

## **In vitro methodes voor het detecteren van mariene toxinen in schelpdieren**

Mariene toxinen zijn schadelijke stoffen die door algen worden geproduceerd. Ze kunnen op basis van hun toxiciteit worden onderverdeeld in diarree inducerende, neurotoxische en paralytische toxinen, respectievelijk DSP's, NSP's en PSP's genoemd. Schelpdieren voeden zich door algen uit het water te filteren waardoor deze toxinen zich in schelpdieren kunnen ophopen. Het consumeren van besmette monsters kan leiden tot diarree, verlamningsverschijnselen en zelfs de dood. Om de voedselveiligheid te garanderen worden schelpdieren dan ook routinematig gecontroleerd. De officiële controle van mosselen op aanwezigheid van mariene toxinen geschiedt in veel landen nog altijd met een muizentest. Hierbij worden muizen geïnjecteerd met een schelpdierextract en het overlijden van de muis geldt als een positieve uitslag. Voor de officiële Europese monitoring (Regulation 2074/2005/EC) zijn jaarlijks 300.000 proefdieren nodig.

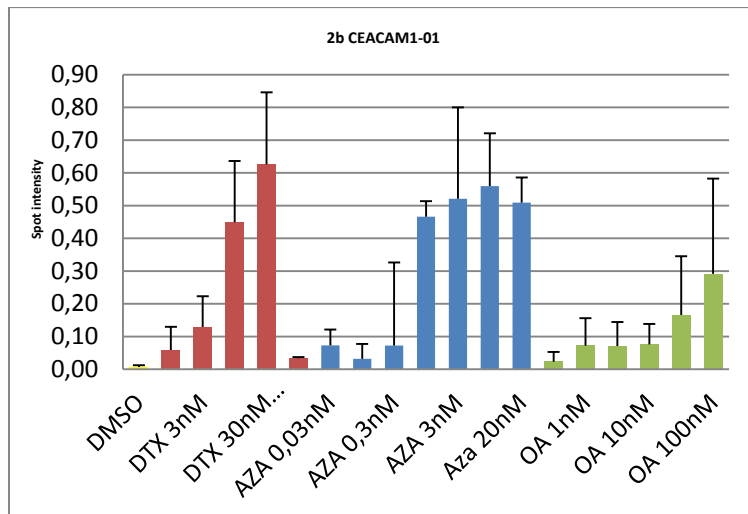
In Nederland is in 2011 overgeschakeld op een door RIKILT ontwikkelde LC/MS-methode, waarmee de meeste maar niet alle toxinen (vaak door gebrek aan standaarden) kunnen worden aangetoond [1]. Deze methode is gevalideerd in andere Europese laboratoria en mag nu officieel voor handhaving worden gebruikt (Regulation 15/2011/EC). Niet alle landen stappen over, omdat er nog altijd een risico op aanwezigheid van nog onbekende toxinen bestaat. In Nederland lijkt die kans erg klein, mede omdat er in Nederland in het verleden nauwelijks toxinen in mosselen zijn aangetoond. Maar contaminaties met toxinen zijn niet helemaal uitgesloten, zoals bleek uit een medio 2012 aangetroffen toxine-producerende dinoflagellaat in een kreek die loost op de Oosterschelde, een van de belangrijkste Nederlandse productiegebieden van mosselen. Toxine bevattende mosselen kunnen de Nederlandse markt ook bereiken via import uit het buitenland. Ook hier hebben we in 2012 in Nederland mee te maken gehad, toen een Zeeuws bedrijf een besmette partij Ierse mosselen had geïmporteerd en overgebracht naar percelen in de Oosterschelde. Consumptie van mosselen uit datzelfde Ierse gebied resulteerde in België tot enkele honderden ziektegevallen. Gezien het risico op onbekende toxinen is in de EU-regelgeving het gebruik van assays met dieren voor controle van productiegebieden ook na 2015 toegestaan. Deze dierproeven kunnen worden ondervangen door in vitro bioassays die de aanwezigheid van mariene toxinen op basis van hun werking aantonen.



### ***Een in vitro bioassay voor het aantonen van DSP's***

"In 2011 hebben we studies verricht met humane Caco-2 darmcellen die werden blootgesteld aan verschillende klassen van diarree inducerende schelpdiertoxinen (DSP's). Daarmee zijn zogenaamde genexpressieprofielen verkregen die redelijk specifiek zijn voor de verschillende klassen van toxinen. In 2011 is op basis van deze gegevens een mini-microarray methode (tube array) ontwikkeld [2] voor het detecteren van dinophysistoxine-1 (DTX1), azaspiracide-1 (AZA1) en okadazuur (OA)", aldus Ron Hoogenboom van het RIKILT. "De methode bleek echter niet snel genoeg (drie dagen). In 2012 hebben we derhalve gewerkt aan een snellere meettechniek (multiplex-PCR) om de test geschikt te maken voor de praktijk, zodat deze kan worden ingezet voor de

routinematige screening van schelpdieren. De eerste resultaten zien er belovend uit en inmiddels zijn er merkergerenen geselecteerd voor de gereguleerde (en meest relevante) DSP's, dat wil zeggen voor dinophysistoxine-1 (DTX1), azaspiracide-1 (AZA1), okadazuur (OA), yessotoxine (YTX) en pectenotoxine (PTX)."



Voorbeeld van regulatie van het CEACAM merkergeren door DTX, AZA en OA (verschillende concentraties in nM) zoals op de tube array gemeten [2].

### ***Uitbreiding bioassay-ontwikkeling naar andere toxinen (NSP's, PSP's)***

"Om de muizentest definitief te vervangen, moeten er echter nog een aantal stappen worden gemaakt", aldus Ron Hoogenboom. "Zo zullen naast de gereguleerde DSP's (DTX1, AZA1, OA, YTX en PTX) ook de andere mariene toxinen moeten worden aangetoond, zoals bijv. palytoxine (PITX), pinnatoxine (PnTX), saxitoxine (STX) en spirolide C (SPX1). STX en SPX1 zijn twee toxinen die in de kreek bij de Oosterschelde werden aangetroffen." Volgens de RIKILT-onderzoekers lieten de resultaten zien dat de Caco-2 darmcellen voor deze type mariene toxinen niet zo gevoelig waren en dat ze voor de NSP's en PSP's naar een ander cel-model moeten overstappen, bijv. een zenuwcel. "Het klopt ook wel met de verwachting dat darmcellen meer geschikt zijn voor detectie van diarree inducerende toxinen (DSP's) en zenuwcellen voor NSP's en PSP's (neurotoxisch en paralytisch)."

### ***Kloppende muizenhartcellen***

Op dit moment heeft het RIKILT samen met de Vakgroep Toxicologie van WUR een gemeenschappelijk VLAG project. Op dit project is Jonathan Nicolas als AIO aangesteld. Hij werkt met stamcellen van muizen die hij laat differentiëren tot kloppende hartcellen. Als de kloppende cellen worden blootgesteld aan neurotoxische modelstoffen, stoppen ze met kloppen. Het kloppen komt terug, als de neurotoxische stof wordt weggehaald. "Een leuke assay die hij nu ook gaat uitproberen met een aantal NSP's, PSP's en extracten van blanco mosselen en besmette mosselpartijen".

"Uiteindelijk hopen we dat in vitro bioassays voor mariene toxinen, eventueel in aanvulling op verbeterde chemisch-analytische methodes, het gebruik van de testen met muizen overbodig maakt, omdat onbekende toxines met eenzelfde werking (waarschijnlijk) ook worden gedetecteerd. Het gecombineerde gebruik van in vitro bioassays en LC/MS-methodes kan dan ook leiden tot identificatie van nog onbekende toxines", aldus Ron Hoogenboom.

Contact:



Dr. Ir. Ron Hoogenboom  
RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen UR  
E-mail: [ron.hoogenboom@wur.nl](mailto:ron.hoogenboom@wur.nl)

[1] Gerssen et al., *ABC* 397 (2010) 3079

[2] Bovee et al., *ES&T* 45 (2011) 8965-8973