Potentieel toxisch fytoplankton in productiegebieden van tweekleppige weekdieren

Evaluatie van het Nederlandse monitoringsprogramma met voorstellen voor een alternatieve aanpak

E. Faassen, T. Bovee, M. Klijnstra, M. Alewijn, A. Gerssen

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Potentieel toxisch fytoplankton in productiegebieden van tweekleppige weekdieren

Evaluatie van het Nederlandse monitoringsprogramma met voorstellen voor een alternatieve aanpak

E. Faassen, T. Bovee, M. Klijnstra, M. Alewijn, A. Gerssen

Dit onderzoek is uitgevoerd door RIKILT Wageningen University & Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research in opdracht van en gefinancierd door de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit.

Wageningen, mei 2018

RIKILT-rapport 2018.002

Faassen, E., Bovee, T., Klijnstra, M., Alewijn, M., Gerssen, A., 2018. *Potentieel toxisch fytoplankton in productiegebieden van tweekleppige weekdieren; Evaluatie van het Nederlandse monitoringsprogramma met voorstellen voor een alternatieve aanpak*. Wageningen, RIKILT Wageningen University & Research, RIKILT-rapport 2018.002. 56 blz.; 6 fig.; 9 tab.; 150 ref.

Projectnummer: 1277360401

Projecttitel: Onderzoek Toxische Algen

Projectleider: Arjen Gerssen

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/446127> of op www.wur.nl/rikilt (onder RIKILT publicaties).

© 2018 RIKILT Wageningen University & Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research. Hierna te noemen RIKILT.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het RIKILT is het niet toegestaan:

- a. *dit door RIKILT uitgebrachte rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b. *dit door RIKILT uitgebrachte rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c. *de naam van RIKILT te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Postbus 230, 6700 AE Wageningen, T 0317 48 02 56, E info.rikilt@wur.nl, www.wur.nl/rikilt. RIKILT is onderdeel van Wageningen University & Research.

RIKILT aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

RIKILT-rapport 2018.002

Verzendlijst:

- Mevr. J.E. van den Boomgaard-Bom
- Dhr G.A. Lam
- Mevr. A.D. van der Linden

Inhoud

	Woord vooraf	5
	Samenvatting	7
	Summary	9
1	Inleiding	11
	1.1 Productie van levende tweekleppige weekdieren en bescherming van de volksgezondheid	11
	1.2 Aanleiding studie	11
	1.3 Doel studie en onderzoeksvragen	11
2	Toxine productie door fytoplankton	13
	2.1 Toxine productie door (marien) fytoplankton	13
	2.1.1 Paralytisch Schelpdier Vergif (PSP)	13
	2.1.2 Amnesisch Schelpdier Vergif (ASP)	13
	2.1.3 Diarrhetisch Schelpdier Vergif (DSP)	14
	2.1.4 Yessotoxine (YTX)	15
	2.1.5 Azaspiracide (AZA)	15
	2.1.6 Tetrodotoxine (TTX)	15
	2.1.7 Neurologisch Schelpdier Vergif (NSP)	16
	2.1.8 Ciguatera Vis en Schelpdier Vergif (CFP en CSP)	16
	2.1.9 Palytoxine (PITx)	17
	2.1.10 Cyclische Imines (CI)	17
	2.1.11 Cyanobacteriële toxines	17
	2.2 Regulering toxines	18
3	Huidige situatie monitoring	19
	3.1 Nederlandse situatie	19
	3.2 Situatie in omliggende landen	20
4	Voorkomen fytoplankton en toxines	22
	4.1 Gebruikte datasets	22
	4.2 Voorkomen potentieel toxine vormend fytoplankton	23
	4.3 Voorkomen toxines	24
	4.4 Relatie tussen het voorkomen van algen en toxines in Nederland	26
	4.5 Relatie tussen het voorkomen van algen en toxines in omliggende landen	28
5	Manieren om het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren te voorspellen	29
	5.1 Bepaling samenstelling fytoplankton	29
	5.2 Bepaling toxiciteit fytoplankton	30
	5.3 Bepaling van de fractie fytoplankton met toxine producerende capaciteit met behulp van moleculaire technieken	30
	5.4 Lage toxine concentraties in tweekleppige weekdieren als waarschuwing gebruiken	31

6	Manieren om het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren en fytoplankton te bepalen	32
6.1	Chemisch-analytische methodes	32
6.2	<i>In vivo</i> methodes	33
6.3	Alternatieve methodes	33
7	Voorstel toekomstig monitoringsprogramma	35
7.1	Afweging alternatieven	35
7.2	Aanbevelingen voor aanpassing van het monitoringsprogramma	37
7.3	Aanbeveling voor nader onderzoek	38
8	Gebruikte afkortingen	39
	Literatuur	41
Bijlage 1	Bemonsteringsschema fytoplankton en toxines SSO 2017	48
Bijlage 2	Fytoplankton Noordzee	49
Bijlage 3	Fytoplankton Westelijke Waddenzee	50
Bijlage 4	Fytoplankton Oostelijke Waddenzee	51
Bijlage 5	Fytoplankton Grevelingenmeer	52
Bijlage 6	Fytoplankton Veerse Meer	53
Bijlage 7	Fytoplankton Oosterschelde	54

Woord vooraf

Voor u ligt een rapport waarin het huidige monitoringsprogramma rondom mariene toxines in tweekleppige weekdieren en de samenstelling van het marien fytoplankton geëvalueerd wordt en waarin voorstellen voor aanpassing van dit programma worden gedaan. Dit rapport is door het RIKILT Wageningen UR opgesteld in opdracht van de competente autoriteit, de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA).

Om tot goede aanbevelingen voor aanpassing van het monitoringsprogramma te komen, is het essentieel om de huidige situatie goed te begrijpen. Op basis van fytoplanktontellingen en toxinegegevens, verzameld in het kader van het sanitair schelpdier onderzoek in de periode 2012-2017, is daarom eerst de effectiviteit van het huidige monitoringsprogramma onderzocht. Verder is er contact geweest met een aantal van de ons omringende landen om te onderzoeken hoe het monitoringsprogramma daar is vormgegeven en hoe omgegaan wordt met het voorkomen van potentieel toxisch fytoplankton en ophoping van toxines in tweekleppige weekdieren. Tenslotte is een literatuurstudie uitgevoerd naar de toxine productie door fytoplankton en zijn manieren gezocht om het toxinegehalte of de toxiciteit in tweekleppige weekdieren en fytoplankton te bepalen en voorspellen. Op basis van alle verzamelde informatie is een aantal aanbevelingen gedaan die naar verwachting zullen leiden tot een efficiëntere vormgeving van het Nederlandse monitoringsprogramma, zonder het huidige risico voor de consument te verhogen.

Samenvatting

In dit rapport wordt het huidige Nederlandse beleid omtrent de monitoring van marien fytoplankton en mariene toxines in tweekleppige weekdieren geëvalueerd en worden aanpassingen aanbevolen.

In Nederland worden de productiegebieden voor tweekleppige weekdieren in het sanitair schelpdier onderzoek gemonitord op onder andere het voorkomen van potentieel toxine producerend fytoplankton en de aanwezigheid van mariene toxines in de producten. Op het moment dat de dichtheid van potentieel toxine producerend fytoplankton een vooraf vastgestelde norm overschrijdt, wordt door de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) fase 1 afgekondigd. Producten mogen dan alleen nog maar verhandeld worden als via metingen is aangetoond dat de toxineconcentratie in de tweekleppige weekdieren onder de norm ligt. Deze werkwijze geeft een goede bescherming van de volksgezondheid, maar leidt regelmatig tot afkondiging van fase 1, zonder dat er norm overschrijdende concentraties toxines in de producten worden aangetroffen. Aangezien het afkondigen van fase 1 leidt tot extra administratieve lasten voor de NVWA en verhoogde kosten voor de sector, is in opdracht van de NVWA geëvalueerd of er efficiëntere manieren zijn om de monitoring vorm te geven, waarbij het risico voor de volksgezondheid niet mag toenemen.

Potentieel toxine producerend fytoplankton, dat in het huidige beleid als indicator wordt gebruikt voor het voorkomen van toxines in tweekleppige weekdieren, overschreed in de periode 2012-2017 130 maal de norm. In 107 van deze gevallen werd deze overschrijding veroorzaakt door fytoplanktonsoorten die mogelijk diarrhetisch schelpdier vergiften (DSP's) produceren. In 21 gevallen waren potentieel amnesisch schelpdier vergiften (ASP's) producerende soorten in te hoge aantallen aanwezig, en potentieel paralytisch schelpdier vergiften (PSP's) producerende soorten overschreden zevenmaal de norm, waarvan 5 maal simultaan met potentieel ASP's of DSP's producerende soorten. In dezelfde periode is geen enkele maal een norm overschrijdende concentratie aan DSP's, ASP's of PSP's in tweekleppige weekdieren gemeten. Yessotoxines (YTX's) en azaspiracides (AZA's), waarvoor geen fytoplanktonnorm is, zijn niet aangetroffen in de geanalyseerde periode. Alleen de concentratie tetrodotoxine (TTX), dat pas vanaf najaar 2015 in tweekleppige weekdieren wordt gemeten en waarvan de producerende organismen nog onbekend zijn, overschreed binnen het kader van het sanitair schelpdier onderzoek in de geanalyseerde periode tienmaal de norm.

In overeenkomst met eerdere Nederlandse monitoringsdata en de situatie in omliggende landen, is er geen generieke relatie ontdekt tussen het voorkomen van potentieel toxine producerende fytoplanktonsoorten en het voorkomen van (lage concentraties) toxines in tweekleppige weekdieren. Slechts eenmaal kon een relatie gelegd worden tussen het voorkomen van DSP's in mosselen en het voorkomen van potentieel DSP producerend fytoplankton, dit was in Kortgene, Veerse Meer, in de zomer en herfst van 2017. Ook uit de internationale literatuur blijkt dat fytoplanktontellingen vaak geen veilige voorspellers zijn. Het is zorgwekkend dat wereldwijd regelmatig norm overschrijdende concentraties toxines in tweekleppige weekdieren of vis worden gevonden zonder dat er toxine producerend fytoplankton is aangetroffen. Het omgekeerde, waarnemingen van een hoge dichtheid potentieel toxine producerend fytoplankton zonder meetbare hoeveelheden toxines in tweekleppige weekdieren, komt ook voor. In specifieke gevallen is de aanwezigheid van bepaalde fytoplanktonsoorten wel een redelijke voorspeller, zoals in een Ierse baai met een terugkerende bloei van toxine producerende *Alexandrium* stammen en detecteerbare hoeveelheden PSP's in de tweekleppige weekdieren.

Vanwege het nagenoeg ontbreken van een relatie tussen het voorkomen van potentieel toxine producerende algen en het daadwerkelijk voorkomen van deze toxines in tweekleppige weekdieren in Nederland, wordt geadviseerd om de fytoplanktonnorm voor potentieel PSP's, ASP's en DSP's producerende soorten los te laten. In plaats daarvan kunnen lage toxineconcentraties (een kwart van de norm) in tweekleppige weekdieren gebruikt worden als trigger voor fase 1. Ook voor YTX, AZA en TTX zou dit beleid gevolgd kunnen worden, waarbij de triggerconcentratie voor TTX minimaal op de

helft van de norm gelegd moet worden in verband met de gevoeligheid van de analysemethode. Dit voorgestelde beleid is vergelijkbaar met de Deense aanpak, een land waar de mosselen net als in Nederland overwegend in bodemcultuur worden gekweekt en waar relatief weinig toxische episodes plaatsvinden.

Het is redelijk onbekend hoe toxisch de in Nederland voorkomende fytoplanktonsoorten zijn, en of er een relatie bestaat tussen de toxineconcentratie in het fytoplankton en in tweekleppige weekdieren. Moleculaire technieken, zoals het bepalen van de hoeveelheid voor toxine productie corresponderende genen, zijn ontworpen om te bepalen of een fytoplanktonmonster wel of geen toxines bevat. Op het moment zijn deze technieken echter nog niet genoeg ontwikkeld om toegepast te kunnen worden als alternatief voor het tellen van fytoplankton. Potentiele toepassing voor monitoringsdoeleinden van mariene toxines zal na verwachting nog minimaal tien jaar op zich laten wachten.

Toxinebepaling in het fytoplankton zou meer inzicht geven in hoe de toxineconcentratie van het fytoplankton is gecorreleerd met de toxineconcentratie in de tweekleppige weekdieren. Hiervoor zouden fytoplanktonmonsters met hoge dichtheden potentieel toxine producerende soorten verzameld kunnen worden en periodiek worden gemeten. Deze gegevens kunnen dan vergeleken worden met de analyseresultaten van de tweekleppige weekdieren die op hetzelfde moment zijn geoogst, en mede op basis van deze informatie kan de voorgestelde monitoringsstrategie na enkele jaren geëvalueerd worden.

In het geval dat fase 2 (gebiedssluiting als gevolg van norm overschrijdende concentraties toxines in tweekleppige weekdieren) is afgekondigd, kan de sector geld besparen door zelf *in situ* de toxineconcentratie in de producten in te schatten met eenvoudig uit te voeren testen ('dipsticks'). Op het moment dat deze testen aantonen dat de toxineconcentratie waarschijnlijk onder de norm is gezakt, kan een monster opgestuurd worden voor een chemisch-analytische toxine bepaling. Dergelijke testen zijn beschikbaar voor PSP's, ASP's en de DSP toxines OA en DTX. Voor PTX's, YTX's, AZA's en TTX zijn nog geen commerciële methodes voor *in situ* analyses beschikbaar.

Ondanks dat geadviseerd wordt om de fytoplanktonnorm niet te handhaven, is het wettelijk verplicht om de fytoplanktonsamenstelling te blijven volgen. Fytoplankton gegevens blijven nodig om eventuele verschuivingen als gevolg van bijvoorbeeld veranderingen van het klimaat, stromingen en afwatering op te kunnen pakken. Het is zelfs wenselijk een bredere screening dan de op het momenteel getelde aantal soorten uit te voeren om alert te blijven op soorten die niet-gereguleerde toxines produceren, en om het opkomen van nieuwe soorten, zoals de opkomst van *Alexandrium* in 2012, waar te kunnen nemen.

Geadviseerd wordt om niet gereguleerde toxines, waaronder cyanobacteriële toxines, uit voorzorg te monitoren om potentiële risico's, zoals de vondst van TTX, dat op het moment van eerste detectie (2015) nog niet gereguleerd was, in kaart te brengen. Voor de toxines waarvan de producerende algen bekend zijn kan de toxineconcentratie van het fytoplankton of de tweekleppige weekdieren bepaald worden op het moment dat potentieel toxine producerend fytoplankton wordt waargenomen. Van toxines waarvan de producerende soorten onbekend of moeilijk waar te nemen zijn wordt aanbevolen een periodieke screening van de tweekleppige weekdieren uit te voeren. Voor een dergelijke screening zijn zowel chemisch analytische en op bioactiviteit gebaseerde methodes beschikbaar.

Tenslotte is de bovenstaande analyse voornamelijk uitgevoerd op de huidige situatie. Toekomstige veranderingen, zoals verandering van klimaat of kweekmethode, kunnen een verandering van beleid noodzakelijk maken. Regelmatige evaluatie van de doeltreffendheid en het beschermingsniveau van het monitoringsprogramma is daarom nodig.

Summary

This report contains an evaluation of the current Dutch monitoring program for marine phytoplankton and bivalve molluscs. It also contains recommendations for adaptation of the program.

In the Netherlands, potentially toxic phytoplankton species and the occurrence of toxins in bivalves are monitored in the production areas. In case the density of potentially toxic phytoplankton exceeds a certain limit, the Dutch competent authority (Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, NVWA) changes the status of the production area from phase 0 to phase 1. During phase 1, products may only be put on the market if the marine toxin concentrations are shown to be below the regulatory limits. This approach ensures a high level of consumer safety, but frequently a phase 1 is issued, while the toxin concentration in the products is below the regulatory limit. As issuing a phase 1 encompasses an extra administrative burden to the NVWA and extra costs for the sector, the NVWA requested an evaluation of the current monitoring program. Ideally, more efficient strategies for predicting the occurrence of marine toxins in bivalves, that do not lead to a higher risk for the consumer, should be identified.

In the period 2012-2017, potentially toxic phytoplankton, which is currently used as an indicator for the occurrence of marine toxins in bivalves, exceeded the pre-set limit on 130 occasions. In 107 of these cases, the density of potential diarrhetic shellfish poisons (DSPs) producing species was too high. In 21 cases, potential amnesic shellfish poisons (ASPs) producing species were too abundant. Potential paralytic shellfish poisons (PSPs) producing species exceeded the limit seven times, five of these events occurred simultaneously with too high densities of potential ASP or DSP producing species. During the same period, the PSP, ASP and DSP concentrations were below the toxin norms for bivalves. Yessotoxins (YTXs) and azaspiracids (AZAs), toxins for which no phytoplankton limits are set, were not detected in the evaluated period. Based on data of the regular survey, only the tetrodotoxin (TTX) concentration, of which the producing organism is unknown and which has only been monitored from October 2015 on, exceeded the regulatory limit on ten occasions in the last two years.

In accordance with earlier Dutch monitoring data and with the situation in neighbouring countries, no general relation could be established between the presence of potentially toxic phytoplankton and the occurrence of (low concentrations) of toxins in bivalve molluscs. Only in one case a correlation was observed between the density of potentially DSP producing phytoplankton and DSPs in mussels (Kortgene, Veerse Meer, summer and fall 2017). The literature also shows that worldwide the presence of phytoplankton is not a reliable indicator. Most troublesome is the occurrence of toxins in bivalves and fish exceeding the permitted levels without detection of toxin producing phytoplankton. The opposite also occurs, i.e. presence of high cell numbers of potentially toxic phytoplankton without any measurable amounts of toxins in bivalves. In some specific cases, the phytoplankton community can be a good predictor for the presence of toxins in bivalves, such as in an Irish bay with recurring blooms of *Alexandrium* species and subsequent detectable amounts of PSPs in bivalves.

Because of the lack of an evident correlation between the presence of potentially toxin producing phytoplankton and the presence of these toxins in bivalves, it is recommended to abandon the phytoplankton limit for potential PSPs, ASPs and DSPs producing species. Instead, low toxin concentrations (of one-fourth of the current regulatory limit) in bivalves should be used to trigger phase 1. This approach would also be applicable for YTX, AZA and TTX. For TTX, the limit to trigger phase 1 should be at least half of the current regulatory limit, due to the sensitivity of the analytical method. The proposed change in regulation is comparable to the Danish approach. The situation in Denmark is also comparable to the Dutch situation, in both countries the mussels are mainly grown in bottom cultures, and in both countries relatively few toxic episodes occur.

The toxicity of the Dutch phytoplankton community is rather unknown and it is also unknown if there is a relation between the amounts of toxins in phytoplankton and the toxin concentrations in bivalves.

Molecular tools, such as the quantification of genes that correspond to toxin production, are not yet suitable to be used as an alternative for phytoplankton cell counting. Potential application for monitoring marine toxins will most likely not yet be possible in the coming decade.

Determination of the phytoplankton toxicity would give insight into whether there is a relation between the phytoplankton toxin concentration and the concentration in bivalves. To this end, phytoplankton samples containing high densities of potentially toxin producing phytoplankton could be collected, stored and analysed periodically. These data can then be compared to the toxin data in bivalves harvested at the same moment. The information thus obtained should contribute to a future evaluation of the recommended adaptations of the monitoring program.

In a phase 2 situation (production site closure due to toxin concentrations in bivalves that exceed the regulatory limit), the producers could estimate the toxin concentration in their products *in situ* with the use of simple assays (dipsticks). Only when these simple assays indicate that the toxin concentration has most likely dropped below the regulatory limit, a sample can be sent out for chemical analysis. This procedure would be cheaper than the current practice of frequent sample testing by chemical methods. These type of dipstick tests are available for PSPs, ASPs and the DSP toxins OA and DTX. No commercial methods are yet available for *in situ* analysis of PTXs, YTXs, AZAs and TTX.

Despite the recommendation to abandon the phytoplankton norms, it is a legal requirement to continue the monitoring of the phytoplankton community. The thus obtained phytoplankton data are needed to timely observe shifts in the phytoplankton community, e.g. due to changes of the climate or hydrodynamics. It is even advisable to expand the monitoring to a broader screening of species, in order to be able to pick up species that produce non-regulated toxins and to observe shifts in the phytoplankton composition, such as the increased abundance of *Alexandrium* in 2012.

It would also be prudent to monitor the non-regulated toxins, including cyanobacterial toxins, in order to signal potential risks, such as the detection of TTX in 2015. For the toxins from known phytoplankton producers, the concentration in phytoplankton or bivalves could be determined when potential toxin producing phytoplankton is observed. For the toxins of which the producers are unknown or difficult to observe, it is recommended to perform a periodical chemical analytical or bioactivity based screening of bivalves.

The recommendations described above are based on an analysis of the current Dutch situation. Future changes, such as climate change or adaptations of the culturing techniques, might render an adaptation of the monitoring program necessary. Periodical review of the efficiency and the level of consumer protection of the program is therefore needed.

1 Inleiding

1.1 Productie van levende tweekleppige weekdieren en bescherming van de volksgezondheid

In Nederland liggen verschillende productiegebieden voor tweekleppige weekdieren. Tweekleppige weekdieren zijn dieren met een schelp bestaande uit twee kleppen, die door middel van een scharnier zijn verbonden. Samen met onder andere zeeslakken en inktvissen behoren zij tot de schelpdieren. In Nederland worden met name mosselen (*Mytilus edulis*), oesters (*Crassostrea gigas* en *Ostrea edulis*), kokkels (*Cerastoderma edule*) en scheermessen/mesheften (*Ensis* spp.) geproduceerd/verzameld. Omdat de producten worden verhandeld voor menselijke consumptie, moeten zij aan een aantal kwaliteitseisen voldoen. Zo zijn er normen voor de aanwezigheid van de ziekteverwekkende bacterie *Escherichia coli* [1], de aanwezigheid van contaminanten, te weten een aantal zware metalen, polycyclische aromatische koolwaterstoffen, dioxinen en polychloorbifenylen [2-4], en de aanwezigheid van mariene toxines [5-7]. De Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) is de competente autoriteit op dit gebied en ziet toe op de naleving van de regels voor de Nederlandse productiegebieden voor levende tweekleppige weekdieren en op de bewerking en verwerking ervan. Om te voorkomen dat tweekleppige weekdieren op de markt komen die niet geschikt zijn voor menselijke consumptie, vindt regelmatige bemonstering plaats. Indien hierbij vastgesteld wordt dat normen worden overschreden, kan de NVWA tijdelijke maatregelen opleggen.

1.2 Aanleiding studie

Om de kans te verkleinen dat tweekleppige weekdieren met norm overschrijdende concentraties mariene toxines op de markt gebracht worden, wordt het potentieel toxine producerende fytoplankton gemonitord binnen de productiegebieden en worden de toxinegehalten in de producten bepaald. Zowel de fytoplanktontellingen als de toxinemetingen worden volgens een vooraf opgesteld schema uitgevoerd, en voor zowel de fytoplanktondichtheid in het water als de toxineconcentratie in het product zijn normen vastgesteld. Als de dichtheid van potentieel toxine producerend fytoplankton de normen overschrijdt, mogen de producten uit het betreffende gebied alleen verhandeld worden als toxinemetingen aantonen dat de toxineconcentraties in het product beneden de wettelijk vastgestelde normen liggen. In praktijk betekent dit dat producten uit een gebied met fytoplanktonoverschrijding soms dagelijks ter analyse worden aangeboden zolang de fytoplanktondichtheid in het gebied boven de norm ligt. Deze monsters worden aangeleverd door de sector en zijn geen onderdeel van het reguliere monitoringsprogramma. Als de fytoplanktondichtheid tot onder de norm is gezakt wordt weer overgegaan op het normale bemonsteringsschema.

Deze huidige manier van bemonsteren lijkt een goed beschermingsniveau voor de volksgezondheid te bieden. Omdat de fytoplanktonnormen veel vaker overschreden worden dan de toxinenormen, worden echter regelmatig tijdelijke maatregelen afgekondigd voor gebieden waarin na meting van de producten blijkt dat de toxinegehalten (ver) onder de norm zijn. Dit leidt tot extra administratie voor de NVWA en verhoogde kosten voor de sector, die de aanvullende toxinemetingen zelf moet betalen.

1.3 Doel studie en onderzoeksvragen

Het doel van deze studie is om te evalueren of de huidige manier waarop de productiegebieden voor levende tweekleppige weekdieren met betrekking tot mariene toxines gemonitord en gereguleerd worden kan worden aangepast zodat het huidige beschermingsniveau voor de volksgezondheid

minimaal wordt gehandhaafd, maar dat het risico op het voorkomen van toxines in de producten op een efficiëntere manier wordt ingeschat. Hiertoe worden de volgende deelvragen beantwoord:

- Welke soorten (potentieel) toxine vormende algen geven een indicatie voor de aanwezigheid van mariene toxines in levende tweekleppige weekdieren voor Nederland?
- Welke mogelijkheden zijn er, anders dan de huidige methode voor het meten van fytoplankton, die eenzelfde (of betere) voorspellende waarde hebben voor de aanwezigheid van toxines?
- Welke normen voor (potentieel) toxinevormende algen zouden in Nederland gehanteerd moeten worden om een goede voorspelling te geven voor de aanwezigheid van toxines, zodat minimaal huidige bescherming voor de volksgezondheid gewaarborgd is?
- Op welke wijze zou het huidige monitoringsprogramma aangepast moeten worden om het risico op de vorming van (potentieel) toxinevormende algen en de daaruit voortkomende toxines beter in kaart te brengen?

2 Toxine productie door fytoplankton

2.1 Toxine productie door (marien) fytoplankton

In het mariene en estuariene milieu kan een grote diversiteit aan toxines voorkomen. Deze toxines worden geproduceerd door een even divers aantal fytoplankton soorten. Tweeekleppige weekdieren voeden zich met fytoplankton en na ingestie van toxine producerend fytoplankton kunnen deze toxines zich in tweeekleppige weekdieren ophopen. Hieronder wordt een aantal belangrijke groepen toxines (zowel de in Nederland gereguleerde als ongereguleerde toxines) en de producerende fytoplanktonsoorten geïntroduceerd. Een samenvatting van toxines en een aantal belangrijke producerende fytoplanktonsoorten staat weergegeven in Tabel 2.1.

2.1.1 Paralytisch Schelpdier Vergif (PSP)

De groep toxines die het paralytisch schelpdier vergiftiging syndroom (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) veroorzaakt bestaat uit saxitoxines (STX) en de qua structuur verwante gonyautoxines (GTX) en C-toxines. PSP's kunnen zowel door mariene/estuariene dinoflagellaten van bijvoorbeeld de geslachten *Alexandrium*, *Gymnodinium* en *Pyrodinium* worden geproduceerd [8], als door cyanobacteriën zoals *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* en *Cylindrospermopsis* [9] (zie ook paragraaf 2.1.11). *Alexandrium* komt zowel in tropische gebieden als in gematigde zones voor. In schelpdieren worden de wateroplosbare PSP's voornamelijk tijdens en na een algenbloei aangetroffen. Sommige *Alexandrium* soorten produceren cysten die naar de bodem van de zee zakken en daar overwinteren. Vanwege hun hoge toxinegehalte kunnen deze cysten ook een bron van verontreiniging voor de schelpdieren vormen.

Symptomen van PSP bij de mens variëren van tintelingen rond de lippen, tandvlees en tong en gevoelloosheid in de vingertoppen en tenen. In ernstige gevallen leidt PSP tot complete verlamming van het ademhalingsstelsel, en is het dodelijk binnen 2-12 uur na consumptie van besmet vlees. PSP komt regelmatig voor in Zuid en Noord Amerika en Azië [10-12]. Dierlijke intoxicatie komt ook voor, bijvoorbeeld de dood van landbouwhuisdieren in Australië [9] en dicht bij huis, de dood van een hond in Nederland in 2012. Deze dode hond was blootgesteld aan een intense *Alexandrium* bloei met hoge PSP concentraties in de Ouwerkerkse kreek, die dicht bij mosselweekgebieden ligt [13]. Hoewel in Nederland tot op heden geen humane PSP-vergiftigingen zijn geconstateerd, is dat wel het geval in de ons omringende landen Denemarken, Engeland en Frankrijk [14].

2.1.2 Amnesisch Schelpdier Vergif (ASP)

Domoïnezuur (DA, Domoic Acid) bestaat uit verschillende structurele varianten en is verantwoordelijk voor het amnesisch schelpdier vergiftiging syndroom (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP). DA wordt voornamelijk geproduceerd door algen van de soort *Pseudo-Nitzschia* en *Chondria armata*. Andere fytoplanktonsoorten die DA kunnen produceren zijn *Digenea simplex*, *Alsidium corallinum*, *C. baileyana*, *Amansia glomerata* en *Vidalia obtusiloba* [15]. De belangrijkste ASP producenten zijn de *Pseudo-Nitzschia* soorten.

DA veroorzaakt darmklachten, hoofdpijn en geheugenverlies (korte termijn), maar kan zelfs leiden tot coma en de dood [16]. *Pseudo-Nitzschia* komt voor in alle kustwateren van de Atlantische, de Stille en de Indische Oceaan. In Ierse king scallops (*Pecten maximus*) zijn zeer hoge ASP concentraties gevonden: 240 µg DA/g in het hele monster, en 2.820 µg DA/g in het spijsverteringsweefsel [17]. Sinds de uitbraak van ASP in 1987 op het Canadese eiland Prince Edward, waar 107 mensen leden aan darmklachten en neurotoxische verschijnselen na het eten van besmette gekweekte mosselen (er viel zelfs een aantal doden), wordt dit toxine echter goed gemonitord en zijn er sindsdien weinig humane intoxicaties [18, 19]. Wereldwijd zijn er wel geregeld intoxicaties van dieren, zoals zeevogels en zeeleeuwen, en DA wordt wereldwijd dan ook gezien als een potentieel groot en blijvend gevaar.

Tabel 2.1 Toxines en belangrijke producerende algen.

Toxinegroep	Genus	Soort	Ref
PSP's	<i>Alexandrium</i>	<i>angustitubulatum, catenella, fundyense, lusitanicum, minutum, ostenfeldii, tamarense, tamiyavanichii</i>	[20-22]
	<i>Gymnodinium</i>	<i>catenatum</i>	[20]
	<i>Pyrodinium</i>	<i>bahamense</i>	[20]
	Diverse cyanobacteriën		[23]
ASP's	<i>Pseudo-Nitzschia</i>	<i>australis, calliantha, cuspidata, delicatissima, fraudulenta, galaxiae, multiseries, multistriata, pseudodelicatissima, pungens, seriata, turgidula</i>	[15, 24]
	<i>Chondria</i>	<i>armata, baileyana</i>	[15]
	<i>Diginea</i>	<i>simplex</i>	[15]
	<i>Alsidium</i>	<i>corallinum</i>	[15]
	<i>Amansia</i>	<i>glomerata</i>	[15]
	<i>Vidalia</i>	<i>obtusiloba</i>	[15]
DSP's	<i>Dinophysis</i>	<i>acuta, acuminata, arenarium, caudata, fortii, mitra, norvegica, ovum, sacculus, rotundata, tripos</i>	[25-30]
	<i>Prorocentrum</i>	<i>arenarium, belizeanum, concavum, lima</i>	[31]
	<i>Phalacroma</i>	<i>rotundatum</i>	[32]
Yessotoxines	<i>Protoceratium</i>	<i>reticulatum</i>	[33, 34]
	<i>Lingulodinium</i>	<i>polyedrum</i>	[33]
	<i>Gonyaulax</i>	<i>polyhedra, spinifera</i>	[33, 34]
Azaspiracides	<i>Azadinium</i>	<i>dexteroporum, poporum, spinosum</i>	[35, 36]
	<i>Amphidoma</i>	<i>languida</i>	[36]
Tetrodotoxines		Waarschijnlijk bacteriële oorsprong	
NSP's	<i>Karenia</i>	<i>brevis</i>	[33, 37]
	<i>Chattonella</i>	<i>cf. verruculosa</i>	[38]
CFP's/CSP's	<i>Gambierdiscus</i>	<i>australes, balechii, belizeanus, caribeanus, carolinianus, carpenteri, excentricus, honu, lapillus, pacificus, polynesiensis, ribotype 2, scabrosus, silvae, toxicus</i>	[39]
	<i>Fukuyoa</i>	<i>ruetzleri, paulensis, yasumotoi</i>	[39]
Palytoxines	<i>Phalythoa</i>	<i>toxica, tuberculosa</i>	[40, 41]
	<i>Ostreopsis</i>	<i>heptagona, lenticularis, mascarenensis, ovata, siamensis</i>	[42]
Cyclische Imines	<i>Alexandrium</i>	<i>ostenfeldii</i>	[43]
	<i>Karenia</i>	<i>selliformis</i>	[44]
	<i>Gymnodium</i>	<i>mikimotoi</i>	[45]
	<i>Vulcanodinium</i>	<i>rugosum</i>	[46]
	<i>Prorocentrum</i>	<i>lima</i>	[46]
Cyanobacteriële toxines	Diverse genera,	diverse toxinegroepen	[23]

2.1.3 Diarrhetisch Schelpdier Vergif (DSP)

Het diarrhetisch schelpdier vergiftiging syndroom (Diarrhetic Shellfish Posining, DSP), wat zich uit in hevige diarree na het consumeren van schelpdieren, wordt toegeschreven aan twee toxinegroepen: okadaic acid (OA) en dinophysistoxines (DTX's). De pectenotoxines (PTX's) vallen vanuit historisch perspectief ook onder de groep DSP toxines, hoewel zij geen diarree veroorzaken. *Dinophysis*,

Phalacroma en *Prorocentrum* zijn de belangrijkste producenten van DSP toxines, verschillende algen van deze soorten kunnen zowel OA, PTX, als DTX produceren. Deze soorten komen het meest in Europa en Japan voor [26, 28]. Met name *Dinophysis fortii*, *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. sacculus* en *D. norvegica* kunnen OA en DTXs produceren en worden in Europese wateren aangetroffen [47-50]. In Nederland worden regelmatig hoge aantallen *D. acuminata* gevonden, maar slechts zelden detecteerbare hoeveelheden DSP toxines (zie paragraaf 4.4). Het omgekeerde komt internationaal ook vaak voor: OA/DTX toxines worden aangetroffen, maar met microscopie worden geen potentieel toxine producerende algen gezien [50]. PTX-2 kan net als OA en DTX-1 door *D. acuminata* en *D. fortii* worden geproduceerd en komt vaak in iets grotere hoeveelheden voor [49]. PTX-2 kan ook door *D. acuta* en *D. tripos* worden geproduceerd, in de laatste zelfs zonder detecteerbare hoeveelheden aan OA of DTX, maar in schelpdieren wordt het merendeel snel omgezet in het niet of nauwelijks toxische PTX-2 SA (PTX-2 seco acid) [51, 52]. De eerst beschreven intoxicatie in Nederland met OA/DTX, die meestal samen voorkomen, was in 1961 [53].

2.1.4 Yessotoxine (YTX)

Protoceratium reticulatum, *Lingulodinium polyedrum*, *Gonyaulax polyhedra* en *G. spinifera* zijn dinoflagellaten die yessotoxines (YTX's) kunnen produceren [34, 54]. Van YTX's blootstelling zijn geen humane effecten en intoxicatie incidenten bekend, maar in proefdieren vervetten hartcellen als gevolg van YTX blootstelling. Gebleken is dat wereldwijd alle *P. reticulatum* toxines produceren; met name YTX, maar ook de YTX-analogen. De profielen en de gehalten aan de YTX's verschillen echter sterk, lopend van 4,5 tot 65,0 pg/cel [55-58]. Ook is gebleken dat de alg al lang verdwenen kan zijn, terwijl de gehalten in de schelpdieren nog heel hoog zijn [59]. Van *L. polyedrum* zijn zowel toxische als niet toxische stammen geïsoleerd, en van de toxine producerende stammen variëren de hoeveelheden aan gevormde YTX's enorm [60]. Dit betekent dat of de variatie in de stammen van deze soort groot is, of dat *L. polyedrum* toxisch wordt onder bepaalde omstandigheden. In de Adriatische zee zijn verschillende keren uitbraken van *L. polyedrum* geweest, gedurende welke nooit toxische mosselen zijn aangetroffen. Ook voor *G. spinifera* geldt dat er enige variatie in toxiciteit is en dat uitbraken in de Adriatische zee nooit correleerden met toxische mosselen [60]. Sommige fytoplanktonsoorten produceren voornamelijk YTX, andere voornamelijk homoYTX. HomoYTX wordt wel vaak aangetroffen in mosselen tijdens een *G. spinifera* uitbraak, maar de gevonden gehalten zijn meestal laag.

2.1.5 Azaspiracide (AZA)

Azadinium spinosum is een relatief kleine dinoflagellaat die azaspiracide toxines (AZA's) kan produceren [61]. Ook de AZA's kunnen diarree veroorzaken. De eerst beschreven humane intoxicatie door AZA's was in Nederland en vond plaats in 1995, toen 8 mensen ziek werden na het eten van uit Ierland geïmporteerde mosselen [35]. In eerste instantie tastte men in het duister, omdat er geen bekende DSP's werden gevonden en het duurde tot 1997 voordat AZA, tot dan toe een volledig onbekende, werd ontdekt. Lange tijd werd gedacht dat *Protoperdinium crassipes* de producent van dit toxine was. Pas sinds 2009 weten we dat *A. spinosum*, een tot dan toe onbekende soort, de echte producent is [61]. Ondertussen zijn er ruim vijftig AZA's bekend, en weten we dat ook *A. dexteroporum*, *A. poporum* en *Amphidoma languida* AZA's kunnen produceren [36]. Literatuur omtrent de correlatie tussen het voorkomen van *A. spinosum* en de AZA toxines en/of besmette schelpdieren is er (nog) niet.

2.1.6 Tetrodotoxine (TTX)

Tetrodotoxine (TTX) kan worden geproduceerd door sommige bacteriën zoals *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Alteromonas*, en *Pseudoalteromonas tetraodonis*. De toxische effecten van TTX lijken op die van de STX's en ook het werkingsmechanisme van TTX lijkt op dat van de STX's: blokkade van natrium kanalen (VGSCs, Voltage Gated Sodium Channels) [62]. TTX-vergiftiging komt met name in Japan voor en besmette kogelvis is meestal de oorzaak. In de periode 2001-2007 waren er 313 TTX intoxicaties in Japan en 6% was dodelijk [63]. Kogelvis is verboden in Europa, maar de laatste jaren wordt TTX ook in Europese tweekleppige weekdieren, onder andere afkomstig uit Engeland, Griekenland en Nederland, aangetroffen [64]. In 2015, 2016 en 2017 werden in Nederland met TTX besmette oesters en mosselen gevonden, de bron van TTX in deze tweekleppige weekdieren is nog niet geïdentificeerd.

2.1.7 Neurologisch Schelpdier Vergif (NSP)

Dinoflagellaten van met name de soort *Karenia brevis* (ook bekend als *Ptychodiscus brevis* of *Gymnodinium breve*) kunnen de neurotoxische brevetoxines (PbTx's), verantwoordelijk voor het neurologisch schelpdier vergiftiging syndroom (Neurologic Shellfish Poisoning, NSP) produceren. De laatste jaren worden er echter steeds meer *Karenia* soorten gevonden die deze toxines kunnen produceren en ook ander fytoplankton, zoals *Chattonella cf. verruculosa*, kunnen PbTx's produceren [38]. PbTx's binden aan VGSCs, waardoor de natrium kanalen worden geopend en er een continue instroom van natrium in de cel plaatsvindt. PbTx blootstelling kan leiden tot tintelingen van de lippen en in de mond, overgeven, gedeeltelijke verlamming en ademhalingsproblemen. NSP lijkt dus op een mildere vorm van PSP [38, 65]. *Karenia* algenbloei gaat meestal gepaard met massale sterfte van vissen, zeevogels en zeezoogdieren [66-68]. *K. brevis* komt voor in de Golf van Mexico, Caribische zee en voor de kusten van Nieuw Zeeland, en bloei komt regelmatig en over het hele jaar voor voor de kusten van Florida en Texas (Verenigde Staten). Oesters, kokkels, mosselen en vinvis accumuleren PbTx's zonder er zelf last van te ondervinden, en in vinvis kunnen zelfs een jaar na een fytoplanktonbloei PbTx's nog worden aangetroffen. De enige beschreven gevallen van humane intoxicatie na het eten van schelpdieren vonden plaats in Nieuw Zeeland en Florida. De grootste gedocumenteerde NSP uitbraak was in Nieuw Zeeland in 1992-1993 en betrof 180 gevallen [69]. In Florida waren er twee gevallen in 1995, 3 in 1996, 2 in 2001, 4 in 2005, en 20 in 2006 [65, 70]. De PbTx concentratie in de kokkels uit 2006 was 42.900 µg PbTx-2 eq/kg, ver boven de Amerikaanse Food and Drug Administration (US-FDA) norm van 800 µg PbTx-2 eq/kg, hetgeen overeenkomt met 200 muisenheden/kg (MU, mouse units). Literatuur van na 2006 is er nauwelijks.

Het monitoren van de PbTx producerende algen heeft er in Florida voor gezorgd dat ondanks het veelvuldig voorkomen van de algen en met PbTx besmette schelpdieren en vissen, het aantal humane intoxicaties beperkt is gebleven [38]. In Florida worden gebieden gesloten als het aantal *K. brevis* cellen boven de 5.000 per liter komt (achtergrond is daar normaal zo'n 1.000 cellen per liter). Gebieden worden weer geopend als het aantal cellen weer beneden de 5.000/L is gedaald en de muizentest (Mouse BioAssay, MBA) met extracten van schelpdieren en vis negatief is, dat wil zeggen kleiner dan 200 MU/kg [71].

In Florida werkt het monitoren van *K. brevis* in combinatie met de MBA dus redelijk goed, maar het werkelijk aantal intoxicaties ligt waarschijnlijk hoger dan is gedocumenteerd. Bovendien zijn er meer soorten die PbTx's kunnen produceren en deze lijken zich meer en meer over de wereld te verspreiden. Het monitoren van de PbTx algen wordt daardoor complexer [38].

2.1.8 Ciguatera Vis en Schelpdier Vergif (CFP en CSP)

Het Ciguatera Vis Vergiftiging syndroom (Ciguatera Fish Poisoning, CFP) kenmerkt zich door maagdarfstoornissen zoals diarree, kramp, misselijkheid en overgeven, neurotoxische effecten zoals omgekeerde temperatuurgevoeligheid, spierpijn, jeuk en onscherp zien, en cardiovasculaire effecten zoals aritmie en hartstilstand. Sommige klachten kunnen jaren aanhouden [72]. De toxines die hiervoor verantwoordelijk zijn worden geproduceerd door de microalgen *Gambierdiscus* en *Fukuyoa* [39]. Ciguateratoxines worden voornamelijk aangetroffen in vis, vooral in tropische gebieden waar de algen veel voorkomen. Omdat ciguateratoxines bioaccumuleren, worden ze vooral gevonden in (grote) predatoren, zoals rode snapper, zeebaars, tand- en zaagbaars, murene en barracuda. De laatste jaren worden ciguateratoxines ook aangetroffen in giant clams (*Tridacna* sp.), bij vergiftiging spreken we in dat geval over Ciguatera Schelpdier Vergiftiging syndroom (Ciguatera Shellfish Poisoning, CSP) in plaats van CFP. In de Cariben en het Zuidzeegebied zijn CSP en CFP de voornaamste mariene vergiftigingen, met enkele tienduizenden gevallen per jaar. Wereldwijd wordt het aantal intoxicaties geschat op 50.000 tot 100.000. Van de verantwoordelijke toxines, ciguatoxines (CTX's), maiotoxines (MTX's) en gambierol toxines, is het vet oplosbare en hitte- en zuurbestendige ciguatoxine de belangrijkste [73]. De laatste decennia neemt de incidentie van CFP in de tropen toe en verspreiden zowel *Gambierdiscus* als *Fukuyoa* zich naar minder warme wateren zoals de Middellandse Zee en de Noordoostelijke Atlantische Oceaan. Als gevolg hiervan zijn enkele CFP gevallen op de Canarische eilanden en Madeira en een verdacht geval in Israël [74] gemeld. Daarnaast draagt de export van vis van Oceanië naar Europa en de VS bij aan de verdere verspreiding van deze ziekte [75, 76].

2.1.9 Palytoxine (PITx)

Palytoxines (PITx's) zijn een van de meest toxische mariene toxines. Palytoxine werd het eerst gevonden in *Palythoa toxica*, een zacht koraal [40], later werden verschillende analogen in *P. tuberculosa* aangetoond [41]. Weer andere analogen van PITx zijn aangetroffen in dinoflagellaten van het geslacht *Ostreopsis* [42, 46, 77, 78]. Deze algen worden o.a. aangetroffen in de Middellandse Zee en in Italië is met name veel onderzoek gedaan aan *O. cf. ovata*. PITx's worden wereldwijd gevonden en accumuleren in vis en schelpdieren [79, 80]. PITx's smaken bitter en metaalachtig en kunnen o.a. leiden tot spierpijn, krampen, diarree, nierfalen en ademhalingsproblemen. In ernstige gevallen kan een vergiftiging leiden tot de dood [81]. In Nederland is er één geval beschreven van een vergiftiging met PITx's, dat overigens niet gerelateerd is aan consumptie van tweekleppige weekdieren. Een gezin bestaande uit 4 personen is op de spoedeisende hulp beland nadat ze door inademing en aanraking een PITx intoxicatie hebben opgelopen. Dit gebeurde bij het schoonmaken van een zoutwateraquarium. Kokend water is gebruikt om korstanemonen te verwijderen van een steen. De toxische dampen die hierbij zijn ontstaan zijn door de gezinsleden ingeademd. De patiënt die de steen ook heeft aangeraakt kreeg direct jeukklachten die na 10 minuten verdwenen, ongeveer 4 uur later begon de patiënt zich ziek te voelen (metaalsmaak in de mond en last van hoofdpijn, misselijkheid, koude aanvallen met rillingen en klappertanden, en hevige spierkrampen door het hele lichaam). De andere gezinsleden hadden vergelijkbare klachten, maar in mindere mate. Binnen 48 uur waren de klachten weer verdwenen [82].

2.1.10 Cyclische Imines (CI)

De groep van de cyclische imines (CI's) bestaat uit verschillende soorten lipofiele mariene verbindingen: spirolides (SPX's), gymnodimines (GYM's), pinnatoxines (PnTx's), pteriatoxines (PtTx's), prorocentrolides en spiro-prorocentrimines [83, 84]. CIs worden door verschillende dinoflagellaten geproduceerd. SPX's worden voornamelijk door *Alexandrium ostenfeldii* gevormd, GYM's door *Karenia selliformis*, PnTx's door *Vulcanodinium rugosum*, en prorocentrolides door *Prorocentrum lima*. Spiro-prorocentrimines worden waarschijnlijk door *Prorocentrum* soorten geproduceerd en de producent van PtTx's is niet bekend [46]. Het aantal bekende CI's neemt toe, tot op heden zijn er 31 bekend: 14 SPX's, 4 GYM's, 7 PnTx's, 3 PtTx's, 2 prorocentrolides en 1 spiro-prorocentrimine. Daarnaast komen in schelpdieren ester derivaten van SPX's (21) en PnTx's (26) voor, deze worden waarschijnlijk gevormd door metabolisme in het schelpdier. CI's zijn neurotoxisch in proefdieren en van de SPX's en GYM's is bekend dat ze aangrijpen op de muscurinic (m) en nicotinic (n) acetylcholine receptoren (mAChR's en nAChR's) [85]. De PnTx's binden alleen aan de nAChR's [86]. De aangrijppunten van de prorocentrolides en spiro-prorocentrimines zijn onbekend. Gevallen van humane CI intoxicaties zijn niet bekend.

2.1.11 Cyanobacteriële toxines

Cyanobacteriën, ook vaak blauwalgen genoemd, kunnen zowel in zout- als in zoetwater voorkomen. De naam blauwalg is misleidend, omdat blauwalgen niet behoren tot de eucaryotische algen, maar tot de bacteriën. Veel cyanobacteriën kunnen toxines produceren, waaronder microcystines, nodularines, cylindrospermopsines, anatoxines en saxitoxines (PSP's, zie paragraaf 2.1.1). De chemische structuur en toxische werking van cyanotoxines is erg divers. Zo hebben microcystines voornamelijk een effect op de lever, maar worden ook andere organen en het zenuwstelsel aangetast, en worden sommige microcystines ervan verdacht carcinogeen te zijn [87, 88]. Nodularines lijken qua structuur op microcystines en hebben een vergelijkbare toxische werking [88]. Cylindrospermopsines zijn lever-, cel- en neurotoxisch en zijn daarnaast waarschijnlijk ook nog carcinogeen [88]. Anatoxines en saxitoxines zijn acuut neurotoxisch [88, 89].

Mens en dier kunnen ernstig ziek worden van deze cyanotoxines, het zwemmen en drinken in en van water waarin veel cyanobacteriën voorkomen, wordt dan ook sterk afgeraden. Voedselproducten zoals vis en garnalen uit aquacultuur en schelpdieren kunnen met cyanotoxines besmet raken [90].

2.2 Reguleren toxines

Voor veel van de hierboven beschreven toxines is wetgeving opgesteld over de maximaal toelaatbare concentratie in tweekleppige weekdieren. Omdat veel toxinegroepen bestaan uit meerdere, in structuur en toxiciteit vergelijkbare, toxines zijn in veel gevallen toxic equivalent factors (TEFs) vastgesteld [91, 92]. Tabel 2.2 laat zien dat de Europese normen niet altijd gelijk zijn aan die in Australië, Japan of de US en dat naar mening van de European Food Safety Authority (EFSA), die haar risicobeoordeling baseert op een dosis die leidt tot acute toxiciteit (ARfD, Acute Reference Dose), de veilige concentraties meestal lager ligt dan de in Europa gehanteerde normen. Ook individuele landen hebben soms strengere normen dan de meeste internationale normen, zo hanteert Mexico een relatief lage norm van 300 µg STX-eq/kg voor PSP toxines [93].

Voor TTX in tweekleppige weekdieren is nog geen internationale wetgeving beschikbaar, Nederland hanteert de door EFSA geadviseerde veilige concentratie van 44 µg TTX/kg als norm [94].

Voor cyanobacteriële toxines zijn geen schelpdiernormen vastgesteld, de wereld gezondheidsorganisatie (World Health Organisation, WHO) adviseert echter een acceptabele dagelijkse inname (Tolerable Daily Intake, TDI) van 0,04 µg microcystine-LR/kg lichaamsgewicht (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/microcystin.pdf).

Tabel 2.2 Internationale wetgeving voor de verschillende groepen mariene toxines.

Toxinegroep	Codex ^a	EU ^b	EFSA ^c	FSANZ ^d	Japan ^e	US-FDA ^f
PSP (µg STX-2HCl-eq/kg)	800	800	75	800	800	800
ASP (mg/kg)	20	20	4,5	20	20	20
DSP (µg OA-eq/kg)	160	160*	45	200	160	160
PTX (µg PTX2-eq/kg)	-	-	120	-	-	-
YTX (mg YTX-eq/kg)	-	3,75	3,75	-	-	-
AZA (µg AZA1-eq/kg)	160	160	30	-	160	160
TTX (µg/kg)	-	-	44	-	2000	-
NSP (µg PbTx2-eq/kg)	800	-	Meer onderzoek	800	800	800
CFP (µg CTX1B-eq/kg)	-	0	Meer onderzoek	-	0,2	0,01
PITX (µg/kg)	-	-	30	-	-	-
CI	-	-	Meer onderzoek	-	-	-
Cyanobacteriële toxines	-	-	-	-	-	-

^a[95], ^b[5, 6], ^c[96-106], ^d[107], ^e[108], ^f[109]; *Deze EU norm wordt uitgedrukt in µg OA-eq/kg en wordt berekend op basis van de concentraties OA, DTX1-3 en PTX1-2 en de bijbehorende TEFs

3 Huidige situatie monitoring

3.1 Nederlandse situatie

De Nederlandse monitoring is gebaseerd op Europese wetgeving [1, 5, 6]. In Nederland zijn productiegebieden aangewezen waarin tweekleppige weekdieren gevist en of gekweekt mogen worden (Figuur 3.1). De monitoring van deze gebieden en van de verwateringsgebieden wordt uitgevoerd in het Sanitair Schelpdier Onderzoek (SSO), een programma dat is opgezet door de NVWA met als projectleider het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Afhankelijk van het seizoen en het soort visserij worden de gebieden wekelijks tot maandelijks bemonsterd, en de aanwezigheid van *E. coli* en toxines wordt bepaald in de producten, net als de dichtheid potentieel toxine producerend fytoplankton in het water. Verder worden de monsters eenmaal per jaar geanalyseerd op chemische contaminanten. Bemonstering wordt grotendeels uitgevoerd door de overheid en voor een klein aantal gebieden door de sector. Het RIVM voert de *E. coli* tellingen uit, de fytoplankton tellingen worden uitgevoerd door Wageningen Marine Research en de toxine bepalingen in tweekleppige weekdieren worden uitgevoerd door het RIKILT, net als de bepaling van de chemische contaminanten. Productiegebieden 9 (Eems/Dollard), 16 en 17 (Westerschelde) zijn niet in gebruik en worden derhalve niet bemonsterd. Ter illustratie van de inhoud van het SSO programma, zijn de bemonsteringsschema's voor fytoplankton en tweekleppige weekdieren van 2017 opgenomen in Bijlage 1.

Figuur 3.1 Productiegebieden levende tweekleppige weekdieren in Nederland. Bron: Informatieblad NVWA, 6 maart 2017.

Het fytoplankton wordt geanalyseerd op de aanwezigheid van levende potentieel toxine producerende algen soorten. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen mogelijk PSP producerende soorten (norm: 1.000 cellen/L), mogelijk ASP producerende soorten (norm: 500.000 cellen/L) en mogelijk DSP producerende soorten (norm: 100 cellen/L). Toxinenormen zijn bepaald voor de volgende toxinegroepen: PSP's, ASP, DSP's, YTX's, AZA's en TTX (Tabel 3.1, [5, 6, 94]), deze toxines worden dan ook gemonitord in het kader van het SSO. Voor YTX's en AZA's zijn geen fytoplanktonnormen geformuleerd, hoewel deze toxines wel door fytoplankton geproduceerd worden. Voor TTX zijn ook geen fytoplankton normen beschikbaar, dit komt doordat het nog onbekend is door welk organisme TTX wordt geproduceerd in Nederland, en omdat TTX productie waarschijnlijk niet alg gerelateerd is. TTX wordt vanaf oktober 2015 gemonitord in het SSO programma.

Tabel 3.1 *Toxine normen voor tweekleppige weekdieren.*

Toxinegroep	Norm	Toxines
PSP	800 µg STX.dHCl equivalenten/kg	Saxitoxines (STX), Gonyautoxines (GTX), C-toxines
ASP	20 mg domoïnezuur/kg	Domoïnezuur (DA)
DSP	160 µg okadaic acid equivalenten/kg	Okadaic acid (OA), Dinophysistoxines (DTX), Pectenotoxines (PTX)
YTX	3,75 mg yessotoxine equivalenten/kg	Yessotoxines (YTX)
AZA	160 µg azaspiracide equivalenten/kg	Azaspiracides (AZA)
TTX*	44 µg tetrodotoxine/kg	Tetrodotoxine (TTX)

* Gemeten vanaf oktober 2015

Indien de fytoplankton tellingen en de toxinemetingen beide onder de normen liggen, wordt de monitoring uitgevoerd als vastgesteld in het SSO (fase 0). Indien in een productiegebied de fytoplankton norm wordt overschreden, gaat fase 1 in en neemt de NVWA een tijdelijke maatregel (besluit). Deze maatregel houdt in dat de producten uit het betreffende gebied niet direct in de handel mogen worden gebracht, maar dat eerst moet worden vastgesteld of het toxinegehalte onder de norm ligt. De producent kan ervoor kiezen om de eerstvolgende toxinebepaling uit het SSO af te wachten, of om zelf een aanvullende toxinebepaling uit te laten voeren. Het product wordt vrijgegeven voor de handel als aangetoond kan worden dat de toxine concentraties onder de norm liggen. Fase 1 blijft van kracht tot de fytoplankton dichtheden weer onder de norm liggen, tot die tijd moet dus elke oogst op toxines worden geanalyseerd. Als er toxine concentraties boven de norm worden aangetroffen, dan wordt het productiegebied tijdelijk gesloten voor de visserij op tweekleppige weekdieren (fase 2). Deze fase blijft van kracht totdat door twee achtereenvolgende bemonsteringen, met een minimale tussenliggende periode van 48 uur, is aangetoond dat de toxineconcentraties weer onder de norm zijn gezakt [110]. Bij een fytoplankton overschrijding hoeft alleen aanvullend gemonitord te worden op het toxine dat mogelijk door deze soorten wordt geproduceerd, bij een overschrijding van potentieel DSP producerende algen hoeft bijvoorbeeld alleen extra op de DSP toxines worden gemeten.

3.2 Situatie in omliggende landen

Om een beeld te krijgen hoe de omliggende landen omgaan met monitoring van potentieel toxine vormende algen en toxinemetingen in tweekleppige weekdieren, is contact gezocht met de nationale referentielaboratoria van België, Denemarken, Duitsland, Ierland, Noorwegen, Verenigd Koninkrijk en Zweden. Aan hen is het volgende gevraagd:

- Wordt de fytoplankton gemeenschap in uw land gemonitord, en zo ja, zijn er grenswaarden voor verschillende (groepen) fytoplankton soorten?
- Wat gebeurt er als fytoplankton dichtheden boven de grenswaarden liggen?
- Heeft u een relatie kunnen ontdekken tussen het toxinegehalte in de tweekleppige weekdieren en de aanwezigheid of dichtheid van een bepaalde fytoplankton soort?

Europese landen met een andere hydrodynamica en fytoplankton samenstelling, zoals Frankrijk, Spanje, Portugal en Italië zijn niet benaderd in deze studie.

Van de gecontacteerde nationale referentielaboratoria hebben Ierland, het Verenigd Koninkrijk en Denemarken gereageerd. In alle drie deze landen wordt de fytoplankton gemeenschap gemonitord. Echter, hoe er omgegaan wordt met de resultaten van de fytoplankton tellingen verschilt per land.

In Denemarken, waar evenals in Nederland relatief weinig toxische episodes voorkomen [111], zijn grenswaarden opgesteld voor fytoplankton. Deze grenswaarden worden niet als officiële limieten behandeld, maar als richtlijnen. Over het algemeen worden productiegebieden niet gesloten op basis van overschrijdingen van de fytoplankton grenswaarden zolang er geen grensoverschrijdende hoeveelheden toxines in de tweekleppige weekdieren worden aangetroffen. Omdat de chemische analysemethodes steeds gevoeliger zijn geworden, heeft de chemische analyse de functie van 'early warning signal' deels overgenomen van de fytoplankton monitoring. Verder wordt in Denemarken maatwerk verricht indien de omstandigheden daarom vragen. Vaak vindt hierover eerst overleg plaats tussen de Deense competente autoriteit, het nationale referentielaboratorium en de sector. Zo kan de

bemonsteringsfrequentie verhoogd worden op basis van fytoplanktontellingen, hoewel er geen fytoplanktonnormen meer gehanteerd worden. Vanwege de mogelijk snelle accumulatie van PSP's in schelpdieren en de hoge giftigheid van de toxines zijn de Denen zijn vooral erg voorzichtig als er lage concentraties PSP's in tweekleppige weekdieren worden aangetroffen, of als er potentieel PSP producerend fytoplankton aanwezig is.

Ook in Ierland worden de fytoplankton tellingen niet gebruikt om productiegebieden te sluiten. Als de *Alexandrium* dichtheid boven de 200 cellen/L uitkomt, moet het eerstvolgende monster op PSP's getest worden. In één baai zijn vaker PSP problemen, monsters afkomstig van deze baai worden wekelijks doorgemeten op PSP's, ongeacht de tellingen. Alle Ierse monsters van tweekleppige weekdieren worden standaard getest op domoïnezuur (ASP toxine) en de lipofiele toxines, waardoor de tellingen minder belangrijk zijn. Wel worden verhoogde dichtheden van *Pseudo-Nitzschia* en de aanwezigheid van *Dinophysis* gebruikt om de frequentie van de chemische analyses te verhogen. Tenslotte worden in Ierland ook de dinoflagellaten *Heterocapsa* en *Azadinium* (een potentiële azaspiracide produceerder) geteld. Omdat deze soorten met het oog moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn, worden ze beiden geteld, en de tellingen worden gebruikt om een indicatie te geven van mogelijke risico's. Tenslotte wordt de fytoplankton monitoring gebruikt om te waarschuwen over mogelijke opkomende soorten of veranderende toxine profielen.

In het Verenigd Koninkrijk zijn grenswaarden voor verschillende fytoplankton soorten opgesteld. Overschrijding van deze normen betekent dat de tweekleppige weekdieren op toxines moeten worden doorgemeten, productiegebieden worden niet gesloten op basis van tellingen. Voor *Alexandrium* is geen grenswaarde opgesteld, voor deze soort is alleen de aanwezigheid al genoeg om toxine analyses uit te voeren. De hoogte van de grenswaarden kan verschillen per regio, zo is de grenswaarde voor *Pseudo-Nitzschia* spp. lager in Schotland (50.000 cellen/L) dan in Engeland, Wales en Noord-Ierland (150.000 cellen/L). Naast de soorten waarvoor een grenswaarde is vastgesteld, wordt ook een aantal andere soorten gemonitord: de potentieel YTX producerende *Lingulodinium polyedrum* en *Protoceratium reticulatum*, *Karenia mikimotoi* (potentieel giftig voor vissen) en *Prorocentrum cordatum* (kan levergifstoffen bevatten). Net als in de andere twee besproken landen, kan ook in het Verenigd Koninkrijk de monitoringsfrequentie van zowel het fytoplankton of de tweekleppige weekdieren verhoogd worden op basis van de fytoplanktonsamenstelling.

4 Voorkomen fytoplankton en toxines

In dit hoofdstuk wordt het voorkomen van potentieel toxine producerend fytoplankton en toxines in tweekleppige weekdieren besproken, en wordt gekeken naar een eventuele relatie tussen beiden. Hierbij is zowel de Nederlandse situatie als de situatie in de ons omringende landen onderzocht.

4.1 Gebruikte datasets

De gebruikte fytoplankton data zijn afkomstig van celtellingen uitgevoerd door Wageningen Marine Research in de periode 2012-2017 (laatste telling op 21-06-2017). In de geanalyseerde database zijn de volgende soorten opgenomen: *Alexandrium* spp., *A. minutum*, *A. ostenfeldii*, *A. tamarense*, *Pseudo-Nitzschia* spp., *P-N. delicatissima*, *P-N. fraudulenta*, *P-N. pungens*, *P-N. multiseries*, *P-N. seriata*, *P-N. turgidula*, *Prorocentrum* spp., *Pr. lima*, *Pr. micans*, *Pr. minimum*, *Pr. triestinum*, *Dinophysis* spp., *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii*, *D. norvegica*, *D. rotundata*, *D. sacculus* en *Gymnodinium mikimotoi*. De tellingen zijn uitgevoerd in de productiegebieden van levende tweekleppige weekdieren in Nederland in het kader van het SSO. Voor het bepalen van het overschrijden van de fytoplanktonnorm zijn de volgende soorten gebruikt (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Gebruikte soortensamenstelling van de toxine vormende algen.

Type grenswaarde	Norm (# cellen/L)	Soorten die meetellen voor de grenswaarde
PSP vormende algen	1.000	<i>Alexandrium</i> totaal
ASP vormende algen	500.000	<i>Pseudo-Nitzschia</i> totaal
DSP vormende algen	100	<i>Prorocentrum lima</i> en <i>Dinophysis</i> totaal excl. <i>D. rotundata</i>

De toxine data zijn afkomstig van analyses uitgevoerd op het RIKILT in het kader van het SSO in de periode 2012-2017 (laatste analyse op 16-11-2017). Alleen de gereguleerde toxines zijn in deze analyses meegenomen. Alle analyses zijn uitgevoerd met behulp van vloeistofchromatografie gekoppeld aan tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS). De toxines waarop is gemeten staan vermeld in Tabel 4.2. Tenzij anders vermeld, zijn alleen de waarden die boven de actielimiet (PSP, ASP) of rapportagegrens (DSP, PTX, AZA, YTX, TTX) liggen in deze studie meegenomen (Tabel 4.2). De gebruikte database bevat analyses van 2.250 monsters, en bestaat uit analyses van mosselen (71%), oesters (13%), *Ensis* (8%) en kokkels (6%). Van minder dan 1% van de monsters is de soort niet te achterhalen vanwege incomplete registratie. Resultaten van geïmporteerde levende tweekleppige weekdieren zijn niet in deze studie meegenomen.

Tabel 4.2 Gemeten toxines in het kader van het SSO.

Toxinegroep	Actielimiet / rapportagegrens	Gemeten toxines, tussen haakjes het aantal gemeten varianten per groep
PSP	250 µg/kg	Saxitoxines (5), Gonyautoxines (10), C-toxines (4)
ASP	10 mg/kg	Domoïnezuur (2)
DSP	20 µg/kg	Okadaic acid (1), Dinophysistoxines (3), Pectenotoxines (2)
YTX	125 µg/kg	Yessotoxines (4)
AZA	10 µg/kg	Azaspiracides (3)
TTX*	20 µg/kg	Tetrodotoxines (7)

* Opgenomen in het SSO vanaf oktober 2015

4.2 Voorkomen potentieel toxine vormend fytoplankton

Van de getelde soorten zijn alleen *Alexandrium* spp., *A. ostenfeldii*, *Pseudo-Nitzschia* spp., *P-N delicatissima*, *Prorocentrum* spp., *Pr. lima*, *Pr. micans*, *Pr. minimum*, *Pr. triestinum*, *Dinophysis* spp., *D. acuminata* en *D. rotundata* aangetroffen.

In de periode 2012-2017 is het 130 maal voorgekomen dat een of meerdere fytoplanktonnormen werd overschreden, het aantal overschrijdingen wisselt erg per jaar (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Overschrijdingen van de fytoplanktonnormen in 2012-2017.

Jaar	Aantal overschrijdingen fytoplanktonnorm	Waarvan alleen PSP gerelateerde algen	Waarvan alleen ASP gerelateerde algen	Waarvan alleen DSP gerelateerde algen	Waarvan PSP en DSP gerelateerde algen	Waarvan PSP en ASP gerelateerde algen
2012	11	0	0	11	0	0
2013	2	1	0	1	0	0
2014	47	1	6	36	0	4
2015	24	0	0	23	1	0
2016	34	0	3	31	0	0
2017	12	0	8	4	0	0

Het merendeel van de overschrijdingen (107) werd veroorzaakt door potentieel DSP producerende algen (Figuur 4.1). Deze overschrijdingen waren in 96% van de gevallen toe te schrijven aan hoge dichtheden van *Dinophysis acuminata* en in 4% aan *Prorocentrum lima*. Overschrijding van de norm voor potentieel ASP producerend fytoplankton kwam in totaal 21 keer voor en werd veroorzaakt door de alg *Pseudo-Nitzschia* spp. Potentieel PSP producerende fytoplankton overschreed in totaal 7 maal de norm, 2 maal door *A. ostenfeldii* en 5 maal door *Alexandrium* spp. Een simultane overschrijding van twee fytoplankton normen kwam vijfmaal voor, namelijk viermaal voor de combinatie van potentieel PSP en ASP producerende algen, en eenmaal voor de combinatie van potentieel PSP en DSP producerende algen.

Figuur 4.1 Overschrijdingen van de fytoplanktonnorm van alle gebieden over de periode 2012-2017.

De fytoplanktonpopulatie verschilt per gebied (Bijlage 2 t/m 7), zo waren de aantallen potentieel toxine vormende algen in de Oostelijke Waddenzee laag, met slechts driemaal een overschrijding in 2017, terwijl de norm voor de potentieel DSP producerende algen in het Grevelingenmeer frequent ruim overschreden werd. Potentieel PSP producerende algen kwamen slechts sporadisch in hoge dichtheden voor: in 2014 zijn zeer hoge dichtheden (tot 24.000 cellen/L) *Alexandrium* spp waargenomen in de Noordzee en de Westelijke Waddenzee, terwijl *A. ostenfeldii* eenmaal in normoverschrijdende dichtheden voorkwam in het Grevelingenmeer (2015) en de Oosterschelde

(2013). Overschrijdingen van potentieel DSP vormende algen kwamen in alle gebieden behalve de Oostelijke Waddenzee voor, overschrijdingen van potentieel ASP vormende algen waren in de geanalyseerde periode beperkt tot de Noordzee en Waddenzee.

Een vergelijking met de fytoplanktonsamenstelling in de periode 1999-2009 levert voor potentieel PSP producerend fytoplankton een vrij consistent beeld op. In deze periode kwam PSP producerend fytoplankton sporadisch voor, maar werd de fytoplanktonnorm voor deze groep niet overschreden [112]. In 2012 vond echter een hevige *A. ostenfeldii* bloei plaats in de Ouwerkerkse Kreek, een kreek die niet tot de productiegebieden behoort maar wel afwatert op een productiegebied in de Oosterschelde. De PSP fytoplanktonnorm werd in de kreek overschreden en in de volgende jaren werd *A. ostenfeldii* nog meerdere malen aangetroffen [113].

Potentieel ASP producerend fytoplankton was ook in de periode 1999-2009 aanwezig in de Nederlandse productiegebieden, in deze periode werd in zowel de Noordzee, Waddenzee als in het deltagebied de ASP fytoplanktonnorm overschreden [112].

Potentieel DSP producerend fytoplankton kwam ook in de periode 1999-2009 in hoge dichtheden voor met normoverschrijdingen in zowel de Noordzee, Waddenzee als het deltagebied [112]. Een verschil met de dataset die in de huidige studie is gebruikt, is dat voor de periode 1999-2009 *D. rotundata* bij het potentieel DSP producerend fytoplankton is geteld. In tegenstelling tot de periode 2012-2017, zijn in de periode 1999-2009 incidenteel waarnemingen van *D. acuta* en *D. norvegica* gedaan. *D. sacculus* en *D. fortii* zijn in beide periodes niet waargenomen.

4.3 Voorkomen toxines

Van de gemeten toxines zijn alleen DSP's (achtmaal) en TTX (27 maal) boven de rapportagegrens/actielimiet aangetroffen. Van deze toxines lagen alleen de TTX concentraties soms boven de norm (tienmaal, Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Voorkomen gemeten toxines in 2012-2107.

Toxinegroep	Aantal maal aangetroffen	Waarvan boven de huidige norm
PSP	0	0
ASP	0	0
DSP	8	0
YTX	0	0
AZA	0	0
TTX*	27	10

* Opgenomen in het SSO vanaf oktober 2015

De DSP toxines die zijn aangetroffen zijn okadaic acid en het dinophysistoxine DTX2. DSP toxines zijn aangetroffen in de Noordzee (eenmaal, 34,4 µg OA equivalenten/kg, scheermessen/mesheften), de Oosterschelde (eenmaal, 63,0 µg OA equivalenten/kg, mossel) en het Veerse Meer (zesmaal, max 43,0 µg OA equivalenten/kg, mossel). Hierbij is het opvallend dat alle waarnemingen van DSP in het Veerse Meer in 2017 zijn gedaan (Figuur 4.2, zie ook paragraaf 4.4).

Figuur 4.2 DSP toxines in de Noordzee, de Oosterschelde en het Veerse Meer in de periode 2012-2017. De onderste grijze stippellijn geeft de rapportagegrens aan, de bovenste grijze stippellijn geeft de norm aan. Datapunten op de nullijn geven aan dat de concentraties in deze monsters onder de rapportagegrens liggen.

TTX is het meest frequent waargenomen toxine, terwijl deze pas vanaf 2015 is opgenomen in het SSO programma. TTX is alleen aangetroffen in de productiegebieden Oosterschelde Noord en Oost (Figuur 4.3). Het is op het moment onbekend welk organisme in de Oosterschelde verantwoordelijk is voor de productie van TTX, waarschijnlijk wordt TTX niet door algen maar door bacteriën, bijvoorbeeld van het genus *Vibrio*, geproduceerd.

Figuur 4.3 Tetrodotoxine in de Oosterschelde in de periode 2015-2017. De onderste grijze stippellijn geeft de rapportagegrens aan, de bovenste grijze stippellijn geeft de norm aan. Datapunten op de nullijn geven aan dat de concentraties in deze monsters onder de rapportagegrens liggen.

De afwezigheid van grensoverschrijdende concentraties PSP en ASP toxines in Nederlandse productiegebieden is consistent met data van voor 2012 [112, 114]. DSP toxines zijn eerder gemeten in Nederland, de laatste keren dat er DSP concentraties boven de norm zijn gevonden was in 2001, 2002 en 2003 [112, 114]. Tijdens deze episodes zijn de toxines niet met LC-MS/MS, maar met de minder specifieke rattentest (Rat Bioassay, RBA, zie paragraaf 6.2) aangetoond.

4.4 Relatie tussen het voorkomen van algen en toxines in Nederland

Zoals in paragraaf 4.3 geschetst, zijn in de Nederlandse productiegebieden in de periode 2012-2017 slechts sporadisch door algen geproduceerde toxines aangetroffen en zijn de normen voor deze groepen toxines niet overschreden. Alleen het waarschijnlijk niet door algen geproduceerde TTX is soms gevonden in concentraties boven de norm.

In de zomer en herfst van 2017 zijn in Kortgene, Veerse Meer, herhaaldelijk DSP toxines aangetroffen in concentraties beneden de norm. De algentellingen corresponderend met deze toxinemetingen waren recent en daarom nog niet opgenomen in de geanalyseerde database. Deze zijn daarom apart opgevraagd bij Wageningen Marine Research en niet opgenomen in de overige analyses in deze studie. Tijdens de periode waarin DSP toxines gevonden zijn in Kortgene, was van het potentieel DSP producerend fytoplankton alleen *D. acuminata* aanwezig. Zoals uit Figuur 4.4 blijkt, is er in dit specifieke geval een goede correlatie tussen de *D. acuminata* dichtheid en de DSP concentratie in de mosselen. De hoogst aangetroffen *D. acuminata* dichtheid was 9.500 cellen/L, de fytoplanktonnorm werd in dat geval 95 maal overschreden. De DSP concentratie vlak na deze piek bleef met maximaal 43 µg OA equivalenten/kg ruim onder de norm. Zoals verder uit Figuur 4.4 blijkt, kunnen er nog toxines in tweekleppige weekdieren worden aangetroffen nadat de fytoplanktonbloei over is. Dit maakt het vinden van correlaties tussen potentieel toxine producerende algen en toxines in tweekleppige weekdieren op basis van incidentele waarnemingen (in tegenstelling tot langdurigere episodes), lastig.

Figuur 4.4 Het voorkomen van potentieel DSP vormende algen (in dit geval alleen bestaande uit *D. acuminata*, roze driehoeken) en het voorkomen van DSP toxines (blauwe cirkels) in mosselen in de periode juli-november 2017 in Kortgene, Veerse Meer. De horizontale grijze stippellijn geeft de norm voor DSP vormende algen aan. Datapunten voor DSP toxines op de nullijn geven aan dat de concentraties in deze monsters onder de detectiegrens liggen.

Naast de bovenstaande bescheiden DSP episode, zijn DSP toxines enkele malen aangetroffen in concentraties boven de rapportagegrens, maar ook zijn er enkele waarnemingen die onder de rapportagegrens vallen. Van achttien DSP toxine waarnemingen zijn ook fytoplanktontellingen beschikbaar. Van deze achttien waarnemingen komen DSP toxines elfmaal tegelijkertijd voor met de alg *D. acuminata*, in 7 gevallen is deze algensoort afwezig (Tabel 4.5). *Dinophysis spp.* en *Prorocentrum lima*, de andere twee in de database gevonden soorten die gebruikt worden voor de berekening van totaal DSP fytoplankton, waren niet aanwezig op het moment dat DSP toxines werden gevonden. Opvallend is dat in Noordzee Noord (4 waarnemingen) en Oosterschelde Oost (2 waarnemingen, waaronder de hoogst aangetroffen concentratie) wel DSP toxines zijn gevonden, maar geen van de getelde potentieel DSP vormende algen zijn waargenomen (Tabel 4.5).

Mede omdat het voorkomen van DSP toxines in de bovenstaande gevallen incidenteel was, vergeleken met de iets langer durende episode in Kortgene in 2017, is er geen goede correlatie tussen *D. acuminata* dichtheid en de hoeveelheid DSP toxines in tweekleppige weekdieren waar te nemen (Figuur 4.5). Wel lijkt het uit deze beperkte dataset zo dat als *D. acuminata* en DSP toxines gelijktijdig voorkomen, dit pas plaatsvindt boven een dichtheid van 80 cellen/L (Figuur 4.5). Ook is het zo dat er 89 maal grensoverschrijdende dichtheden van *D. acuminata* zijn waargenomen waarbij geen DSP toxines zijn gedetecteerd.

Tabel 4.5 Al dan niet gelijktijdig voorkomen van potentieel DSP vormende algen (in dit geval alleen bestaande uit *D. acuminata*) en DSP toxines in 18 monsters waarin DSP toxines zijn gevonden en waarvan algendata beschikbaar waren in de periode 2012-2017. De gegevens van Kortgene, 2017 zijn niet in deze tabel opgenomen.

Productiegebied	# malen wel DSP toxines maar geen <i>D. acuminata</i> aangetroffen	# malen DSP toxines en <i>D. acuminata</i> samen aangetroffen
Grevelingenmeer	1	6
Noordzee Midden	0	1
Noordzee Noord	4	0
Oosterschelde Oost	2	0
Westelijke Waddenzee Noord	0	4
Totaal	7	11

Figuur 4.5 Relatie tussen het voorkomen van potentieel DSP vormende algen (in dit geval alleen bestaande uit *D. acuminata*) en het voorkomen van DSP toxines in tweekleppige weekdieren in de periode 2012-2017. De DSP episode in Kortgene, 2017 is in deze grafiek niet opgenomen. De verticale grijze stippellijn geeft de norm voor potentieel DSP vormende algen aan. Monsters waarin geen DSP toxines zijn aangetroffen zijn niet in de grafiek opgenomen.

DSP toxines zijn eerder gevonden in Nederlandse productiegebieden [112, 114]. In 2007, werden DSP toxines aangetroffen in 7 productiegebieden, zij het in concentraties onder de norm. In dit jaar was er per productiegebied een duidelijke relatie tussen het voorkomen van de toxines in tweekleppige weekdieren en potentieel DSP producerende algen [112]. Meestal lijkt *D. acuminata* in de Nederlandse situatie verantwoordelijk voor de aanwezigheid van DSP's in tweekleppige weekdieren, hoewel hoge *D. acuminata* dichtheden in 2009 niet leidden tot aantoonbare hoeveelheden DSP toxines in tweekleppige weekdieren [114]. Andersom zijn in eerdere jaren (1981, 1986, 1987 en 1989) DSP toxines gevonden bij *D. acuminata* dichtheden onder de 100 cellen/L [114]. Omdat deze testen zijn uitgevoerd met de RBA, zijn de concentraties aan DSP toxines niet bekend.

Tijdens de dichte bloei van *A. ostenfeldii* in de Ouwerkerkse Kreek in 2012 zijn hoge concentraties PSP toxines in het fytoplankton gemeten en is er waarschijnlijk een hond overleden door PSP toxine vergiftiging [13, 115]. In de Oosterschelde, waar de Ouwerkerkse Kreek op loost, zijn geen grensoverschrijdende hoeveelheden *Alexandrium* aangetroffen in deze periode, wel was er in het daaropvolgende jaar, 2013, eenmalig een hoge dichtheid van 15.000 cellen/L *Alexandrium ostenfeldii* aanwezig. In de periodes rond de *A. ostenfeldii* bloeien in de Ouwerkerkse Kreek zijn er geen PSP toxines aangetroffen in de tweekleppige weekdieren uit de Oosterschelde. Ook de incidentele hoge dichtheden *Alexandrium* spp in de Noordzee en Westelijke Waddenzee in 2014 hebben niet geleid tot detecteerbare hoeveelheden PSP toxines in tweekleppige weekdieren uit deze gebieden, net zomin als de beperkte bloeien in het Grevelingenmeer (2014 t/m 2016), waarbij de fytoplanktonnorm eenmaal overschreden werd.

Vanwege het nagenoeg afwezig zijn van toxines anders dan TTX en DSP, is het niet mogelijk om een relatie tussen algentellingen en toxineconcentraties op te stellen. Voor YTX en AZA kan deze relatie niet opgesteld worden omdat de potentieel producerende algen voor deze toxinegroepen niet gerapporteerd worden. Er kan wel worden geconcludeerd dat voor zowel PSP, ASP en DSP toxines de aanwezigheid van een norm overschrijdende hoeveelheden potentieel toxine vormende algen niet heeft geleid tot norm overschrijdende hoeveelheden toxines in de tweekleppige weekdieren in de bestudeerde periode.

4.5 Relatie tussen het voorkomen van algen en toxines in omliggende landen

In de Deense situatie is de relatie tussen het voorkomen van potentieel toxische algen en toxines in tweekleppige weekdieren meestal niet aanwezig. Uitzondering hierop is een DSP episode als gevolg van hoge dichtheden *D. acuminata* in 2006 [25]. In Ierland worden aangetroffen *Alexandrium* stammen incidenteel moleculair getest om te bepalen of ze wel of geen PSP toxines produceren. Indien toxische stammen aanwezig zijn, is er een goede correlatie tussen de *Alexandrium* celtellingen en de toxinegehalten in tweekleppige weekdieren. Ook de potentieel ASP producerende soort *Pseudo-Nitzschia* wordt moleculair getest. De correlatie tussen *Pseudo-Nitzschia* celtellingen en toxines in tweekleppige weekdieren is alleen goed als er ASP producerende stammen zijn aangetoond, maar dit is niet altijd het geval. In Ierland is er een redelijke correlatie tussen de *Dinophysis* celtellingen en het voorkomen van DSP's. In het Verenigd Koninkrijk is geen goede relatie te vinden tussen celtellingen en toxinegehalten in tweekleppige weekdieren.

5 Manieren om het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren te voorspellen

Zoals in hoofdstuk 4 beschreven, leidt de huidige regelgeving, waarin tijdelijke maatregelen kunnen worden opgelegd op basis van de aanwezigheid van potentieel toxine vormend fytoplankton, met enige regelmaat tot het afkondigen van tijdelijke maatregelen, terwijl er geen normoverschrijdingen van de bijbehorende toxines plaatsvinden. Andersom worden soms (onder de norm) DSP toxines aangetroffen in tweekleppige weekdieren zonder dat het duidelijk is welke fytoplanktonsoort daarvoor verantwoordelijk is. Het enige toxine dat boven de norm aangetroffen wordt, is TTX, waarvoor geen fytoplanktonnorm beschikbaar is. De fytoplankton tellingen dienen in het huidige beleid als waarschuwing voor het voor kunnen komen van toxines in de producten. In dit hoofdstuk worden mogelijke manieren voor het voorspellen van het voorkomen van toxines in tweekleppige weekdieren behandeld. Een aantal methodes is gebaseerd op het bepalen van het toxinegehalte in fytoplankton of tweekleppige weekdieren, verschillende manieren om toxineconcentraties te bepalen worden besproken in hoofdstuk 6. Op het bepalen van de samenstelling van het fytoplankton na, is geen van de hieronder behandelde methodes getest op geschiktheid voor de Nederlandse situatie. Om te kunnen bepalen of een methode daadwerkelijk een goede voorspellende waarde heeft, moet deze enkele jaren operationeel zijn geweest.

5.1 Bepaling samenstelling fytoplankton

Hoewel de meeste mariene toxines geproduceerd worden door fytoplankton, is het vaak moeilijk om een verband te ontdekken tussen de aanwezigheid van potentieel toxine vormend fytoplankton en toxines in tweekleppige weekdieren (zie ook hoofdstuk 4). Dit komt doordat de hoeveelheid toxine die uiteindelijk in een tweekleppig weekdier terecht komt van een aantal factoren afhangt.

Een eerste vereiste voor het ophopen van toxines in tweekleppige weekdieren is dat er toxine producerende organismen, in het geval van alle gereguleerde toxines behalve TTX is dat fytoplankton, aanwezig zijn. Toxine producerend fytoplankton moet in voldoende mate worden binnengehaald door de tweekleppige weekdieren, die vervolgens het fytoplankton opnemen of direct weer uitscheiden. Uit opgenomen en verteerde algen kunnen de toxines vrijkomen, waarna ze kunnen worden omgezet, uitgescheiden of opgeslagen.

Dit onderzoek heeft bevestigd dat ook voor de Nederlandse situatie de hoeveelheid toxine producerend fytoplankton dat door een tweekleppig dier wordt opgenomen moeilijk in is te schatten op basis van fytoplanktontellingen. Dit is te verklaren doordat:

- De samenstelling van de fytoplanktongemeenschap sterk kan variëren in ruimte en tijd, en de fytoplanktontellingen dus slechts een momentopname voor één specifieke locatie geven.
- De fytoplanktongemeenschap bestaat uit toxine producerende en niet toxine producerende soorten. Deze soorten zijn niet altijd microscopisch van elkaar te onderscheiden.
- Een fytoplanktonsoort bestaat uit verschillende stammen. Deze stammen zijn over het algemeen niet van elkaar te onderscheiden op basis van microscopie. Het toxine gehalte en de toxine samenstelling van verschillende fytoplanktonstammen kan sterk verschillen. Zo is het bijvoorbeeld van sommige cyanobacteriën en de dinoflagellaat *D. acuminata* bekend dat bepaalde stammen niet in staat zijn toxines te produceren, terwijl andere stammen van dezelfde soort dat wel kunnen [87, 116-119].
- Het toxine gehalte in de cel binnen een stam kan verschillen als gevolg van veranderende groeiomstandigheden en groeisnelheden [87, 116-118].
- Tweekleppige weekdieren een variabele hoeveelheid toxine producerend fytoplankton binnen krijgen; de fractie van het fytoplankton dat toxines bevat varieert, tweekleppige weekdieren kunnen hun filtratiesnelheid aanpassen aan de hoeveelheid fytoplankton in het water en tweekleppige weekdieren kunnen tot op bepaalde hoogte selecteren welke soorten fytoplankton ze opnemen [120, 121].

In het geval van intense lokale bloeien gedomineerd door één toxine producerende fytoplankton soort is het vaak wel mogelijk een relatie te leggen tussen fytoplanktontellingen en de hoeveelheid toxines in tweekleppige weekdieren (bijvoorbeeld [25, 122]), maar in veel gevallen is er om bovenstaande redenen geen duidelijke relatie te ontdekken voor de gereguleerde toxines, en komen zowel vals positieve als vals negatieve voorspellingen (vaak) voor.

Ook voor de niet gereguleerde toxines zijn fytoplanktontellingen niet altijd de beste voorspeller voor het voorkomen van toxines in producten. Zo is het monitoren van de algen geen optie om CFP te voorkomen. Ten eerste zijn niet alle soorten en stammen van *Gambierdiscus* en *Fukuyoa* bekend en zijn ze in het laboratorium niet allemaal even toxisch [39, 123]. Ten tweede kunnen vissen grote afstanden afleggen, het wel of niet aanwezig zijn van de algen in het water waarin ze gevangen worden zegt dus weinig over het risico dat ze besmet zijn. Het voorspellen van het voorkomen van cyanobacteriële toxines op basis van de aanwezigheid van potentieel toxische cyanobacteriën is bijvoorbeeld ook niet makkelijk, omdat de cyanobacterie stammen binnen een soort sterk verschillen in hun vermogen om toxines te produceren, en omdat deze stammen microscopisch niet te onderscheiden zijn.

5.2 Bepaling toxiciteit fytoplankton

Een van de cruciale factoren voor het voorspellen van de toxine concentraties in tweekleppige weekdieren is of het aanwezige fytoplankton toxines bevat. Zoals hierboven uitgelegd is dat niet altijd te voorspellen op basis van microscopische tellingen. Een mogelijke alternatieve of aanvullende techniek is het bepalen van de toxiciteit van het fytoplankton. Op het moment van monsternamen voor de fytoplanktontellingen zou een extra watermonster genomen kunnen worden. Dit monster kan standaard op toxines worden geanalyseerd (voor mogelijke methodes, zie hoofdstuk 6), maar er kan ook voor worden gekozen om alleen te analyseren als uit de fytoplanktontellingen blijkt dat er een bepaalde hoeveelheid potentieel toxine producerend fytoplankton aanwezig is. Na verloop van tijd kan geëvalueerd worden of de toxine concentratie in het fytoplankton een goede voorspellende waarde heeft voor de toxine concentratie in de tweekleppige weekdieren.

5.3 Bepaling van de fractie fytoplankton met toxine producerende capaciteit met behulp van moleculaire technieken

Detectie van fytoplankton soorten die in staat zijn om toxines te produceren, op basis van de genen die verantwoordelijk zijn voor toxineproductie, is in theorie een goede manier om te voorspellen of het fytoplankton toxines bevat. Dit zou een extra zekerheid geven naast de celtellingen waarin alleen potentieel toxine producerende cellen worden meegenomen. Omdat bij deze celtellingen de wel en geen toxine producerende stammen vaak niet te onderscheiden zijn, geven celtellingen meestal een te ruime schatting van het aantal toxine producerende algen. De praktijk van het bepalen van de hoeveelheid toxine producerende genen is echter vaak wat weerbarstig. Ten eerste is voor de meeste mariene toxines nog geen selectieve assay beschikbaar die gericht test op het voorkomen van de genen die corresponderen met toxine productie. Voor PSP's is een dergelijke test, gebaseerd op het gen dat correspondeert met STX productie, wel beschikbaar, de geschiktheid van deze test [124] moet nog bepaald worden.

De ontwikkeling van Polymerase Chain Reaction (PCR) assays voor het aantonen van cyanotoxine genen is verder ontwikkeld dan voor de meeste (andere) mariene toxines, en deze kits zouden een alternatief kunnen zijn voor het microscopisch tellen van de toxine producerende cellen [125]. Er zijn commercieel verkrijgbare kits die 4 voor toxine productie corresponderende genen aantonen, namelijk *mcyE* (coderend voor productie van microcystines), *ndaF* (nodularines), *cyrJ* (cylindrospermopsines) en *sxtA* (saxitoxines, PSP's). Alleen voor anatoxines zijn nog geen commerciële PCR kits verkrijgbaar. Het 16S rRNA gen kan gebruikt worden als een controle voor de aanwezigheid van cyanobacterieel DNA [126].

De relatie tussen PCR assays en het toxine gehalte in fytoplankton is voor een aantal toxines onderzocht, en varieert van redelijk tot matig [125]. Ook met deze testen kunnen vals negatieve en vals positieve resultaten verkregen worden in vergelijking met chemisch-analytische methodes [125] en het gebruik van deze methodes wordt voor cyanobacteriën nog niet aangeraden voor risicoanalyse [127]. De relatie tussen PCR assays op fytoplankton en het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren moet nog onderzocht worden.

Naar verwachting duurt het nog minimaal tien jaar voordat bovengenoemde moleculaire technieken voor de meeste gereguleerde toxines kunnen worden toegepast om aan te tonen of het fytoplankton toxines bevat. De exacte toxineconcentratie zal ook dan vaak lastig in te schatten zijn op basis van deze technieken alleen, omdat het toxinegehalte tussen toxische stammen en binnen cellen varieert (zie paragraaf 5.1).

5.4 Lage toxine concentraties in tweekleppige weekdieren als waarschuwing gebruiken

De aanwezigheid van toxines in tweekleppige weekdieren is een eenduidige indicatie voor de blootstelling van tweekleppige weekdieren aan toxine producerend fytoplankton. Als zodanig zou het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren dan ook kunnen dienen als een waarschuwing voor een opkomende fytoplanktonbloei, met verhoogde toxineconcentraties in tweekleppige weekdieren als gevolg. In het huidige beleid worden toxineconcentraties in weekdieren alleen gerapporteerd als zij boven de rapportagegrens/actielimiet liggen, en wordt fase 2 afgekondigd als de concentraties boven de norm liggen. Er zou voor gekozen kunnen worden om fase 1 in te laten gaan op het moment dat lage concentraties toxines in tweekleppige weekdieren gemeten worden in plaats van op basis van overschrijdingen van de fytoplanktonnorm.

6 Manieren om het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren en fytoplankton te bepalen

Er zijn verschillende manieren om de toxineconcentratie in een monster, of de toxiciteit ervan, te bepalen. Hieronder worden voor de gereguleerde toxines enkele soorten methodes besproken.

6.1 Chemisch-analytische methodes

Chemisch-analytische methodes, zoals LC-MS/MS en vloeistofchromatografie gekoppeld aan fluorescentie detectie (LC-FLD) worden veel gebruikt voor de identificatie en kwantificatie van mariene toxines. Over het algemeen zijn deze methodes, en zeker LC-MS/MS, erg selectief. Een nadeel is dat de meeste toxinegroepen bestaan uit vele, qua structuur op elkaar lijkende, stoffen. Vaak zijn er per toxinegroep slechts enkele standaarden beschikbaar, waardoor de analyse wordt bemoeilijkt en het risico bestaat dat bepaalde stoffen worden gemist. Ook worden met chemisch-analytische methodes de concentraties van individuele stoffen bepaald. Omdat de verschillende toxinevarianten vaak verschillen in hun toxiciteit, is de som van de individuele stoffen geen goede maat voor de toxiciteit van een monster. Daarom worden de resultaten van chemisch-analytische methodes vaak uitgedrukt toxiciteits-equivalenten, die bepaald zijn door de concentraties van de individuele componenten te vermenigvuldigen met hun TEFs.

De European Union Reference Laboratory (EURL) referentie methode voor PSP's is een tijdrovende LC-FLD methode [128]. Voor screening worden over het algemeen LC-MS/MS methodes ingezet. Uitdaging hierbij is dat de PSP groep uit meer dan 30 bekende stoffen bestaat, terwijl er maar enkele standaarden beschikbaar zijn [9]. Wettelijk gezien moeten voor PSP's alle toxinevarianten waarvoor referentiestoffen beschikbaar zijn gemeten worden [129, 130]. Naar verwachting gaat de LC-MS/MS op termijn de LC-FLD methode vervangen [131].

Voor de detectie van ASP's is vloeistofchromatografie gekoppeld aan ultraviolet detectie (LC-UV) de referentiemethode [132] en daarnaast worden LC-MS/MS methodes vaak gebruikt voor screening [131]. Voor ASP's zijn voldoende analytische standaarden en gecertificeerde referentiematerialen beschikbaar. Voor de wet moeten voor de ASP toxines het totale DA gehalte bepaald worden [129].

Voor DSP's zijn er LC-FLD methodes ontwikkeld [133, 134]. De selectiviteit van deze methodes is echter niet optimaal. De huidige EURL referentie methode voor DSP's is de LC-MS/MS [131]. Ook voor DSP's geldt dat door een gebrek aan gecertificeerde standaarden het niet mogelijk is om alle toxines uit deze groep aan te tonen. Wettelijk hoeven alleen OA, DTX1-3 en PTX1-2 gemeten te worden. AZA's en YTX's worden vaak tegelijk met de DSP's gemeten, voor deze stoffen moeten wettelijk gezien AZA1-3 en YTX, homo YTX en hun twee 45 hydroxy varianten aangetoond worden [92].

TTX wordt vaak met de LC-MS/MS gemeten. Vanwege het polaire karakter van TTX, is de TTX analyse soms geïntegreerd in bestaande PSP methodes [131]. Tot op heden zijn er 29 TTX varianten, met verschillende toxiciteiten, bekend [135]. De meeste van deze beschreven varianten lijken alleen in kogelvis voor te komen, in tweekleppige weekdieren komt voornamelijk TTX zelf voor en lijkt de vorming van metabolieten nauwelijks op te treden.

6.2 *In vivo* methodes

De muizentest (Mouse Bio Assay, MBA) is de bekendste *in vivo* assay voor het aantonen van mariene toxines. Het aantonen van DSP's gebeurde lange tijd voornamelijk met de MBA, waarbij mannelijke muizen worden geïnjecteerd met een schelpdierextract en wordt gekeken of de muizen binnen een bepaalde tijd overlijden (positieve test als binnen 24 uur 2 van de 3 muizen overlijden) [136]. Met name in Nederland is ook enige tijd een RBA gebruikt, waarbij werd gekeken of de vrouwelijke ratten die waren gevoerd met tweekleppige weekdieren binnen 16 uur diarree kregen [47]. PTX's en YTX's veroorzaken echter geen diarree in de RBA. De MBA's werken niet voor alle toxinegroepen even goed, zo presteren ze niet zo goed voor ASP's, maar zijn PSP's wel aan te tonen met de MBA. De detectielimiet van de MBA voor PSP's is 400 µg STX-eq/kg, wat de test gevoelig genoeg maakt voor de landen die een norm van 800 µg STX-eq/kg hanteren. Voor bijvoorbeeld Mexico, waar een norm van 300 µg STX-eq/kg wordt gehanteerd, is deze test te ongevoelig.

Een voordeel van dit soort *in vivo* methodes is dat ze, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de chemisch analytische methodes, als resultaat de toxiciteit van het monster geven. Een nadeel is dat het onbekend is door welke stoffen deze toxiciteit precies is veroorzaakt. De MBA en RBA zijn niet feilloos, ze zijn weinig specifiek en geven zowel vals positieven als vals negatieven. Ook worden de muizen in de MBA door middel van een injectie in de buikholte blootgesteld. Hierdoor wordt het maag-darmstelsel omzeild, wat voor sommige toxines voor compleet andere toxiciteitseffecten kan leiden dan orale blootstelling. Tenslotte wordt in veel landen het gebruik van proefdieren als niet wenselijk beschouwd.

6.3 Alternatieve methodes

Uit het bovenstaande blijkt dat zowel chemisch-analytische als *in vivo* methodes sterke en zwakke punten hebben. Een zwak punt van chemisch-analytische methodes is het onvermogen om op een directe manier de toxiciteit van een monster te bepalen. Verder zijn deze chemisch-analytische methodes vaak specifiek op een aantal stoffen gericht, waardoor nieuwe/onbekende stoffen niet altijd opgemerkt worden. Om deze en andere problemen te overkomen is er een scala aan alternatieve methodes ontwikkeld. Hieronder zal een aantal ervan besproken worden.

Er is een aantal *in vitro* cel testen beschikbaar voor het aantonen van toxines. De neuro-2a bioassay is een veelbelovende celtest die in staat is om neurotoxines, zoals PSP's en TTX, maar ook de andere mariene toxines, uitgezonderd DA, aan te tonen [9, 46, 131, 137, 138]. Dit heeft wel als keerzijde dat de test weinig specifiek is, hoewel een gerichte opwerking van het monster een indicatie kan geven van de toxinegroep die het effect heeft veroorzaakt. Verder kan de neuro-2a assay ongewenste matrix effecten (vals positieven) geven, ook ter voorkoming hiervan is een goede opwerking van het monster essentieel. Vanwege zijn gevoeligheid en capaciteit om een breed scala aan toxines te detecteren, is de neuro-2a bioassay een geschikte test om de meer specifiekere chemisch-analytische methodes te complementeren. Naast de neuro-2a bioassay is er nog een aantal *in vitro* assays beschikbaar dat op specifiekere toxinegroepen test (bijvoorbeeld [139, 140]).

Een ander type testen, gevoelig genoeg voor het aantonen van toxines in tweekleppige weekdieren, is gebaseerd op het werkingsmechanisme van het toxine. Zo is er voor PSP's, die aan de VGSCs (natrium kanalen) binden een receptorbindingsassay beschikbaar [141]. Deze test is mogelijk ook toepasbaar op TTX, dat VGSC blokkeert. Deze assay is echter niet volledig diervriendelijk, omdat de receptoren uit ratten hersenen moeten worden geïsoleerd. Daarnaast zijn ze lastig uit te voeren omdat gebruik gemaakt wordt van een radioactief ligand. Voor ASP verloopt de toxische werking via de N-methyl-D-aspartaat receptor, en op basis van dit mechanisme is een werkende receptor assay ontworpen [142]. Ook deze assay maakt echter gebruik van een radioactief ligand, wat routinematig gebruik in de weg staat. De werking van de DSP toxines OA en DTX's bestaat uit het remmen van eiwitfosfatasen. OA en DTX's kunnen dan ook worden aangetoond met een goede en gevoelige fosfatase inhibitie assay ([143], ongepubliceerde data RIKILT). Deze test is formeel goedgekeurd door het EURL als alternatieve test voor het screenen op de aanwezigheid van OA en DTX's in tweekleppige weekdieren. Voor het aantonen van AZA's, PTX's en YTX's zijn geen receptorbindingsassays

beschikbaar. Door de praktische beperkingen van de testen voor PSP's en ASP's, en de beperkte beschikbaarheid van receptorbindingsassays voor een aantal andere toxines, lijkt alleen de fosfatase inhibitie assay voor het aantonen van OA en DTX's geschikt voor screeningsdoeleinden.

Naast celtesten zijn er ook detectiemethodes ontwikkeld die gebaseerd zijn op de binding van het toxine aan een specifiek antilichaam. Dit soort testen wordt in twee uitvoeringen gemaakt: een dipstick variant (ook wel lateral flow device, LFD, genoemd, qua vormgeving en werking vergelijkbaar met een zwangerschapstest) en een variant op een well-plaat (hiervan zijn de Enzyme Linked Sorbent Assays, ELISA's, vrij bekend). Het voordeel van de dipstick testen is dat deze in het veld toegepast kunnen worden, de plaat testen worden in het laboratorium uitgevoerd, maar kunnen meerdere monsters tegelijk analyseren. Voor PSP's is een heel scala aan dergelijke testen ontwikkeld, en zijn zowel goede LFD's als geschikte ELISA's bekend. Ook voor ASP's zijn veel van dit soort testen beschikbaar [15]. Voor de DSP groep zijn er goed werkende commercieel verkrijgbare ELISA kits beschikbaar voor OA en DTX's, die deze toxines beneden de norm kunnen aantonen [50]. Ook voor het aantonen van YTX's is er een goed werkende ELISA beschikbaar [144, 145]. Tot op heden bestaan er geen goede en snel werkende immunoassays (ELISA of LFD) voor PTX's en AZA's. Hoewel wel aan de ontwikkeling gewerkt wordt [146, 147], zijn er ook voor TTX nog geen goedwerkende commercieel verkrijgbare eenvoudige tests (ELISA of LFD) beschikbaar. Goed werkende LFD methodes kunnen ingezet worden om *in situ* een snelle screening uit te voeren, terwijl ELISA's op het lab de rol van snelle screening op zich zouden kunnen nemen. Een nadeel van op antilichamen gebaseerde testen is dat de affiniteit van het antilichaam voor de verschillende toxinevarianten kan verschillen. In dat geval wordt de totale toxiciteit van de monster over- of onderschat. Bij dit type testen is het daarom gangbaar dat positieve resultaten worden bevestigd (en indien nodig ook gekwantificeerd) met chemisch-analytische methodes. Met name voor LFD's lijkt een rol weggelegd bij *in situ* screening in het geval van afkondiging van fase 2. Op het moment dat een gebied gesloten is vanwege norm overschrijdende toxine concentraties in tweekleppige weekdieren, kunnen producenten zelf met deze testen een indicatie krijgen van de toxineconcentratie in hun product. Alleen op het moment dat deze beneden de norm gezakt lijkt te zijn, hoeft dan een monster opgestuurd te worden voor chemische analyse, waardoor geld bespaard kan worden.

7 Voorstel toekomstig monitoringsprogramma

In het geval van mariene toxines in tweekleppige weekdieren, wordt het risico voor de consument bepaald door de toxineconcentratie in het product. Omdat er meestal geen goede correlatie tussen de dichtheid van potentieel toxine producerend fytoplankton en de concentratie van toxines in tweekleppige weekdieren is, moet in het toekomstig beleid het toxinegehalte in het product nog meer centraal komen te staan. Voor een optimale bescherming van de volksgezondheid zou een gevoelige en betrouwbare indicator voor het voorkomen van toxines in tweekleppige weekdieren gehanteerd moeten worden, en om bedrijfseconomische redenen zou deze indicator weinig vals positieve uitslagen moeten geven. Hieronder worden potentiële alternatieven afgewogen en wordt een voorstel gedaan voor aanpassingen aan het huidige monitoringsprogramma.

7.1 Afweging alternatieven

In het huidige beleid vormt de fytoplanktonsamenstelling, meer specifiek de dichtheid van potentieel toxine producerende soorten, de indicator voor het voorkomen van toxines in tweekleppige weekdieren. Zoals in dit rapport beschreven, is de voorspellende waarde van deze indicator echter gering.

Een betere aanpak is om niet het overschrijden van de fytoplanktonnormen, maar lage concentraties toxines in tweekleppige weekdieren te gebruiken als trigger voor fase 1. De hoogte van de toxineconcentratie die als grenswaarde wordt gehanteerd, bepaalt het beschermingsniveau voor de volksgezondheid (hoe lager de concentratie die als grenswaarde wordt gehanteerd, hoe hoger het beschermingsniveau). Aan de andere kant kan het hanteren van lage toxineconcentraties leiden tot een verhoging van het aantal vals positieve waarschuwingen, en zullen voor sommige toxinegroepen de chemische analysemethoden aangepast moeten worden om lage concentraties aan te kunnen tonen. Voor de meeste toxinegroepen lijkt een toxineconcentratie in tweekleppige weekdieren van een kwart van de norm goed hanteerbaar. Voor PSP's is een kwart van de norm de laagste haalbare concentratie met de huidige analytische methode. Voor ASP's, DSP's, YTX's en AZA's kan gevoeliger gemeten worden, maar wordt ingeschat dat een concentratie op een kwart van de norm een goede balans is tussen bescherming van de volksgezondheid en het aantal maal dat fase 1 afgekondigd moet worden. Voor TTX is een concentratie van een kwart van de norm niet altijd goed meetbaar met de huidige methode, daarom wordt voor dit toxine een triggerwaarde van een concentratie op de helft van de norm voorgesteld.

Indien de hierboven gehanteerde triggerwaarden gehanteerd worden, neemt het aantal afkondigingen van fase 1 naar verwachting af. Ter illustratie: in de periode 2012-2017 zijn PSP, ASP en DSP toxines in totaal viermaal boven de voorgestelde triggerwaarde gedetecteerd, tegenover 130 maal een normoverschrijding van potentieel PSP, ASP of DSP producerend fytoplankton (Tabel 7.1). De TTX concentratie in tweekleppige weekdieren lag in dezelfde periode 13 maal boven de voorgestelde triggerwaarde, en tienmaal boven de norm (Tabel 7.1). De voorgestelde werkwijze zal voornamelijk voor ASP en DSP toxines, soorten waarvoor in de huidige situatie wel regelmatig fytoplanktonoverschrijdingen plaatsvinden, maar waarvan in de periode 2012-2017 geen normoverschrijdingen in tweekleppige weekdieren hebben plaatsgevonden, leiden tot minder frequentere afkondigingen van fase 1. Een bijkomend voordeel is dat TTX, waarvan de producent nog niet geïdentificeerd is in de Nederlandse wateren, ook op deze manier in de monitoring opgenomen kan worden, net als YTX en AZA, waarvoor geen fytoplanktonnorm beschikbaar is. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat de voorgestelde triggerwaarde voor TTX en de TTX norm dicht bij elkaar liggen, en dat de TTX concentratie in tweekleppige weekdieren binnen een week sterk kan stijgen.

Tabel 7.1 Aantal keren dat toxineconcentraties in tweekleppige weekdieren voorkomen boven de detectielimiet, voorgestelde triggerwaarde en norm in de periode 2012-2017.

Toxinegroep	# malen boven detectielimiet en onder voorgestelde trigger waarde*	# malen boven voorgestelde trigger waarde* maar onder norm	# malen boven norm
PSP toxines	0	0	0
ASP toxines	0	1	0
DSP toxines	24	3	0
YTX's	0	0	0
AZA's	0	0	0
TTX**	37	13	10
Totaal	61	17	10

* PSP toxines: 200 µg STX.dHCl eq/kg, ASP toxines 5 mg DA eq/kg, DSP toxines: 40 µg OA eq/kg, YTX: 0,94 mg YTX eq/kg, AZA: 40 µg AZA eq/kg, TTX: 22 µg TTX/kg; ** Opgenomen in SSO vanaf oktober 2015

Door het loslaten van de fytoplanktonnormen voor potentieel PSP, ASP en DSP producerende algen en daarvoor in de plaats lage toxine concentraties in tweekleppige weekdieren te gebruiken, zal fase 1 minder vaak in werking worden gesteld en zal het risico voor de consument op norm overschrijdende toxine concentraties in tweekleppige weekdieren waarschijnlijk niet toenemen (gebaseerd op de Nederlandse monitoringsdata van 1999-2017). Onder andere in Denemarken, net als Nederland een land met overwegend bodemcultuur en relatief weinig toxische incidenten, wordt een soortgelijk beleid toegepast. Voor alle toxinegroepen geldt dat er normoverschrijding in een product kan plaatsvinden zonder dat het monster van de voorgaande week een toxine concentratie boven de triggerwaarde bevatte. De mate van bescherming van zowel de huidige situatie als de hierboven voorgestelde aanpak is moeilijk in te schatten vanwege het weinig voorkomen van toxines in tweekleppige weekdieren.

Er is vrij weinig bekend over de toxiciteit van de in Nederland voorkomende fytoplanktonsoorten, en of er een relatie bestaat tussen de toxineconcentratie in het fytoplankton en in tweekleppige weekdieren. Moleculaire technieken, zoals het bepalen van de hoeveelheid voor toxine productie corresponderende genen, zijn ontworpen om te bepalen of een fytoplanktonmonster mogelijk wel of niet toxines bevat. Het voorspellen van de toxiciteit van het fytoplankton op basis van moleculaire technieken is op het moment echter nog niet ver genoeg ontwikkeld voor potentiële toepassing in de praktijk, waarschijnlijk kan dit soort technieken op zijn vroegst pas over tien jaar worden toegepast. Toxinebepaling in het fytoplankton is het alternatief. Het vergelijken van de toxineconcentratie in fytoplankton en in tweekleppige weekdieren zal aangeven of de aanwezigheid van toxines in het fytoplankton een betere voorspellende waarde voor het voorkomen van toxines in tweekleppige weekdieren heeft dan het huidig gehanteerde dichtheid van potentieel toxische fytoplankton.

Zowel voor het huidige beleid, als een mogelijk beleid gebaseerd op het voorkomen van lage concentraties toxines in tweekleppige weekdieren, geldt dat incidenten niet te voorkomen zijn. In dit kader is het daarom ook nodig (en wettelijk verplicht) om een regelmatige fytoplanktonscreening uit te voeren. Alarmerende verschuivingen in de fytoplanktonsamenvatting zouden nog steeds de mogelijkheid moeten kunnen bieden tot het afkondigen van fase 1, ook al zijn er nog geen toxines in tweekleppige weekdieren gevonden. Ook zouden verhoogde fytoplanktondichtheden aanvullende maatregelen kunnen initiëren, zoals het bepalen van de toxiciteit van het fytoplankton of het verhogen van de monitoringsfrequentie van de tweekleppige weekdieren. Het bepalen van de toxiciteit van het fytoplankton kan uitgevoerd worden met chemisch analytische methodes (LC-MS/MS), maar ook met de neuro-2a bioassay, die gevoelig is voor alle mariene toxines, behalve DA (ASP's). Voor de ASP's zijn een receptor assay [148] en goedwerkende LFD's beschikbaar.

De bovenstaande afweging van alternatieven is gebaseerd op een analyse van de huidige Nederlandse situatie en het recente verleden. Toekomstige veranderingen, zoals het veranderen van de manier van kweken en het veranderen van de fytoplanktonsamenvatting als gevolg van klimaatverandering, verandering in de hydrologie en/of waterkwaliteit, kunnen voor veranderende risico's zorgen. Zo verschilt de fytoplanktoninname, en daarmee de mogelijke blootstelling aan toxines, van mosselen die

in hangcultuur gekweekt worden van mosselen uit bodemcultuur. Uit een vergelijking tussen het PSP gehalte in mosselen uit hang- en bodemcultuur tijdens twee opvolgende fytoplankton bloeien in de Limfjord, Denemarken, blijkt dat in dat specifieke geval de PSP concentraties in de hangcultuur vele malen hoger waren dan in de bodemcultuur [111].

Dat de fytoplanktonsamenstelling gaat veranderen als gevolg van klimaatveranderingen en andere aanpassingen aan het watersysteem is bekend, maar hoe deze verandering er uit gaan zien nog niet [149, 150]. Het is daarom zaak om alert te blijven op potentiële veranderingen in de fytoplanktonsamenstelling en de daarbij behorende toxineprofielen, zoals de opkomst van *Alexandrium* in 2012. De fytoplankton monitoring zou daarom zo vormgegeven moeten worden dat veranderingen buiten soorten die tot de 'usual suspects' behoren ook worden gesignaleerd. Dit vereist een brede screening van de aanwezige soorten. Daarnaast moeten de methodes voor het detecteren van toxines in staat zijn een breed scala aan stoffen of toxische effecten op te kunnen pikken, hiervoor zijn goede technieken (LC-MS/MS analyse en de neuro-2a bioassay) beschikbaar.

Ook is het aan te bevelen om de cyanobacteriële toxines op het netvlies te houden. Hoewel cyanobacteriën vaak in zoetwater voorkomen, zijn er ook soorten die goed gedijen in brakke of zoute milieus. Daarnaast kunnen cyanobacteriën via zoetwater in estuaria terechtkomen en door mosselen worden opgenomen. In het Verenigd Koninkrijk zijn met microcystine besmette mosselen gevonden als gevolg van een cyanobacteriebloei in de in het estuarium uitstromende rivier (persoonlijke communicatie A. Turner, Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Verenigd Koninkrijk). Ook in de Zeeuwse Delta zijn cyanobacteriën aanwezig [113] en is in een zeer beperkte screening van Nederlandse mosselen in één van de zes geteste mosselen microcystine-LR aangetroffen (mossel uit de Oosterschelde, geoogst in 2017, ongepubliceerde data RIKILT). De aanwezigheid van een bepaalde dichtheid aan potentieel toxine producerende cyanobacteriën zou een analyse op de relevante cyanobacteriële toxines kunnen triggeren.

7.2 Aanbevelingen voor aanpassing van het monitoringsprogramma

Voor de toekomstige vormgeving van het monitoringsprogramma van mariene toxines in tweekleppige weekdieren worden op basis van deze studie de volgende aanbevelingen gedaan:

Voor PSP, ASP en DSP toxines wordt aanbevolen de fytoplanktonnorm los te laten, en in plaats daarvan lage toxineconcentraties in tweekleppige weekdieren te gebruiken als trigger voor fase 1. De voorgestelde triggerconcentratie is een kwart van de huidige norm. Ook voor YTX, AZA en TTX zouden lage concentraties in tweekleppige weekdieren kunnen dienen als trigger voor fase 1, waarbij de triggerconcentratie voor TTX minimaal op de helft van de huidige norm moet liggen vanwege de gevoeligheid van de analysemethode.

Ondanks dat wordt aangeraden om de fytoplanktonnormen los te laten, dient de monitoring van de fytoplanktonsamenstelling door te gaan. Een bredere screening dan op het momenteel getelde aantal soorten is nodig om alert te blijven op soorten die niet-gereguleerde toxines produceren, en om nieuwe soorten en verschuivingen in de fytoplanktonsamenstelling waar te kunnen nemen. Onder andere cyanobacteriën dienen in de screening opgenomen te worden.

Het is aan te raden om niet gereguleerde toxines, waaronder cyanobacteriële toxines, uit voorzorg te monitoren om potentiële risico's, zoals de eerste detectie van TTX in 2015, en de vondst van onveilige TTX concentraties in 2016 en 2017, in kaart te brengen. Voor de toxines waarvan de producerende algen bekend zijn kan de toxineconcentratie van het fytoplankton of de tweekleppige weekdieren bepaald worden op het moment dat potentieel toxine producerend fytoplankton wordt waargenomen. Van toxines waarvan de producerende soorten onbekend of moeilijk waar te nemen zijn wordt aanbevolen een periodieke screening van de tweekleppige weekdieren uit te voeren, monsters kunnen bijvoorbeeld opgespaard worden en een selectie kan één- of tweemaal per jaar worden doorgemeten.

Deze screening kan uitgevoerd worden met zowel chemisch-analytische methodes, als met de op bioactiviteit gebaseerde neuro-2a bioassay.

Zowel voor het huidige beleid, als de hierboven beschreven aanpassingen, geldt dat flexibiliteit nodig is om de kans op incidenten te verlagen. Indien de situatie daar aanleiding toe geeft, zal de competente autoriteit, eventueel in overleg met het nationaal referentie laboratorium en de sector, aanvullende of afwijkende maatregelen moeten kunnen treffen. Vanwege veranderende omstandigheden is een regelmatige evaluatie van de doelmatigheid en het beschermingsniveau van het monitoringsprogramma noodzakelijk.

7.3 Aanbeveling voor nader onderzoek

De toxineconcentratie in het fytoplankton is mogelijk een efficiënte en betrouwbare indicator voor het toxinegehalte in tweekleppige weekdieren. Het lijkt daarom de moeite waard om de toxineconcentratie in het fytoplankton een aantal jaar simultaan met de fytoplanktonsamenstelling en de toxineconcentratie in tweekleppige weekdieren te bepalen om te onderzoeken of het bepalen van de fytoplanktontoxiciteit inderdaad een goede manier kan zijn om de toxineconcentratie in tweekleppige weekdieren te voorspellen. Hiervoor kunnen fytoplanktonmonsters, genomen op het moment dat er hoge dichtheden potentieel toxine producerende soorten aanwezig zijn, opgeslagen worden en enkele malen per jaar gemeten worden op de relevante toxinegroepen.

Verder is het in de toekomst wenselijk om tweekleppige weekdieren te screenen op bekende en nieuwe risico's. Na volledige validatie en internationale erkenning is het de bedoeling om de neuro-2a bioassay (gevoelig voor DSP's, YTX's, AZA's, NSP's, PSP's, CFP's/CSP's, PITx en TTX en alle analogen daarvan) hiervoor in te zetten. Om te onderzoeken of deze methode de screenende rol van de LC-MS/MS over kan nemen, is het wenselijk om beide technieken een tijd parallel te laten draaien op een subset van de SSO monsters.

Beide aanbevelingen zullen aan de NVWA worden voorgesteld als onderdeel van de wettelijke onderzoekstaken voor 2019.

8 Gebruikte afkortingen

Algemeen

EFSA	European Food Safety Authority
EURL	European Union Reference Laboratory
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand
NVWA	Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
SSO	Sanitair Schelpdier Onderzoek
US-FDA	United States Food and Drug Administration
WHO	World Health Organisation

Biologische en immunoassays, moleculaire technieken

ELISA	Enzyme Linked Sorbent Assay
LFD	Lateral Flow Device
mAChR	muscurinic Acetylcholine Receptor
MBA	Mouse Bio Assay, muizentest
MU	Mouse Units, eenheid gebruikt in de MBA
nAChR	nicotinic Acetylcholine Receptor
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBA	Rat Bio Assay, rattentest
VGSC	Voltage Gate Sodium Channel, natrium kanaal

Chemisch-analytische methodes

LC-FLD	Vloeistofchromatografie gekoppeld aan fluorescentie detectie
LC-MS/MS	Vloeistofchromatografie gekoppeld aan tandem massa spectrometrie
LC-UV	Vloeistofchromatografie gekoppeld aan ultraviolet detectie

Toxines en vergiftigingssyndromen

ARfD	Acute Reference Dose
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning, het verantwoordelijke toxine is DA
AZA	Azaspiracide
CFP	Ciguatera Fish Poisoning, de verantwoordelijke toxines zijn CTXs, MTXs en gambierol toxines
CI	Cyclische Imine, een groep verbindingen bestaande uit SPXs, GYMs, PnTx, PtTx, prorocontrolides en spiroprorocentrimines
CSP	Ciguatera Shellfish Poisoning, de verantwoordelijke toxines zijn CTXs, MTXs en gambierol toxines
CTX	Ciguatoxines, verantwoordelijk voor CFP en CSP
DA	Domoïnezuur (domoic acid), verantwoordelijk voor ASP
DSP	Diarrhetic shellfish poisoning, de DSP toxines omvatten OAs, DTXs en PTXs
DTX	Dinophysistoxine, valt onder de DSP toxines
GTX	Gonyautoxine, valt onder de PSP toxines
GYM	Gymnodimines, een CI
MTX	Maiotoxines, verantwoordelijk voor CFP en CSP
NSP	Neurologic Shellfish Poisoning, verantwoordelijke toxine is PbTx
OA	Okadaic acid, valt onder de DSP toxines
PbTx	Brevetoxines, verantwoordelijk voor NSP
PITx	Palytoxines
PnTx	Pinnatoxine, een CI
PSP	Paralytic shellfish poisoning, verantwoordelijke toxines zijn STXs, GTXs en C-toxines
PtTx	Pteriatoxine, een CI
PTX	Pectenotoxine, valt onder de DSP toxines

PTX-2 SA	Pectenotoxine 2 seco acid
SPX	Spirolides, een CI
STX	Saxitoxine, valt onder de PSP toxines
TDI	Tolerable Daily Intake, acceptabele dagelijkse inname
TEF	Toxic Equivalent Factor
TTX	Tetrodotoxine
YTX	Yessotoxine

Literatuur

1. European_Commission, *Corrigendum to Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption*. Official Journal of the European Union, 2004.
2. European_Commission, *COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, 2006.
3. European_Commission, *COMMISSION REGULATION (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, 2011.
4. European_Commission, *COMMISSION REGULATION (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, 2011.
5. European_Commission, *Corrigendum to regulation (EC) NO 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin*. Official Journal of the European Union, 2004.
6. European_Commission, *Commission Regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs*. Official Journal of the European Union, 2013.
7. Minister_van_Volksgezondheid_Welzijn_en_Sport, *Beleidsregel Warenwet TTX in levende tweekleppige weekdieren*, in *Staatscourant* 38280, Koninkrijk_der_Nederlanden. 2017.
8. Hackett, J.D., et al., *Evolution of saxitoxin synthesis in cyanobacteria and dinoflagellates*. *Molecular Biology and Evolution*, 2013. **30**(1): p. 70-78.
9. Humpage, A.R., V.F. Magalhaes, and S.M. Froscio, *Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. **397**(5): p. 1655-1671.
10. Cusick, K.D. and G.S. Saylor, *An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions*. *Marine Drugs*, 2013. **11**(4): p. 991-1018.
11. McLaughlin, J., Castrodale, L., *Paralytic Shellfish Poisoning in Juneau, Kodiak, and Haines, June 2010, State of Alaska Epidemiology*. 2010: Anchorage.
12. Nicolas, J., et al., *Marine biotoxins and associated outbreaks following seafood consumption: Prevention and surveillance in the 21st century*. *Global Food Security*, 2017. **15**: p. 11-21.
13. Burson, A., et al., *Termination of a toxic Alexandrium bloom with hydrogen peroxide*. *Harmful Algae*, 2014. **31**: p. 125-135.
14. Schlax, C., *Natuurlijke toxinen in voedingsmiddelen: Fycotoxinen, Ten Hagen en Stam bv ism Koninklijke Nederlandse Chemische Vereniging*. 2001.
15. Saeed, A.F., et al., *Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics*. *Algal Research*, 2017. **24**: p. 97-110.
16. Pulido, O.M., *Domoic acid toxicologic pathology: A review*. *Marine Drugs*, 2008. **6**(2): p. 180-219.
17. James, K.J., et al., *Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland*. *Toxicon*, 2005. **46**(8): p. 852-858.
18. Perl, T.M., et al., *An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid*. *New England Journal of Medicine*, 1990. **322**(25): p. 1775-1780.
19. Trainer, V.L. and F.J. Hardy, *Integrative monitoring of marine and freshwater harmful algae in washington state for public health protection*. *Toxins*, 2015. **7**(4): p. 1206-1234.
20. Beppu, R., et al., *Occurrence of PSP-producing dinoflagellate Alexandrium tamiyavanichii in Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan*. *Marine Pollution Bulletin*, 2008. **56**(4): p. 758-763.

21. Martin, J.L., A.R. Hanke, and M.M. LeGresley, *Long term phytoplankton monitoring, including harmful algal blooms, in the Bay of Fundy, eastern Canada*. Journal of Sea Research, 2009. **61**(1-2): p. 76-83.
22. MacKenzie, L., et al., *The dinoflagellate genus Alexandrium (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics*. Harmful Algae, 2004. **3**(1): p. 71-92.
23. Chorus, I., et al., *Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters*. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews, 2000. **3**(4): p. 323-347.
24. Bates, S. and V.L. Trainer, *The ecology of harmful diatoms*, in *Ecology on Harmful Algae*, E. Graneli and T. Turner, Editors. 2006, Springer: Berlin. p. 81-93.
25. Jørgensen, K., Andersen, P., *Relation between the concentration of Dinophysis acuminata and diarrheic shellfish poisoning toxins in blue mussels (Mytilus edulis) during a toxic episode in the Limfjord (Denmark), 2006* Journal of Shellfish Research, 2007. **26**(4): p. 1081-1087.
26. MacKenzie, L., et al., *Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in Dinophysis acuta and Dinophysis acuminata from New Zealand*. Harmful Algae, 2005. **4**(1): p. 75-85.
27. Spatharis, S., et al., *Dynamics of potentially harmful microalgae in a confined Mediterranean Gulf-Assessing the risk of bloom formation*. Harmful Algae, 2009. **8**(5): p. 736-743.
28. Ten-Hage, L., et al., *Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate Prorocentrum arenarium Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean)*. Toxicon, 2000. **38**(8): p. 1043-1054.
29. Raho, N., et al., *Morphology, toxin composition and molecular analysis of Dinophysis ovum Schütt, a dinoflagellate of the "Dinophysis acuminata complex"*. Harmful Algae, 2008. **7**(6): p. 839-848.
30. Draisci, R., et al., *First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (dinophysis fortii) related to seafood poisoning in Europe*. Toxicon, 1996. **34**(8): p. 923-935.
31. Hu, T.M., et al., *Identification of Dtx-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate Prorocentrum-Lima*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1995(5): p. 597-599.
32. Caroppo, C., R. Congestri, and M. Bruno, *On the presence of Phalacroma rotundatum in the southern Adriatic Sea (Italy)*. Aquatic Microbial Ecology, 1999. **17**(3): p. 301-310.
33. Wang, D.Z., *Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review*. Marine Drugs, 2008. **6**(2): p. 349-371.
34. Loader, J.I., et al., *Convenient large-scale purification of yessotoxin from Protoceratium reticulatum culture and isolation of a novel furanoyessotoxin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(26): p. 11093-11100.
35. Krock, B., et al., *Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea*. Harmful Algae, 2009. **8**(2): p. 254-263.
36. Rossi, R., et al., *Mediterranean Azadinium dexteroporum (Dinophyceae) produces six novel azaspiracids and azaspiracid-35: a structural study by a multi-platform mass spectrometry approach*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. **409**(4): p. 1121-1134.
37. Landsberg, J.H., L.J. Flewelling, and J. Naar, *Karenia brevis red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: Decadal advancements*. Harmful Algae, 2009. **8**(4): p. 598-607.
38. Watkins, S.M., et al., *Neurotoxic shellfish poisoning*. Marine Drugs, 2008. **6**(3): p. 431-455.
39. Litaker, R.W., et al., *Ciguatera toxicity of Gambierdiscus and Fukuyoa species from the Caribbean and Gulf of Mexico*. PLoS ONE, 2017. **12**(10).
40. Walsh, G.E. and R.L. Bowers, *A review of Hawaiian zoanthids with descriptions of three new species*. Zoological Journal of the Linnean Society, 1971. **50**(2): p. 161-180.
41. Uemura, D., et al., *Studies on palytoxins*. Tetrahedron, 1985. **41**(6): p. 1007-1017.
42. Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, and M. Forino, *Chemistry of palytoxin and its analogues*, in *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry: Second Edition*. 2015. p. 85-111.
43. Cembella, A.D., N.I. Lewis, and M.A. Quilliam, *The marine dinoflagellate Alexandrium ostenfeldii (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins*. Phycologia, 2000. **39**(1): p. 67-74.
44. Miles, C.O., et al., *Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from Karenia selliformis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(16): p. 4838-4840.

-
45. Seki, T., et al., *Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New-Zealand oysters and the dinoflagellate, Gymnodinium Sp.* Tetrahedron Letters, 1995. **36**(39): p. 7093-7096.
 46. Reverté, L., et al., *Alternative methods for the detection of emerging marine toxins: Biosensors, biochemical assays and cell-based assays.* Marine Drugs, 2014. **12**(12): p. 5719-5763.
 47. Kat, M., *Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate Dinophysis acuminata.* Antonie Van Leeuwenhoek, 1983. **49**(4-5): p. 417-27.
 48. Murata, M., et al., *Isolation and Structural Elucidation of the Causative Toxin of the Diarrhetic Shellfish Poisoning.* NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1982. **48**(4): p. 549-552.
 49. Nagai, S., et al., *Differences in the production and excretion kinetics of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 between cultures of Dinophysis acuminata and dinophysis fortii isolated from western japan.* Journal of Phycology, 2011. **47**(6): p. 1326-1337.
 50. McNamee, S.E., et al., *Distribution, occurrence and biotoxin composition of the main shellfish toxin producing microalgae within European waters: A comparison of methods of analysis.* Harmful Algae, 2016. **55**: p. 112-120.
 51. Miles, C.O., et al., *Isolation of pectenotoxin-2 from Dinophysis acuta and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities.* Toxicon, 2004. **43**(1): p. 1-9.
 52. Fabro, E., et al., *Co-occurrence of Dinophysis tripos and pectenotoxins in Argentinean shelf waters.* Harmful Algae, 2015. **42**(1): p. 25-33.
 53. Kat, M., *The occurrence of Prorocentrum species and coincidental gastrointestinal illness of mussels consumers.*, in *Toxic dinoflagellate blooms*, D. Taylor, Seliger, H.H., Editor. 1979, Elsevier: Amsterdam. p. 215-220.
 54. Bowden, B.F., *Yessotoxins - Polycyclic ethers from dinoflagellates: Relationships to diarrhetic shellfish toxins.* Toxin Reviews, 2006. **25**(2): p. 137-157.
 55. Álvarez, G., et al., *Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate Protoceratium reticulatum (Dinophyceae) in Northern Chile.* Journal of Sea Research, 2011. **65**(4): p. 427-434.
 56. Dominguez, H.J., et al., *Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications.* Toxicon, 2010. **56**(2): p. 191-217.
 57. Paz, B., et al., *Yessotoxins profile in strains of Protoceratium reticulatum from Spain and USA.* Toxicon, 2007. **50**(1): p. 1-17.
 58. Suzuki, T., et al., *Yessotoxin analogues in several strains of Protoceratium reticulatum in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2007. **1142**(2): p. 172-177.
 59. Guerrini, F., et al., *Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate Protoceratium reticulatum in batch-cultures.* Harmful Algae, 2007. **6**(5): p. 707-717.
 60. Pistocchi, R., et al., *Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic Sea - 15 Years of studies on cultured species.* Marine Drugs, 2012. **10**(1): p. 140-162.
 61. Tillmann, U., et al., *Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins.* European Journal of Phycology, 2009. **44**(1): p. 63-79.
 62. Lee, C.H. and P.C. Ruben, *Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin.* Channels, 2008. **2**(6): p. 407-412.
 63. Noguchi, T. and O. Arakawa, *Tetrodotoxin - Distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication.* Marine Drugs, 2008. **6**(2): p. 220-242.
 64. Turner, A.D., et al., *Potential Threats Posed by Tetrodotoxins in UK Waters: Examination of Detection Methodology Used in Their Control.* Marine Drugs, 2015. **13**(12): p. 7357-7376.
 65. Lombet, A., J.N. Bidard, and M. Lazdunski, *Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel.* FEBS Letters, 1987. **219**(2): p. 355-359.
 66. Landsberg, J.H., *The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms.* Reviews in Fisheries Science, 2002. **10**(2): p. 113-390.
 67. Flewelling, L.J., et al., *Brevetoxicosis: Red tides and marine mammal mortalities.* Nature, 2005. **435**(7043): p. 755-756.
 68. Trainer, V.L. and D.G. Baden, *High affinity binding of red tide neurotoxins to marine mammal brain.* Aquatic Toxicology, 1999. **46**(2): p. 139-148.

69. Todd, K., *A Review of NSP Monitoring in New Zealand in Support of a New Programme*, in *Cawthron Report*. 2002, Cawthron Institute: Nelson, New Zealand.
70. Terzagian, R., *Five clusters of Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) in Lee County, July, 2006*, in *Epi Update*. 2006, Florida Department of Health.
71. State_of_Florida, *Contingency Plan for the Control of Shellfish Potentially contaminated by Marine Biotoxin*, revised, Nov. 29. 2007.
72. Friedman, M.A., et al., *Ciguatera fish poisoning: Treatment, prevention and management*. Marine Drugs, 2008. **6**(3): p. 456-479.
73. Fuwa, H., et al., *Diverted total synthesis and biological evaluation of gambierol analogues: Elucidation of crucial structural elements for potent toxicity*. Chemistry - A European Journal, 2004. **10**(19): p. 4894-4909.
74. Rodríguez, F., et al., "Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of Gambierdiscus: Implications for future trends of ciguatera in the area". Harmful Algae, 2017. **67**: p. 131-143.
75. Dickey, R.W. and S.M. Plakas, *Ciguatera: A public health perspective*. Toxicon, 2010. **56**(2): p. 123-136.
76. Epelboin, L., et al., *Two clusters of ciguatera fish poisoning in Paris, France, related to tropical fish imported from the French Caribbean by travelers*. Journal of Travel Medicine, 2014. **21**(6): p. 397-402.
77. Lenoir, S., et al., *First evidence of palytoxin analogues from an Ostreopsis mascarenensis (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean*. Journal of Phycology, 2004. **40**(6): p. 1042-1051.
78. Ukena, T., et al., *Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002. **16**(24): p. 2387-2393.
79. Aligizaki, K., et al., *Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art*. Toxicon, 2011. **57**(3): p. 390-399.
80. Munday, R. and J. Reeve, *Risk assessment of shellfish toxins*. Toxins, 2013. **5**(11): p. 2109-2137.
81. Satoh, E., T. Ishii, and M. Nishimura, *Palytoxin-induced increase in cytosolic-free Ca²⁺ in mouse spleen cells*. European Journal of Pharmacology, 2003. **465**(1-2): p. 9-13.
82. Snoeks, L., Veenstra, J., *Een gezin met koorts na reiniging van zeeaquarium*. Ned Tijdschr Geneesk., 2012. **156**(A42000): p. 1-3.
83. Otero, A., et al., *Cyclic imines: Chemistry and mechanism of action: A review*. Chemical Research in Toxicology, 2011. **24**(11): p. 1817-1829.
84. Chatzianastasiou, M., et al., *Cyclic imines, as emerging marine toxins: Chemical properties, distribution, toxicological aspects and detection methods*. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 2011. **62**(3): p. 240-248.
85. Bourne, Y., et al., *Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(13): p. 6076-6081.
86. Selwood, A.I., et al., *Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(10): p. 6532-6542.
87. Zurawell, R.W., et al., *Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments*. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews, 2005. **8**(1): p. 1-37.
88. Pearson, L., et al., *On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin*. Marine Drugs, 2010. **8**(5): p. 1650.
89. Fawell, J.K., et al., *The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse; II anatoxin-a*. Human and Experimental Toxicology, 1999. **18**(3): p. 168-173.
90. Botana, L.M., *Seafood and Freshwater Toxins, pharmacology, physiology, and detection*. Third edition ed, ed. L.M. Botana. 2014, Boca Raton: CRC Press.
91. FAO/WHO, *Technical paper on Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs*. 2016, Rome. 108.
92. European_Commission, *COMMISSION REGULATION (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs*. Official Journal of the European Union, 2011.

93. Aune, T. *Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood*. in *X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. 2000. Guarujá, Brazil: Ponsen & Looyen.
94. &_Onderzoeksprogrammering, B.R., *Advies over de gezondheidkundige waarde van TTX in oesters en mosselen*. 2017.
95. Anon, *Standard for live and raw bivalve molluscs*, C.S. 292-2008. 2008.
96. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - azaspiracid group*. The European Food Safety Authority Journal, 2008. **723**: p. 1-52.
97. Alexander, J., et al., *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group* The European Food Safety Authority Journal, 2010. **1677**: p. 1-29.
98. Alexander, J., et al., *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group* The European Food Safety Authority Journal, 2010. **1627**: p. 1-38.
99. Alexander, J., et al., *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins)* The European Food Safety Authority Journal, 2010. **1628**: p. 1-39.
100. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - Domoic acid*. The European Food Safety Authority Journal, 2009. **1181**: p. 1-61.
101. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues*. The European Food Safety Authority Journal, 2008. **589**: p. 1-62.
102. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - palytoxin group*. The European Food Safety Authority Journal, 2009. **1393**: p. 1-38.
103. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - pectenotoxin group*. The European Food Safety Authority Journal, 2009. **1109**: p. 1-47.
104. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - saxitoxin group*. The European Food Safety Authority Journal, 2009. **1019**: p. 1-76.
105. Alexander, J., et al., *Marine biotoxins in shellfish - yessotoxin group*. The European Food Safety Authority Journal, 2008. **907**: p. 1-62.
106. Knutsen, H.K., et al., *Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods*. European Food Safety Authority Journal, 2017. **15**(4): p. n/a.
107. Anon, *Contaminants and natural toxicants*, A.N.Z.F.S. Code. 2011, Food Standards Australia New Zealand. p. Standard 1.4.1.
108. Vilariño, N., et al., *From science to policy: dynamic adaptation of legal regulations on aquatic biotoxins*, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins*, L.M. Botana, C.M. Louzao, and N. Vilariño, Editors. 2015. p. 441-483.
109. Anon, *Fish and fisheries products hazards and control guidance*. 2011, Food and Drug Administration. Chapter 6: Natural Toxins (A chemical Hazard).
110. Minister_van_Volksgezondheid_Welzijn_en_Sport, *Beleidsregels bemonsteringsplannen sanitaire monitoring*, in *Staatscourant 4853*, Koninkrijk_der_Nederlanden. 2014.
111. Jørgensen, K., Andersen, P., Thorbjørnsen, B.R., *Review of toxic episodes and management strategies in relation to Danish mussel production*, in *ICMSS*. 2009: Nantes.
112. van der Fels-Klerx, H.J., Adamse, P., Goedhart, P.W., Poelman, M., Pol-Hofstad, I.E., van Egmond, H., Gerssen, A., *Monitoring phytoplankton and marine biotoxins in production waters of the Netherlands: results after one decade*. Food additives & Contaminants: Part A, 2012. **29**(10): p. 1616-1629.
113. Kamermans, P., Blanco, A., Poelman, M., *Risico beoordeling opbloei Alexandrium ostenfeldii in het Kustlaboratorium en mitigerende maatregelen*. 2013, Imares Wageningen UR.
114. Gerssen, A., et al., *Marine Toxins: Chemistry, Toxicity, Occurrence and Detection, with Special Reference to the Dutch Situation*. Toxins, 2010. **2**(4): p. 878.
115. Meijninger, A., *Intoxicatie bij een hond door dinoflagellaten (plaagalg) na een zwempartij*. Tijdschrift voor diergeneeskunde, 2013. **6**.
116. Reguera, B., et al., *Dinophysis Toxins: Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish*. Marine Drugs, 2014. **12**(1): p. 394.
117. Tong, M., et al., *Characterization and comparison of toxin-producing isolates of Dinophysis acuminata from New England and Canada*. Journal of Phycology, 2015. **51**(1): p. 66-81.
118. Marcaillou, C., F. Mondeguer, and P. Gentien, *Contribution to toxicity assessment of Dinophysis acuminata (Dinophyceae)*. Journal of Applied Phycology, 2005. **17**(2): p. 155-160.

119. Kardinaal, W.E.A., et al., *Microcystis genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes*. Aquatic Microbial Ecology, 2007. **48**(1): p. 1-12.
120. Riisgård, H.U., *On measurement of filtration rates in bivalves—the stony road to reliable data: review and interpretation*. Marine Ecology Progress Series, 2001. **211**: p. 275-291.
121. Shumway, S.E., et al., *Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1985. **91**(1-2): p. 77-92.
122. Klöpffer, S., Scharek, R., Gerdts, G., *Diarrhetic shellfish toxicity in relation to the abundance of Dinophysis spp. in the German Bight near Helgoland*. Marine Ecology Progress Series, 2003. **259**(93-102).
123. Pisapia, F., et al., *Toxicity screening of 13 Gambierdiscus strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays*. Harmful Algae, 2017. **63**: p. 173-183.
124. Gao, Y., et al., *High specificity of a quantitative PCR assay targeting a saxitoxin gene for monitoring toxic algae associated with paralytic shellfish toxins in the Yellow Sea*. Applied and Environmental Microbiology, 2015. **81**(20): p. 6973-6981.
125. Galet, V., et al., *Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment?* Water Research, 2017. **118**: p. 227-238.
126. Baker, L., et al., *Rapid, multiplex-tandem PCR assay for automated detection and differentiation of toxigenic cyanobacterial blooms*. Molecular and Cellular Probes, 2013. **27**(5-6): p. 208-214.
127. Pacheco, A., I. Guedes, and S. Azevedo, *Is qPCR a Reliable Indicator of Cyanotoxin Risk in Freshwater?* Toxins, 2016. **8**(6): p. 172.
128. Lawrence, J.F., B. Niedzwiedek, and C. Menard, *Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study*. Journal of Aoac International, 2005. **88**(6): p. 1714-1732.
129. European_Commission, *COMMISSION REGULATION (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004*. Official Journal of the European Union, 2005.
130. European_Commission, *COMMISSION REGULATION (EC) No 1664/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures*. Official Journal of the European Union, 2006.
131. Gerssen, A., Klijnstra, M.D., *The Determination of Marine Biotoxins in Seafood*, in *Analysis of food toxins and toxicants*, Y.-C. Wong, Lewis, R.J., Editor. 2017, John Wiley & Sons Ltd.: Oxford.
132. Quilliam, M.A., et al., *High-Performance Liquid-Chromatography of Domoic Acid, a Marine Neurotoxin, with Application to Shellfish and Plankton*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1989. **36**(3): p. 139-154.
133. Sasaki, K., et al., *Fluorometric analysis of pectenotoxin-2 in microalgal samples by high performance liquid chromatography*. Natural Toxins, 1999. **7**(6): p. 241-246.
134. Yasumoto, T. and A. Takizawa, *Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1997. **61**(10): p. 1775-1777.
135. Yotsu-Yamashita, M., et al., *Effects of Specific Modifications of Several Hydroxyls of Tetrodotoxin on Its Affinity to Rat Brain Membrane*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999. **289**(3): p. 1688-1696.
136. Stabell, O.B., I. Steffenak, and T. Aune, *An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of 'diarrhetic' shellfish toxins*. Food and Chemical Toxicology, 1992. **30**(2): p. 139-144.
137. Testé, V., et al., *Comparison of changes in toxicity during growth of Anabaena circinalis (cyanobacteria) determined by mouse neuroblastoma bioassay and HPLC*. Journal of Applied Phycology, 2002. **14**(5): p. 399-407.
138. Boderó, M., et al., *Screening for the presence of lipophilic marine biotoxins in shellfish samples using the neuro-2a bioassay*. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 2017: p. 1-15.

-
139. Leira, F., et al., *Development of a F actin-based live-cell fluorimetric microplate assay for diarrhetic shellfish toxins*. Analytical Biochemistry, 2003. **317**(2): p. 129-135.
 140. Pierotti, S., et al., *A slot blot procedure for the measurement of yessotoxins by a functional assay*. Toxicon, 2007. **49**(1): p. 36-45.
 141. Ruberu, S.R., et al., *Receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins: Optimization and interlaboratory comparison*. Journal of Aoac International, 2003. **86**(4): p. 737-745.
 142. Van Dolah, F.M., et al., *A microplate receptor assay for the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, utilizing a cloned glutamate receptor*. Analytical Biochemistry, 1997. **245**(1): p. 102-105.
 143. Twiner, M.J., et al., *Structure-activity relationship studies using natural and synthetic okadaic acid/dinophysistoxin toxins*. Marine Drugs, 2016. **14**(11).
 144. Briggs, L.R., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of yessotoxin and its analogues*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(19): p. 5836-5842.
 145. Samdal, I.A., et al., *Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (Mytilus edulis)*. Toxicon, 2005. **46**(1): p. 7-15.
 146. Zhou, Y., et al., *Gold nanoparticle probe-based immunoassay as a new tool for tetrodotoxin detection in puffer fish tissues*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2010. **146**(1): p. 368-372.
 147. Thattiyaphong, A., et al., *Efficiency of a rapid test for detection of tetrodotoxin in puffer fish*. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2014. **35**(2): p. 111-119.
 148. Caillaud, A., T. Yasumoto, and J. Diogène, *Detection and quantification of maitotoxin-like compounds using a neuroblastoma (Neuro-2a) cell based assay. Application to the screening of maitotoxin-like compounds in Gambierdiscus spp.* Toxicon, 2010. **56**(1): p. 36-44.
 149. Hinder, S.L., et al., *Changes in marine dinoflagellate and diatom abundance under climate change*. Nature Climate Change, 2012. **2**(4): p. 271-275.
 150. Hallegraeff, G.M., *Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge*. Journal of Phycology, 2010. **46**(2): p. 220-235.

Ter illustratie voor de inhoud van het SSO programma staan hieronder de bemonsteringsschema's voor fytoplankton en tweekleppige weekdieren van 2017 weergegeven. In de jaren 2012-2016 zijn vergelijkbare bemonsteringsschema's gevolgd.

[illegible]

Bijlage 2 Fytoplankton Noordzee

Bijlage 3 Fytoplankton Westelijke Waddenzee

Populatiedynamiek van (potentieel) PSP, ASP en DSP producerende algen (linker kolom) in de periode 2012-2017. Grijs stippellijnen geven de grenswaarde voor de verschillende groepen algen aan. Figuur rechtsboven toont het aantal normoverschrijdingen op basis van algentellingen in dezelfde periode.

Bijlage 4 Fytoplankton Oostelijke Waddenzee

Bijlage 5 Fytoplankton Grevelingenmeer

Bijlage 6 Fytoplankton Veerse Meer

Populatie dynamiek van (potentieel) PSP, ASP en DSP producerende algen (linker kolom) in de periode 2012-2017. Grijze stippellijnen geven de grenswaarde voor de verschillende groepen algen aan. Figuur rechtsboven toont het aantal normoverschrijdingen op basis van algentellingen in dezelfde periode.

Bijlage 7 Fytoplankton Oosterschelde

Normoverschrijding algen, Oosterschelde

Populatiedynamiek van (potentieel) PSP, ASP en DSP producerende algen (linker kolom) in de periode 2012-2017. Grijze stippellijnen geven de grenswaarde voor de verschillende groepen algen aan. Figuur rechtsboven toont het aantal normoverschrijdingen op basis van algentellingen in dezelfde periode.

RIKILT Wageningen University & Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
www.wur.nl/rikilt

RIKILT-rapport 2018.002

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life

RIKILT Wageningen University & Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
www.wur.nl/rikilt

RIKILT-rapport 2018.002

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.