

Anatoxin-a och homoanatoxin-a i dricksvattentäkt

Riskvärdering

Denna titel kan laddas ner från: www.livsmedelsverket.se/publicerat-material/.

Citera gärna Livsmedelsverkets texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Livsmedelsverket, 2018

ISSN 1104-7089

Handläggare: Ulla Beckman Sundh, UN/RN

Frågeställare: Torbjörn Lindberg, RG/KS

Internt diarienummer: RN028/2014

Riskvärderingsunderlag angående anatoxin-a och homoanatoxin-a i dricksvattentäkt

Bakgrund: I arbetet med projekt "Metoder för tidig varning och krisberedskap för toxiner från cyanobakterier i dricksvatten" (SOFÅ 24-12) har Heide Pekar hittat anatoxin i Mälaren och i skånska Vombsjön. Dessa sjöar är råvattentäkter för dricksvattenverk.

Övergripande frågeställning: Begäran om utredning av riskerna med olika cyanotoxiner i svenskt dricksvatten. Behövs det specifika rekommendationer om riskhanteringsåtgärder för olika cyanotoxiner i svenskt dricksvatten. Detta underlag rör anatoxin-a respektive homoanatoxin-a i dricksvattentäkt.

Underlaget ska användas till/målgrupp: Underlaget ska användas av Livsmedelsverket som riskvärderingsunderlag för ställningstagande och inriktningsbeslut för myndighetsutövning (i.e. riskhanteringsåtgärd), i praktiken för vägledning/rådgivning. Dokumentet ska vara av sådan kvalitet att det kan vidarebefordras till kommuner och vid behov publiceras på hemsidan.

Underlaget rapporteras som: Skriftligt dokument.

Inledning

Anatoxin-a och homoanatoxin-a är potenta nervtoxiner som kan produceras av cyanobakterier (blå-gröna alger). Masstillväxt (blomning) av cyanobakterier som producerat anatoxin-a eller homoanatoxin-a har varit orsak till död hos djur som druckit sjövatten med toxiner eller ätit av den tjocka massa av cyanobakterier som kan ansamlas i strandkanten när blomningar driver iland. (Araoz et al, 2010a). När anatoxin-a-producerande cyanobakterier först isolerades på 1960-talet, så gavs toxinet namnet Very Fast Death Factor - VFDF, på grund av att möss som injicerats intraperitonealt med celler eller filtrat av cyanobakterierna dog snabbt, inom 2-7 minuter efter injektionen, efter att ha fått kramper och förlamningsymtom. Den aktiva komponenten VFDF isolerades och strukturbestämde på 1970-talet, och döptes om från VFDF till anatoxin-a. (Carmichael et al, 1975; Devlin et al, 1977; Moore, 1977) Homoanatoxin-a isolerades 1992 från en art av släktet *Planktothrix* (tidigare *Oscillatoria*) (Skulberg et al, 1992).

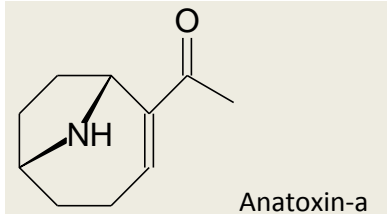
Arter som visat sig producera anatoxin-a har återfunnits i släktena *Anabaena*, *Ahanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Planktothrix* (tidigare *Oscillatoria*) och *Rhaphidiopsis*. Homoanatoxin-a har hittats hos arter från släktena *Planktothrix* (tidigare *Oscillatoria*), *Anabaena*, *Rhaphidiopsis* och *Phormidium*. Några arter har visat sig ha kapacitet att bilda både anatoxin-a och homoanatoxin-a (Aráoz et al, 2010a; Quiblier et al, 2013). Sannolikt kommer toxiner att hittas hos allt fler arter, i och med att de har börjat uppmärksammas och fler analyser utförs.

Cyanobakteriearter som producerar anatoxin-a eller homoanatoxin-a, förekommer i sjöar över hela världen, och toxiner är potentiellt en fara vid förekomst i dricksvattentäkter. Anatoxin-a och homoanatoxin-a kan förekomma inneslutna i cyanobakterieceller, eller fritt löst i vatten. Om en

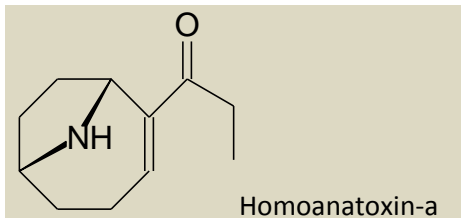
människa eller annat däggdjur får i sig cyanobakterier som innehåller toxinerna, så frigörs toxinerna när cyanobakteriecellerna bryts ned i mag-tarmkanalen. Såvitt känt från den litteraturundersökning som ligger till grund för detta underlag har det dock inte förekommit några fall av förgiftning av människa med anatoxin-a eller homoanatoxin-a via dricksvatten.

Struktur

Anatoxin-a och homoanatoxin-a är sekundära bicykliska aminer.



Kemiskt namn: 1-(9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-yl)ethan-1-one



Kemiskt namn: 1-(9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-yl)propan-1-one

Både anatoxin-a och homoanatoxin-a kan förekomma som två olika isomerer, (+)-isomer och (-)-isomer. Det är (+)-isomeren av anatoxin-a som produceras av cyanobakterier.

Mekanism för toxicitet

Generellt

Anatoxin-a och homoanatoxin-a är nervtoxiner som ger muskelförlamning.

(+)-Anatoxin-a är en potent agonist vid nikotineriga acetylkolinreceptorer (nAChR).

Acetylcholinreceptorer

Nikotineriga acetylkolinreceptorer (nAChR) har acetylkolin, som sin naturliga ligand och aktivator. Acetylkolinaktivering av receptorn gör att en jonkanal öppnas i cellmembranet och släpper igenom katjoner (Na⁺, Ca⁺⁺, K⁺), framförallt flödar Na⁺ in i cellen, och K⁺ ut. Flödet ger upphov till en aktionspotential hos den cell som påverkas, varpå jonkanalen stängs. Hela förloppet går på någon millisekund. Överstimulering av receptorn förhindras genom att acetylkolin snabbt bryts ned av enzymet acetylkolinesteras.

Dessa nAChR medierar snabb transmission av nervimpulser till muskelceller. De förmedlar även impulser i det autonoma nervsystemet, och de står för grundläggande funktioner i det centrala nervsystemet.

Även andra ämnen kan stimulera nAChR, exempelvis ämnet nikotin, vilket gett namn åt receptorsubtypen, nAChR.

Försök *in vitro* har visat att (+)-anatoxin-a har en mycket större affinitet till nAChR än vad både acetylkolin och nikotin har. (Swanson et al, 1986)

Anatoxin-a

I likhet med acetylcolin stimulerar anatoxin-a nAChR, och påverkar i och med det skelettmusklernas funktion och funktioner som hör till det autonoma nervsystemet, till exempel andningen. Till skillnad från acetylcolin bryts anatoxin-a inte ned av acetylcolinesteras, eller av något annat känt enzym, vilket gör att när nAChR stimuleras av anatoxin-a blir de överstimulerade och "fixerade i aktivt läge", och desensibiliseras. Följden blir muskelkramp, snabb uttrötning av muskler och förlamning. Om andningsmuskulaturen påverkas och förlamas dör den påverkade individen snabbt. (Araóz, 2010b; Carmichael et al, 1975; 1977; Devlin et al 1977)

I och med att anatoxin-a har en specifik affinitet till nAChR och dessutom är resistent mot att brytas ned av acetylcolinesteras har ämnet syntetiserats som laboratoriekemikalie och använts i forskning som rör nervsystemets funktion.

Homoanatoxin-a

Homoanatoxin-a är en potent analog till anatoxin-a, och ger motsvarande effekter som anatoxin-a. (Araóz, 2010a) Bindningsstudier *in vitro* har visat att homoanatoxin-a har lika stor affinitet till nAChR i nervsystemet som anatoxin-a. (Wonnacott et al, 1992)

Molekylstrukturens betydelse för toxiciteten

Det är (+)-isomeren av anatoxin-a som produceras av cyanobakterier. I *in vitro* försök har man funnit att (+)-anatoxin-a är minst 150 gånger mer potent än (-)-anatoxin-a vad gäller att stimulera muskel från groddjur (Swanson et al 1986). I *in vitro* studier där muskelkontraktion av frampreparerad muskel från groddjur studerades var (+)-anatoxin-a mer än dubbelt så potent än en racemisk blandning av (+)- och (-)-formerna av anatoxin-a, en blandning med 1:1 av isomererna (Spivak et al, 1983). Studier av akut toxicitet på mus (LD₅₀ i.v. resp. i.p.) indikerade att (+)-anatoxin-a var avsevärt mer potent, upp emot 190 ggr, än (-)-anatoxin-a. Ingen effekt sågs efter intraperitoneal injektion av (-)-anatoxin-a i doser upp till 73 mg/kg. Den rena (+)-formen av anatoxin-a var cirka 2,5 gånger mer potent än den racemiska blandningen av de två formerna efter intravenös injektion. (Valentine et al, 1991)

Absorption, biotransformation och eliminering

Det saknas studier över absorption, biotransformation och eliminering av anatoxin-a liksom av homoanatoxin-a. Studier över akut toxicitet där försöksdjur sonmatats med anatoxin-a, visar att ämnet ger snabb effekt inom ett fåtal minuter, från vilket det går att dra slutsatsen att anatoxin-a snabbt tas upp i blodcirkulationen och distribueras till olika organ.

Biodegradation

Anatoxin-a i vattenlösning bryts vid högt pH ned av solljus till produkter som saknar toxicitet, med en halveringstid på endast några timmar, sannolikt till dihydro- och epoxy-produkter. (James et al, 2007) Även bakteriell nedbrytning förekommer. Enligt WHO (1999) är halveringstiden för anatoxin-a i eutrofiska sjöar vanligen runt 24 timmar.

Att anatoxin-a lätt bryts ned av solljus vid alkaliskt pH gör att prover för analys bör surgöras före förvaring, och bör förvaras i temperaturer av -20°C eller lägre. (James et al, 2007)

Symtom vid förgiftning av anatoxin-a och homoanatoxin-a

Akuta effekter

Akuta effekter av anatoxin-a hos djur är darrningar (tremor), gångsvårigheter, konvulsioner och slutligen död på grund av förlamning av andningsmuskulatur.

Andra effekter som observerats hos djur var sänkt blodtryck och sänkt hjärtfrekvens av allvarlig art, som ledde till hypoxi, andningsstillestånd och acidosis. Dessa effekter observerades när när anatoxin-a givits till möss i form av systemisk perfusion (Aráoz et al, 2010)

Kroniska effekter

Det saknas information om eventuella subkroniska eller kroniska effekter av anatoxin-a och homoanatoxin-a.

Eventuell förgiftning av badande

Anatoxin-a ansågs till att börja med vara den troliga orsaken till förgiftning av två tonårspojkar, varav den ene avled. Pojkarna simmade i en damm med en pågående blomning av *Anabaena*. Den pojke som avled fick kramper och avled i hjärtsvikt två dagar efter att ha svält dammvatten i samband med badet. Den andra pojken blev sjuk i svår diarré och magsmärtor, men överlevde. Celler från *Anabaena flos-aquae* kunde påvisas vid analys av pojkarnas avföring. Den tidsperiod som gick mellan exponering för toxinet och dödsfallet är dock inte i överensstämmelse med vad som skulle förväntas om anatoxin-a var enda orsak till effekterna. Det visade sig också att den analys som utfördes av magsäcksinnehåll, och som påvisade anatoxin-a, sannolikt feltolkade fenylalanin som toxinet i och med att dessa har samma retentionstid vid analys med LC-MS quadropol. (Behm, 2003, enligt USEPA, 2006; Carmichael&Yuan, 2004; James et al, 2007)

Toxikologiska studier

Akut toxicitet

LD50 vid oral tillförsel bestämdes till 16,2 mg (15,4-17,0) (+)-anatoxin-a hydroklorid (98% renhet)/kg kroppsvikt för möss (Swiss Webster ND-4), vilket motsvarar **13,3** mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt. I motsvarande studier med lysat av *Anabaena flos-aquae*-celler bestämdes till LD50 till 6,7 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt. (Stevens&Krieger, 1991)

Fawell et al (1999) utförde ett test kallat Irwin screen test på mus. I testet fick grupper av 5 möss, kön ej angivet, (+)-anatoxin-a via långsam intravenös injektion. Doseringen var 0; 10; 30 och 100 mikrog/kg kroppsvikt. Djuren observerades 15 minuter, 30 minuter, 1 timme, 2 timmar och 4 timmar efter det de injicerats. Alla djuren som fått 100 mikrog/kg kroppsvikt dog inom 1 minut efter injektion, de uppvisade tecken på kolinergergi stimulering och CNS-effekter i form av salivering, ökad andningsfrekvens, urinavgång och hyperaktivitet. Två av djuren i gruppen som fick 30 mikrog/kg kroppsvikt dog och de övriga tre uppvisade ökad andningsfrekvens, salivering och hyperaktivitet men hade återhämtat sig två minuter efter injektionen. Vid den dosen och lägre doser sågs inga effekter enligt Irwin screen parametrar.

En fem-dagars studie på möss var avsedd för att göra dosval inför en 28-dagars studie. I fem-dagarsstudien sondmatades två hanar och två honor per dosgrupp med syntetiskt (+)-anatoxin-a i vattenlösning i doser av 1,2; 2,5; 6,2 och 12,3 mg/kg kroppsvikt och dag. Substansen var inköpt från Calbiochem-Novabiochem Corporation. Renheten av det (+)-anatoxin-a som användes angavs inte. Någon kontrollgrupp ingick inte i studien. Djuren i högdosgruppen (12,3 mg/kg) och en hona i gruppen som fick 6,2 mg/kg dog inom 5 minuter efter det de fått dosen av anatoxin-a under någon av de första 4 dagarna. Hanarna i 6,2 mg/kg gruppen uppvisade hyperaktivt beteende efter den tredje dosen, alltså efter tredje dagen. Inga andra tecken på neurotoxicitet rapporterades. Överlevande djur visade inga onormala kliniska symtom, och inget onormalt observerades när de överlevande djuren obducerades efter att ha avlivats. Studiens NOAEL (no observed adverse effect level) angavs till 2,5 mg/kg kroppsvikt och dag. Denna dosnivå valdes därför som maximal dos i den följande 28-dagars studien. (Fawell&James, 1994; Fawell et al, 1999)

Subakut/subkronisk toxicitet, med mera

I den 28-dagars studie som nämnts ovan (Fawell&James, 1994; Fawell et al, 1999) sondmatades möss (CrI:CD-1(ICR)BR) dagligen med (+)-anatoxin-a hydroklorid i vattenlösning i 28 dagar. Tio hanar och 10 honor ingick i varje dosgrupp och doseringen var 0 (kontroll); 0,12; 0,6 resp. 3 mg (+)-anatoxin-a hydroklorid/kg kroppsvikt och dag, motsvarande 0 (kontroll); 0,1; 0,5 resp. 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag. Vattenlösningarnas halt bekräftades med HPLC. Det framgår dock inte om detta gjordes mer än en gång, eller om det skedde flera gånger under studiens gång. Det framgår inte heller om färsk lösning beredd dagligen eller mer sällan, eller något om förvaring av lösningar. Djurens beteende observerades dagligen, födointag och kroppsvikt mättes varje vecka och den sista veckan av studien utfördes oftalmologiska, hematologiska samt kliniskt kemiska undersökningar. Vid studiens slut utfördes patologiska undersökningar på alla djur och organvikter av njure, lever, binjure och testis mättes. Utförliga histologiska undersökningar utfördes på djuren i kontrollgruppen och högdosgruppen, samt på de djur som dog under studiens gång, eller uppvisade patologiska förändringar.

Tre djur dog innan studien var slutförd. En hane i lågdosgruppen (0,1 mg/kg) blev illa tilltygad av andra hanar i samma bur, och avlivades. En hane i mellandosgruppen (0,5 mg/kg) och en hona i högdosgruppen dog inom 2½ timme efter dosering på dag 10 resp. 14 av studien. Djuren visade inte några tecken på sjukdom innan de dog, och det gick inte att fastställa dödsorsaken genom de patologiska och histopatologiska undersökningar som utfördes.

De enda andra observationer som gjordes i studien var en signifikant ökning av hemoglobin (Hb) hos hanar i 0,1 mg/kg-gruppen; signifikant ökning av både Hb och serum-natrium (Se-Na) hos honor i 0,5 mg/kg-gruppen ($p < 0,05$).

Baserat på att det inte gick att utesluta att de två dödsfallen, ett i mellandosgruppen och ett i högdosgruppen, var orsakade av testsubstansen så angav artikelförfattarna studiens NOAEL till 0,1 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag.

I en studie på råttor gavs honråttor anatoxin-a i dricksvatten i 7 veckor. (Astrachan et al, 1980) Tre dosgrupper om vardera 20 råttor fick i 0; 0,51 respektive 5,1 ppm (ppm motsvarar mg/L) anatoxin-a i dricksvattnet. Anatoxin-a hade sitt ursprung i en kultur av *Anabaena flos-aquae*, och toxinet var delvis renat, men graden av renhet var ej kvantifierad. UV-absorbansmätning indikerade att anatoxin-a var dominerande i det framrenade toxinet. Baserat på tidigare studie av råttors dricksvattenkonsumtion antog författarna att råttorna drack 0,1 mL vatten/g kroppsvikt, och att råttorna fick i sig 0; 0,05 respektive 0,5 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag. Klinisk status, foderintag, kroppsvikt, blodstatus (hematokrit och räkning av vita blodkroppar), serum enzymer (alkaliskt fosfat [ALP], alaninaminotransferas [ALT], gamma glutamyl transferas [GGT] och kolinesteras) kontrollerades på försöksdjuren varje vecka under studien. Vid studiens slut undersöktes även leveroxidasaktivitet (aldrin epoxidering *in vitro*). Organvikter av lever, njure och mjälte noterades och patologiska och histologiska undersökningar gjordes på lever, njure, mjälte, binjuror, hjärta, lunga och hjärna från samtliga djur. Studien följer ingen standardiserad design och är ofullständigt rapporterad. Inga effekter av doseringen med toxinet observerades, vilket indikerar ett NOAEL på 0,5 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag, alltså den högsta dosen som ingick i studien. Det bör dock observeras att kvantifieringen av den mängd anatoxin-a som råttorna exponerades för är mycket osäker.

I samma publikation som ovan redovisar Astrachan et al (1980) även en studie är toxinet gavs intraperitonealt till dräktiga guldhamstrar. Det framgår inte helt klart i publikationen, men får antagas att det är samma beredning av toxin som använts, som i 7-veckorsstudien på råttor. Hamstrarna fick toxin i doser om 0,125 eller 0,200 mg/kg kroppsvikt 3 ggr om dagen dagar 8-11 eller 12-14 av dräktigheten, utom en grupp som fick 0,200 mg toxin 1 gång dagligen dag 8-14 av dräktigheten. Djuren avlivades dag 15. Fostervikt mättes och eventuella synliga missbildningar noterades. Signifikant lägre fostervikt mättes i alla grupper som fått toxin, utom den grupp som fått 0,200 mg toxin/kg dag 12-14. En genomgående tendens var att antal resorptioner var högre i den

grupp som behandlats med toxin. Studien är varken genomförd eller rapporterad på ett sätt som gör att det går att dra några egentliga slutsatser utifrån den.

En studie har utförts på dräktiga möss av stammen Crl:CD-1(ICR)BR. (Fawell&James, 1994; Fawell et al, 1999) I studien sonmatades grupper på 10 respektive 12 dräktiga möss dagligen med (+)-anatoxin-a hydroklorid under dag 6-15 av dräktigheten. Doserna var 0 eller 2,5 mg/kg kroppsvikt. Djuren avlivades dag 18 av dräktigheten och antal implantationer liksom antal levande foster räknades. Foster vikt noterades samt eventuella yttre missbildningar. Inga effekter som kunde relateras till anatoxin-a noterades, varken hos foster eller vuxna djur. Författarna ansåg 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt (den enda testade dosen) vara NOEL i studien, både vad gäller effekter på foster och mödrar.

Det saknas data över eventuella effekter av kroniska intag av anatoxin-a och homoanatoxin-a, liksom cancerstudier. Med undantag för ovan rapporterade studien saknas även data över eventuella effekter på reproduktion och teratogena effekter.

Farokarakterisering

Eftersom det saknas studier över eventuella kroniska effekter av anatoxin-a och homoanatoxin-a går det inte att fastställa ett tolerabelt dagligt intag (TDI). Ett TDI ska kunna täcka in en konsumtion under en livstid, och för att fastställa ett TDI måste alltså data över kronisk toxicitet finnas.

Dataunderlaget för att uttala sig om subakut och subkronisk toxicitet är mycket begränsat, men är vad som finns att tillgå för att förslå en akut referensdos (ARfD), i brist på möjlighet att fastställa ett TDI. ARfD är den högsta mängd av ett ämne som en person kan inta under en begränsad tidsperiod (upp till ett dygn) utan hälsorisk.

De toxikologiska studier som finns att tillgå, för att komma fram till en ARfD, är en 7-veckors studie där anatoxin-a som renats fram ur en cellkultur gavs i dricksvatten till råttor (Astrachan et al, 1980), samt en 28-dagars studie där kommersiellt (+)-anatoxin-a gavs oralt via sond till möss (Fawell et al, 1999). Båda dessa studier har sina brister vad gäller metodologi och rapportering. Dricksvattenstudien utfördes på ett tillräckligt antal djur, 20 råttor ingick per dosgrupp, men endast djur av ett kön (honor), och de gavs ett toxin som inte var fullständigt definierat och kvantifierat. Studien saknar observationer vad gäller ett antal parametrar (ex.vis inom klinisk kemi, hematologi, histopatologi) och den är inte fullständigt beskriven. Två dosnivåer ingick i studien (uppskattade till 0,05 respektive 0,5 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag), men inga effekter sågs vid någon dos. NOEL angavs till 0,5 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt, den högsta dosnivån som ingick i studien.

I 28-dagarsstudien ingick 10 hanar och 10 honor per dosgrupp, jämfört med dricksvattenstudien var exponeringen för (+)-anatoxin-a bättre karakteriserad: 0,1; 0,5 respektive 2,5 mg/kg kroppsvikt och dag. Det framgår dock inte hur testsubstansen lagrats under studiens gång, och om det finns risk för att lagring och handhavande kan ha påverkat stabiliteten av testsubstansen. Baserat på att ett djur i mellandos- respektive högdosgruppen dog inom 2½ timme efter dosering på dag 10 respektive 14 av studien, utan att uppvisa andra tecken på sjuklighet, angavs NOEL till 0,1 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt. Denna nivå valdes eftersom det inte gick att finna vad som orsakat dödsfallen, och därför inte gick att säkerställa att dödsfallen inte var relaterade till testsubstansen. De enda fynd som gjordes i övrigt i studien var en signifikant ($p < 0.05$) ökning av Hb hos hanar i lågdosgruppen och hos honor i mellandosgruppen, samt en signifikant ökning av serumnivån av natrium (Se-Na) hos honor i mellandosgruppen. Ett antagande att dödsfallen inte var relaterade till testsubstansen, kan stödjas av att samtliga djur i högdosgruppen överlevde, och att inga tecken på effekter av testsubstansen observerades hos dessa djur. Detta innebär att NOEL kan anses vara 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt, den högsta dosen som testades.

I draft toxicological reviews of cyanobacterial toxins: Anatoxin-a, US National Center for Environmental Assessment, USEPA, November 2006 anser EPA att dessa två dödsfall sannolikt inte är relaterade till testsubstansen, och anger att det är troligt att ett reellt NOAEL i denna studie är 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag, den högsta dos som ingick i studien.

I en studie över effekter på foster sondmatades 12 dräktiga möss med 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt under 10 dagar av dräktigheten, dag 6-15, och inga effekter på mödrar eller avkomma observerades vid dag 18 av dräktigheten, då djuren avlivades (Fawell et al, 1999).

I fem-dagarsstudien av Fawell et al (1999) sågs dödsfall hos alla djur som fått 12,3 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag via sondmatning och hos ett av fyra djur som fått 6,2 mg. Hanar i gruppen som fått 6,2 mg uppvisade hyperaktivitet. De djur som fått lägre doser, 1,2 respektive 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt och dag visade inga tecken på några effekter av doseringen, varken kliniskt eller vid obduktion.

Studier av akut toxicitet är av mycket begränsat värde vid riskvärdering av ämnen som kan komma att konsumeras dagligen under lång tid, till exempel för ämnen som kan förekomma i dricksvatten. De studier som finns visar LD50 vid oral exponering ligger vid 13,3 mg (+)-anatoxin-a för möss, när substansen gavs som hydroklorid i vattenlösning. LD50 oralt för anatoxin-a i form av lysat av *Anabaena flos-aquae*-celler var 6,7 mg/kg kroppsvikt.

ARfD – Akut Referensdos

Det finns ingen enskild studie som ger tillräckligt med information för att kunna ligga till grund för att fastställa en ARfD. Av de studier som finns att tillgå är 28-dagars studien på möss (Fawell et al, 1999) den som är mest komplett, och där testsubstansen och doseringen är bäst definierad. Troligt NOAEL i den studien är den högsta dosen som gavs; 2,5 mg (+)-anatoxin-a/kg kroppsvikt. Inga dosrelaterade effekter förekommer, men det har dock inte gått att ange orsak till två dödsfall som inträffade, ett i mellandosgruppen på dag 10 av studien och ett i högdosgruppen på dag 14, det tycks dock mindre sannolikt att de är relaterade till testsubstansen i och med att inga andra dosrelaterade symtom eller skador märktes på övriga djur i dessa och andra dosgrupper under hela studien.

Ett stöd för att NOAEL i 28-dagarsstudien var 2,5 mg/kg kroppsvikt är att inga effekter observerades vid kliniska observationer av de dräktiga honor som fick motsvarande dos under 10 dagar av dräktigheten i studien som rörde effekter på foster (Fawell et al, 1999), liksom att inga effekter sågs vid den dosnivån i den fem-dagars studie som användes för att fastställa dosnivåer inför 28-dagarsstudien.

Vid beräkning av en ARfD utgående från NOAEL 2,5 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt från 28-dagarsstudien på mus (Fawell et al, 1999), måste osäkerhetsfaktorer användas. Som osäkerhetsfaktorer bör som brukligt en faktor 10 användas för att kompensera för artskillnader, en faktor 10 för att kompensera för individskillnader. I detta fall bör även ytterligare en faktor 10 användas för att kompensera för brister i databasen, exempelvis det faktum att NOAEL är fastställt utifrån en 28-dagarsstudie och ej en 90-dagarsstudie. Med tanke bland annat på att substansen anatoxin-a är relativt instabil och det inte framgår hur lagring av substansen skett, om analys av doser utförts genom hela studien, samt andra oklarheter i rapporteringen av studien, läggs ytterligare en osäkerhetsfaktor 2 till de övriga. Beräkningen av ARfD innehåller stora osäkerheter, och i väntan på att studier finns tillgängliga som kan ge ett bättre underlag är det lämpligt att ange ett temporärt ARfD (tARfD) vilket beräknas till $2,5/2000 = 0,00125$ mg anatoxin-a/kg kroppsvikt. (1,25 mikrog anatoxin-a/kg kroppsvikt).

Enligt resonemanget ovan blir tARfD 1,25 mikrogram anatoxin-a/kg kroppsvikt. Bindningsstudier *in vitro* har visat att homoanatoxin-a binder till nAChR med samma affinitet som anatoxin-a. Utgående från detta kan antas att homoanatoxin-a har motsvarande toxicitet som anatoxin-a. Detta skulle

betyda att samma storlek på tARfD som för anatoxin-a även kan användas för homoanatoxin-A: 1,25 mikrogram homoanatoxin-a/kg kroppsvikt.

Eventuell exponering för anatoxin-a och homoanatoxin-a via dricksvatten

Arter som kan producera anatoxin-a och homoanatoxin-a har återfunnits i Sverige, och anatoxin-a har hittats i svenskt sjövattnen, i sjöar som används som vattentäcker för råvattnen till vattenverk. Det finns inte data som kan ge en uppfattning om människor i Sverige har exponerats för toxinerna via dricksvatten, och heller inte data som kan ge underlag för att beräkna hur stor risken är för att sådan exponering kan ske.

Riskkaraktärisering för anatoxin-a och homoanatoxin-a i dricksvatten

Det tARfD på 1,25 mikrogram anatoxin-a/kg kroppsvikt som föreslagits ovan kan användas för att beräkna riktvärden, nivågränser där eventuella åtgärder behöver vidtagas för att säkerställa en säker dricksvattenförsörjning, för anatoxin-a och homoanatoxin-a i dricksvatten.

Nedan, i tabell 1, redovisas beräkningar av intag av anatoxin-a respektive homoanatoxin-a från dricksvatten. Då det inte finns någon känd intagsväg för toxinerna annat än via vatten, har 100% av intaget allokerats till dricksvatten.

För den yngsta åldersgruppen har antagandet gjorts att barnen konsumerar modersmjölksersättning beredd med toxininnehållande dricksvatten.

Tabell 1. Beräkning av riktvärden. Beräkningen bygger på NOAEL 2,5 mg anatoxin-a/kg kroppsvikt, vilket med användande av säkerhetsfaktorer enligt ovan ger tARfD 1,25 mikro/kg kroppsvikt.

Befolkningsgrupp	Personens vikt (kg)	Vattenkonsumtion (mL/dag)	Riktvärde baserat på ARfD 1,25 mikrog/kg kroppsvikt, 100% av intaget kommer från dricksvatten (mikrog/L)
spädbarn 3 veckor	4,2	700	7,5
spädbarn > 4 månader	6.6	800	10,3
4-åringar	18	1600	14,1
8-åringar	31	1600	24,2
12-åringar	42	2100	25
vuxna	70	2000	44

Vikten vid olika åldrar baseras på Livsmedelsverket (2012;2006)

Vattenkonsumtion vid olika åldrar baseras på EFSA (2010)

Osäkerheter

Det finns mycket stora osäkerheter bakom de riktvärden som presenteras i tabell 1. Eftersom det saknas toxikologiska data över kronisk toxicitet har inte TDI kunnat beräknas, utan beräkningen av riktvärden baseras på ett temporärt ARfD vilka i detta fall bygger på, och finner stöd i, subkroniska djurstudier. De subkroniska studier som finns att tillgå har brister, i metodologi och/eller i rapportering vilket sammantaget ger en stor osäkerhet. I väntan på att bättre data ska bli tillgängliga är det ARfD som beräknats temporärt (tARfD). När bättre data finns att tillgå kan ARfD komma att förskjutats uppåt eller nedåt, beroende på resultat av kommande undersökningar.

Gränsvärden för riskhantering i andra länder

Ett fåtal länder har gränsvärden eller riktvärden för hantering av anatoxin-a och/eller homoanatoxin-a i dricksvatten.

United Kingdom Water Industry Research (UKWIR) har som rekommendation angivit Short term No Adverse Response Levels (SNARLs), 24-timmars SNARL för anatoxin-a är 3 mikrogram/L och 7-dagars är 1,5 mikrogram/L.

Nya Zeeland använder sig av provisoriska gränsvärden för dricksvatten, dessa är 6 mikrogram/L vatten för anatoxin-a och 2 mikrogram/L för homoanatoxin-a. (Ministry of Health of New Zealand, 2005) Vid beräkning av detta värde utgår de från NOAEL 2 mg/kg kroppsvikt och dag, använder en säkerhetsfaktor 1000, räknar med en kroppsvikt på 70 kg, ett vattenintag på 2000 mL/dag, och har allokerat 80% av TDI till dricksvatten. Det framgår inte vilken studie som ligger till grund för NOAEL på 2 mg/kg kroppsvikt.

I USA finns inget officiellt gränsvärde, men två stater, Ohio och Oregon, har enligt uppgift 'guidance/action level' för anatoxin-a i dricksvatten. I Ohio är detta 20 mikrog/L, i Oregon 3 mikrog/L dricksvatten.

Slutsatser och sammanfattning

Anatoxin-a och homoanatoxin-a är nervtoxiner som kan bildas av vissa arter av cyanobakterier (blå-gröna alger) som lever i sötvatten.

Toxinerna verkar genom att specifikt binda till nikotinergera acetylkolinreceptorer. De ger en överstimulering av receptorerna på grund av att toxinerna inte bryts ned av acetylkolinesteras eller andra enzymer. Toxinerna ger effekt mycket snabbt. Den mest påtagliga allvarliga effekten vid svår förgiftning är förlamning av skelettmuskulatur och andningsmuskulatur, vilket kan vara livshotande.

Arter som har kapacitet att bilda toxinerna finns i svenska sjöar. Anatoxin-a har återfunnits i sjöar i Sverige. Det finns inte underlag som kan ge en uppfattning om ifall människor i Sverige har exponerats för toxinerna via dricksvatten, eller som kan ge en uppfattning om hur stor risken är för att detta kan ske. Anatoxin-a är relativt labilt, och bryts ned relativt snabbt, vilket naturligtvis minskar riskerna för att människor ska exponeras för toxinet via dricksvatten.

Om toxinerna skulle förekomma i dricksvatten skulle detta kunna ge allvarliga följder, det finns därför anledning att utarbeta rekommendationer för riskhanteringsåtgärder.

Baserat på en temporär akut referensdos (tARfD) 1,25 mikrog anatoxin-a/kg kroppsvikt och att 100% av intaget av anatoxin-a respektive homoanatoxin-a allokeras till dricksvatten kan ett riktvärde beräknas för när åtgärder kan behöva vidtas, det blir 7,5 mikrogram anatoxin-a/L dricksvatten. Utgående från att toxiciteten av homoanatoxin-a är lika stor som för anatoxin-a blir riktvärdet detsamma för homoanatoxin-a.

Referenser

- Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. 2010a. Neurotoxic cyanobacterial toxins. Review. *Toxicon* 56:813-828.
- Aráoz R, Vilariño N, Botana LM, Molgó J. 2010b. Ligand-binding assays for cyanobacterial neurotoxins targeting cholinergic receptors. *Anal Bioanal Chem* 397:1695-1704.
- Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. 1980. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 18 (5-6):684-688.
- Behm D. 2003. Coroner cites algae in teen's death. *Milwaukee Journal Sentinel*. September 6, refererat i Draft toxicological reviews of cyanobacterial toxins: Anatoxin-a, US National Center for Environmental Assessment, USEPA, November 2006.
- Carmichael WW, Biggs DF, Gorham PR. 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 187:542-544.
- Carmichael WW, Gorham PR, Biggs DF. 1977. Two laboratory case studies on the oral toxicity to calves of the freshwater cyanophyte (blue-green algae) *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Can Vet J* 18(3):71-75.
- Carmichael WW, Yuan MCF. 2004. Human mortality from accidental ingestion of toxic cyanobacteria – a case re-examined. In Sixth international conference on toxic cyanobacteria, p.61, abstract. Bergen, Norge.
- Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, Stavric B. 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can J Chem* 55(8):1367-1371.
- EFSA. 2010. Scientific Opinion on dietary reference values for water. *EFSA Journal* 8(3):1459.
- Fawell JF, James HA. 1994. Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of anatoxin-a and a method for its determination in reservoir water. FWR Report No. FR0492/DoE372.
- Fawell JF, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Hum Exp Toxicol* 18(3):168-173.
- James KJ, Crowley J, Duphard J, Lehane M, Furey A. 2007. Anatoxin-a and analogues: discovery, distribution and toxicology. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Ed. LM Botana. Blackwell Publishing. 141-158. ISBN-13: 978-0-8138-2700-1 (alk. paper), ISBN-10: 0-8138-2700-0 (alk. paper)
- Livsmedelsverket. 2006. Riksmaten – barn 2003. Livsmedels och näringsintag bland barn i Sverige.
- Livsmedelsverket. 2012. Livsmedels- och näringsintag bland vuxna i Sverige. Resultat från matvaneundersökning genomförd 2010-2011.
- Ministry of Health of New Zealand. 2005. Drinking-water Standards for New Zealand. Ministry of Health of New Zealand, Wellington.
- Moore RE. 1977. Toxins from blue-green algae. *BioScience* 27(12):797-802.

Quiblier C, Wood A, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert J-F. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. *Water Res* 47:5464-5479.

Skulberg OM, Carmichael WW, Andersen RA, Matsunaga S, Moore RE, Skulberg R. 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatoriacean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ Toxicol Chem* 11(3):321-329.

Spivac CE, Waters J, Witkop B, Albuquerque EX. 1983. Potencies and channel properties induced by semirigid agonists at frog nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 23:337-343.

Stevens DK, Krieger RI. 1991. Effect of route of exposure and repeated doses on the acute toxicity in mice of the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-a. *Toxicon* 29(1):134-138.

Swanson KL, Allen CN, Aronstam RS, Rapoport H, Albuquerque EX. 1986. Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol Pharmacol* 35(2):223-231.

Valentine WM, Schaeffer DJ, Beasley VR. 1991. Electromyographic assessment of the neuromuscular blockade produced *in vivo* by anatoxin-a in the rat. *Toxicon* 29(3):347-357.

Washington State Department of Health. 2008. Washington State recreational guidance for microcystins (provisional) and anatoxin-a (interim/provisional). Washington State Department of Health, Olympia, Washington.

WHO. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus I and Bartram J, eds. Taylor and Francis. New York and London.

Wonnacott S, Swanson KL, Albuquerque EX, Huby NJS, Thompson P, Gallagher T. 1992. *Biochem Pharmacol* 43(3):419-423.



Livsmedelsverket

Uppsala Hamnesplanaden 5, SE-751 26

www.livsmedelsverket.se