA competitivo con limite di rivelazione di 0,147 ppb e limite di quantificazione di 0,175 ppb. La reattività crociata di questo kit ELISA con le altre varianti delle microcistine è rispettivamente: microcistina-LR 0,50%, microcistina-LA 0,81%, microcistina-RR 0,92%, microcistina-YR 1,42% (50% B_0).

Entrambi i kit sono basati sull'anticorpo policionale elaborato da Chu *et al.* (1989) contro la microcistina-LR, che si lega alle microcistine e ai loro metaboliti come i coniugati microcistina-glutatione (Metcalf, 2000).

Il kit per microcistine Beacon (BEACON Analytical Systems Inc., Portland, ME, USA) è anch'esso basato su un anticorpo policionale elaborato contro la microcistina-LR come nei casi precedenti. La percentuale di reattività crociata contro le altre microcistine in questo sistema è: microcistina-LR 100%, microcistina-RR 87%, microcistina-YR 48%.

Le assorbanze delle soluzioni di reazione finale di questi tre kit sono state misurate a 450 nm con uno spettrofotometro Anthos 2010 (Anthos – Labtech, Salzburg, Austria).

Purificazione delle microcistine da campioni di acqua per analisi mediante spettrometria di massa

La purificazione dei campioni di acqua è stata effettuata su cartucce C18 EC SPE equilibrate con 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua MilliQ; successivamente, 100 mL di campione sono stati caricati e lasciati percolare per gravità; la cartuccia è stata quindi lavata con 5 mL di acqua MilliQ e seccata sotto vuoto per 30 min. La colonna SPE è stata quindi eluita con 5 mL TFA 1% in metanolo; il campione è stato seccato sotto corrente di azoto a 40°C, poi dissolto in 1 mL di metanolo e analizzato con LC/ESI-MS/MS a trappola ionica, MALDI-ToF-MS ed LC/ESI-Q-ToF-MS/MS.

Purificazione delle microcistine da tessuto ittico per analisi mediante spettrometria di massa

Brevemente, 200 μ L di estratto sono stati filtrati con un filtro di cellulosa rigenerata (diametro dei pori 0,2 μ m, diametro del filtro 25 mm, Alltech, Sedriano, Italia) e analizzati con LC/ESI-MS/MS a trappola ionica, MALDI-ToF-MS ed LC/ESI-Q-ToF-MS/MS.

Analisi di microcistine mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica

Le analisi son state effettuate in un sistema LC/ESI-MS equipaggiato con pompa P2000, degassatore SCM 1000, autocampionatore AS1000 e spettrometro di massa a trappola ionica LCQ Advantage con sorgente ionica electrospray (ESI) (ThermoElectron, Italia). La separazione cromatografica è stata effettuata iniettando un volume di 50 μ L di campione in una colonna in

acciaio inossidabile da $250 \times 3,0$ mm con particelle da 4 µm Max RP 80 Å Synergi (Phenomenex, Torrance, CA, USA), ad un flusso di 0,3 mL /min, con fase mobile A) acqua contenente 0,05% di TFA, e fase mobile B) acetonitrile (ACN) al 0,05% di TFA. La cromatografia è stata eseguita in gradiente lineare a temperatura ambiente, con il seguente programma:

1	,	0 1	U		
tempo (min)	0	2	18	26	29
%B	30	30	100	100	30

Il tempo di riequilibrio tra due corse è stato di 12 min. Lo spettrometro di massa LCQ Advantage è stato periodicamente tarato con soluzioni standard di Ultramark, caffeina e peptide Met-Arg-Phe-Ala a massa nota, fornite dal produttore. Durante gli esperimenti LC/ESI-MS/MS, gli spettri di massa sono stati acquisiti nella modalità di ionizzazione positiva per MC-RR, MC-YR e MC-LR, e nella modalità ioni negativi per la MC-LW e la MC-LF. I parametri dello spettrometro sono stati ottimizzati modulando (*tune*) sullo ione $[M+H]^+$ della MC-RR, a *m*/*z* 1038,5, e sullo ione $[M+H]^-$ della MC-LW, a *m*/*z* 1023,5. Il *tune* è stato effettuato ad un flusso LC di 0,3 mL/min.

Sono stati adottati i seguenti parametri sperimentali LC/ESI-MS/MS: temperatura del capillare 300 °C, voltaggio di spray 4,5 kV, numero di microscan 3, tempo di iniezione massimo 200 ms. Altre condizioni sperimentali (energia di collisione, ampiezza di isolamento) sono state ottimizzate per ogni composto. L'analisi LC/ESI-MS/MS è stata effettuata monitorando i segnali delle transizioni ione precursore \rightarrow ione prodotto (*selected reaction monitoring*, SRM) estratti dal dataset LC/ESI-MS/MS di ogni esperimento; i cromatogrammi SRM sono stati registrati selezionando almeno 2 ioni diagnostici per ogni microcistina. Per migliorare la specificità del metodo, sono stati introdotti eventi MS³ sia per la MC-LW che per la MC-LF, oltre agli eventi SRM per l'analisi MS/MS. I dati sono stati acquisiti e processati utilizzando il software XcaliburTM, versione 1.3, della ThermoElectron.

I cromatogrammi SRM sono stati integrati e i calcoli quantitativi eseguiti sia rispetto a rette di taratura con standard esterno, sia a rette di taratura *matrix-matched*.

Le curve di taratura per verificare la linearità del metodo in solvente e in matrice sono state calcolate mediante regressione lineare, usando soluzioni standard in metanolo nell'intervallo da 10 a 75 ng/mL. Per ogni singola sessione di lavoro è stato analizzato un bianco di reagente, campioni in bianco e campioni contaminati con standard di tossina.

Analisi di microcistine mediante spettrometria MALDI-ToF/MS

Gli esperimenti in spettrometria di massa sono stati eseguiti con uno spettrometro di massa Voyager DE-PRO *Time-of-Flight* equipaggiato con un laser ad azoto (337 nm, ampiezza di pulsazione 3 ns); come matrice è stato usato l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico. Il campione (1 μ L da una soluzione in acqua) è stato caricato sul probe dello spettrometro e portato a secco. Successivamente è stato aggiunto 1 μ L di una miscela 10 mg/mL di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in H₂O/acetonitrile (1/1 v/v) contenente 0.1% TFA. Per ogni campione l'acquisizione dello spettro di massa è stata effettuata in ioni positivi, modalità *reflectron*, accumulando 200 pulsazioni laser. Il voltaggio di accelerazione è stato di 20 kV. La taratura dello spettrometro di massa è stato tarato nell'intervallo di massa da 500 a 2500 *m/z* usando 1 μ L di standard Low Mass Range Peptide Mix (nome commerciale della miscela "Mix1", Applied Biosystems, Monza, Italia); è stata calcolata una risoluzione da 20.000 a 100.000 uma negli intervalli di massa di lavoro.

La modalità di decadimento post-sorgente (*Post Source Decay*, PSD) ha permesso l'identificazione degli ioni prodotto derivanti dagli ioni molecolari delle cianotossine presenti nei singoli campioni; ciò consente di eseguire anche una verifica con i dati già noti in letteratura (Erhard, 1999) per identificare le singole cianotossine non solo in base alla massa esatta, ma anche dal *pattern* di frammentazione.

Analisi di microcistine mediante LC/ESI-Q-ToF-MS/MS

L'analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS consente di separare i componenti presenti nel campione mediante cromatografia liquida e quindi di ottenere spettri sia MS full scan che MS/MS mediante uno spettrometro ibrido quadrupolo-time-of-flight (Q-ToF); in questo modo, si possono combinare l'analisi della massa esatta degli ioni molecolari e/o precursori, e lo studio dei loro profili di frammentazione. È' stato usato un modello Ultima (Waters, Manchester, UK), equipaggiato con una sorgente ionica electrospray (ESI) operante nella modalità ioni positivi, e un sistema con pompe ad alta pressione per nano-cromatografia modello CapLC (Waters, Manchester, UK). I campioni (1 μ L) sono stati caricati su una *trap column* ZorbaxTM 300 SB C18 trap 5 mm × 100 μ m i.d. collegata in linea con una colonna separativa capillare Atlantis C18 15 cm × 100 μ m i.d. per la cromatografia delle microcistine al flusso di 1 μ L/min, utilizzando 0.1% TFA in acqua (fase mobile A) e in 84% acetonitrile acquoso contenente 0.1% TFA (fase mobile B). La cromatografia è stata eseguita in gradiente lineare a temperatura ambiente, secondo il seguente programma:

tempo (min)	0	40	45	50
% B	0	60	90	0

Il tempo di riequilibrio tra le analisi è stato di 5 minuti. L'analisi in spettrometria di massa è stata effettuata sia in modalità MS (continuum) che modalità MS/MS (*data dependent acquisition*, DDA) per ottenere gli spettri di frammentazione delle microcistine. Tutti gli spettri sono stati acquisiti alla velocità di 1 scan/sec, con le condizioni seguenti sperimentali in sorgente: voltaggio del capillare 3000 V; *cone voltage* 100 V; *extractor* 0 V; lenti RF 60. I dati grezzi sono stati processati con il software MassLynx[™] versione 3.5. La taratura dello spettrometro di massa è stata eseguita prima delle analisi in base alla massa nota degli ioni a carica multipla dello standard fibrinopeptide-Glu.

Dati di specificità, recupero e precisione

La specificità di metodo è stata valutata analizzando 20 campioni di acqua incontaminata di diverse origini (laghi, rete idrica), che non hanno mostrato segnali interferenti provenienti dalla matrice nei cromatogrammi MS e MS/MS, registrati utilizzando le singole tecniche analitiche impiegate. Tutti i campioni di acqua sono stati analizzati mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica, MALDI-ToF/MS ed LC/ESI-Q-ToF/MS. I limiti di rivelazione (LODs) delle 5 microcistine sono stati calcolati sulla base di un rapporto 3:1 segnale/rumore (S/N) dagli spettri MS e MS/MS dei bianchi. Per valutare i limiti di quantificazione (LOQs) delle 5 microcistine con le tecniche MS impiegate, alcuni campioni d'acqua sono stati contaminati con concentrazioni decrescenti di microcistine; i campioni sono stati analizzati e il LOQ definito come la più bassa concentrazione di analita determinata e identificata sulla base del suo spettro MS/MS (Tabella 1). La riproducibilità intra-laboratorio del metodo è stata calcolata analizzando

sei diversi campioni d'acqua contaminati con una miscela delle 5 microcistine a 0,1, 0,2 e 0,5 ng/mL, in due diversi giorni. Sono stati calcolati i recuperi medi (Tabella 2).

Microcistina						
	MS/MS a trappola ionica	MALDI- ToF/MS	Q-ToF- MS/MS	MS/MS a trappola ionica	MALDI- ToF/MS	Q-ToF- MS/MS
MC-RR MC-LR MC-YR MC-LW MC-LF	0,1 0,1 0,1 0,5 0,5	0,1 0,2 0,2 0,5 0,5	0,01 0,01 0,01 0,01 0,01	0,5 0,5 0,5 1 1	1 2 1 2 2	0,1 0,1 0,1 0,1 0,1 0,1

Tabella 1.	Limiti di rilevazione (LOD) e quantificazione (LOQ) di MC-RR, MC-LR, MC-YR, MC-LW,
	MC-LF delle tecniche di spettrometria di massa studiate; per LC/ESI-Q-ToF/MS è stato
	considerato lo ione prodotto m/z 135,07

Tabella 2. Percentuali medie di recupero e riproducibilità intra-laboratorio (CV%) calcolate a 0,2 ng/mL (n. 6) e 0,5 ng/mL (n. 6), misurate con differenti rivelatori spettrometri di massa

Livello di contaminazione (ng/mL)	Microcistina	MS/MS a trap ionica	opola	MALDI-ToF/	MS	Q-ToF-MS/I	MS
(-	Recupero medio (%)	CV (%)	Recupero medio (%)	CV (%)	Recupero medio (%)	CV (%)
0,2	MC-RR	88,6	8,4	91,2	4,2	81,9	3,2
	MC-LR	72,6	6,9	91,3	2,7	80,1	2,3
	MC-YR	74,1	9,3	91,0	3,8	80,2	3,1
	MC-LW	83,6	18,2	75,4	4,2	69,4	6,4
	MC-LF	83,9	3,8	78,2	8,9	70,1	6,3
0,5	MC-RR	87,6	8,7	90,1	3,3	85,9	3,3
	MC-LR	96,5	11,4	87,8	3,1	85,0	3,5
	MC-YR	95,1	9,1	89,2	2,6	83,0	4,3
	MC-LW	81,8	16,5	84,5	3,8	77,2	4,1
	MC-LF	81,6	3,2	88,2	3,8	78,2	5,1

Purificazione della CYN da campioni di acqua per analisi mediante spettrometria di massa

La purificazione è stata effettuata mediante SPE su cartucce HLB Oasis equilibrate con 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua MilliQ; 20 mL di campione precedentemente filtrato su carta sono stati caricati sulla colonna SPE e fatti defluire per gravità; la cartuccia è stata lavata con 5 mL di acqua MilliQ quindi asciugata a secco sotto vuoto per 30 minuti. La colonna SPE è stata quindi eluita con 5 mL di metanolo contenente 0,05% di acido acetico v/v, e l'eluato portato a secco sotto corrente di azoto a 40° C. Il residuo è stato dissolto in 1 mL di acqua MilliQ, e analizzato mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica, MALDI-ToF-MS ed LC/ESI-Q-ToF-MS/MS.

Purificazione della CYN da campioni di alghe per analisi mediante spettrometria di massa

I campioni di acqua contenenti cianobatteri in sospensione (volume di 50 mL) sono stati centrifugati in tubo Falcon a 1086 g per 10 minuti; il pellet è stato separato, pesato e sospeso in 500 μ L di acqua MilliQ, poi trasferito in una provetta Eppendorf da 2 mL e sonicato per 10 min. Il campione è stato centrifugato a 18790 g per rimuovere i detriti cellulari e il supernatante separato e analizzato mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica, MALDI-ToF-MS ed LC/ESI-Q-ToF-MS/MS.

Purificazione della CYN da campioni di tessuto muscolare di pesce per analisi mediante spettrometria di massa

I campioni di muscolo da pesci non contaminati sono stati privati della pelle, poi omogenati con un blender; da 5 g sono stati pesati in un tubo Falcon ed estratti due volte con 20 mL di acqua MilliQ/acetonitrile (30/70 v/v), contenente 0,05% di acido acetico v/v; dopo agitazione su vortex per 2 min, il campione è stato centrifugato a 1086 g per 10 min e il supernatante è stato separato. Il volume del campione è stato ridotto a circa 6–7 mL in rotovapor a 40°C, e il volume finale portato a 10 mL con acqua MilliQ. È stata effettuata per due volte una estrazione liquido-liquido con 10 mL di *n*-esano, per rimuovere i componenti grassi; la fase organica è stata separata e scartata dopo centrifugazione a 1086 g per 5 min. Cinque mL di fase acquosa sono prelevati e addizionati con 25 mL di acqua MilliQ, poi caricati per gravità su una cartuccia SPE HLB Oasis, precedentemente equilibrata con 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua MilliQ; la cartuccia è lavata con 5 mL di acqua MilliQ e portata a secco sotto vuoto per 30 min. La colonna SPE è stata eluita con 5 mL di acqua MilliQ/acetonitrile (30/70 v/v), contenente 0,05% di acido acetico v/v; l'eluato è stato portato a secco in corrente di azoto a 40°C e il residuo dissolto in 1 mL di acqua MilliQ, poi analizzato mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica, MALDI-ToF-MS ed LC/ESI-Q-ToF-MS/MS.

Analisi di cilindrospermopsina mediante LC/ESI-MS/MS a trappola ionica

Per le prove LC-MS/MS è stato usato un sistema per cromatografia liquida modello Surveyor (Thermo Fisher, Milano, Italia) costituito da una pompa quaternaria Surveyor LC pump Plus, un autocampionatore Surveyor plus e un rivelatore spettrometro di massa LCQ Advantage a trappola ionica con interfaccia sorgente electrospray (ESI); il sistema cromatografico e i dati sono gestiti mediante il software Xcalibur[™] versione 1.3 (Thermo Fisher).

È stato eseguito uno studio preliminare mediante spettrometria di massa della cilindrospermopsina, in ioni positivi e negativi; è stata definita la migliore polarità di ionizzazione, sono state studiate le migliori condizioni per la l'analisi MS, sia *full scan* che *selected reaction monitoring* (SRM), e per l'analisi in frammentografia MS/MS. La cilindrospermopsina è stata caratterizzata studiando il suo spettro di massa in modalità ioni positivi. I parametri per l'analisi MS

e MS/MS sono stati ottimizzati lavorando in modalità *flow injection*, iniettando la cilindrospermopsina alla concentrazione di 0,5 µg/mL in metanolo a flusso LC a 0,25 mL/min, con fase mobile A) Acido acetico 0,05 % in acqua MilliQ e B) acetonitrile in rapporto 95/5 v/v. Sono state determinate le condizioni analitiche ottimali in termini di energia di collisione, voltaggio del capillare, ampiezza della banda di isolamento. Ai fini dell'analisi quantitativa e della conferma qualitativa in MS/MS sono stati selezionati gli ioni diagnostici a m/z 274,1, 318,2, 336,2, 416,1.

La separazione cromatografica della cilindrospermopsina in LC/ESI-MS/MS è stata eseguita mediante una colonna a fase inversa Luna-PFP 80 Å, 4 μ m, 150×3.0 mm (Phenomenex, Italia), eluita isocraticamente a flusso 0,25 mL/min con fase mobile A) Acido acetico 0,05 % in acqua MilliQ e B) acetonitrile in rapporto 95/5 v/v, tempo di analisi 10 min.

Lo spettrometro di massa è stato periodicamente tarato con soluzioni standard di Ultramark, caffeina e peptide Met-Arg- Phe-Ala a masse note, fornite dal produttore. Sono stati impostati i seguenti parametri sperimentali LC/ESI-MS/MS: temperatura capillare 300 °C, voltaggio spray 4,5 kV, numero di microscan 3, tempo massimo di iniezione 200 ms. Ulteriori condizioni sperimentali (energia di collisione, ampiezza di isolamento), e gli ioni diagnostici per l'analisi MS/MS sono riportati in Tabella 3; lo ione prodotto ad m/z 336,2 (il picco base) è stato selezionato per l'analisi quantitativa.

Tabella 3. Analisi LC/ESI-MS/ MS in trappola ionica

Condizioni sperimentali

Modalità di ionizzazione	positiva
Tempo massimo di iniezione (ms)	200
Ampiezza di isolamento (m/z)	2
lone precursore (m/z)	416,2 (M+H) ⁺
Energia di collisione (%)	32
Transizioni SRM	416,2→336,2
	416,2→318,2
	416,2→274,1
Ioni diagnostici MS/MS selezionati (m/z)	336,2 (picco base)
	318,2
	274,1

Per l'esecuzione dell'analisi i parametri dello spettrometro di massa sono stati ottimizzati eseguendo il *tune* sullo ione $(M+H)^+$ a m/z 416,2. Il procedimento di *tune* è stato effettuato in condizioni di flusso LC. L'analisi LC/ESI-MS/MS è stata effettuata monitorando i segnali delle transizioni ione precursore \rightarrow ione prodotto, in modalità *selected reaction monitoring*, SRM). Sono stati analizzati sia bianchi che campioni addizionati con CYN. I cromatogrammi SRM sono stati ottenuti estraendo i segnali di transizione ione precursore—ione prodotto dal dataste LC/ESI-MS/MS. Le curve di taratura per l'analisi quantitativa sono state calcolate mediante regressione lineare, utilizzando soluzioni standard di CYN in acqua MilliQ a 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 e 50,0 ng/mL. Sono state calcolate anche curve di calibrazione standard in matrice (*matrix-matched*); a questo scopo, campioni di acqua incontaminata sono stati processati mediante regressione lineare dell'analisi cromatografica. I dati sono stati processati mediante regressione lineare dell'area di picco contro la concentrazione addizionata di CYN a 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 e 50,0 ng/mL. Allo stesso modo, le curve di taratura standard nel muscolo di pesce sono state calcolate analizzando campioni incontaminati purificati e poi addizionati con CYN a 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 e 50,0 ng/mL.

Analisi di CYN mediante MALDI-ToF/MS

Gli esperimenti sono stati eseguiti con uno spettrometro di massa *time-of-flight* Voyager DE-PRO (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) fornito di un laser a N_2 (337 nm, 3 ns pulse width). Come matrice dispersiva è stato utilizzato l'acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB), data la maggiore polarità della CYN.

Per le analisi, 1 μ L del campione disciolto in acqua è stato caricato sul *probe* e portato a secco. Quindi, è stato aggiunto 1 μ L di soluzione 10 mg/mL di DHB in acqua/acetonitrile 50/50 v/v contenente 1% acido fosforico.

Per ogni analisi, l'acquisizione degli spettri di massa è stata eseguita in ioni positivi, modalità *reflectron*, accumulando 200 pulsazioni laser, ad un voltaggio di accelerazione di 20 kV. La taratura esterna della massa è stata eseguita con standard di peptidi a basso peso molecolare (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA).

Per la CYN è stato calcolato un limite di rivelazione (LOD) di 0,2 ng/mL

Analisi di CYN mediante LC/ESI-Q-ToF-MS/MS

L'analisi LC/ESI-Q/ToF/MS-MS delle MCs è stata eseguita con uno spettrometro di massa ibrido *quadrupole-time-of*-flight (Q-ToF) Ultima (Waters, Manchester, UK), dotato di una sorgente ionica *electrospray* ESI NanoLockSpray, interfacciato ad un sistema per nanocromatografia liquida ad alta pressione modello CapLC (Waters, Manchester, UK). Per le analisi, 1 µL di campione è stato caricato su una *trap column* 5 mm × 100 µm i.d. ZorbaxTM 300 SB C18 (Agilent Technologies, USA), collegata ad una colonna cromatografica capillare 15 cm × 100 µm i.d. Atlantis C18 al flusso 1 µL/min, usando 0,1% TFA in acqua (fase mobile A) e 0,1% TFA in 84% acetonitrile acquoso (fase mobile B). La cromatografia è stata eseguita in modalità ioni positivi, a temperatura ambiente in gradiente lineare, secondo il programma:

tempo (min)	0	40	45	50	55
% fase mobile B	0	60	90	0	0

Le prove LC-MS sono state eseguite lavorando sia in modalità (*continuum*) MS che in MS/MS, in modalità *Data Dependent Acquisition* (DDA) degli spettri di frammentazione delle microcistine. Gli spettri sono stati acquisiti ad 1 scan/sec. Per la sorgente ionica sono stati ottimizzati i seguenti parametri:

- capillary voltage: 3000 V;
- cone Voltage: 100 V;
- Extractor: 0 V;
- RF Lens: 60.

I dati sono stati elaborati con il software MassLynx[™] versione 3.5 (Waters, Manchester, UK). La taratura dello spectrometro di massa è stata eseguita in base agli ioni multi-carica del peptide fibrinopeptide-Glu (mw 1570.57 Da) introdotto a parte.

Dati di specificità, recupero e precisione

La specificità dei metodi utilizzati è stata verificata esaminando 20 campioni di acqua incontaminata di diverse origini (laghi, stagni), per valutare le possibili interferenze di matrice negli spettri MS e MS/MS; ugualmente, la specificità del metodo per il muscolo di pesce è stata

valutata analizzando 20 campioni incontaminati. La riproducibilità intra-laboratorio del metodo per l'analisi dell'acqua, espressa come coefficiente di variazione percentuale CV %, è stata calcolata analizzando sei diversi campioni d'acqua contaminati con CYN alle concentrazioni di 0,5, 1,0 e 2,0 ng/mL, in due diversi giorni; ugualmente, la riproducibilità intra-laboratorio del metodo per l'analisi del muscolo di pesce, espressa come coefficiente di variazione percentuale CV %, è stata calcolata analizzando sei differenti campioni di muscolo di pesce contaminati con CYN alle concentrazioni di 2,0, 5,0 e 10,0 ng/g, in due diversi giorni. Sono stati calcolati anche i recuperi medi. I dati di linearità in solvente e matrice per l'analisi trappola ionica SRM LC/ESI-MS/MS sono riportati in Tabella 4.

loni	Linearità in solvente		Linearità in matrice		Linearità in matrice	
diagnostici	(acqua MilliQ)		(acqua)		(muscolo di pesce)	
m/z	Concentrazione (ng/mL)	R²	Concentrazione (ng/mL)	R²	Concentrazione (ng/g)	R ²
336,2	1,0–50	0,998	1,0–50	0,993	1,0–50	0,993
274,1	1,0–50	0,999	1,0–50	0,992	1,0–50	0,992

Tabella 4. Linearità di risposta del rivelatore a trappola ionica (analisi SRM LC/ESI-MS/MS)

I limiti di quantificazione (LOQ) nelle matrici studiate sono stai valutati analizzando alcuni campioni di acqua e muscolo di pesce contaminati artificialmente a concentrazioni decrescenti di CYN; i LOQ dei metodi sono stati misurati come le concentrazioni di fortificazione alle quali tutti gli ioni diagnostici selezionati erano ancora rivelabili. I limiti di rivelazione (LOD) sono stati calcolati sulla base del rapporto segnale/rumore 3:1 nei cromatogrammi MS e MS/MS dei campioni bianchi. In Tabella 5 sono riportati i valori di LOD e LOQ valutati per l'analisi di CYN con diverse tecniche di analisi MS e MS/MS.

Tabella 5.	Limite di determinazione (LOD,	, rapporto S/N = 5) e limite	di quantificazione (LOQ) per	la
	CYN			

Matrice	LOD		LC	Q
	acqua	pesce	acqua	pesce
	(ng/mL)	(ng/g)	(ng/mL)	(ng/g)
lon trap MS/MS	0,1	2	0,5	10
MALDI-ToF/MS	0,1	0,1	0,2	0,5
Q-ToF-MS/MS	0,1	0,2	0,2	0,5

RISULTATI OTTENUTI

Un panorama aggiornato dei laghi contaminati da cianotossine nella nostra penisola è rappresentato in Figura 2. Microcistine e cilindrospermopsina sono state identificate in campioni di acqua fino ad una concentrazione totale rispettivamente di 226,1 e di 175,1 μ g/L (Messineo, 2009).

I 180 campioni di pesci e crostacei analizzati con saggio ELISA sono stati raccolti in alcuni laghi del Centro e Sud Italia (Figura 2), ed hanno rivelato nell'88% dei casi presenza di microcistine. I valori complessivi hanno variato da 0,2 a 14,6 ng di microcistine /g di tessuto fresco.

I valori nel tessuto muscolare, specificamente soggetto a consumo umano, hanno variato da 0,2 a 36,4 ng/g di prodotto fresco.

In particolare, il 96 % dei campioni di visceri (valore più alto 14,6 ng/g), il 76 % dei campioni di muscolo e il 100% dei campioni di ovario (valore più alto 17,1 ng/g) erano contaminati.

La differenza di accumulo tra tessuto muscolare e visceri, questi generalmente più contaminati rispetto ai primi, variava notevolmente (da quasi mille volte in un pesce coregone prelevato a marzo 2006 a solo il 30% in un coregone prelevato a gennaio 2008).

Considerando che un essere umano adulto di circa 60 kg ingerisce generalmente porzioni di pesce da 100 a 300 g (Magalhaes, 2003; Mohamed, 2003), il livello di microcistine nel 12% dei campioni di muscolo era anche di 5,6 volte superiore al valore di TDI raccomandato di 0.04 μ g/kg di peso corporeo al giorno suggerito dall'OMS (Chorus e Bartram, 1999).

Secondo le recenti linee guida per il rischio acuto e cronico proposte dall'EPA (USA, 2006), il limite TDI è, rispettivamente, 0.006 e 0.003 μ g microcistine/kg di peso corporeo/ giorno; considerati questi valori la percentuale dei campioni di muscolo di pesce esaminati eccedente la soglia di consumo consigliata saliva al 58 %.

Per una corretta valutazione del rischio, la rilevazione di microcistine nel tessuto crudo di pesci deve essere affiancata dalla considerazione della riduzione di peso operata durante la cottura senza causare distruzione delle tossine, che vengono di fatto concentrate (Bruno, 2009; Zhang, 2009).

I risultati riportati in Tabella 6 mostrano la presenza di cilindrospermopsina nell'acqua e in tre pesci del lago Albano esaminati con il kit ELISA Abraxis. In uno dei tre campioni è stato rilevato un contenuto di microcistine non modico, a dimostrare la co-presenza di tossine in pesci provenienti da laghi con fioriture quasi contemporanee di più specie di cianobatteri tossici.

Le analisi dei tessuti sono state tutte effettuate utilizzando l'estrazione con cartucce SPE Oasis. Questa scelta è stata compiuta dopo aver confrontato le rese da estrazione tra cartucce SPE C18 e SPE OASIS, che sono risultate in media superiori del 42,3% (variazione di efficienza dal 14,5% al 64,5% in più).



Figura 2. Laghi con fioriture tossiche esaminati; in grassetto quelli con esame aggiuntivo della fauna ittica

Tossine	Data di prelievo	Specie cianobatterica	Specie ittica	Tossina extra- cellulare	N° cellule (cell x	Concentrazione in tessuto ittico (ng/g)		
				(iig/iiic)	10 / L)	Visceri	Muscolo	Ovario
CYN	sett. 06	Aphanizomenon ovalisporum	Salmo trutta	1	1	0,6 2,7	0,1 0,8	0,07 /
CYN	lug. 08	Aph. ovalisporum	Cyprinus carpio	0,20	2,4	Ĩ	0,36	/
CYN	ott. 08	Aph. ovalisporum	Cyprinus carpio	1,5	113	/	0,181	/
MC	ott. 08	Planktothrix rubescens	Cyprinus carpio	0,88	850	/	7,9	/

Tabella 6.	Contenuto di cilindrospermopsina (CYN) e microcistine (MC) in acqua e in estratti da
	tessuti ittici di Salmo trutta e Cyprinus carpio dal lago Albano misurato mediante ELISA

Il sistema di estrazione con cartucce SPE OASIS presenta inoltre una perdita minima di tossina nella procedura (media del 3,8%), fortemente preferibile alle metodiche che impiegano ripetute manipolazioni con solventi intervallate da evaporazioni a secco.

Nelle analisi di muscolo, visceri e ovario è stata rilevata una diversa efficienza dei sistemi ELISA a parità di condizioni operative. L'efficienza può essere riassunta come segue: Envirogard > Envirologix > Beacon.

Gli estratti di 12 campioni analizzati con i primi due sistemi davano valori differenti del doppio a vantaggio del primo sistema; il paragone tra 7 estratti di campioni analizzati con i sistemi Beacon ed Envirogard ha dato valori in media quattro volte più alti nel secondo sistema, mentre il paragone tra cinque estratti di campioni analizzati con i sistemi Beacon ed Envirologix ha dato valori in media due volte più alti nel secondo sistema.

Queste evidenze sono in accordo con quanto esperito da Graham *et al.*, (2009) sulla diversa affinità degli anticorpi costituenti i test verso le microcistine non –LR: in particolare la scarsa affinità del test Beacon verso le microcistine –LA ed –YR, e la media affinità del test Envirologix per le microcistine -LA, -RR ed –YR potrebbero giustificare i differenti valori in presenza di campioni contenenti importanti quantità di queste tossine; poiché i campioni algali o ittici contaminati contengono sempre una miscela di tossine, la diversa capacità di rilevarle può diventare significativa per la corretta valutazione del rischio.

A parte le differenze in affinità, i calibratori del sistema Beacon spesso risultavano fuori della curva di calibrazione, causando la necessità di ripetere l'intera analisi.

Tencalla *et al.* (1994) sperimentarono la morte entro 96 ore di trote costrette ad assunzione forzata di cellule congelate di *Microcystis* sp., per una dose complessiva di 6,6 mg di microcistine/ kg di peso corporeo.

La presenza di concentrazioni variabili da 4 a 14 μ g/g in diversi campioni di visceri suggerisce che le concentrazioni di microcistine in questi pesci erano vicine a livelli letali o subletali per le specie ittiche. Tuttavia le microcistine possono accumularsi nei pesci a livelli che, pur non essendo letali per essi, possono essere superiori ai limiti raccomandati per il consumo umano delle acque potabili.

La cromatografia a trappola ionica è già stata descritta in letteratura per la determinazione delle microcistine nel tessuto ittico.

La possibilità di studiare gli spettri di frammentazione mediante esperimenti in MS/MS (MS²) e/o MS/MS/MS (MS³) è un potente mezzo per l'identificazione di ogni cianotossina, permettendo di accrescere la specificità di metodo. Il metodo che abbiamo sviluppato ha

impiegato la modalità a ionizzazione positiva per MC-LR, MC-YR e MC-RR, mentre la modalità a ionizzazione negativa è stata impiegata per le microcistine MC-LW e MC-LF, più apolari. In questo modo siamo stati in grado di determinare e identificare le cinque microcistine fino a 5 ng/g. I recuperi medi hanno variato tra 53 e 91 % per le microcistine studiate; sfortunatamente, al livello di contaminazione di 5 ng/g di tessuto muscolare, con CV % inferiori al 10%. Da questo punto di vista, secondo i dati descritti in letteratura, l'analisi LC-MS/MS a triplo quadrupolo è più adeguata per l'analisi quantitativa di bassi livelli di contaminazione, e assicura una più alta precisione.

Anche l'uso del MALDI-ToF/MS è già stato descritto per analizzare le microcistine e molte altre cianotossine. Questa tecnica permette accurate misurazioni della massa con elevata risoluzione, inoltre possono essere effettuati esperimenti di frammentazione. La risposta del rivelatore ToF/MS per le microcisitine è stata lineare nell'intervallo di concentrazioni da 10 a 250 ng/mL. Recuperi medi superiori al 74,5% sono stati misurati per tutte le microcistine, con buona riproducibilità intra-laboratorio (CV % < 7,3%). L'analisi MALDI-ToF/MS ha dimostrato anche buona sensibilità nel rivelare le microcistine studiate, che sono state identificate fino a concentrazioni sub-ppb (parti per biliardo) per MC-LR, MC-YR e MC-RR.

L'analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS è stata usata per la prima volta nel nostro studio per rivelare le microcistine e la cilindrospermopsina in acque, massa batterica e nel tessuto ittico. Questa tecnica analitica, rispetto alle altre utilizzate, consente la separazione delle sostanze studiate mediante nano-cromatografia in fase liquida, quindi l'analizzatore ToF/MS ad alta risoluzione determina la massa molecolare con elevata accuratezza dei singoli composti eluenti; tuttavia, le sostanze separate dalla colonna cromatografica possono essere selezionate dal quadrupolo posto dopo l'interfaccia ESI, quindi frammentate nella cella di collisione e i frammenti rivelati dallo spettrometro ToF/MS. La natura ibrida dello strumento rappresenta la sua forte innovazione nell'analisi MS/MS; infatti, le proprietà dell'analisi space-based tipiche del quadrupolo si uniscono all'elevata risoluzione del ToF/MS, con la possibilità di studiare il pattern di frammentazione delle singole sostanze separate in LC e ricavarne informazioni circa la struttura molecolare del composto di interesse. Tutte le microcistine studiate sono efficientemente separate in LC, quindi quantificate e identificate (Tabella 7). Come nel caso dell'analisi MS a trappola ionica e MALDI-ToF/MS, la MC-LW e la MC-LF mostrano segnali di intensità inferiore, a causa di una peggiore capacità di ionizzazione. Per la MC-RR sono presenti lo ione molecolare mono-carica e quello con doppia carica, di maggiore intensità. Le singole microcistine possono essere analizzate registrando lo spettro completo degli ioni correlati allo ione molecolare. Inoltre, si può selezionare lo ione di interesse, in questo caso sia quello mono-carica che quello doppia-carica, per frammentarlo nella cella di collisione dello spettrometro e registrare quindi lo spettro MS/MS. Questo spettro è caratteristico della sostanza in esame, e ne rappresenta una sorta di "carta di identità", perché i frammenti caratteristici consentono di identificare la sostanza, in base alla massa molecolare, e "ricostruire" la struttura della molecola.

Per ogni cianotossina sono stati ottenuti caratteristici spettri MS ed MS/MS utilizzati come riferimento per successive analisi qualitative e quantitative. Gli spettri MS/MS delle cinque microcistine hanno evidenziato lo ione prodotto a 135 m/z derivante dal gruppo funzionale dell'ADDA; la presenza di questo ione frammento altamente caratteristico delle microcistine bersaglio permette di effettuare l'analisi in modalità SRM con elevata selettività di rivelazione.

Come dato di fatto, i LOD delle cinque microcistine calcolati sulla base di un rapporto di 3/1 segnale/rumore dello ione prodotto a 135 m/z sono risultati bassissimi, fino a 0,01 ng/mL.

I LOQ delle cinque microcistine sono stati sperimentalmente verificati; mediante analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS è stato possibile ottenere una sensibilità molto migliore rispetto alle

determinazioni LC-MS/MS a trappola ionica, con un limite di quantificazione di 0,1 ng/mL (0,1 ppb) per tutte le microcistine.

La risposta dello spettrometro in modalità MS/MS è lineare nell'intervallo di concentrazioni da 0,1 a 50,0 ng/mL, rivelandosi adatto agli scopi dei controlli ufficiali per il contenuto di microcistine totali nelle acque dolci.

L'analisi LC/ESI-MS/MS con trappola ionica, MALDI-ToF/MS e LC/ESI-Q-ToF-MS/MS sono state impiegate per analizzare alcuni campioni di tessuto ittico contaminati da tossine cianobatteriche: i risultati sono paragonati in Tabella 8.

La cilindrospermopsina mostra uno spettro Q-ToF-MS/MS, in modalità ionizzazione positiva, con molti ioni diagnostici: almeno 4 ioni diagnostici sono molto intensi, assicurando una notevole selettività dell'analisi. Gli ioni diagnostici a m/z 274 e m/z 305 sono stati selezionati per effettuare l'analisi quantitativa.

Grazie alla migliore capacità di rivelazione le analisi MALDI-ToF/MS e LC/ESI-Q-ToF-MS/MS hanno rilevato più composti rispetto all'analisi LC-MS con trappola ionica. Da un punto di vista qualitativo i risultati di entrambi i rilevatori ToF/MS sono abbastanza paragonabili.

 Tabella 7.
 Confronto tra le prestazioni dei metodi MALDI-ToF/MS e LC/ESI-Q-ToFMS/MS per l'analisi di microcistine in tessuto ittico contaminato con 5 ng/g (n. 6)

	Recuperi medi			
	MC-RR (CV %)	MC-LR (CV %)	MC-LW (CV %)	MC-LF (CV %)
MALDI-ToF/MS LC/ESI-Q-TOF-MS/MS	89,7 (3,2) 90,8 (2,1)	90,1 (4,3) 88,6 (0,1)	74,5 (7,3) 78,4 (7,0)	80,2 (6,9) 83,1 (5,9)

Tabella 8. Confronto delle concentrazioni di microcistine determinate in alcuni campioni di tessuto ittico con differenti tecniche MS/MS

Campione	Concentrazione di microcistine (ng/g)				
	LC/ESI-MS/MS trappola ionica	MALDI-ToF/MS	LC/ESI-Q-ToFMS/MS		
Muscolo di Mugil cephalus	MC-LF (4)	MC-LF (4)	MC-LF (4)		
Corpo di Procambarus clarkii	MC-LR (23)	MC-LF (4) MC-LW (7) MC-LR (15)	MC-LF (4) MC-LW (5) MC-LR (11)		
Muscolo di Mugil cephalus	MC-LF (79)	MC-RR (18) MC-LF (4)	MC-RR (10) MC-LF (4)		
Visceri di Mugil cephalus	MC-RR (36)	MC-RR (10)	MC-RR (9)		

Le prestazioni del metodo per l'analisi della CYN in acqua dolce

La purificazione del campione è stata rapida e semplice. La cilindrospermopsina è stata recuperata efficacemente dall'acqua dolce, e identificata con certezza nei campioni contaminati artificialmente (Gallo, 2009). Durante lo studio è stato provato che il LOQ del metodo è 0,10 ng/mL, laddove quattro ioni diagnostici di CYN sono ancora rivelabili. Un LOD di 0,04 ng/mL è stato calcolato sulla base di un rapporto S/N 3/1. Monitorare lo ione precursore e tre ioni

prodotto garantisce l'alta selettività del metodo; non sono state osservate interferenze di matrice nei campioni non contaminati, a prova della specificità del metodo. La risposta quantitativa per l'analisi di CYN osservata con il rivelatore MS a trappola ionica nelle acque dolci era lineare nell'intervallo di concentrazione studiato, sia in solvente che in matrice. Non è stato osservata significativa soppressione o incremento (*enhancement*) del segnale. I recuperi medi e la ripetibilità del metodo, espressa come coefficiente di variazione della percentuale (CV %), erano soddisfacenti a tutti i livelli di contaminazione; i dati dei livelli di contaminazione a 0,50 e 2 ng/mL sono riportati in Tabella 9.

Le prestazioni del metodo per l'analisi della CYN in muscolo di pesce

Il metodo per la purificazione della cilindrospermopsina ha richiesto l'introduzione della partizione liquido-liquido con *n*-esano, per rimuovere le componenti grasse dalla matrice. La risposta del rivelatore MS a trappola ionica è stata lineare nell'intervallo da 1 a 50 ng/g; non è stata osservata alcuna interferenza dovuta alla matrice analizzando i campioni dei bianchi, a prova della specificità del metodo. Il LOQ e il LOD del metodo rispettivamente ad 1 e 0,6 ng/g sono molto soddisfacenti, testimoniando l'univoca identificazione della CYN e la quantificazione fino a bassi livelli di bio-accumulazione. La CYN nel campione è identificata chiaramente dagli ioni diagnostici, esibendo un buon rapporto S/N. È stato osservato un leggero effetto di soppressione ionica, che ha richiesto l'analisi quantitativa mediante curve di taratura in matrice (*matrix-matched*). Sono stati calcolati recuperi medi e riproducibilità intra-laboratorio del metodo soddisfacenti; in Tabella 9 sono riportati i risultati relativi al livello di fortificazione a 10 ng/g.

Livello di contaminazione (ng/mL)	Percentuale media di recupero (%) (n=6)	Ripetibilità, CV (%) (n=6)	
In acqua dolce			
0,50	76,2	5,8	
2,0	65,4	9,8	
In muscolo di pesce (ng/g)			
10	63,6	8,0	

Tabella 9. La percentuale di recupero media e la ripetibilità in termini di CV % del metodo LC/ESI-MS/MS con trappola ionica per l'analisi di CYN nell'acqua dolce e nel muscolo di pesce

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Nello studio effettuato è stato sviluppato un metodo di estrazione delle microcistine da tessuto ittico semplice, rapido ed efficiente, che ha consentito di delineare con aderenza alla realtà gli effettivi margini di rischio presenti in ambienti contaminati. La presenza di microcistine nei tessuti di fauna ittica pregiata, come i coregoni e i persici sole, implica anche considerazioni sugli effetti tossici esercitati durante la crescita e il normale sviluppo degli individui, che in queste condizioni presentano stock ittici con peso medio ridotto e minore adattabilità (Ernst, 2006; Smith e Haney, 2006).

Le analisi effettuate con un metodo ELISA semplice e veloce sui pesci provenienti dal lago Albano hanno rivelato per la prima volta la capacità di accumulo della tossina cilindrospermopsina in salmonidi e ciprinidi di un lago naturale profondo, in concomitanza con due fioriture di una specie di cianobatterio che produce la tossina. I livelli determinati nelle trote e nelle carpe esaminate erano moderati ma diversi tessuti, incluso l'ovario, sono risultati contaminati. La potenzialità della cilindrospermopsina di dare luogo a concentrazioni nella fauna acquatica è un serio problema, specie quando gli organismi sono utilizzati per il consumo umano; in questo quadro dovrà essere considerata la possibile esposizione al rischio delle popolazioni locali attraverso il consumo di pesce pregiato i cui muscoli abbiano accumulato la tossina.

In aggiunta alla crescente domanda di programmi di monitoraggio per le microcistine, è stata anche dimostrata la necessità di accertamenti per la eventuale presenza di specie produttrici di diversi generi di tossine d'acqua dolce.

Yuan, (2006) hanno dimostrato che le tecniche strumentali utilizzate hanno un'importanza basilare nell'equivalenza delle misurazioni (ad es. tra risultati dei test ELISA e LC-MS/MS). Per le nostre analisi immunologiche e strumentali sono state adottate le stesse tecniche estrattive allo scopo di effettuare entrambe le misurazioni partendo dalla stessa efficienza di estrazione.

In questo studio sono stati rilevati valori di microcistine diversi nelle analisi dello stesso campione tramite ELISA e tramite LC-MS/MS.

Differenze nella concentrazione di microcistine totali misurata tramite LC-MS/MS con triplo quadrupolo o ELISA nel tessuto ittico sono state osservate anche in altri studi (Magalhaes, 2001; Lawrence, 2001; Rapala, 2002; Mountford, 2005; Wood, 2006). Secondo questi studi, la diversa disponibilità al metodo analitico LC-MS/MS delle microcistine libere e legate potrebbe dare ragione delle differenze trovate nei risultati.

Nell'analisi di conferma tramite tecniche di spettrometria di massa, è noto che la tecnica MALDI-ToF/MS può rivelare tutti i composti ionizzati presenti nel campione, all'interno di un ampio intervallo di rapporti massa/carica.

La misura accurata della massa è utile nell'identificazione della sostanza. In generale, questa tecnica spettrometrica è ritenuta meno sensibile e ripetibile di LC-MS/MS a triplo quadrupolo e in trappola ionica, perciò non sembra la scelta migliore per l'analisi quantitativa. Al contrario, l'analis MALDI-ToF/MS è un potente mezzo di indagine di un ampio intervallo di masse molecolari, permettendo la rilevazione simultanea di diverse classi di cianotossine in un singolo esperimento; questo consente la rapida identificazione di cianotossine già note in letteratura ma anche di composti incogniti.

Come esempio, sulla base degli spettri di frammentazione MALDI –TOF/MS, nelle fioritura di *P. rubescens* nel lago d'Averno (NA) nel 2007, due delle principali cianotossine prodotte sono state identificate come anabaenopeptina B e anabaenopeptina F (caratterizzate da tossicità inferiore a quella delle microcistine) sulla base della loro massa e dei loro spettri PSD MS/MS,

già descritti in letteratura. Un terzo composto aveva, invece, un peso molecolare che non corrispondeva a nessuna cianotossina già nota in letteratura; l'analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS ha consentito di caratterizzare questo composto come una nuova microcistina variante, ovvero la 9-acetil-Adda-MC-RR (Ferranti, 2008; Ferranti, 2009). In effetti, la possibilità di ottenere spettri di frammentazione e misurare con alta risoluzione la massa degli ioni prodotto, permette di studiare la struttura molecolare di composti sconosciuti, persino quando sono presenti modificazioni non comuni della struttura e/o aminoacidi non comuni.

L'analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS dei tessuti ittici ha mostrato alti recuperi medi e alta specificità a causa della separazione cromatografica, dell'isolamento selettivo dello ione a 135 m/z e della risoluzione del rivelatore Q-ToF. Non è stata osservata alcuna interferenza di matrice da campioni di pesce non contaminato ai tempi di ritenzione delle microcistine studiate. Questa tecnica ha esibito i migliori risultati in termini di capacità di rilevazione, recuperi medi e riproducibilità intra-laboratorio (espresso come CV %). Il rivelatore spettrometro di massa ibrido Q-ToF è altamente sensibile è ripetibile; i bassi valori dei LOQ garantiscono la potenza di questo strumento analitico nel rivelare anche precoci contaminazioni di microcistine nel tessuto ittico. Per ogni microcistina sono stati ottenuti spettri MS e MS/MS, utilizzati come riferimento per successive analisi qualitative e quantitative. Gli spettri MS/MS delle microcistine sono struttura della microcistina; la presenza di questo frammento altamente caratteristico della molecola delle microcistine consente un'analisi notevolmente selettiva.

I risultati del nostro lavoro dimostrano che l'analisi LC/ESI-MS/MS e LC/ESI-Q-ToF-MS/MS sono altamente selettive per la rivelazione della CYN, grazie alla presenza di 4 ioni diagnostici. I metodi sviluppati sono estremamente soddisfacenti per la determinazione affidabile e sicura nelle acque dolci e nel muscolo di pesce, mostrando recuperi medi e ripetibilità soddisfacenti; i LOQ misurati sono i più bassi riportati in letteratura, consentendo il controllo della contaminazione anche in fase precoce e negli ultimi stadi di bio-accumulazione. In particolare, la cilindrospermopsina può essere rivelata a livelli di concentrazione ben al di sotto dei valori guida proposti per le acque dolci.

Il controllo rapido e l'accurata identificazione basata sulla massa delle biotossine cianobatteriche possono essere facilmente effettuati mediante la MALDI-ToF/MS, che consente di indagare ampi intervalli di massa molecolare. Tuttavia, un'accurata caratterizzazione della struttura di tutti i composti può essere raggiunta solo tramite lo studio degli spettri di frammentazione tramite LC/ESI-Q-ToF-MS/MS, oppure LC/ESI-MS/MS in trappola ionica. In particolare, lo spettrometro di massa ibrido Q-ToF ha mostrato caratteristiche di selettività e riproducibilità intra-laboratorio paragonabili a quelle descritte in letteratura per il triplo quadrupolo, ma ha l'enorme vantaggio di poter identificare anche composti incogniti grazie alla misura esatta della massa. D'altra parte, l'analisi LC-MS/MS a triplo quadrupolo è effettuata monitorando la presenza di ioni frammento di sostanze di cui sono note la massa e la struttura molecolare.

Per questi motivi, l'uso di rivelatori spettrometri di massa ibridi come il Q-ToF-MS rappresenta l'approccio più moderno allo studio delle cianotossine prodotte da una fioritura, perché può fornire ampi dettagli sulla struttura molecolare di composti appartenenti a diverse classi; in questo modo, è possibile ottenere un profilo completo delle cianotossine prodotte ma anche determinare i livelli di contaminazione con precisione e a basse concentrazioni.

La possibilità di ottenere informazioni dettagliate e affidabili rappresenta un potente strumento per valutare il rischio derivante dalle fioriture di cianotossine per i consumatori, sia attraverso le acque dolci che attraverso gli alimenti.

L'attività di ricerca svolta ha consentito di sviluppare una metodologia operativa che mira, complessivamente, a caratterizzare le cianotossine prodotte nell'ambito della fioritura algale,

analizzando un estratto della massa batterica mediante MALDI-ToF/MS; in questo modo, sono individuate le cianotossine prodotte ed eventuali varianti (composti de-metilati, acetilati, o contenenti amminoacidi modificati) (Ferranti, 2008). L'analisi LC/ESI-Q-ToF/MS/MS è particolarmente efficace, e permette la caratterizzazione strutturale di cianotossine poco comuni o non ancora descritte in letteratura. La strategia analitica e i metodi di prova sviluppati rappresentano uno strumento diagnostico rapido ed efficace per caratterizzare il tipo e l'entità della contaminazione, già dalle prime fasi della fioritura cianobatterica; in questo modo è possibile monitorare nel tempo le cianotossine prodotte, quindi valutare i rischi tossicologici per la fauna e per l'eventuale contaminazione dell'acqua e dei prodotti ittici. La determinazione dei livelli di contaminazione rappresenta il presupposto fondamentale per adottare le misure di prevenzione necessarie a ridurre i rischi per la sicurezza alimentare del consumatore, in funzione della durata della fioritura cianobatterica e della scomparsa delle tossine dall'acqua e dai prodotti ittici presenti nel corpo idrico.

BIBLIOGRAFIA

- Agrawal MD, Bagchi S, Bagchi N, Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by Microcystis blooms collected in Central India, *Hydrobiologia* 2001;464:37-44.
- Baganz D, Staaks G, Pflugmacher S, Steinberg CEW. A comparative study on microcystin-LR induced behavioural changes of two fish species (*Danio rerio* and *Leucaspius delineatus*). *Environ Toxicol* 2004;19:564-70.
- Bain P, Shaw G, Patel B. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. J. Toxicol. *Environ Health* Part A 2007;70:1687-93.
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. J Phycol 1997;33:613-6.
- Blom JF, Bister B, Bischoff D, Nicholson G, Jung G, Süssmuth RD, Juttner F. Oscillapeptin J, a New Grazer Toxin of the Freshwater Cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of Natural Products* 2003;66: 431-4.
- Bouaicha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 2004;148:53-63.
- Bouaicha N, Maatouk I, Plessis MJ, Perin F. Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Environ Toxicol* 2005;20:341-7.
- Bruno M, Melchiorre S, Messineo V, Volpi F, Di Corcia A, Aragona I, Guglielmone G, Di Paolo C, Cenni M, Ferranti P, Gallo P. Microcystin detection in contaminated fish from Italian lakes using ELISA immunoassays and LC-MS/MS analysis. In: *Handbook on Cyanobacteria*. Gault PM, Marler HJ (Ed.). Nova Science Publishers, Inc. 2009. pp. 191-210.
- Carmichael WW. The toxins of cyanobacteria. Am Sci 1994;270:78-86.
- Cazenave J, Wunderlin DA, de los Angeles Bistoni M, Ame MV, Krause E, Pflugmacher S, Wiegend C. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus, Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology* 2005;75:178-90.
- Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon, on behalf of the World Health Organization, Geneva; 1999.
- Chu FS, Huang X, Wie RD, Carmichael WW. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl Environ Microbiol 1989;55:1928-33.
- Chung F, Chen H, Nath R. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DANN adducts. *Carcinogenesis* 1996;17:2105-11.
- Czarnecki O, Lippert I, Henning M, Welker M. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environ Microbiol* 2006;8:77-87.
- 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;163:113-85.
- Erhard, M, von Döhren H, Jungblut P. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Biotechnology* 1997;15:906-9.
- Erhard M, von Döhren H, Jungblut PR. Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktotrix* agardhii HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13:337-43.

- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR. Oral toxicity of the microcystin- containing cyanobacteium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology* 2006;79:31-40.
- Ferranti P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Characterisation of biotoxins produced by a cyanobacteria bloom in Lake Averno using two LC-MS-based techniques. *Food Addit and Contam* 2008;25(12):1530-7.
- Ferranti P, Fabbrocino S, Nasi A, Caira S, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight Tandem Mass Spectrometry for Microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of Microcystin-RR. *Rapid Commun. Mass Spectr* 2009;23:1328-36.
- Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterisation of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164:73-81.
- Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2001;16(5):408-12.
- Froscio SM, Humpage AR, Wickramasinghe W, Shaw G, Falconer IR. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 2008;51:191-8.
- Gallo P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Ferranti P, Bruno M, Serpe L. Determination of cylindrospermopsin in freshwaters and fish tissue by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2009;23:3279-84.
- Griffiths DJ, Saker ML. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2003;18(2):78-93.
- Graham JL, Loftin KA, Meyer MT, Ziegler AC. Information Sharing on Algal Issues. Kansas Water Science Center Algal Toxin Team, November 10, 2009.
- Harada KI, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium Umezakia natans and its screening method. *Toxicon* 1994;32:73-84.
- Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ. Microbiol* 1985;50:1292-5.
- Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer IR. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 1997;35(3):341-6.
- Hilborn ED, Carmichael WW, Yuan M, Azevedo SMFO. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicon* 2005;46:218-21.
- 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, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research/DNA Repair* 2000; 472(1/2):155-61.
- Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity : role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, 2005;68:739-53.
- International Agency for Research on Cancer. *Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 94. Lyon: IARC; 2008.
- Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, Harada K. Comparison of protein phospatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compound. *Toxicon* 2002;40:1017-25.

- Jakobi C, Oberer L, Quiquerez C, Konig WA, Weckesser J. Cyanopeptolin S, a sulfate-containing depsipeptide from a water bloom of Microcystis sp. *FEMS Microbiology Letters* 1995;129(2-3):129-33.
- Jewel MA, Affan MA, Khan S. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Science* 2003;6:1046-50.
- Jungmann D, Benndorf J. Toxicity to Daphnia of a compound extracted from laboratory and natural Microcystis spp., and the role of microcystins. *Freshwater Biology* 1994;32:13-20.
- Keil C, Forchert A, Fastner J, Szewzyk U, Rotard W, Chorus I, Kraetke R. Toxicity and microcystin content of extracts from a Planktothrix bloom and two laboratory strains. *Water Research* 2002;36(8):2133-9.
- Kinnear SHW, Fabbro LD, Duivenvoorden LJ, Hibberd EMA. Multiple-organ toxicity resulting from cylindrospermopsin exposure in tadpoles of the cane toad (*Bufo marinus*). *Environ Toxicol* 2007;22:550-8.
- Kiss T, Vehovszky A, Hiripi L, Kovacs A, Voros L. Membrane effect of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindropermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurons. *Comp Biochem Physiol* 2002;131C:167-76.
- Kodani S, Ishida K & Murakami M. Aeruginosin 103-A, a thrombin inhibitor from the cyanobacterium *Microcystis viridis. Journal of Natural Products* 1998;61:1046-8.
- Li RH, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu YD, Watanabe MM. First report of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). J Phycol 2001;37:1121-6.
- Magalhaes VF, Marinhao MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO, Azevedo SMFO. Microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 2003;42:289-95.
- Manti G, Mattei D, Messineo V, Melchiorre S, Bogialli S, Sechi N, Casiddu P, Luglie' A, Di Brizio M, Bruno M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News* 2005;28:8-9.
- Malbrouck C, Kestemont P. Effect of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006;25(1):72-86.
- Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Luglie` A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 2009;39:95-106.
- Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M. Seasonal succession of Cylindrospermopsis raciborskii and Aphanizomenon ovalisporum blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic lake Albano, Central Italy. Environ Toxicol 2010;25(1):18-27.
- Metcalf JS, Beattie KA, Pflugmacher S, Codd GA. Immunocrossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. FEMS Microbiol Lett 2000;189:155-8.
- Metcalf J, Barakate A, Codd GA. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol Lett* 2004;235:125-9.
- Ministero della Salute, Circolare Ministero Sanità 31/7/1998 IX.400.4/13.1/3/1447, 1998.
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA. Estimation of microcystin in the freshwater fish Oreochromis niloticus in an Egyptian fish farm containing a microcystin bloom. Environmental Toxicol 2003;18:137-41.
- Mountfort DO, Holland P, Sprosen J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. *Toxicon* 2005;45:199-206.
- Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G, Shaw GR, Smith MJ, Chishwell RH, Seawright AA, Moore MR. Deoxycylindrospermopsin, an analogue of Cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 1999;14:163-6.
- Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 1998;352:21-6.

- 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.
- Rasmussen JP, Cursaro M, Froscio SM, Saint CP. An examination of the antibiotic effects of cylindrospermopsin on common gram-positive and gram-negative bacteria and the protozoan *Naegleria lovaniensis*. *Environ Toxicol* 2008;23:36-43.
- Ressom R, Soong FS, Fitzgerald J, Turczynowicz L, El Saadi O, Roder D, Maynard T, Falconer I. *Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae)*. Canberra: National Health and Medical Research Council/Australian Government Publishing Service; 1994.
- Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Humpage AR, Falconer IR, Marr M, Chernoff N. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 2007;49:855-64.
- Rohrlack T, Christoffersen K, Hansen PE, Zhang W, Czarnecki O, Henning M, Fastner J, Erhard M, Neilan BA, Kaebernick M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of Microviridin J, a new Microcystis metabolite toxic to Daphnia. *J Chem Ecol* 2003;29:1757-70.
- Rohrlack T, Christoffersen K, Kaebernick M, Neilan BA. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulicaria*. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:5047-50.
- Rücker J, Stuken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedener C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon* 2007;50:800-9.
- Saker M, Eaglesham GK. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in tissues of the Redclaw crayfish Cherax quadricarinatus. Toxicon 1999; 37:1065-77.
- Saker M, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel Anodonta cygnea. Toxicon 2003;43:185-94.
- Schembri M, Neilan BA, Saint CP. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii. Environ Toxicol* 2001;16:413-21.
- Seifert M, Mc Gregor G, Eaglesham G, Wickramasinge W, Shaw G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya* wollei (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 2007;6:73-80.
- Shaw GR, Seawright AA, Moore MA, Lam PKS. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicological activity. *Ther Drug Monit* 2000;22:89-92.
- Shen XY, Lam PKS, Shaw GR, Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 2002;40:1499-1501.
- Shin HJ, Murakami M, Matsuda H, Yamaguchi K. Microviridins D-F, serine protease inhibitors from the cyanobacterium Oscillatoria agardhii (NIES-204). Tetrahedron 1996;52:8159-68.
- Smith JL, Haney JF. Foodweb transfer, accumulation and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin in pumpkin-seed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 2006;48:580-9.
- Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhaes VF, Hilborn ED, Carmichael WW, Azevedo SMFO. Sub-lethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro-Brazil. *Environ Toxicol* 2006;21:95-103.
- Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepisto L, Metcalf JS, Codd GA, Meriluoto J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol* 2006;21:552-60.
- 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 cylindrospermopsim. *BMC Dermatology* 2006;6:5-11.

- Teixeira da Gloria Lima Crux M, Da Conceicao Nascimento Costa M, Lucia Pires de Carvalho V, Dos Santos Pereira M, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam Bahia Brazil. *Bull of the Pan Am Health Organ* 1993;27(3):244-53.
- Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorynchuss mykiss*). Aquat Toxicol 1994;30:215-24.
- Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, Ito E, Watanabe M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga Umezakia natans. Toxicon 1994;32:833-43.
- US Environmental Protection Agency. Toxicological reviews of cyanobacterial toxins: microcystins LR, RR, YR and LA (external review draft). US Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/66/R-06/139, 2006.
- Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. Mol Nutr Food Res 2007;51:7-60.
- Vasas G, Gaspar A, Suranyi G, Batta G, Gyemant G, M-Hamvas M, Mathe' C, Grigorszky I, Molnar E, Borbely G. Capillary Electrophoretic Assay and purification of Cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (Blue-Green *Sinapis* Test). *Analytical Biochemistry* 2002;302:95-103.
- Welker M, von Döhren H. Cyanobacterial peptides Nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiol Rev 2006;30:530-63.
- Xie L, Xie P, Guo L, Li L, Miyabara Y, Park HD. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China. *Environ Toxicol* 2005;20:293-300.
- Yuan M, Carmichael WW, Hilborn ED. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1196. *Toxicon* 2006;48:627-40.
- Zhang D, Xie P, Chen J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and ist consequences for food safety. *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;84:202-7.
- Zimba PV, Khoo L, Brittain S, Carmichael WW. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. J Fish Dis 2001;24:41-7.
- Zimba PV, Camus A, Allen EH, Burkholder JM. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility. *Aquaculture* 2006;261:1048-55.