



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening  
en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX DEN HAAG

Uw kenmerk  
021128-HB01

Uw brief van  
28-11-2002

Kenmerk  
CGM/050628-01

Datum  
28 juni 2005

Onderwerp  
Advies "Classificatie van toxine producerende genen"

Geachte heer Van Geel,

Hierbij bied ik u een advies aan betreffende de classificatie van toxine producerende genen, naar aanleiding van de adviesvraag (021128-HB01) van uw ministerie.

### Samenvatting

In de huidige Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen worden genen coderend voor toxines onderverdeeld in drie toxiciteitsklassen op basis van de zogenaamde LD<sub>50</sub> waarde van een toxine. In de praktijk blijkt dit criterium in veel gevallen slechts moeilijk toepasbaar te zijn. Het Ministerie van VROM heeft de COGEM daarom verzocht om de classificatie en de daarbij gehanteerde criteria te herzien. Verder moet de classificatie ook hanteerbaar zijn voor genen coderend voor toxische metabolieten.

De COGEM adviseert om de drie toxiciteitsklassen te herdefiniëren tot twee klassen. Hiervoor worden de klassen 1 en 2 samengevoegd tot klasse TK-1, klasse T-3 blijft gehandhaafd en wordt hernoemd tot TK-2.

Voor veel toxines is nog geen relevante LD<sub>50</sub> waarde bekend. Additionele criteria zouden daarom gehanteerd moeten worden om de mate van giftigheid van een toxine in te schatten. De COGEM heeft derhalve een viertal criteria opgesteld om (mogelijke) toxine producerende genen in te schalen in de toxiciteitsklasse TK-1 of TK-2. Deze criteria hebben betrekking op (1) mogelijke genotoxische of carcinogene eigenschappen, (2) de LD<sub>50</sub> waarde, (3) de letaliteit en (4) aanwijzingen voor toxiciteit, zoals irreversibele effecten of een relevante homologie.

Nadat de toxiciteitsklasse van een toxine is vastgesteld, kan het inperkingsniveau bepaald worden voor de werkzaamheden met toxines in associatie met ggo's. De COGEM adviseert werkzaamheden met TK-1 toxines overeenkomstig met de huidige inschalingen van een T-1 toxine en werkzaamheden met TK-2 toxines in overeenstemming met T-2 toxines in te schalen.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized loop followed by a horizontal line with a small dash underneath.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

cc. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

# **Classificatie van toxine producerende genen**

COGEM advies CGM/050628-01

## **Commissie Genetische Modificatie (COGEM)**

De COGEM heeft volgens de Wet milieubeheer (§ 2.3) tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van genetisch gemodificeerde organismen en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van genetische modificatie.



---

**INHOUDSOPGAVE**

<b>1. Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>2. Inleiding</b>	<b>7</b>
2.1 Toxines	7
2.2 Definitie toxines	8
2.3 Adviesvraag	9
<b>3. Toxines</b>	<b>13</b>
3.1 Eiwittoxines	13
3.2 Toxische metabolieten	14
<b>4. Classificatie toxine producerende genen</b>	<b>17</b>
4.1 Internationale classificatie	17
4.2 LD <sub>50</sub> waarde	18
4.2.1 Bepaling LD <sub>50</sub> waarde	20
4.3 Indeling toxiciteitsklassen	21
4.4 Criteria voor toxiciteitsklassen TK-1 en TK-2	22
4.5 Aanpassingen van toxiciteitsklassen	26
4.6 Regelgeving	27
4.7 Conclusie	27
<b>5. Inperkingsniveau werkzaamheden</b>	<b>29</b>
5.1 De donorsequentie	30
5.2 Gastheerorganisme	30
5.3 Conclusie	31
<b>6. Eindconclusie</b>	<b>33</b>
<b>Referenties</b>	<b>35</b>
<b>Bijlage 1:</b> Stroomschema toxiciteitklassen	41
<b>Bijlage 2:</b> Eiwittoxines	43
<b>Bijlage 3:</b> Toxische metabolieten	49
<b>Bijlage 4:</b> R-TECS Database	57
<b>Bijlage 5:</b> LD <sub>50</sub> lijsten	59
<b>Bijlage 6:</b> Mogelijke carcinogenen	65



## 1. Samenvatting

In de huidige Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (GGO) worden genen coderend voor eiwittoxines onderverdeeld in drie toxiciteitsklassen op basis van de toxiciteit (uitgedrukt in de LD<sub>50</sub> waarde) van het gevormde toxine. De toxiciteitsklassen worden gehanteerd om tot een inperkingsniveau te komen voor werkzaamheden met genen coderend voor toxines in associatie met genetisch gemodificeerde organismen. De huidige toxiciteitsklassen zijn als volgt ingedeeld:

- T-1: LD<sub>50</sub> waarde ligt tussen 1 en 100 µg/kg
- T-2: LD<sub>50</sub> waarde ligt tussen 0,1 en 1 µg/kg
- T-3: LD<sub>50</sub> waarde is kleiner of gelijk aan 0,1 µg/kg.

In de praktijk blijkt de LD<sub>50</sub> waarde in veel gevallen slechts moeilijk toepasbaar te zijn voor de inschaling van toxine producerende genen in toxiciteitsklassen. Het Ministerie van VROM heeft de COGEM daarom verzocht om deze classificatie en de daarbij gehanteerde criteria te herzien. Verder zal de classificatie ook hanteerbaar moeten zijn voor genen coderend voor toxische metabolieten. Het advies betreft daarom de inschaling van zowel de genen die coderen voor eiwittoxines als de genen coderend voor toxische metabolieten.

De COGEM adviseert om de huidige drie toxiciteitsklassen te vereenvoudigen en te herdefiniëren tot twee toxiciteitsklassen (TK). Hiervoor worden de huidige klassen T-1 en T-2 samengevoegd tot TK-1. Het combineren van de twee klassen heeft verschillende redenen. Ten eerste is de bepaling van de LD<sub>50</sub> waarde voor een toxine sterk afhankelijk van allerlei factoren. Dit kan tot gevolg hebben dat twee afzonderlijke bepalingen van de LD<sub>50</sub> waarde leiden tot verschillende waarden voor hetzelfde toxine. Mogelijk zou hierdoor het toxine afhankelijk van de gebruikte methode in klasse T-1 danwel in T-2 ingeschaald worden. Ten tweede is de COGEM van mening dat het verschil in giftigheid op basis van de LD<sub>50</sub> waarde tussen toxines van klasse T-1 en T-2 gering is. Tenslotte geven de huidige gehanteerde aanvullende maatregelen bij werkzaamheden met T-2 toxines ten opzichte van werkzaamheden met T-1 toxines geen extra bescherming.

Naast het samenvoegen van de klassen T-1 en T-2, blijft klasse T-3 gehandhaafd en wordt hernoemd tot TK-2. Dit resulteert in een herziene classificatie die als volgt is opgebouwd:

- TK-1: Toxines hebben een lichte of matige toxiciteit waarvan de LD<sub>50</sub> waarde ligt tussen 0,1 en 100 µg/kg.

- TK-2: Toxines hebben een hoge toxiciteit waarvan de LD<sub>50</sub> waarde kleiner dan of gelijk is aan 0,1 µg/kg.

Voor veel (mogelijk) toxische producten is echter nog geen (relevante) LD<sub>50</sub> waarde bekend en daarnaast is het niet altijd mogelijk om een LD<sub>50</sub> waarde te bepalen. Daarom moeten additionele criteria gehanteerd worden om de mate van toxiciteit van een schadelijk product in te schatten. In veel gevallen zijn namelijk wel aanwijzingen voorhanden dat het een schadelijk product kan betreffen. De COGEM heeft daarom een viertal criteria opgesteld om (mogelijk) toxine producerende genen in te schalen in toxiciteitsklasse TK-1 of TK-2:

1. Product bezit genotoxische of carcinogene eigenschappen.

Genen coderend voor toxines die genotoxische of carcinogene eigenschappen bezitten, dienen ingeschaald te worden in de hoogste toxiciteitsklasse (TK-2). De eigenschappen kunnen een verstoring van de genregulatie en het ontstaan van tumoren veroorzaken en is niet-dosisafhankelijk in tegenstelling tot de LD<sub>50</sub> waarde. Door het laten meewegen van dit eerste criterium bij de classificatie wordt verder gekeken dan alleen naar de acute toxiciteit.

2. LD<sub>50</sub> waarde is bekend.

Het tweede criterium wordt gehanteerd indien het toxine geen genotoxische of carcinogene eigenschappen bezit en daarnaast de LD<sub>50</sub> waarde van het toxine bekend is. Het toxine producerende gen wordt ingeschaald op basis van de LD<sub>50</sub> waarde van het product. Er dient wetenschappelijke literatuur aangeleverd te worden waaruit een realistische en relevante bepaling van de LD<sub>50</sub> waarde blijkt.

3. Product is letaal.

Indien geen LD<sub>50</sub> waarde bekend is van een product, maar er zijn wel aanwijzingen dat het product letaal is (LD<sub>100</sub> waarde), dan kan het gen coderend voor het desbetreffende product alsnog ingeschaald worden. Hiervoor wordt de volgende classificatie gehanteerd:

- Niet-toxisch: LD<sub>100</sub> waarde hoger dan 2 g/kg.
- TK-1: LD<sub>100</sub> waarde ligt tussen 100 µg/kg en 2 g/kg.
- TK-2: LD<sub>100</sub> waarde is onbekend of is kleiner of gelijk aan 100 µg/kg.

4. Aanwijzingen voor toxisch product.

Dit criterium is van toepassing als voor een product de bovenstaande criteria niet bekend zijn, maar er wel aanwijzingen zijn dat het een toxisch product betreft. Deze aanwijzingen kunnen bijvoorbeeld het ontstaan van irreversibele effecten na blootstelling aan het product betreffen. Genen



coderend voor een dergelijk product dienen ingeschaald te worden op TK-1 niveau. Een andere aanwijzing kan betrekking hebben op een onbekende sequentie die gekloneerd wordt uit een donororganisme dat toxines produceert. Indien de toxiciteitsklasse van het gen coderend voor dit toxine niet bekend is, dient de onbekende sequentie op TK-1 geclassificeerd te worden. Is de toxiciteitsklasse wel bekend, dan wordt de onbekende sequentie ingeschaald in dezelfde klasse als het reeds bekende toxine producerende gen. Tenslotte kan de te kloneren sequentie een relevante homologie vertonen met een sequentie van een reeds bekend toxinegen. Indien de toxiciteitsklasse van dit toxinegen bekend is, zal het te kloneren gen in dezelfde klasse ingeschaald worden. Is de klasse echter onbekend, dan zal het te kloneren gen op TK-1 geclassificeerd worden. Deze manier van inschalen wordt ook gehanteerd indien een (mogelijk) toxine een structurele verwantschap vertoont met een reeds bekend toxine.

Nadat de toxiciteitsklasse van een gen coderend voor een toxine is vastgesteld, kunnen de inperkingsmaatregelen bepaald worden voor werkzaamheden met toxines in associatie met ggo's. De COGEM adviseert dat werkzaamheden met een TK-1 toxine op inperkingsniveau ML-II dienen plaats te vinden, overeenkomstig met de huidige T-1 toxines. Werkzaamheden met TK-2 toxines moeten op ML-III niveau uitgevoerd worden. Een hoger inperkingsniveau biedt in deze situatie geen extra bescherming aan de medewerker en het milieu. De werknemer is in een ML-III werkruimte volledig beschermd door middel van het gebruik van handschoenen en een klasse 2 veiligheidskabinet.

In sommige situaties is het denkbaar dat het inperkingsniveau omlaag geschaald kan worden zoals reeds het geval is in de huidige Regeling GGO. Bij de omlaagschaling van het inperkingsniveau voor werkzaamheden dient de veiligheid van de werknemer en het milieu altijd voorop te staan.

De COGEM wil er met nadruk op wijzen dat de gehanteerde classificatie betrekking heeft op werkzaamheden met toxines in associatie met ggo's en niet op wildtype biologische agentia.



## 2. Inleiding

Werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) worden gereguleerd met behulp van inschalingsvoorschriften die opgenomen zijn in de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (Regeling GGO) (1). De werkzaamheden dienen onder het juiste inperkingsniveau plaats te vinden. Dit niveau is afhankelijk van de risico's die de werkzaamheden met zich meebrengen.

Een onderdeel van de Regeling GGO heeft betrekking op de regulering van werkzaamheden waarbij (mogelijk) toxine producerende genen in een gastheer gekloneerd worden. Tevens worden de werkzaamheden gericht op het tot expressie brengen van toxines op deze manier gereguleerd. Voor de bepaling van een passend inperkingsniveau voor de werkzaamheden speelt de acute giftigheid van een toxine een belangrijke rol. Op basis van de acute giftigheid wordt het gen coderend voor het desbetreffende toxine ingedeeld in één van de drie toxiciteitsklassen. Via deze classificatie komt de uiteindelijke inschaling van de werkzaamheden tot stand.

In de praktijk blijkt dat de acute giftigheid als criterium voor de classificatie van toxinegenen slechts moeizaam toegepast kan worden. Het ministerie van VROM heeft de COGEM daarom verzocht om deze methode te herzien. De classificatie zal ook hanteerbaar moeten zijn voor genen die betrokken zijn bij de vorming van toxische metabolieten.

Het onderhavige advies is tot stand gekomen op basis van literatuuronderzoek en raadplegingen van zowel leden van de COGEM als externe deskundigen. Tevens heeft op 11 juni 2004 een hoorzitting plaatsgevonden, waarbij de inschaling van toxines met deskundigen is besproken.

### 2.1 Toxines

Veel organismen zijn in staat om een diversiteit aan stoffen te produceren die voor andere organismen giftig zijn. Deze natuurlijk geproduceerde giftige stoffen worden toxines genoemd (2). Eén van de belangrijkste functies van een toxine is om het organisme te beschermen tegen andere concurrerende of vijandige organismen. Ook het creëren van een niche voor de gastheer en het verkrijgen van essentiële voedingsstoffen kunnen tot de functie van een toxine behoren. In de natuur komen vele soorten toxines voor, afkomstig van onder andere bacteriën, schimmels, geleedpotigen, vissen, slangen en planten, elk met hun eigen werkingsmechanisme (2;3). Enkele bekende toxines zijn ricine

(planten), het difterietoxine (*Corynebacterium diphtheriae*), het botulisme toxine (*Clostridium botulinum*) en aflatoxines (*Aspergillus* soorten) (2;3;4). Toxines kunnen onderverdeeld worden in eiwitten en metabolieten. Eiwittoxines zijn genproducten die toxisch zijn, terwijl toxische metabolieten tot stand komen onder invloed van diverse genproducten. Toxische metabolieten worden gevormd door het secundaire metabolisme. Dit metabolisme vormt verbindingen (secundaire metabolieten) die niet direct essentieel zijn voor het voortleven (groei en ontwikkeling) van een organisme.

Toxines kunnen na opname door een organisme schade aan diens gezondheid veroorzaken. Opname in het lichaam kan plaatsvinden via inademing (inhalatie), door inslikken (oraal), via de huid (dermaal) of door prikincidenten in bloedvaten (intraveneus) of spieren (intramusculair). Afhankelijk van het toxine kunnen de gezondheidseffecten direct of vertraagd zichtbaar worden met plaatselijke of algemene effecten. Bij hogere organismen, zoals de mens, kunnen effecten optreden aan de ogen, huid, slijmvliezen, zenuwcellen of inwendige organen afhankelijk van de eigenschap van het toxine en de manier van blootstelling. De ernst van de effecten kan beperkt blijven tot lichte irritatie, maar kan ook leiden tot verlamingsverschijnselen en de dood (5).

## 2.2 Definitie toxine

Een correcte en algemeen aanvaarde definitie van de begrippen toxine en toxiciteit is essentieel voor het opstellen van criteria voor toxiciteitsklassen. Er worden veel verschillende omschrijvingen voor het begrip toxiciteit gehanteerd, maar de meeste definities zijn vaak toegespitst op een bepaald doel of werkerrein en zijn daardoor onvolledig (2;3;5-7). De door de COGEM geraadpleegde deskundigen zijn van mening dat de definitie voor het begrip toxiciteit volgens de 'Canadian Environmental Protection Act' het best toepasbaar is (8). Deze Canadese definitie heeft betrekking op zowel substanties als levende micro-organismen en richt zich voornamelijk op het milieu. Om tot een correcte definitie voor het begrip toxine te komen, die zich beperkt tot eiwitachtige substanties en toxische metabolieten in relatie tot mens en milieu, heeft de COGEM de definitie als volgt aangepast en geherformuleerd.

Een natuurlijk geproduceerde verbinding is een toxine, indien deze in het milieu, in een hoeveelheid of concentratie, of onder condities:

- a – een gevaar vormt of zal vormen voor het menselijk leven of voor de gezondheid, of

- b – een onmiddellijk, of op lange termijn, schadelijk effect heeft of zal hebben op het milieu of biodiversiteit, of
- c – een gevaar vormt of zal vormen voor het milieu of omgeving waarvan het leven afhankelijk is.

Onder de begrippen gevaar en schadelijke effecten, zoals gebruikt in de definitie, wordt verstaan: “*leidend tot irreversibele effecten*”.

De meest gangbare indicatie van toxiciteit is de zogenaamde 50% letale dosis ( $LD_{50}$ ), welke voor het eerst in 1927 door J.W. Trevan beschreven is (9). De  $LD_{50}$  test is ontwikkeld om de giftigheid van stoffen onderling te kunnen vergelijken op basis van de letaliteit van de stof. De  $LD_{50}$  waarde geeft de dosis weer die na eenmalige toediening leidt tot de dood van de helft van de aan de toxinedosis blootgestelde proefdieren. Hierbij wordt alleen de acute toxiciteit bepaald, aangezien de duur van de observatieperiode maximaal twee weken na eenmalige toediening is.

Om onduidelijkheid te voorkomen tussen de mate van giftigheid van een hoge dan wel een lage  $LD_{50}$  waarde, kan gesteld worden dat hoe lager de waarde is des te toxischer is het toxine.

### 2.3 Adviesvraag

In de Regeling GGO en de bijbehorende Richtlijnen van de COGEM worden toxines gezien als schadelijke producten, die worden onderverdeeld in drie klassen, T-1, T-2 en T-3, gebaseerd op de  $LD_{50}$  waarde van het toxine (1). Hierbij worden de volgende criteria gehanteerd:

- T-1 :  $LD_{50}$  voor vertebraten van 1 t/m 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- T-2 :  $LD_{50}$  voor vertebraten van 0,1 t/m 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$
- T-3 :  $LD_{50}$  voor vertebraten kleiner of gelijk 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$

In de praktijk zijn deze regels moeilijk toepasbaar omdat de  $LD_{50}$  waarde van een toxine vaak ontbreekt. Het bepalen van een  $LD_{50}$  waarde is complex, aangezien de stof in voldoende mate en hoeveelheid gezuiverd dient te worden waarbij de toxische activiteit niet verloren mag gaan. Daarnaast kunnen stoffen in het ene proefdiermodel toxisch zijn en in het andere juist niet. Een voorbeeld is het toxine van de spin *Latrodectus mactans tredecimguttatus* waarbij de  $LD_{50}$  waarde voor kikkers een factor duizend hoger is dan voor cavia's (10).

De COGEM is door het Ministerie van VROM verzocht om de criteria voor de classificatie van toxines te herzien. Hierbij is de COGEM specifiek gevraagd of de indeling en zwaarte van de inschaling van eiwittoxines in de klassen T-1, T-2 en T-3 nog up-to-date is. Tevens is gevraagd welke argumenten en experimentele resultaten door een aanvrager aangeleverd moeten worden indien van een toxine geen toxiciteitklasse bekend is. Tegelijkertijd met het herzien van de classificatie-criteria voor eiwittoxines dient de inschaling van toxische metabolieten verwerkt te worden, aangezien hiervoor nog geen systematische aanpak is ontwikkeld. De vragen hebben daarom betrekking op zowel de eiwittoxines als op de toxische metabolieten. Onderstaand zijn de adviesvragen van het Ministerie van VROM in cursief geciteerd.

- 1. Moet de vraag naar de classificatie van toxines zo gesteld worden als nu gebruikelijk is? Nu moeten aanvragers de T-klasse opgeven op basis van LD<sub>50</sub> gegevens; een deel van de problemen wordt opgelost als een aanvrager zou kunnen opgeven of van het toxine een T-klasse bekend is.*
- 2. Welke gegevens over T-klassen van toxines zijn bruikbaar, en als er meerdere bronnen zijn, kan dan worden aangegeven welke de beste zijn?*
- 3. Zijn de commissie betrouwbare en bruikbare lijsten bekend?*
- 4. Op grond van welke criteria kan worden vastgesteld of de gegevens op de door u genoemde lijsten, of gegevens die door aanvragers worden geleverd, adequaat zijn voor de bepaling van de T-klasse van een toxine?*
- 5. Het vaststellen van een LD<sub>50</sub> waarde voor een 'nieuw' toxine is, zoals boven aangegeven, niet eenvoudig. Hoe moet te werk worden gegaan als er van een toxine geen T-klasse bekend is? Welke argumenten en experimentele resultaten, anders dan een directe bepaling van de LD<sub>50</sub>, zijn hierbij relevant?*
- 6. Is de zwaarte van de inschaling van genen coderend voor een toxine van klasse T1-T3 nog up-to-date? Wij verzoeken u om onderbouwd concrete voorstellen te doen voor de inschaling.*
- 7. De nu geldende inschalingvoorschriften dateren van vóór 1990. Het lijkt erop dat er elders inmiddels anders wordt gedacht over de inschaling. De NIH bijvoorbeeld vraagt, voor zover wij na kunnen gaan, alleen nog speciale maatregelen te nemen voor activiteiten met T-3 toxines.*
- 8. Welke argumentatie of experimentele onderbouwing moet een aanvrager leveren om aan te tonen dat een soort/stam geen toxines vormt?*
- 9. Dezelfde vragen gelden voor de inschaling van micro-organismen die toxische metabolieten vormen, met dit verschil dat er voor dit probleem niet eerder naar een systematische aanpak is gezocht.  
Een aanpak zou kunnen zijn:*

- *Zijn er vertegenwoordigers van de soort bekend die toxische metabolieten vormen? Wat is er bekend over de reactieketen die leidt tot de vorming van het toxische metaboliet, en over de voorwaarden waaraan moet zijn voldaan om vorming van het metaboliet te laten optreden, bijvoorbeeld ten aanzien van beschikbaarheid van substraten.*
- *Zo ja, kan een inschatting worden gemaakt van de mate van toxiciteit van een organisme? Hoe moet hierbij rekening worden gehouden met de kweekomstandigheden van het organisme? In hoeverre kunnen deze gegevens worden geëxtrapoleerd naar een nieuwe gastheer?*
- *Welke gegevens zijn adequaat om te onderbouwen dat een soort/stam geen vertegenwoordigers heeft die toxine produceren?*

In het onderhavige advies zullen in eerste instantie in hoofdstuk 3 de eiwittoxines en toxische metabolieten kort behandeld worden. In hoofdstuk 4 worden herziene toxiciteitsklassen voorgesteld en wordt hier nader op ingegaan. Daarnaast wordt een methode behandeld waarmee toxines ingeschaald kunnen worden in de desbetreffende toxiciteitsklasse met behulp van specifieke criteria. Tot slot worden in hoofdstuk 5 enkele factoren behandeld die van invloed kunnen zijn op het inperkingsniveau van werkzaamheden met toxines.





### 3. Toxines

In het onderhavige advies worden de toxines onderverdeeld in eiwittoxines en toxische metabolieten. Hieronder zullen deze groepen kort toegelicht worden. In bijlage 2 zal verder ingegaan worden op de eiwittoxines en worden een aantal karakteristieke voorbeelden behandeld van eiwittoxines afkomstig van micro-organismen, planten en dieren. In bijlage 3 worden vervolgens voorbeelden gegeven van toxische metabolieten die geproduceerd worden door schimmels, planten en (blauw)algen.

#### 3.1 Eiwittoxines

Vele organismen (zoals insecten, schorpioenen, slangen en vissen) zijn in staat tot de productie van eiwittoxines. Het overgrote deel van de eiwittoxines wordt echter gevormd door micro-organismen, waaronder bacteriën.

Bacteriën produceren onder andere exotoxines, dit zijn schadelijke producten die uitgescheiden worden. Tot deze groep behoren de meest giftige eiwittoxines voor de mens. Het botulinetoxine, het tetanustoxine en het difterietoxine zijn voorbeelden van dergelijke zeer toxische eiwittoxines. De zeer giftige substanties hebben een LD<sub>50</sub> waarde die lager is dan 100 ng/kg en zijn daarom ingeschaald in de hoogste toxiciteitsklasse. Daarnaast zijn er vele eiwittoxines die gekenmerkt worden als licht tot matig toxisch, waarbij de LD<sub>50</sub> waarde ligt tussen 100 ng/kg en 100 µg/kg. Toxines met een dergelijke LD<sub>50</sub> waarde zijn onder andere pneumolysine van *Streptococcus pneumoniae* en staphylococcus enterotoxines B en F afkomstig van *Staphylococcus aureus*.

In het algemeen zijn eiwittoxines die afkomstig zijn van dieren niet uitermate giftig. De LD<sub>50</sub> waarde van de meeste dierentoxines valt buiten de huidig gehanteerde inschaling in toxiciteitsklassen. Slechts een enkele slangensoort produceert een eiwittoxine met een LD<sub>50</sub> waarde die binnen de laagste toxiciteitsklasse valt. Ook eiwittoxines geproduceerd door planten zijn vaak niet voldoende giftig om ingeschaald te worden in een toxiciteitsklasse. Een uitzondering hierop is abrine, dat ingeschaald wordt in een lage toxiciteitsklasse.

Eiwittoxines worden vaak door één specifiek gen gecodeerd (11). Echter, een toxine kan ook samengesteld zijn uit verschillende subunits welke elk afzonderlijk door een gen gecodeerd worden (12).

### 3.2 Toxische metabolieten

Een groot aantal organismen zijn behalve in staat tot de productie van eiwittoxines ook in staat tot de vorming van toxische metabolieten.

Organismen waarvan bekend is dat ze beschikken over een uitgebreid secundair metabolisme zijn planten en schimmels. Daarnaast zijn ook (blauw)algen in staat tot de productie van toxische metabolieten. Hieronder worden enkele belangrijke punten naar voren gehaald die van belang kunnen zijn voor de systematiek van het advies (zie bijlage 3 voor een meer volledig overzicht).

Toxische metabolieten van schimmels worden mycotoxines genoemd. De productie van mycotoxines vereist complexe reacties waarbij meerdere genen betrokken zijn. In sommige gevallen is het aantal genen bekend, zoals bij aflatoxines. Een cluster van 25 genen is betrokken bij de synthese van aflotoxines. Bij aflatoxines is aangetoond dat het uitschakelen van één gen kan leiden tot een blokkering van de productie. Daarnaast zullen de genen die betrokken zijn bij de productie van mycotoxines niet onder alle omstandigheden tot expressie komen. Vele factoren zijn namelijk van invloed op de productie van mycotoxines, onder meer de temperatuur, de luchtvochtigheid en het substraat.

De LD<sub>50</sub> waarden van bekende mycotoxines zijn in alle gevallen hoger dan 100 µg/kg en vallen daarmee niet in één van de toxiciteitsklassen. Daarentegen zijn enkele mycotoxines bij chronische blootstelling (mogelijk) carcinogeen, dit zijn onder meer aflatoxine B1 en sterigmatocystine (zie bijlage 6).

Planten hebben gedurende de evolutie vele toxische metabolieten ontwikkeld. De start van de syntheseroutes van toxische metabolieten is algemeen aanwezig in planten, maar de routes voor de verdere synthese zijn specifiek per plantensoort of taxonomisch verwante groep van plantensoorten (13). Naast de specificiteit van een syntheseroute, is bovendien een groot aantal genen betrokken bij de productie van secundaire metabolieten. Voor de vorming van een toxische metaboliet zijn vaak 30 enzymatische stappen vereist. Het is vaak onbekend of de genen in een plant georganiseerd liggen in clusters of verspreid over het genoom. Daarnaast zijn in tegenstelling tot de schimmels soms verschillende type cellen vereist voor de productie van toxische metabolieten in een plant.

In het algemeen zijn de LD<sub>50</sub> waarden van toxische metabolieten in planten hoog. Slechts een enkele schadelijke metaboliet heeft een LD<sub>50</sub> waarde die binnen een toxiciteitsklasse valt.

Cyanotoxines worden geproduceerd door cyanobacteriën, ook wel blauwalgen genoemd. In overeenstemming met de planten en schimmels wordt de synthesroute voor cyanotoxines gecodeerd door meerdere genen. De genen liggen waarschijnlijk in clusters op het genoom. Het ontbreken of uitschakelen van één gen kan de productie van cyanotoxines blokkeren. De cyanobacteriën zijn moeilijk te kweken, maar de gastheer voor genetische modificatie hoeft deze beperking niet te hebben.

Cyanotoxines hebben in vergelijking met andere toxische metabolieten een lage LD<sub>50</sub> waarde. Derhalve worden cyanotoxines, in tegenstelling tot toxische metabolieten van planten of schimmels, in het algemeen wel ingedeeld in toxiciteitsklassen. Vergeleken met eiwittoxines worden cyanotoxines echter in een relatief lage toxiciteitsklasse ingeschaald.



## 4. Classificatie toxine producerende genen

Voor de inschaling van werkzaamheden in associatie met toxines dient de toxiciteitsklasse van het desbetreffende toxine producerende gen bekend te zijn. De inschaling in toxiciteitsklassen wordt gereguleerd met behulp van de voorschriften die zijn opgenomen in de Regeling GGO. Ter vergelijking met deze richtlijn worden hieronder de internationale richtlijnen kort beschreven. Vervolgens zal ingegaan worden op enkele kenmerken van de LD<sub>50</sub> waarde die de basis vormt voor de huidige onderverdeling van de toxiciteitsklassen. Als laatste wordt een herziene indeling van de toxiciteitsklassen met de bijbehorende inschalingscriteria weergegeven.

### 4.1 Internationale classificatie

In een aantal landen is een classificatie-systeem voor toxines opgesteld. In 1981 heeft het 'National Institutes of Health' (NIH) in de Verenigde Staten een regelgeving opgesteld met specifieke richtlijnen voor kloneringsexperimenten met genen die coderen voor toxines (14). In deze richtlijnen wordt onderscheid gemaakt tussen verschillende toxiciteitsklassen op basis van LD<sub>50</sub> waarden. De indeling van deze klassen door de NIH is destijds gekozen op basis van de volgende argumentatie: "*The division between the classes are, perforce, somewhat arbitrary but represent the working group's best sense of convenience and prudence, given the limited knowledge available*" (15). België, Zwitserland, Noorwegen, Zweden, Bulgarije, Australië, Taiwan, Brazilië en Nederland hanteren de NIH richtlijnen.

De regelgeving in Duitsland hanteert geen indeling in toxiciteitsklassen. Wel wordt bij het verlenen van de vergunningen rekening gehouden met toxines. Hierbij worden verbindingen met een LD<sub>50</sub> waarde in mg/kg al als toxines beschouwd, dit in tegenstelling tot de NIH richtlijnen.

Door het NIH zijn toxine-classificaties opgesteld met 1) algemene richtlijnen voor toxines die giftig zijn voor vertebraten en 2) richtlijnen voor het kloneren van toxines in *Escherichia coli* K-12. De laatst genoemde richtlijn maakt onderscheid tussen drie toxiciteitsklassen en is ook de basis van de Nederlandse indeling van toxines in de Regeling GGO (1;4). De algemene richtlijn maakt echter slechts onderscheid tussen twee klassen. Voor laboratorium-werkzaamheden met toxines met een LD<sub>50</sub> waarde voor vertebraten kleiner of gelijk aan 0,1 µg/kg is toestemming nodig van zowel de veiligheidscommissie van het lokale instituut als van het NIH. Indien gewerkt wordt met toxines met een LD<sub>50</sub> waarde tussen de 0,1 µg/kg en 100 µg/kg is alleen goedkeuring nodig

van de veiligheidscommissie van het lokale instituut. Deze experimenten dienen wel gemeld te worden aan het NIH (4). Voor kloneringen met genen die coderen voor toxines met een LD<sub>50</sub> waarde groter dan 100 µg/kg zijn geen speciale eisen gesteld.

## 4.2 LD<sub>50</sub> waarde

De indeling van toxines in toxiciteitsklassen is op dit moment gebaseerd op de LD<sub>50</sub> waarde. Deze waarde biedt de mogelijkheid om de toxiciteit van substanties met elkaar te vergelijken op basis van de letaliteit. Aan het gebruik van deze waarde zitten echter een aantal nadelen. Naast het feit dat er veel proefdieren nodig zijn voor de bepaling van een LD<sub>50</sub> waarde, is het geen constante waarde. Vele factoren kunnen namelijk van invloed zijn op de toxiciteit van een substantie en daarmee de uiteindelijke LD<sub>50</sub> waarde. Ten eerste is de waarde, zoals al eerder vermeld is, afhankelijk van het proefdiermodel. De meest gebruikte proefdieren zijn muizen, ratten en kippen. Daarnaast is van de volgende factoren aangetoond dat ze in proefdieren een negatief effect kunnen hebben op de LD<sub>50</sub> waarde, te weten stress, leeftijd, gewicht, voeding, volume en de oplossing waarin de substantie is opgenomen (2). Tevens is de LD<sub>50</sub> waarde sterk afhankelijk van de wijze van toediening van het toxine. Een geteste toedieningswijze hoeft niet de meest effectieve manier te zijn om het specifieke doelwitorgaan van het toxine te bereiken. Een ander nadeel is dat de LD<sub>50</sub> waarde alleen de letale dosis van het toxine aanduidt en niet de ernstige effecten die veroorzaakt kunnen worden bij een lagere dosis.

Binnen de farmaceutische wereld wordt de LD<sub>50</sub> waarde als achterhaald beschouwd en het aantal LD<sub>50</sub> bepalingen is daardoor aan het afnemen. Door verscheidene instanties zijn inmiddels andere methodes in gebruik genomen om de toxiciteit van een substantie te bepalen. Hieronder wordt het gebruik van twee methodes toegelicht.

### ***NOAEL***

Een methode die tegenwoordig veelvuldig wordt toegepast voor de inschatting van de toxiciteit van substanties is de ‘No Observed Adverse Effect Level’ (NOAEL), die als volgt gedefinieerd is: *“The highest level of exposure in toxicological or epidemiological studies at which there is no statistically or biologically significant increase in the frequency or severity of adverse effects between the exposed population and a suitable reference population”* (16). De NOAEL waarde heeft betrekking op het hoogste blootstellingsniveau waarbij nog geen schadelijk effect door de substantie gezien wordt. De effecten kunnen bepaald worden na acute, subacute, semi-chronische en chronische blootstelling

en de methode voldoet daarmee meer aan de gestelde Europese richtlijn 2001/18/EG dan de LD<sub>50</sub> waarde. De ‘Environmental Protection Agency’ (EPA) en de ‘Organisation for Economic Co-operation and Development’ (OECD) hebben de NOAEL-methode al enige tijd in gebruik voor de bepaling van de aanvaardbare dagelijkse dosis van een substantie.

Er zitten echter ook nadelen aan het gebruik van de NOAEL. In eerste instantie kan het definiëren van een schadelijk effect problemen opleveren (16). Hiernaast is de opzet van de testmethode belangrijk. De OECD richtlijnen schrijven gestandaardiseerde toxicologische testen voor. De test bestaat in het algemeen uit één controlegroep en drie groepen die elk een andere concentratie van het toxine toegediend krijgen. De NOAEL wordt bepaald door de drie groepen te vergelijken met de controlegroep. Uiteindelijk correspondeert de NOAEL met één van de geteste concentraties in de studie (17). Het is echter mogelijk dat uit de test blijkt dat alle concentraties een schadelijk effect vertonen. De NOAEL kan dan niet afgeleid worden en de laagste concentratie uit de test wordt in dit geval de ‘Lowest Observed Adverse Effect Level’ (LOAEL) genoemd. De NOAEL is dus afhankelijk van de gekozen concentraties. Een bijkomend nadeel is dat de dosis-response kinetiek niet bekend is. Een toxine kan bij een bepaalde concentratie geen effect veroorzaken, maar kan bij een licht verhoogde concentratie al letaal zijn. Dit in tegenstelling tot een ander toxine dat pas bij een concentratie die vele malen hoger is dan de NOAEL letaal zal zijn. De NOAEL is daarnaast sterk afhankelijk van de groepsgrootte. De waarde zal in het algemeen hoger zijn wanneer de groepsgrootte kleiner is, terwijl juist het tegenovergestelde wenselijk is (16). Verder wordt een NOAEL bepaald per schadelijk effect én per tijdsduur (bijvoorbeeld acuut of chronisch) waarna de laagste waarde als drempelwaarde aangeduid wordt (18). Uit studie-evaluaties blijkt echter dat blootstelling aan een concentratie gelijk of zelfs lager dan de NOAEL het ontstaan van schadelijke effecten niet uitsluit (16). Een laatste nadeel is dat voor veel toxines de NOAEL bepaald is met betrekking tot (sub)chronische blootstelling. Dit houdt in dat de blootstelling wordt uitgedrukt in een drempelwaarde per dag. Onder laboratoriumomstandigheden is het wenselijk dat tevens een NOAEL voor acute blootstelling bepaald wordt.

### ***Benchmark approach***

Enkele beperkingen van de NOAEL-methode, zoals de dosis-response kinetiek en de afhankelijkheid van de gekozen concentraties, kunnen voorkomen worden door het volgen van de recentelijk ontwikkelde ‘benchmark approach’. De benchmark-benadering maakt, met behulp van computer software, een schatting van de dosis-response curve op basis van alle beschikbare data (17). Hieruit volgt uiteindelijk de dosis die correspondeert met een bepaald effect (19). Het

uitvoeren van de benchmark-methode wordt met name gestimuleerd door de EPA. Daarnaast onderzoeken de OECD en de Gezondheidsraad of deze methode ingevoerd kan worden voor het opstellen van nieuwe richtlijnen met betrekking tot toxiciteitsstudies.

Evenals bij de bepaling van de NOAEL, wordt bij de benchmark-methode ook gekeken naar (sub)chronische effecten en meestal niet naar acute effecten van substanties.

De NOAEL-methode en de Benchmark-methoden lijken om bovengenoemde redenen niet geschikt als eventuele basis voor de classificatie van toxines. Aangezien er op dit moment geen betere alternatieven gevonden zijn, adviseert de COGEM om de classificatie van toxines aan de hand van de LD<sub>50</sub> waarde te handhaven.

#### **4.2.1 Bepaling LD<sub>50</sub> waarde**

Voor een goede interpretatie van de LD<sub>50</sub> waarde is het van belang dat gegevens aanwezig zijn waaruit blijkt hoe de LD<sub>50</sub> waarde is vastgesteld. Het NIH heeft richtlijnen opgesteld voor de bepaling en de interpretatie van de LD<sub>50</sub> waarde. Gegevens over de wijze van toediening, het werkingsmechanisme, het doelwitorgaan van het toxine en het gebruikte proefdiermodel zijn in de richtlijnen van essentieel belang (20). Het NIH stelt in zijn richtlijnen dat de toxicologische gegevens bij mensen zeer belangrijk zijn voor de bepaling van een fysisch inperkingsniveau voor toxinerwerkzaamheden. Echter in veel gevallen ontbreken dergelijke gegevens, wat ertoe heeft geleid dat toxicologische gegevens afgeleid mogen worden van toxiciteitsstudies bij primaten. Voor de classificatie van een toxine wordt in dit geval de toxiciteit bepaald door middel van een intraveneuze injectie bij minimaal 4 dieren. Indien zowel de toxicologische gegevens van de mens en andere primaten ontbreken, dan dient de classificatie bepaald te worden aan de hand van de LD<sub>50</sub> waarde van de meest gevoelige kleine proefdierensoort (muizen, cavia's of konijnen). De LD<sub>50</sub> waarde wordt dan bepaald door een intraveneuze injectie bij minimaal 4 dieren van elke soort (12 dieren in totaal) (14;15). De meeste toxiciteitgegevens zijn daarom gebaseerd op dierexperimenten met kleine proefdieren (20;21-37).

De LD<sub>50</sub> waarde die gebruikt wordt voor de classificatie dient volgens de door de COGEM geraadpleegde deskundigen bij voorkeur gebaseerd te zijn op de acute giftigheid na orale of dermale toediening bij kleine proefdieren (38). Deze routes zijn het meest in overeenstemming met de manieren waarop medewerkers in een laboratorium met toxines in contact kunnen komen (39-41). Bepaalde verbindingen, zoals het Bt-toxine, zijn alleen toxisch voor insecten. Zoogdieren en dus ook kleine proefdieren die gebruikt worden voor de bepaling



van de LD<sub>50</sub> waarde zijn ongevoelig voor dit toxine. De geraadpleegde deskundigen zijn van mening dat het gezien de aard van het toxine niet noodzakelijk is om additionele veiligheidsmaatregelen te hanteren.

De hierboven beschreven strategie voor de bepaling van de LD<sub>50</sub> waarde dient gehanteerd te worden als een uitgangsregel, tenzij naast deze bepaling ook andere LD<sub>50</sub> waarden bekend zijn die middels een andere toedieningswijze en/of proefdiermodel vastgesteld zijn. Voor de interpreteerbaarheid van dergelijke gegevens is het van belang om nader inzicht te verkrijgen omtrent het werkingsmechanisme van het toxine. Een andere toedieningswijze, zoals intraveneus, intraperitoneaal of inhalatie, kan bijvoorbeeld leiden tot een minder effectieve werking van het toxine (2;3). Derhalve dient de LD<sub>50</sub> waarde in deze situaties bepaald te zijn door middel van de route van toediening die relevant en waarschijnlijk is voor de werking van het toxine.

De aanwezigheid van betrouwbare lijsten waarin toxines reeds geclassificeerd zijn, is wenselijk. Echter volledige lijsten zijn bij de COGEM niet bekend. De COGEM wijst daarom op de mogelijkheid om deze lijsten aan te leggen en beschikbaar te stellen. In de bijlagen 5 en 6 zijn wel uitgebreide lijsten opgenomen van LD<sub>50</sub> waarden van toxines geproduceerd door micro-organismen, planten, slangen, vissen, insecten, spinnen en schorpioenen. De LD<sub>50</sub> waarden in deze lijsten zijn onder andere afkomstig van de 'Registry of Toxic Effects of Chemical Substances' (RTECS) van het 'National Institute for Occupational Safety and Health' (20).

### **4.3 Indeling toxiciteitsklassen**

De huidige indeling van toxine producerende genen in de klassen T-1, T-2 of T-3 is enkel gebaseerd op de LD<sub>50</sub> waarde van het toxine. De bepaling van de LD<sub>50</sub> waarde is echter sterk afhankelijk van meerdere factoren. Dit kan tot gevolg hebben dat twee afzonderlijke bepalingen tot een verschillende LD<sub>50</sub> waarde leiden voor hetzelfde toxine. Dit zou kunnen resulteren in een toxine dat via methode 1 geclassificeerd wordt in klasse T-1 (1 t/m 100 µg/kg) en via methode 2 in klasse T-2 (0,1 t/m 1 µg/kg) ingedeeld wordt (2;3;10). Aangezien de geraadpleegde deskundigen van mening zijn dat het verschil in toxiciteit op basis van de LD<sub>50</sub> waarde tussen klasse T-1 en T-2 gering is en dat geen wezenlijke extra maatregelen genomen hoeven te worden om het risico van werken met deze toxines extra te beperken, adviseert de COGEM om de huidige classificatie te vereenvoudigen en tevens te herdefiniëren tot de toxiciteitsklassen (TK) 1 en 2.

De huidige klassen T-1 en T-2 zullen worden samengevoegd tot klasse TK-1. Klasse T-3 zal gehandhaafd blijven en hernoemd worden tot klasse TK-2. De indeling in twee toxiciteitklassen is vergelijkbaar met de algemene richtlijnen van het NIH (4). In tabel I is de vergelijking weergegeven tussen de huidige en de nieuwe toxiciteitsklassen.

**Tabel I.** Overzicht indeling in toxiciteitklassen (TK-1 en TK-2) ten opzichte van de huidige T-1, T-2 en T-3 klassen op basis van LD<sub>50</sub> waarden (1).

LD <sub>50</sub> in µg/kg	Toxiciteitklassen		Omschrijving
	Huidige	Nieuwe	
> 100			Nagenoeg niet toxisch
≤ 100	T-1	<b>TK-1</b>	Licht tot matig toxisch
≤ 1	T-2		
≤ 0,1	T-3	<b>TK-2</b>	Zeer toxisch

De scherpe grenzen tussen TK-1 en TK-2 die gesteld zijn aan de hand van de LD<sub>50</sub> waarde zijn gebaseerd op “expert judgement”. De grenswaarden zijn gekozen in het belang van de veiligheid voor mens en milieu om een onderscheid te kunnen maken tussen producten die zeer toxisch zijn en producten die licht tot matig toxisch zijn.

Zeer giftige toxines die op basis van hun LD<sub>50</sub> ingeschaald worden in TK-2 zijn onder meer het botulismetoxine (*Clostridium botulinum*), tetanustoxine (*Clostridium tetani*), difterietoxine (*Corynebacterium Diphtheriae*) en het neurotoxine van *Shigella dysenteriae* (4). Toxines die licht tot matig giftig zijn en die inschaald worden in klasse TK-1 zijn onder meer: abrine, ricine, *Clostridium perfringens* epsilon toxine, *Staphylococcus aureus* alpha toxine, *Staphylococcus aureus* beta toxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, *Bordetella pertussis* toxin, de letale factor van *Bacillus anthracis*, *Pasteurella pestis* muizentoxines, zuurstoflabiele hemolysines zoals streptolysine O, en bepaalde neurotoxines van slangen (4).

#### 4.4 Criteria voor toxiciteitklassen TK-1 en TK-2

De inschaling van genen coderend voor toxines is in de huidige richtlijn uitsluitend gebaseerd op de LD<sub>50</sub> waarde van het gevormde product. Aangezien deze waarde niet altijd bekend is en het ook niet altijd mogelijk is om een LD<sub>50</sub> waarde te bepalen, moeten additionele criteria gehanteerd worden om de mate

van toxiciteit van een schadelijk product in te schatten. Het is namelijk mogelijk dat het toxine letaal blijkt te zijn of dat er gegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat vergelijkbare genen coderen voor toxines.

De classificatie van toxine producerende genen in de toxiciteitklassen, TK-1 en TK-2, wordt hieronder omschreven in een viertal criteria (tevens schematisch weergegeven in bijlage 1). Deze criteria dienen slechts gehanteerd te worden indien er daadwerkelijk aanwijzingen zijn dat een genproduct toxisch zou kunnen zijn. In de eerste twee criteria wordt bepaald of het product genotoxische of carcinogene eigenschappen bezit en of een LD<sub>50</sub> waarde van het product bekend is. Indien dit niet bekend is kunnen in de derde situatie mogelijk bekende gegevens over de letale dosis bijdragen aan de bepaling van de toxiciteitklasse. De vierde situatie heeft betrekking op aanwijzingen, bekend uit de wetenschappelijke literatuur, betreffende toxische eigenschappen van een product. De vier criteria staan schematisch weergegeven in het stroomschema in bijlage 1.

### ***1- Genotoxiciteit en carcinogeniteit***

De uit het donororganisme afkomstige verbinding heeft genotoxische of carcinogene eigenschappen. Dit zijn toxines die het erfelijk materiaal beïnvloeden waardoor de genregulatie ontregeld wordt of waardoor tumoren kunnen ontstaan. Volgens het ‘one-hit model’ kan één carcinogeen molecuul al in het ontstaan van kanker resulteren. In onder meer de Europese richtlijnen voor voedselveiligheid en de ARBO-richtlijnen wordt uitgegaan van het ALARA-principe (‘As Low As Reasonably Achievable’), waarbij de laagst mogelijke concentratie nagestreefd wordt. De ARBO-richtlijnen betreffende kankerverwekkende stoffen gelden ook wanneer geen of weinig blootstelling valt te voorzien (42).

Aangezien veel referenties verbindingen als carcinogeen aanmerken, is de COGEM van mening dat bij voorkeur het overzicht van de ‘International Agency for Research on Cancer’ (IARC) gehanteerd dient te worden om te bepalen of een verbinding carcinogeen is. Bij het IARC zijn carcinogenen ingedeeld in de klassen 1, 2A, 2B, 3 en 4. In klasse 1 zitten verbindingen die bewezen carcinogeen zijn voor mensen, terwijl klasse 2A verbindingen waarschijnlijk en klasse 2B mogelijk carcinogeen zijn. Stoffen die onder klasse 3 vallen zijn niet classificeerbaar als zijnde carcinogeen voor mensen en klasse 4 verbindingen zijn waarschijnlijk niet carcinogeen. In de literatuur zijn zeer weinig eiwittoxines bekend die carcinogeen zijn. Een beschreven voorbeeld van een carcinogeen eiwittoxine is Cytotoxin-associated gene-A (Cag A) van *Helicobacter pylori* (43-46). Er zijn sterke aanwijzingen, maar geen directe

bewijzen, dat het toxine verantwoordelijk is voor adenocarcinoma in de maag. Het IARC, dat onderdeel is van de 'World Health Organization' (WHO), heeft dit micro-organisme geïnclassificeerd als een type 1 carcinogeen (44;47). In tegenstelling tot eiwittoxines zijn in de literatuur verscheidene toxische metabolieten bekend die carcinogeen of mogelijk carcinogeen zijn. Onder de schimmels zijn dat onder meer aflatoxine B1, sterigmatocystine, ochratoxine A en fumonisine B1. Microcystine is een voorbeeld van een (mogelijke) carcinogene toxische metaboliet die geproduceerd wordt door cyanobacteriën (zie bijlage 1) (47).

De COGEM adviseert om genen coderend voor verbindingen welke vallen onder klasse 1 en 2 van het IARC te beschouwen als carcinogene stoffen. Naast de classificatie van het IARC kan ook een relevante, wetenschappelijke literatuurreferentie gebruikt worden waarin de carcinogeniteit of genotoxiciteit van een verbinding vermeld wordt. De COGEM adviseert om genen coderend voor eiwittoxines en secundaire metabolieten met genotoxische of carcinogene eigenschappen in te delen in de hoogste toxiciteitsklasse (TK-2) tot vastgesteld is dat de risico's beperkter zijn.

De verstoring van de genregulatie en het ontstaan van tumoren is niet-dosisafhankelijk in tegenstelling tot de LD<sub>50</sub> waarde. Door het laten meewegen van dit eerste criterium bij de classificatie wordt zodoende verder gekeken dan alleen naar de acute toxiciteit.

## ***2- LD<sub>50</sub> waarde is bekend***

Indien het toxine geen (mogelijke) genotoxische of carcinogene eigenschappen bezit en de LD<sub>50</sub> waarde is bekend, dan kan het toxine producerende gen direct ingeschaald worden. Toxinegenen coderend voor een product met een LD<sub>50</sub> waarde die ligt tussen 0,1 en 100 µg/kg bezitten een lichte of matige toxiciteit. Deze genen worden ingeschaald in klasse 1 (TK-1). Tot klasse 2 (TK-2) behoren toxinegenen met een hoge toxiciteit waarvan de LD<sub>50</sub> waarde van het product kleiner dan of gelijk is aan 0,1 µg/kg. Genen die coderen voor toxines met een LD<sub>50</sub> waarde hoger dan 100 µg/kg worden als niet-toxisch beschouwd en behoeven geen classificatie.

De mogelijkheid bestaat dat een realistische of relevante bepaling van een LD<sub>50</sub> waarde niet uit de aangeleverde gegevens blijkt of dat er sprake is van twijfel omtrent de bepaling. De COGEM is in deze gevallen van mening dat het toxine producerende gen in de hoogste toxiciteitsklasse, TK-2, ingedeeld dient te worden totdat additionele gegevens beschikbaar zijn die een lagere inschaling rechtvaardigen.

### **3- Product is letaal**

Het product is niet of niet bewezen genotoxisch of carcinogeen en er is geen LD<sub>50</sub> waarde bekend. Echter, er zijn toxiciteit-gegevens uit experimenten met vertebraten voorhanden waaruit blijkt dat het product letaal kan zijn. Deze toxiciteitgegevens betreffen de letale dosis oftewel de LD<sub>100</sub> waarde, welke per definitie hoger is dan de werkelijke LD<sub>50</sub> waarde. Daarbij is de dosis-respons kinetiek niet bekend, waardoor geen correcte inschatting gemaakt kan worden van de LD<sub>50</sub> waarde (2;3). De geraadpleegde deskundigen zijn van mening dat indien het toxine letaal is en de LD<sub>100</sub> waarde niet bekend is, of gelijk of kleiner is dan 100 µg/kg, het toxine producerende gen inschaald dient te worden in de hoogste toxiciteitsklasse TK-2. Indien de LD<sub>100</sub> waarde groter is dan 100 µg/kg, maar kleiner dan 2 g/kg, dient het gen als toxiciteitsklasse TK-1 geclassificeerd te worden. Genen coderend voor producten die bij orale inname of dermaal contact een acute giftigheid van 2 g/kg of meer hebben, worden door de OECD als niet-giftig beschouwd (48).

De indeling in een lagere of zelfs in geen enkele toxiciteitsklasse is gerechtvaardigd indien met gegevens aangetoond kan worden dat de letale dosis tot stand is gekomen onder omstandigheden die niet realistisch zijn voor het werkingsmechanisme van het toxine. Er kan bijvoorbeeld een niet reële extreem hoge dosis gebruikt zijn of de omstandigheden van het betreffende LD<sub>100</sub> experiment maken het zeer aannemelijk dat de waargenomen dosis onder normale omstandigheden niet zal optreden.

### **4- Aanwijzingen voor toxiciteit product**

Van het product zijn bovenstaande kenmerken niet bekend. Er zijn echter wel aanwijzingen dat het toxische eigenschappen bezit. Het is niet noodzakelijk dat de aanwijzingen uit eigen onderzoek afkomstig zijn, maar deze dienen wel afkomstig te zijn uit wetenschappelijke literatuur en dienen traceerbaar en verifieerbaar te zijn. Aanwijzingen voor toxiciteit kunnen zijn:

- Een product blijkt irreversibele effecten te veroorzaken bij vertebraten. De COGEM is van mening dat het gen coderend voor het toxische product op TK-1 niveau ingeschaald dient te worden.
- Een sequentie vertoont een relevante hoge homologie met de sequentie van een reeds bekend toxine producerend gen. In deze situatie dient de te kloneren sequentie op dezelfde toxiciteitsklasse ingeschaald te worden als het gen waarmee het een hoge homologie vertoont. Is de toxiciteitsklasse van dit gen onbekend dan dient de te kloneren sequentie op TK-1 ingeschaald te worden.
- Een product vertoont een grote mate van structurele verwantschap met een reeds bekend toxine. In deze situatie dient het inperkingsniveau van het gen coderend voor het bekende toxine gehandhaafd te worden voor

de te kloneren sequentie. Is deze toxiciteitsklasse onbekend dan dient de te kloneren sequentie ingedeeld te worden op TK-1.

- Een onbekende sequentie wordt gekloneerd en is afkomstig uit een organisme dat toxines produceert. De te kloneren sequentie moet in dit geval gezien worden als een mogelijke toxine producerende sequentie. Indien de toxiciteitsklasse van het toxine producerende donorgen onbekend is, dan is een TK-1 inschaling voor de te kloneren sequentie van toepassing. Indien de toxiciteitsklasse van het donorgen wel bekend is, dient de toxiciteitklasse van dit gen gehanteerd te worden voor de te kloneren sequentie. Produceert het donororganisme meerdere toxines, dan dient volgens de COGEM, op basis van het voorzorgsprincipe, de toxiciteitklasse van het meest giftige toxine producerende gen gehanteerd te worden.

#### **4.5 Aanpassing van toxiciteitsklasse**

Een toxiciteitklasse van een toxine kan aangepast worden indien additionele gegevens beschikbaar komen die pleiten voor een verlaging of verhoging van de toxiciteitklasse. Dit zijn bijvoorbeeld gegevens betreffende de LD<sub>50</sub> waarde, experimenten in dieren waarbij de carcinogeniteit of genotoxiciteit onderzocht is, of toxiciteitgegevens over de blootstelling van cellijnen aan het toxine.

Indien een vergunningaanvrager van mening is dat een donor- of gastheerorganisme niet meer de mogelijkheid bezit om toxines te vormen, terwijl deze daar normaliter wel toe in staat is, zal hiervoor een onderbouwing geleverd moeten worden. Het is echter niet mogelijk om algemene criteria op te stellen waaraan de onderbouwing moet voldoen. De afwezigheid van toxine-expressie kan namelijk vele verschillende oorzaken hebben. De onderbouwing zal daarom case-by-case beoordeeld moeten worden.

De classificatie van toxines die volgens de huidige richtlijnen heeft plaatsgevonden, kan voor het merendeel eenvoudig omgezet worden in de geadviseerde TK-klassen. Er dient echter wel rekening gehouden te worden met toxines die (eventueel) carcinogeen dan wel genotoxisch zijn. De huidige inschaling is namelijk enkel gebaseerd op de LD<sub>50</sub> waarde van een toxine, terwijl bij de indeling in de TK-klassen in eerste instantie naar de carcinogene of de genotoxische eigenschappen van een toxine wordt gekeken. De inschaling op basis van de LD<sub>50</sub> waarde komt pas hierna aan de orde.

#### **4.6 Regelgeving**

Voor het aanvragen van een vergunning voor werkzaamheden met (mogelijke) toxine producerende genen dient de aanvrager volgens de huidige richtlijnen een aantal vragen te beantwoorden met betrekking tot de LD<sub>50</sub> en de eventueel bekende toxiciteitsklasse. Hierbij moet tevens literatuur aangeleverd worden betreffende de wijze en de relevantie van de LD<sub>50</sub> bepaling. In bepaalde situaties zijn echter al veel gegevens bekend van het toxine en is de toxiciteitsklasse al eerder vastgesteld. Onder deze omstandigheden zou de aanvrager moeten kunnen volstaan met het direct opgeven van de toxiciteitsklasse. Hierbij kan ter onderbouwing verwezen worden naar eerdere beoordelingen.

Om de toxiciteitsklassen van toxines openbaar te maken, zou een lijst opgezet kunnen worden waarop de reeds geclassificeerde toxines vermeld staan.

#### **4.7 Conclusie**

De COGEM is van mening dat de toxiciteitsklassen en de bijbehorende criteria herzien dienen te worden. Naast de LD<sub>50</sub> waarde dienen voor de classificatie van genen coderend voor (mogelijke) toxines ook andere criteria overwogen te worden. Met behulp van deze criteria wordt het mogelijk om carcinogene en genotoxische toxines in te schalen. Daarnaast bestaat de mogelijkheid om toxines in te schalen indien deze letaal zijn of als er aanwijzingen zijn die duiden op een mogelijke toxiciteit van een onbekend product.

Aangezien meerdere toxiciteitsgegevens aan de orde komen bij het gebruik van deze methode zal de uiteindelijke classificatie van toxine producerende genen soepeler verlopen dan onder de huidige richtlijnen.





## 5. Inperkingsniveau werkzaamheden

Nadat de toxiciteitsklasse van een toxine is vastgesteld, is het mogelijk om de inperkingsmaatregelen te bepalen voor werkzaamheden met het desbetreffende toxine in associatie met een genetisch gemodificeerd organisme. In het vorige hoofdstuk heeft de COGEM een herziene classificatie voor toxines voorgesteld. Voor de interpreteerbaarheid van deze klassen en de hieruit volgende inschaling van de werkzaamheden, acht de COGEM het noodzakelijk om experimenten die gericht zijn op het tot expressie brengen van TK-1 toxines op ML-II inperkingsniveau te classificeren en werkzaamheden met TK-2 toxines op ML-III niveau. De COGEM is van mening dat werkzaamheden met TK-2 toxines op ML-III niveau uitgevoerd moeten worden vanwege het feit dat een hoger inperkingsniveau in deze situatie geen extra bescherming biedt aan de medewerker en het milieu. De voorschriften met betrekking tot deze werkzaamheden, inclusief het gebruik van handschoenen en een klasse 2 veiligheidskabinet, in een ML-III werkruimte bieden de medewerker al volledige bescherming. De werknemer zal geen extra bescherming ondervinden in een ML-IV ruimte bij werkzaamheden met toxines.

In bepaalde situaties is het denkbaar dat het inperkingsniveau omlaag geschaald kan worden. Hierbij dienen de veiligheid van de laboratoriummedewerker en het minimaliseren van de kans op ontsnapping van het ggo in het milieu, voorop te staan. Derhalve worden in dit hoofdstuk aandachtspunten voorgelegd waarbij het eventueel mogelijk is om het inperkingsniveau voor experimenten met (mogelijke) toxine producerende ggo's omlaag te schalen. De inperkingsmaatregelen van de werkzaamheden zijn namelijk niet enkel afhankelijk van de toxiciteitsklasse van het te kloneren gen maar ook van onder andere factoren zoals:

- Volledigheid van de toxinesequentie in het ggo;
- Expressie van de toxinesequentie in het ggo;
- Eigenschappen van het gastheerorganisme.

Middels de onderstaande uitwerking van bovengenoemde overwegingen worden de meest adequate en relevante aandachtspunten behandeld om tot een weloverwogen inperkingsniveau van de werkzaamheden te komen.

## 5.1 De donorsequentie

De volledigheid van het geïntroduceerde gen is mede bepalend voor het tot expressie komen van een toxine in de gastheer. Indien een korte sequentie van het gen gekloneerd wordt in het gastheerorganisme, wordt de kans op vorming van een toxine drastisch verlaagd. Aangezien de productie van toxische metabolieten gereguleerd wordt door meerdere genen zal slechts bij het kloneren van grote fragmenten rekening gehouden moeten worden met de expressie van toxische metabolieten. Zowel bij schimmels als bij (blauw)algen liggen de genen voor toxische metabolieten in clusters van meer dan 30 kb. Ook planten hebben een geheel cluster van een groot aantal genen nodig om een gastheer de toxische metaboliet te laten produceren. Op basis van de grootte van bekende clusters, is de grens tussen kleine en grote fragmenten gesteld op 30 kb. Bij kloneringsexperimenten met fragmenten groter dan 30 kb is het daarom mogelijk dat niet alleen eiwittoxines, maar ook toxische metabolieten gevormd worden. Bij de introductie van fragmenten kleiner dan 30 kb zal naar alle waarschijnlijkheid de gastheer niet in staat zijn tot de vorming van toxische metabolieten. In dit geval kunnen toxische metabolieten buiten beschouwing gelaten worden voor de inschaling van werkzaamheden.

De toxiciteit van het product wordt niet alleen bepaald door de grootte van het fragment. Ook het deel van het gen dat gekloneerd gaat worden in het gastheerorganisme kan een indicatie zijn voor de uiteindelijke toxiciteit. Indien de te kloneren sequentie een product oplevert dat zijn toxiciteit verliest of niet tot expressie komt, kan volstaan worden met een lager inperkingsniveau dan op basis van de toxiciteitsklasse van het toxine verwacht zou worden.

De gebruikte regulatoire sequenties, zoals promotors en enhancers, kunnen ook van belang zijn voor de inschaling van werkzaamheden. Indien (mogelijk) regulatoire sequenties aanwezig zijn, is het mogelijk dat het toxische product beter of in grotere hoeveelheden tot expressie komt. Dit pleit juist voor het handhaven van het inperkingsniveau vastgesteld op basis van de toxineclassificatie.

## 5.2 Gastheerorganisme

Naast de volledigheid van de donorsequentie kan ook de gastheer bepalend zijn voor het uiteindelijke inperkingsniveau van de werkzaamheden. Belangrijk hierbij is om te weten of het toxine daadwerkelijk tot expressie komt in het gastheerorganisme. Sequenties betrokken bij de codering voor enzymen betrokken bij de synthese van toxines, bijvoorbeeld regulatoire genen of

signaalstoffen zijn misschien afwezig, waardoor het toxine niet tot expressie komt. Het is bovendien mogelijk dat het toxische product niet constitutief geproduceerd wordt door het gastheerorganisme, maar alleen onder uitzonderlijke condities.

Verder kunnen de kweekomstandigheden van de gastheer van invloed zijn op de toxiciteit van het uiteindelijke ggo en daarmee op het inperkingsniveau. Indien het gastheerorganisme bijvoorbeeld niet onder voor toxineproductie gunstige condities gekweekt wordt, is het risico van het werken met een ggo lager. Daarnaast zou bepaald kunnen worden of het toxische product door de gastheer uitgescheiden kan worden of niet.

Eigenschappen van het gastheerorganisme waardoor overlevingskansen in het milieu verkleind worden, kunnen ook pleiten voor een lager inperkingsniveau. Hiervoor kunnen condities beschreven worden die van invloed zijn op overleving, groei en replicatie van de gastheer.

### **5.3 Conclusie**

De hierboven weergegeven situaties zijn slechts voorbeelden en hebben enkel tot doel om aan te geven dat de toxiciteitsklasse van een toxine producerend gen niet de enige factor is waarop inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden gebaseerd dienen te worden. Het uiteindelijke inperkingsniveau kan om verschillende redenen lager zijn dan het te verwachten niveau op basis van de toxiciteitsklasse van het toxine. Redenen voor omlaagschaling kunnen zijn de onvolledigheid van de toxinesequentie en de kweekomstandigheden van de gastheer. Bij de omlaagschaling van het inperkingsniveau voor werkzaamheden dient de veiligheid van de werknemer en het milieu altijd voorop te staan.



## 6. Eindconclusie

De COGEM heeft in het onderhavige advies een systematische aanpak opgesteld om de toxiciteitsklasse van genen die coderen voor eiwittoxines of voor toxische metabolieten vast te stellen. Via deze classificatie komt de inschaling van de werkzaamheden tot stand. Daarnaast worden er aandachtspunten gegeven op basis waarvan een omlaagschaling van het inperkingsniveau eventueel mogelijk is.

Concluderend adviseert de COGEM:

- Een herziening van de huidige toxineclassificatie door het terugbrengen van drie toxiciteitsklassen naar twee klassen;
- Het hanteren van additionele criteria, naast de LD<sub>50</sub> waarde, om de toxiciteitsklasse van (mogelijke) toxine producerende genen te bepalen;
- Om werkzaamheden met TK-1 toxines op ML-II inperkingsniveau in te schalen en experimenten met toxines van klasse 2 te classificeren op ML-III;
- Werkzaamheden met toxines kunnen onder bepaalde omstandigheden omlaag geschaald worden afhankelijk van onder andere de gastheer-eigenschappen en de volledigheid van de sequentie.

De COGEM wil er met nadruk op wijzen dat de gehanteerde classificatie betrekking heeft op werkzaamheden met toxines in associatie met ggo's en niet op wildtype biologische agentia.



## Referenties

### Literatuur

1. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling, mei 2004.
2. Klaassen, C.D. (1996). Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. McGraw-Hill Companies. United States of America.
3. Niesink, R.J.M., De Vries, J. and Hollinger, M.A. (1995). Toxicology: principles and applications. CRC Press. New York.
4. NIH Guidelines for research involving recombinant DNA molecules - April 2002. Internet website: [http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines\\_02/NIH\\_Guidelines-Apr\\_02.html](http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/NIH_Guidelines-Apr_02.html) (9 oktober 2003).
5. Rubin, E. and Farber, J.L. (1999). Pathology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
6. European Environment Agency. Internet website: <http://glossary.eea.eu.int/EEAGlossary/T/toxicity> (9 oktober 2003).
7. U.S. Environmental Protection Agency. Internet website: [http://oaspub.epa.gov/trs/-trs\\_proc\\_qry.-alphabet?p\\_term\\_nm=T](http://oaspub.epa.gov/trs/-trs_proc_qry.-alphabet?p_term_nm=T) (9 oktober 2003).
8. Canadian Environmental Protection Act (CEPA), sectie 64, 1999.
9. Trevan JW. (1927). The error of determination of toxicity. *Proc Roy Soc* **101B**, blz. 483-514.
10. Maroli, M., Bettini, S., and Panfili, B. (1973). Toxicity of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* venom on frog and birds. *Toxicon* **11**, blz. 203-6.
11. Hadfield, T.L., McEvoy, P., Polotsky, Y., Tzinslerling, V.A. en Yakovlev, A.A. (2000). The pathology of Diphtheria. *The Journal of Infectious Diseases* **181(Suppl 1)**: S116-120.
12. Brossier, F. en Mock, M. (2001) Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon* **39**: 1747-1755.
13. Taiz & Zeiger (1998) Plant physiology. Second edition. Chapter 13, Sinauer Associates, Inc.
14. National Institutes of Health, [www.nih.gov](http://www.nih.gov), maart 2004
15. Gill D.M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* **46(1)**: 86-94.
16. Gezondheidsraad. (2003). Benchmark dose method: Derivation of health-based recommended exposure limits in new perspective.
17. Slob, W., Moerbeek, M., Rauniomaa, E. en Piersma, A.H. (2005). A statistical evaluation of toxicity study designs for the estimation of the Benchmark Dose in continuous endpoints. *Toxicological sciences* **84**: 167-185.
18. U.S. Environmental Protection Agency. (1993). Reference Dose (RfD): description and use in health risk assessment.

19. Woodrow Setzer, R. en Kimmel, C.A. (2003). Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances. *Pure Appl. Chem.* **75(11-12)**: 2151-2158).
20. National Institute for Occupational Safety and Health database: Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (R-TECS), 3 december 1998.
21. Ismail, M., O. H. Osman, K. A. Gumaa, and M. A. Karrar. (1974). Some pharmacological studies with scorpion (*Pandinus exitialis*) venom. *Toxicon* **12**, blz. 75-82.
22. Maroli, M. and Bettini, S. (1971). Effects of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* venom on the dynamics of vertebrate voluntary muscles. *Ann Ist Super Sanita* **7**, blz. 44-55.
23. Schmidt, J. O., Blum, M. S., and Overal, W. L. (1980). Comparative lethality of venoms from stinging hymenoptera. *Toxicon* **18**, blz. 469-74.
24. Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, Miranda, F., and Lissitzky, S. (1971). Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Biochimie* **53**, blz. 1073-8.
25. Schmidt, J. O. (1990). Hymenopteran venoms: Striving towards the ultimate defense against vertebrates, pp. 387-419. In D. L. Evans & J. O. Schmidt [eds.], *Insect de-fenses: adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*. SUNY Press, Albany, NY.
26. Schmidt, P. J., W. C. Sherbrooke, & J. O. Schmidt. (1989). The detoxification of ant (*Pogonomyrmex*) venom by a blood factor in horned lizards (*Phrynosoma*). *Copeia* **1989**: blz. 603-607.
27. Spawls, S. & Branch, B. (1995). *The dangerous snakes of Africa : natural history, species directory, venoms, and snakebite*. Ralph Curtis-Books.
28. Watt DD, Simard JM. (1984). Neurotoxic proteins in scorpion venom. *J Toxicol Toxin Rev* **3**, blz. 181 -221.
29. Hassan, F. (1984). Production of Scorpion Antivenom. Pages 577-605. In: *Handbook of Natural Toxins. Volume 2. Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms* (A. T. Tu, ed.). Marcel Dekker, Inc., New York.
30. Johnson, B. D., J. C. Tullar, and H. L. Stahnke. (1966). A quantitative protozoan bioassay method for determining venom potencies. *Toxicon*, **2**, blz. 297.
31. Stahnke, H. L. (1963). Some pharmacological and biochemical characteristics of *Centruroides sculpturatus* Ewing scorpion venom. Second International Pharmacol. Meet., Prague, Czechoslovakia.
32. Watt, D. D. (1964). Biochemical studies of the venom from the scorpion *Centruroides sculpturatus*. *Toxicon*, **2**, blz. 171.
33. Whittemore, F. W. and H. L. Keegan. (1963). Medically important scorpions in the Pacific area. Pages 107-110. In: *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region* (H. L. Keegan & W. V. MacFarlane, eds.). The Macmillan Company, New York.



34. Zlotkin, E., F. Miranda, and H. Rochat. (1976). Venoms of Buthinae. C, Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. Pages 317-369. In: Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 48. Springer-Verlag, Berlin.
35. Habermehl, G.G. (1981). Venomous animals and their toxins. New York: Springer Verlag. New York.
36. Bettini, S., (1978). Arthropod venoms. Springer, Berlin.
37. Internet website: <http://www.kingsnake.com/toxinology> (11 juli 2003).
38. Guidelines for the Notification and Testing of New Substances: Organisms (december 2001); Pursuant to The New Substances Notification Regulations of the Canadian Environmental Protection Act, 1999.
39. Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten: theorie en praktijk. (2000). Nederlandse Vereniging voor Microbiologie.
40. ARBO-informatieblad AI-9: Biologische agentia. (2000). SDU, Den Haag.
41. ARBO-informatieblad AI-18: Laboratoria. (2000). SDU, Den Haag.
42. Friedman M, Mc Donald GM (1997) Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 55-132.
43. Bjorkholm, B., Falk, P., Engstrand, L., and Nyren, O. (2003). *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med* **253**, blz. 102-19.
44. Cheng, K. S., Lu, M. C., Tang, H. L., and Chou, F. T. (2002). Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA in patients with gastric ulcer and gastritis. *Adv Ther* **19**, blz. 85-90.
45. Perez-Perez, G. I., Peek, R. M., Legath, A. J., Heine, P. R., and Graff, L. B. (1999). The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol* **50**, blz. 833-45.
46. Walker, M. M. and Crabtree, J. E. (1998). *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of duodenal ulceration. *Ann N Y Acad Sci* **859**, blz. 96-111.
47. International Agency for Research on Cancer, [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr), juni 2004.
48. OECD Environment, Health and Safety Publications (2001). Guidance document on acute oral toxicity testing.
49. Harrewijn, G.A., Elementaire microbiologie, 4e druk, 1988. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten.
50. Ellner, P.D., Neu, H.C., Understanding infectious disease, 1992, Mosby Year Book, St. Louis.
51. Robbins, J.B., Schneerson, R., Trollfors, B., Sato, H., Sato Y. en Rappuoli, R. (2005). The Diphtheria and Pertussis components of Diphtheria-tetanus toxoids pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins. *The Journal of Infectious Diseases* **191**: 81-88.
52. Todar, K. (2002) Todar's online textbook of bacteriology, University of Wisconsin-Madison.

53. Corbel, M.J. en Xing, D.K. (2004). Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **3(1)**: 89-101.
54. Smith, A.M., Guzmán, C.A. en Walker, M.J. (2001). The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 309-333.
55. Nederland Vaccin Instituut. Vragen en antwoorden over het besluit van de minister over tijdelijke aankoop acellulair kinkhoestvaccin van 28 april 2004.
56. Quinones, M. Kimsey, H.H. en Waldor, M.K. (2005) LexA cleavage is required for CTX prophage induction. *Molecular Cell* **17**: 291-300.
57. Faruque, S.M., Asadulghani, Rahman, M.M., Waldor, M.K. en Sack D.A. (2000) Sunlight-induced propagation of the lysogenic phage encoding cholera toxin. *Infection and immunity* **68(8)**: 4795-4801.
58. Sack, D.A., Sack, R.B., Nair, G.B. en Siddique, A.K. (2004). Cholera. *The Lancet* **363**: 223-233.
59. Muriana, P.M., *Clostridium botulinum* foodborne poisoning, FS591-I lecture 21. Oklahoma State University.
60. Odjakova, M. en Hadjiivanova, C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* **27(1-2)**: 101-109.
61. Vasconcelos, I.M. en Oliveira, J.T. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* **44**: 385-403.
62. Patočka, J. en Středa, L. (2003). Plant toxic proteins and their current significance for warfare and medicine. *Journal of Applied Biomedicine* **1**: 141-147.
63. Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* **44**: 361-370.
64. Mebs, D. (2001). Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon* **39**: 87-96.
65. Dufton, M.J. (1992). Venomous mammals. *Pharmacol. Ther.* **53(2)**: 199-215.
66. Torres, A.M. en Kuchel, P.W. (2004). The  $\beta$ -defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon* **44**: 581-588.
67. Gomes, A., De, P. en Dasgupta, S.C. (2001). Occurrence of a unique protein toxin from the Indian King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon* **39**: 363-370.
68. Church, J.E. en Hodgson, W.C. (2002). The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon* **40**: 1083-1093.
69. Ouanounou, G., Malo, M., Stinnakre, J., Kreger, A.S. en Molgó J. (2002). Trachynilysin, a neurosecretory protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, forms nonselective pores in the membrane of NG108-15 cells. *The Journal of Biological chemistry* **277(42)**: 39119-39127.
70. Auddy, B. Muhuri, D.C., Alam, M.I. en Gomes, A. (1995). A lethal protein toxin (toxin-PC) from the Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. *Nat. Toxins* **3(5)**: 363-368.
71. Rash, L.D. en Hodgson, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* **40**: 225-254.

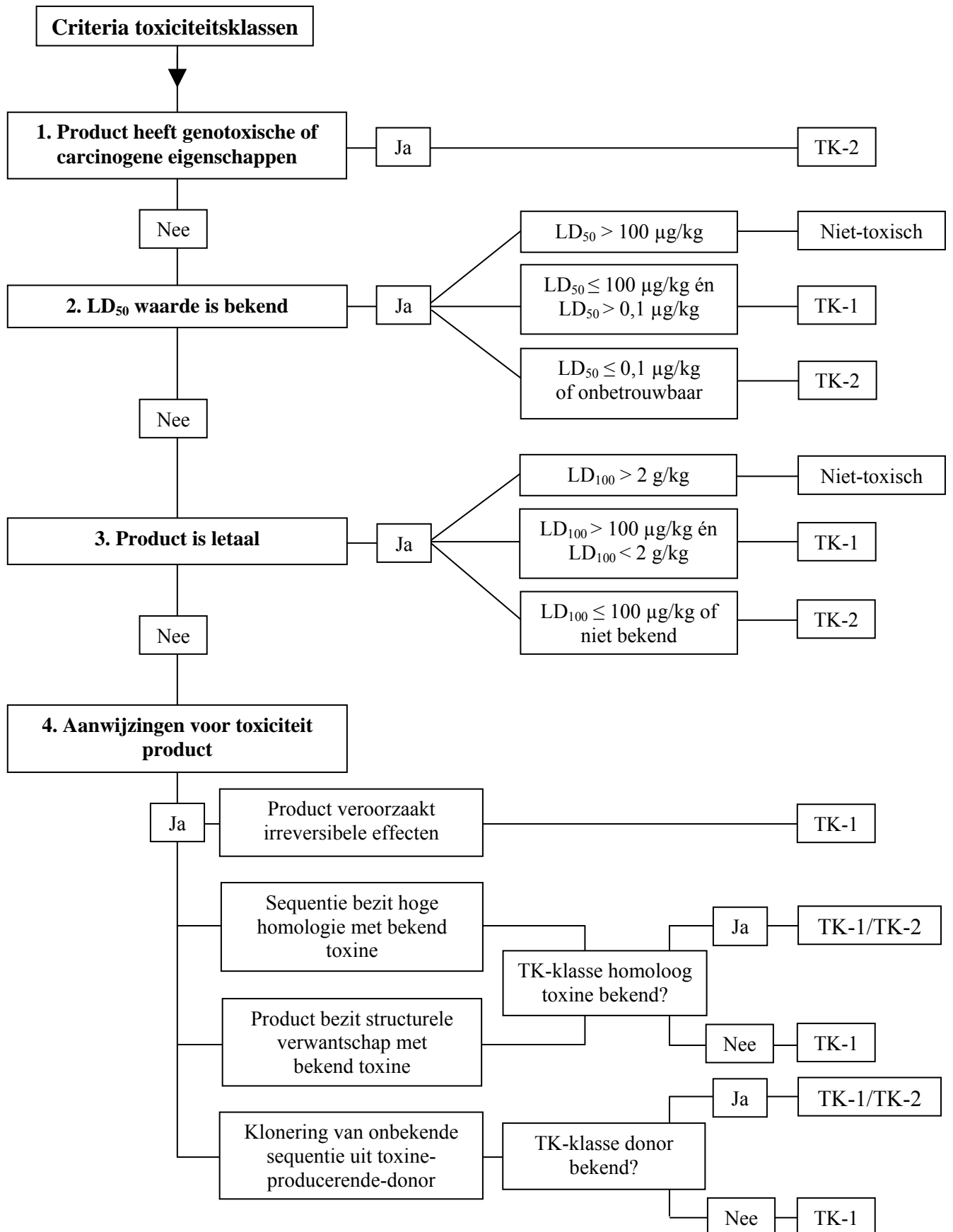
72. Ushkaryov, Y.A., Volynski, K.E. en Ashton, A.C. (2004). The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon* **43**: 527-542.
73. Council for Agricultural Science and Technology (CAST) (2003) Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems. 139: 13.
74. Yu J, Chang P, Erhlich K, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW (2004) Clustered pathway genes in Aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiology* **70** (3) 1253-1262.
75. Sweeney MJ & Dobson DW (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Letters* **175**: 149-163.
76. Sweeney MJ & Dobson DW (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Internat. J. Food Microbiol.* **43**: 141-158.
77. Torres J, Guarro J, Suarez G, Sune N, Calvo MA, Ramirez C (1980) Morphological changes in strains of *Aspergillus flavus* link ex fries and *Aspergillus parasiticus* speare related with aflatoxin production. *Mycopathologia* **72**; 171-174.
78. Woloshuk CP & Prieto R (1998) Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic genes. *FEMS Microbiol. Letters* **160**: 169-176.
79. Creasia DA, Thurman JD, Jones LJ, Nealley ML, York CG, Wannemacher RW, Bunner DL (1987) Acute inhalation toxicity of T-2 Mycotoxin in Mice. *Fun. Appl. Tox.* **8**: 230-235.
80. O'Callaghan J, Caddick MX, Dobson ADW (2003) A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* **149**: 3485-3491.
81. Harborne JB (1993) Introduction in ecological biochemistry. Fourth edition. 365 pp. Acad. Press, London.
82. Van Genderen H, Schoonhoven LM, Fuchs A (1996) Chemisch-ecologische flora van Nederland en België. KNNV Uitgeverij, Utrecht.
83. Valkonen JPT, Keskitalo M, Vasara T, Pietilä L (1996) Potato glycoalkaloids: a burden or a blessing? *Crit. Rev. in Plant sciences* **15**: 1-20.
84. Hitmi A, Coudret A, Barthelemy C (2000) The production of pyrethrins by plant tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 69-89.
85. Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE (2002) Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **75**: 32-49.
86. Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell biology, Molecular Regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 29-66.
87. De Luca V & Laflamme P (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current opinion in Plant biology* **4**: 225-233.

88. Jones PR, Moller BL, Hoj PB (1999) The UDP-glucose:p-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of cyanogenic glycoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **10**: 35483-91.
89. Tattersall DB, Bak S, Jones PR, Olsen CE, Nielsen JK, Hansen ML, Hoj PB, Moller BL (2001) Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* **293**: 1826-1828.
90. Crayton MA; Toxic cyanobacteria blooms: funded by Office of Environmental Health Assessments.
91. Chorus I & Bartram J (1999) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health, consequences, monitoring and management, Spon, London.
92. Haider S, Naithani V, Viswanathan PN, Kakkar P (2003) Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere* **52**: 1-21.
93. Mur LR (2002) Cyanotox. European Co-operation in cyanobacterial research
94. Baden DG, Fleming LE, Bean JA; Handbook of clinical neurology, marine toxins.
95. Mos L (2001) Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environ. Tox. and Pharmacology* **9**:79-85.

### **Geraadpleegde deskundigen**

- Dr. G.A.J. Speijers, Centrum Stoffen Integrale Risicoschatting, RIVM, Bilthoven
- Dr. ir. K. Wernars, Microbiologisch Lab Gezondheidsbescherming, RIVM, Bilthoven
- Dr. D. van Zaane, Wageningen Universiteit en Research Centrum
- Prof. dr. W. Gaastra, Infectieziekten en Immunologie, Universiteit Utrecht
- Prof. dr. F.G.M. Russel, Farmacologie en Toxicologie, UMC Nijmegen / NCMLS
- Prof. dr. J. Verhoef, Eijkman-Winkler Centrum voor Medische Microbiologie, Infectieziekten en Ontsteking, Utrecht
- Dr. J. E. N. Bergmans, Bureau Genetisch Gemodificeerde Organismen, Bilthoven
- Dr. R. P. Bos, Farmacologie en Toxicologie, UMC Nijmegen/NCMLS
- Dr. P. W. M. van Dijk, 'Regularory Affairs', DSM (en BVF platform), Delft
- Ir. H. P. van Egmond, Laboratorium voor Analytisch Residu-onderzoek, RIVM, Bilthoven
- Dr. G. Mertens, Robert Koch-Institut, Zentrum Gentechnologie, Berlijn
- Prof. dr. L. R. Mur, 'Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics', Universiteit van Amsterdam
- Dr. R. A. Samson, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
- Dr. T. Y. Shih, National Institutes of Health, Office of Biotechnology Activities, Bethesda
- Prof. dr. R. Verpoorte, 'Center for Drug Research', Universiteit Leiden
- Leden van de subcommissie Medisch veterinaire, Ingeperkt Gebruik en Landbouw van de COGEM

**Bijlage 1: Stroomschema toxiciteitsklassen**





## **Bijlage 2: Eiwittoxines**

Eiwittoxines worden vaak door één specifiek gen gecodeerd (11). Echter, een toxine kan ook samengesteld zijn uit verschillende subunits welke elk afzonderlijk door een gen gecodeerd worden (12). Vele organismen zijn in staat tot de productie van eiwittoxines, maar ze worden voornamelijk door micro-organismen geproduceerd. Ook insecten, schorpioenen, slangen en vissen zijn hiertoe in staat (2;3). Hieronder zullen enkele voorbeelden van eiwittoxines bij bacteriën, planten en dieren behandeld worden.

### **2.1 Toxines van bacteriën**

Bacteriën zijn veelvuldig in staat tot de vorming van eiwittoxines. Deze kunnen ingedeeld worden in twee groepen, de exotoxines en de endotoxines. Endotoxines vormen een onderdeel van het buitenste membraan van de celwand van Gram-negatieve bacteriën. Endotoxines worden niet door de bacterie uitgescheiden maar komen pas vrij als de bacterie lyseert. De biologische activiteit van een endotoxine is geassocieerd met lipopolysaccharide (LPS). Aangezien LPS geen eiwittoxine is zal deze structuur niet verder behandeld worden.

Voor de mens wordt de meest toxische groep van eiwittoxines gevormd door de exotoxines. In tegenstelling tot de endotoxines, worden exotoxines uitgescheiden door bacteriën. Zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën zijn in staat tot de productie van exotoxines (49). Hieronder zullen enkele bekende exotoxines besproken worden.

#### ***Difterietoxine***

Het difterietoxine wordt geproduceerd en uitgescheiden door de bacterie *Corynebacterium diphtheriae*. Niet alle stammen produceren het toxine, de expressie komt namelijk tot stand in aanwezigheid van het *tox* gen in het genoom van de bacterie. De zeer toxische stammen bezitten zelfs twee of drie *tox* genen. Het *tox* gen is afkomstig van de beta-corynebacteriofaag. De faag kan de bacterie infecteren, waarna deze het *tox* gen tot expressie brengt en daarmee zijn uiteindelijke toxiciteit verkrijgt (11).

De mens is de enige gastheer van *C. diphtheriae*. In het lichaam is het difterietoxine zeer giftig en veroorzaakt difterie. Het toxine remt de eiwitsynthese via stimulatie van adenosine diphosphate ribosylation. Hierdoor kunnen vooral problemen ontstaan aan de bovenste luchtwegen, zoals hoestaanvallen en ademnood. Het toxine is in staat om zich vanuit de longen,

via de bloedbaan, te verspreiden in het lichaam, met als gevolg bloedvergiftiging, aantasting van het hart en in mindere mate de perifere zenuwen (11;50;51). Difterie wordt tegenwoordig voorkomen door inenting met een vaccin gericht tegen het difterietoxine

### ***Toxines van Bordetella pertussis***

Evenals bij *C. diphtheriae* is de mens de enige gastheer van deze bacterie *Bordetella pertussis* (51). Deze veroorzaakt kinkhoest, een infectie gekenmerkt door hevige hoestaanvallen die zelfs tot 12 weken kunnen aanhouden. Vooral bij kinderen kan kinkhoest een ernstig verloop hebben (52). De pathogenese van kinkhoest is complex en een groot aantal virulentiefactoren zijn hierbij betrokken, waaronder enkele exotoxines.

Ten eerste produceert de bacterie het pertussistoxine. Hoewel drie belangrijke stammen van het genus *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* en *B. bronchiseptica*) het *pertussistoxine* gen bezitten, komt het alleen bij *B. pertussis* tot expressie (51). Het pertussistoxine is opgebouwd uit twee subunits, waarbij unit A verantwoordelijk is voor de enzymactiviteit en unit B zowel de binding aan celreceptoren als het binnendringen van unit A in de cellen medieert. Het toxine heeft verschillende effecten op het immuunsysteem, daarmee speelt het pertussistoxine een belangrijke rol bij de kolonisatie van de bacterie in de bovenste luchtwegen (52;53).

Naast het pertussistoxine wordt het adenyl-cyclase-toxine geproduceerd, dat is opgebouwd uit een adenyl-cyclase-domein (ACD) en een hemolysine-domein (HD). HD heeft als primaire functie het mogelijk maken van het intracellulaire transport van ACD. ACD induceert, na activatie, een ongecontroleerde toename van cAMP, een signaalmolecuul dat veel verschillende effecten teweegbrengt afhankelijk van het celtype. Het toxine remt onder andere het immuunsysteem waardoor de infectie zich kan bewerkstelligen (52;53).

Verder produceert *B. pertussis* het 'heat-labile toxin' (voorheen het dermonecrotisch toxine). Dit is echter een cytoplasmatisch eiwit en wordt niet uitgescheiden door de cel. Het toxine is net als het pertussistoxine samengesteld uit twee subunits die beiden een effect hebben op de overdracht van boodschappen tussen cellen. Het toxine heeft daardoor invloed op het ontstaan van ontstekingen en lokale afsterving van het weefsel (52;53;54).

Tegenwoordig wordt getracht kinkhoest te voorkomen met behulp van een nieuw vaccin dat sinds januari 2005 is opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma. Het is een acellulaire vaccin dat één tot vijf van de virulentiefactoren bevat, waaronder in elk geval het pertussistoxine (55).



### ***Choleratoxine***

De infectieziekte cholera wordt veroorzaakt door de bacterie *Vibrio cholerae*. De bacterie produceert verschillende toxines waaronder het choleratoxine. Nadat de bacterie via besmet water of voedsel in de dunne darm terecht is gekomen, kan het choleratoxine onder de juiste omstandigheden, zowel in de omgeving (zoals zonlicht) als in de gastheer (bijvoorbeeld een bepaalde cellulaire respons) tot expressie komen (56;57;58). Tijdens de vermeerdering van de bacterie zal het toxine worden uitgescheiden (58).

Het toxine is opgebouwd uit twee grote subunits, namelijk de toxische subunit A en subunit B. Deze laatste is verantwoordelijk voor de binding van het toxine aan de darmcellen. Dit heeft tot gevolg dat subunit A de cel in migreert waarna een enzym geactiveerd wordt dat vervolgens de darmcellen als een soort pomp laat functioneren. De cellen gaan water verplaatsen vanuit het bloed en de weefsels naar de dunne darm. Dit is de oorzaak van de waterige diarree die kenmerkend is voor cholera (58).

### ***Miltvuurtoxine***

Het miltvuurtoxine wordt geproduceerd door de bacterie *Bacillus anthracis*. De bacterie veroorzaakt de ziekte miltvuur, voornamelijk voorkomend bij dieren, zoals geiten en schapen. Sporadisch kan de bacterie echter ook op mensen overgedragen worden, waarbij huidaandoeningen, long- of darmproblemen kunnen ontstaan (50).

Het miltvuurtoxine is samengesteld uit drie eiwitten, namelijk de 'edema factor' (ED), de 'lethal factor' (LF) en het 'protective antigen'. De binding van de 'protective antigen' aan celreceptoren heeft de expressie van nieuwe celreceptoren tot gevolg, welke herkend worden door EF en LF. EF is de oorzaak van oedeemvorming en LF is essentieel voor de letale activiteit van het toxine. Indien beide factoren de cel binnengaan, leidt dit uiteindelijk tot de vorming van necrotisch weefsel (afhankelijk van de infectieroute). Wanneer de bacterie en het toxine in de circulatie komen, kan dit leiden tot de dood (12;50;52).

### ***Toxines van Clostridium spp.***

De *Clostridia* spp. vormen een bacteriegeslacht waarvan slechts enkele soorten pathogeen zijn voor de mens, zoals *C. tetani* en *C. botulinum*. Als pathogenen van respectievelijk tetanus en botulisme hebben deze bacteriën hun toxiciteit te danken aan eiwittoxines. Beide toxines behoren tot de neurotoxines, maar grijpen aan op verschillende cellen van het zenuwstelsel (52).

Botulisme kan ontstaan doordat het botulinetoxine wordt opgenomen via voedsel dat ontkiemde sporen en bacteriën bevat. Het botulismetoxine wordt in eerste instantie geproduceerd als een 'voorloper'-toxine, samengesteld uit de

neurotoxische-subunit en een niet-toxische-unit. De niet-toxische-unit beschermt de neurotoxische-unit tegen inactivatie tijdens passage door de darm, vervolgens worden de units gesplitst en ontstaat het uiteindelijke neurotoxine (59). Hierna kan het toxine eventueel via de bloedcirculatie het centraal zenuwstelsel bereiken, waardoor slapte of zelfs verlamming van de gastheer kan ontstaan (52).

Tetanus ontstaat meestal doordat wondjes geïnficeerd raken met de sporen van *C. tetani*. Het tetanustoxine wordt geproduceerd tijdens ontkieming van de sporen, vermeerdering, sporulatie en cellyse van de bacteriën. Hierna kan het toxine via de zenuwbanen van de wond migreren naar het centraal zenuwstelsel, alwaar het eventueel kan leiden tot de zware krampen en stijfheid van de spieren.

Het tetanustoxine en het botulinetoxine behoren, naast het difterietoxine, tot de meest toxische substanties die op dit moment bekend zijn. (52).

## 2.2 Toxines van planten

Aangezien planten sessiel zijn, beschikken ze niet over de mogelijkheid om te vluchten voor vijanden, waaronder virussen, bacteriën, insecten en zoogdieren. Dit heeft ertoe geleid dat planten gedurende de evolutie toxische verbindingen zijn gaan ontwikkelen (60). Een aantal van de toxines is, in meer of mindere mate, cytotoxisch, fungitoxisch of toxisch voor insecten en zoogdieren (61;62)

Enkele eiwittoxines die gevormd kunnen worden door planten zijn ricine (*Ricinus communis* L), abrine (*Abrus precatorius* L), modeccin (*Adenia digitata*) en viscum (Viscum album L.). Deze toxines zijn opgebouwd uit twee subunits die door middel van een disulfde binding met elkaar verbonden zijn (2;61;62). De enzymatische-A-subunit kan aangrijpen op de ribosomen met als gevolg een remming in de eiwitsynthese, waarna de cel afsterft. Deze unit geeft het lectine de toxiciteit, hiervoor dient echter wel de B-unit aanwezig te zijn. De B-unit bindt aan de oppervlakte receptoren, waardoor de A-unit de cel ingeleid wordt. De B-unit bezit tevens de mogelijkheid om erythrocyten te laten klonteren (61-63).

Ricine is een bekend voorbeeld van een eiwittoxine en wordt geproduceerd door de wonderboom (*Ricinus communis* L.). De gehele plant is giftig, maar vooral de zaden kunnen hoge concentraties toxines bevatten (2;62). Een vergelijkbaar toxine is abrine dat aanwezig is in de plant het paternosterboontje (*Abrus precatorius* L.) (31). Zaden zijn extreem giftig en kunnen dodelijk zijn voor mensen. Beide eiwittoxines kunnen de oorzaak zijn van ernstige darmproblemen (62;63).

### 2.3 Toxines van dieren

Een groot aantal dieren is in staat tot de productie van eiwittoxines (64). Bekend is dat enkele zoogdieren, bijvoorbeeld het vogelbekdier en verschillende soorten spitsmuizen, toxines produceren. De toxines zijn niet uitermate giftig en brengen hoofdzakelijk verlamming van het prooidier teweeg. Op dit gebied wordt echter zeer weinig onderzoek uitgevoerd (65;66). Vele reptielen, vissen en geleedpotigen zijn daarentegen in staat tot de productie van zeer giftige eiwittoxines. Hieronder zal kort op deze klassen ingegaan worden.

#### *Toxines van reptielen*

Verschillende soorten reptielen zijn in staat om toxines te produceren, vooral slangen vormen een grote groep. Onder de meer dan 3500 slangensoorten, zijn ongeveer 400 soorten giftig voor mensen, waaronder de cobra, de ratelslang en de mamba. De toxines in het gif van deze slangen hebben voornamelijk een negatief effect op het zenuwstelsel. Het gif van de grootste giftige landslang, de Koningscobra (*Ophiophagus hannah*), bevat naast vele neurotoxines ook een eiwittoxine dat een schadelijke effect heeft op het hart (67).

#### *Toxines van vissen*

Van de 25.000 soorten zeevissen zijn er meer dan 200 giftig voor mensen, zoals de pijlstaartroggen (*Urobatix halleri*), de schorpioenvissen (*Scorpanenidae* spp.) en de pietermannen (*Trachinidae* spp.). Waarschijnlijk zijn vissen toxines gaan ontwikkelen ter bescherming van zichzelf. Het merendeel van de giftige vissen beweegt zich namelijk langzaam voort, migreert niet en leeft vaak in schaduwrijke wateren (2;68). Het gif kan afgescheiden worden door middel van bijten of steken, maar er zijn ook vissen bekend waarvan de huid giftige substanties uitscheidt. Deze stoffen bezitten naast een afstotende werking op andere vissen, ook een antibiotische activiteit om zodoende de vissen te beschermen tegen micro-organismen in het water (2;68). Voorbeelden van vissen die eiwittoxines produceren zijn de Indische meerval (*Plotosus canius*), en de steenvis (*Synanceia trachynis*) (69;70).

Het gif van vissen bevat meestal één toxine naast andere actieve componenten (zoals histamine). Het toxine is in veel gevallen verantwoordelijk voor de cardiovasculaire en neuromusculaire. Slechts enkele vissoorten produceren eiwittoxines welke eventueel kunnen leiden tot mortaliteit bij mensen (2;68).

### ***Toxines van geledpotigen***

Slechts een relatief klein aantal geledpotigen is voldoende giftig om potentieel schadelijk te zijn voor mensen. Schorpioenen, duizendpoten en spinnen zijn voorbeelden van giftige geledpotigen (2).

Het gif van bijvoorbeeld spinnen bestaat uit een complex mengsel en het primaire doel is het verlammen of het doden van de prooi. Om dit te bewerkstelligen zijn verschillende neurotoxines in het gif aanwezig. Een groot deel van de neurotoxines zijn eiwitten (71).

Slechts enkele spinnen zijn gevaarlijk voor de mens, hiertoe behoren onder andere loopspinnen (*Chiracanthium* spp.) en zwarte weduwen (*Latrodectus* spp.) (2). De zwarte weduwen produceren voornamelijk toxines tegen de natuurlijke prooi, insecten. Deze spinnen vormen echter één toxine,  $\alpha$ -latrotoxine, dat specifiek gericht is op vertebraten en niet toxisch is voor insecten (72).

### **Bijlage 3: Toxische metabolieten**

Veel organismen zijn behalve tot de productie van eiwittoxines ook in staat tot de vorming van toxische verbindingen die een product zijn van het secundair metabolisme. Het secundair metabolisme produceert verbindingen die niet essentieel zijn voor het voortleven (groei en ontwikkeling) van een organisme. Secundaire metabolieten kunnen schadelijk zijn voor mens, dier, plant en micro-organisme. Schadelijke secundaire metabolieten worden toxische metabolieten genoemd.

Toxische metabolieten worden in een aantal stappen geproduceerd en vereisen dus ook een aantal enzymen die deze reacties kunnen katalyseren. In tegenstelling tot eiwittoxines zijn voor de vorming van de toxische metabolieten die beschreven zijn in de literatuur meerdere genen nodig. Organismen waarvan bekend is dat ze beschikken over een uitgebreid secundair metabolisme zijn planten en schimmels, daarnaast zijn ook dieren en (cyano)bacteriën in staat tot de productie van toxische metabolieten. Aangezien schimmels, planten en (cyano)bacteriën een uitgebreid secundair metabolisme hebben, zullen voorbeelden van toxische metabolieten van deze organismen hieronder behandeld worden.

Het overzicht dat hier geboden wordt, is natuurlijk niet volledig. Het overzicht geeft echter de complexiteit weer van alle mogelijke toxische metabolieten die gevormd kunnen worden.

#### **3.1 Toxische metabolieten van schimmels**

Toxische metabolieten van schimmels worden mycotoxines genoemd. Sinds 1981 zijn er ongeveer 450 mycotoxines bekend. De laatste tien jaar zijn er echter geen nieuwe mycotoxines in de literatuur meer beschreven en volgens de deskundigen zullen er waarschijnlijk ook geen nieuwe mycotoxines meer gevonden worden. Schimmels die mycotoxines produceren worden vooral gevonden in de geslachten *Aspergillus*, *Penicillium* en *Fusarium* en zijn vooral aangetoond in voedsel zoals maïs, pinda's, noten en fruit. Tevens kunnen toxines accumuleren in vlees, eieren en melk. Naast de drie genoemde geslachten behoort ook het geslacht *Stachybotrys* tot de groep van mycotoxine producerende schimmels (73). *Stachybotrys* kan door de productie van sporen en mycotoxines de luchtkwaliteit van gebouwen aantasten.

Meerdere schimmelsoorten kunnen hetzelfde mycotoxine produceren. Daarnaast zijn bepaalde schimmelsoorten in staat om meer dan één mycotoxine te produceren. Voor de productie van mycotoxines zijn complexe reacties

vereist waarbij soms wel 25 genen betrokken kunnen zijn. Deze genen liggen op het genoom in clusters ter grootte van enkele tientallen kilobasenparen.

De meest bekende en schadelijke mycotoxines zijn aflatoxines, trichothecenen, fumonisines, ochratoxine en patuline. Deze zullen hieronder behandeld worden.

### ***Aflatoxines***

De meest bekende en uitvoerigst bestudeerde mycotoxines zijn de aflatoxines, die geproduceerd worden door het geslacht *Aspergillus*. Deze toxines bevinden zich voornamelijk voedsel en veevoer, en veroorzaken daardoor grote economische schade. De toxische *Aspergillus* soorten zijn plantpathogenen en de productie van aflatoxines kunnen slechts plaatsvinden onder bepaalde condities, zoals de hoeveelheid water in voedsel.

Voor de biosynthese van aflatoxine zijn tenminste 23 enzymatische stappen vereist (74). De minimaal 25 genen die hierbij betrokken zijn liggen in een cluster en zijn bijvoorbeeld bij *A. flavus* gelokaliseerd op een regio van circa 75-90 kb. Naast deze schimmelsoort kunnen *A. parasiticus* en *A. nominus* ook aflatoxines produceren (75).

Een tussenproduct van de biosynthetische route van aflatoxine is sterigmatocystine, dat na twee enzymatische reacties wordt omgezet in aflatoxine B<sub>1</sub>. Voor verscheidene ascomyceten en deuteromyceten, waaronder *A. nidulans* en *A. versicolor*, is sterigmatocystine het eindproduct, welke acuut toxisch en carcinogeen is (76). Theoretisch zijn twee extra genen nodig om uit sterigmatocystine aflatoxine te produceren. Uit de praktijk blijkt echter dat de introductie van deze genen niet voldoende is om de betreffende schimmels aflatoxine te laten produceren. Bepaalde genen van de biosynthetische route van aflatoxine kunnen tot expressie gebracht worden in minder verwante organismen, zoals *Saccharomyces cerevisiae* en *Escherichia coli*. Het gen *omtA* codeert voor het O-methyltransferase dat het tussenproduct O-methylsterigmatocystine omzet in aflatoxine. Genetisch gemodificeerde *S. cerevisiae* of *E. coli* waarin het *omtA* gen gekloneerd is, zijn in staat om exogeen toegevoegd O-methylsterigmatocystine om te zetten in aflatoxine B<sub>1</sub> (75).

Deleties en andere genetische effecten resulteren in ‘silencing’ van de betreffende genen in de syntheseroute van aflatoxine (74). Daarnaast zullen de genen die betrokken zijn bij de productie van mycotoxines niet onder alle omstandigheden tot expressie komen. Bij het regelmatig kweken raken sommige aflatoxigene stammen uit de natuur het vermogen om aflatoxine te produceren kwijt. In de literatuur zijn geen aanwijzingen waaruit blijkt dat de genen voor productie of regulatie van aflatoxine verloren zijn geraakt door het regelmatig kweken van de stammen (77).

Aflatoxine B<sub>1</sub> wordt onder de verschillende type aflatoxines beschouwd als de meest potentiële levercarcinogeen voor mens en dier (75;78). Het 'International Agency for Research on Cancer' heeft aflatoxine B<sub>1</sub> als een groep I carcinogeen geclassificeerd. Dit is de hoogste klasse en houdt in dat de verbinding carcinogeen is voor de mens.

### ***Trichothecenen***

De trichothecenen worden voornamelijk gevormd door schimmels behorend tot het geslacht *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Trichoderma*, *Stachybotrys* en *Fusarium* (73). Trichothecenen vormen een groep van zeer diverse verbindingen die de synthese van eiwitten en de replicatie van DNA remmen (73). In tegenstelling tot de aflatoxines, is de kennis omtrent de biosyntheseroute van de verschillende trichothecenen verre van volledig. Voor de productie van trichothecenen zijn meerdere genen nodig waarvan slechts de genen voor de eerste stappen geïdentificeerd zijn. In *Fusarium sporotrichioides* zijn de genen voor de productie van trichocenen waarschijnlijk in clusters gelokaliseerd op het genoom (79).

### ***Fumonisin***

Fumonisin zijn mycotoxines die geproduceerd worden door onder andere *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* en *Alternaria alternata*. Fumonisin remt de biosynthese van sphingolipides die voorkomen in de celmembraan. Er blijkt een relatie te bestaan tussen het ontstaan van slokdarmkanker in de mens en contact met fumonisin (73). Er zijn nog geen enzymen geïsoleerd die betrokken zijn bij de biosynthese van fumonisin. Het is dus nog onbekend of de genen geclusterd zijn in het genoom.

### ***Ochratoxine en patuline***

Het geslacht *Penicillium* bevat ongeveer honderd toxigene soorten die een zeer groot scala aan mycotoxines kunnen produceren, waaronder ochratoxine en patuline (76). Ochratoxine kan ook geproduceerd worden door *A. ochraceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus* en *A. niger*. *P. expansum* veroorzaakt appelrot en is een producent van patuline (76). Patuline is vooral bekend als antibiotica, maar is ook in hoge concentraties onder laboratorium-condities toxisch voor planten en dieren (73). Ochratoxine wordt vooral geassocieerd met remming van enzymen die betrokken zijn bij de biosynthese van fenylalanine en is ook geclassificeerd als een mogelijke carcinogeen behorend tot klasse 2B. Dit houdt in dat de verbinding mogelijk carcinogeen is voor mensen. Ochratoxine leidt waarschijnlijk tot tumoren in de urinewegen en veroorzaakt vermoedelijk niertoxische effecten (73). Ochratoxine wordt

gevormd via een aantal gecombineerde pathways waarbij meerdere genen betrokken zijn die nog niet helemaal zijn opgehelderd (76;80).

### 3.2 Toxische metabolieten van planten

Gedurende de evolutie hebben planten veel toxische verbindingen ontwikkeld. Tot nu toe zijn er in planten vele toxische metabolieten geïdentificeerd (81). Voor de productie van toxische metabolieten zijn vaak 30 enzymatische stappen vereist. Het is onbekend hoe de genen van een biosynthetische route in planten zijn georganiseerd en welke genen een rol spelen hierbij. Het is zowel mogelijk dat de genen verspreid liggen over het genoom als dat ze in clusters georganiseerd zijn.

De start van de syntheseroutes van toxische metabolieten is algemeen aanwezig in planten, maar de routes voor de verdere biosynthese zijn specifiek voor een bepaalde plantensoort of taxonomisch verwante groep van plantensoorten (13). Op basis van de synthesewegen kunnen de secundaire metabolieten in drie groepen ingedeeld worden (13). De eerste biosyntheseweg is de mevalonaatsyntheseweg die leidt tot de biosynthese van pseudo-alkaloïden en terpenen. De aminozuursyntheseweg is de tweede biosyntheseweg en resulteert in de vorming van stikstofhoudende secundaire producten zoals alkaloïden, cyanogene glycosiden en niet-eiwitvormende aminozuren. De laatste syntheseweg is de acetaat-malonaatsyntheseweg die resulteert in de vorming van fenolische verbindingen (13). Van elke syntheseweg zullen secundaire metabolieten behandeld worden.

#### *Pseudo-alkaloïden*

Pseudo-alkaloïden worden ook wel steroïdale glyco-alkaloïden genoemd en zijn stikstofhoudende verbindingen gevormd via de mevalonaatsyntheseweg. Deze glyco-alkaloïden komen maar in enkele families voor zoals bij de *Solanaceae* en *Liliaceae* (82). Sinds 1981 zijn er al meer dan 80 steroïdale glyco-alkaloïden gedetecteerd in aardappelsoorten (*Solanaceae*), waaronder  $\alpha$ -chaconine en  $\alpha$ -solanine (83). Steroïdale glyco-alkaloïden worden via een aantal biosynthese stappen gevormd uit de precursor solanidine. De wijze waarop solanidine gevormd wordt uit de precursor cholesterol in de aardappelplant is nog grotendeels onbegrepen.

Hoge concentraties van steroïdale glyco-alkaloïden zijn vooral gelokaliseerd in de plantorganen met een hoge metabole activiteit. Onrijpe besjes, bloemen en groene delen van de aardappelplant zijn voorbeelden hiervan. Bij het kweken van planten onder verlichting kan de concentratie van steroïdale glyco-alkaloïde in scheuten oplopen tot 17,7 g/kg (83). De maximaal toelaatbare glyco-



alkaloïden concentratie in aardappelen voor consumptie is 200 mg per kg vers gewicht. Steroïdale glyco-alkaloïden kunnen ook een synergistisch effect hebben waarbij de toxiciteit in bepaalde combinaties versterkt wordt zonder dat de concentratie aan steroïdale glyco-alkaloïden is verhoogd. De *Solanum* alkaloïden zijn neurotoxines doordat ze het enzym cholinesterase inactiveren dat de neurotransmitter acetylcholine uit de contactpunten tussen spier en zenuw afbreekt (42).

### **Terpenen**

Terpenen zijn repeterende eenheden van isopentaan of isopreen die gevormd worden via de mevalonaatbiosyntheseweg (13). Pyrethrines zijn monoterpenen die geproduceerd worden door *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Dit insectendodende toxine heeft een lage toxiciteit voor zoogdieren en wordt veelvuldig toegepast als insecticide (84). Pyrethrines komen ook voor in onder andere *Calendula officinalis*, *Chrysanthemum coccinum*, *Tagetes erecta*, *Tagetes minuta*, en *Zinnia elegans*. Tot de triterpenen behoren de cardenoliden en saponinen (85). Cardenoliden, zoals digitoxine van *Digitalis purpurea*, hebben in de mens een werking op het hart doordat ze Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-geactiveerde ATPases beïnvloeden. Saponinen beschadigen bij vissen de kieuwen terwijl ze relatief onschadelijk zijn voor warmbloedige dieren doordat ze niet door de darmwand worden geresorbeerd (82). Voorbeelden van saponinen zijn gypsogenine dat voorkomt bij de *Caryophyllaceae*, medicageenzuur van *Medicago sativa* en hederagenine van *Hedera helix*. De betrokken genen en enzymen bij de productie van pyrethrines en triterpenen zijn nog grotendeels onbekend (84;85).

### **Alkaloïden**

Alkaloïden zijn heterocyclische stikstofhoudende secundaire metabolieten die worden gevormd via de aminozuursyntheseweg. Een groot deel van de planten bevat alkaloïden waarvan er al ruim 12.000 geïdentificeerd zijn. Alkaloïden werken in de plant als afweerstoffen tegen herbivoren (86). Tot de alkaloïden behoren onder andere strychnine, atropine, morfine, codeïne, efedrine, en colchicine. Alkaloïden bestaan uit een aantal aminozuurprecursors. Op basis hiervan kunnen alkaloïden ingedeeld worden in verschillende typen. Voorbeelden van twee typen, de indole en isoquinoline alkaloïden, worden hieronder kort toegelicht.

Terpenoïde indole alkaloïden behoren tot de indole alkaloïden en zijn opgebouwd uit tryptofaan (86). Terpenoïde indole alkaloïden vormen een kwart van alle alkaloïden waarbij de terpenoïde component gevormd wordt uit secologanine. De biosyntheseroutes voor indole alkaloïden zijn deels overlappend met elkaar waarbij voor sommige indole alkaloïden tenminste tien

enzymatische stappen betrokken zijn. Dit is bijvoorbeeld het geval voor ajmaline (87).

Benzylisoquinoline alkaloiden vormen een grote diverse groep van alkaloiden (2500 verbindingen) die behoren tot de isoquinoline alkaloiden. De benzylisoquinoline alkaloiden, waaronder morfine, codeïne, colchicine, tubocurarine, berberine en sanguinarine, worden gevormd uit tyrosine en hebben antiherbivore en anti-microbiële werkingen (86). De biosynthese van benzylisoquinoline alkaloiden verloopt via een aantal stappen met tussenproducten als dopamine en norcoclaurine.

### ***Cyanogene glycosides***

Cyanogene glycosides zijn stikstofhoudende verbindingen die gesynthetiseerd worden uit aminozuren. Wanneer de plant beschadigd raakt kunnen de verbindingen via twee enzymatische stappen afgebroken worden tot vluchtige toxische gassen zoals waterstofcyanide (HCN). HCN blokkeert de cellulaire respiratie door te binden aan heemgroepen van respiratoire enzymen. De biosynthese van de cyanogene glycoside dhurrin is volledig opgehelderd en bestaat slechts uit drie enzymatische stappen (88;89). De enzymen die betrokken zijn bij de biosynthese van dhurrin in *Sorghum* zijn gekloneerd in *Arabidopsis thaliana* en dit heeft geleid tot de productie van dhurrin (89). Ook bepaalde plantensoorten die als voedsel voor de mens gebruikt worden bevatten cyanogene glycosides. De knollen van bijvoorbeeld de cassave (*Manihot esculenta*) bevatten hoge concentraties aan cyanogene glycosides. Een bepaalde bereidingswijze van cassave is noodzakelijk om cyanidevergiftiging te voorkomen.

### ***Niet-eiwitvormende aminozuren***

Niet-eiwitvormende aminozuren zijn toxisch doordat ze naast eiwitvormende aminozuren ingebouwd worden in eiwitten van bijvoorbeeld herbivoren, waardoor het eiwit niet meer functioneel is. Canavanine is een niet-eiwitvormende aminozuur dat sterk lijkt op het aminozuur arginine (13). Het komt onder andere voor in de zaden van *Diclea megacarpa*. De kever *Caryedes brasiliensis* is geadapteerd aan canavanine en kan net als de plant onderscheid maken tussen canavanine en arginine.

### ***Fenolische verbindingen***

Fenolische verbindingen worden gevormd via de acetaat-malonaatsyntheseweg. Deze secundaire metabolieten beschermen de plant tegen UV-straling, werken als afweerstoffen en zijn betrokken bij allelopathie (13). Allelopathie houdt in dat planten metabolieten in de omgeving vrijlaten, die een negatieve invloed hebben op andere planten.

### 3.3 Toxische metabolieten van cyanobacteriën en algen

Een vooraanstaande bron van mariene toxines en cyanotoxines zijn dinoflagellaten, diatomeeën en cyanobacteriën. De belangrijkste toxische geslachten van cyanobacteriën, ook wel blauwalgen genoemd, zijn *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Microcystis*. Het aantal toxische cyanobacteriesoorten is sterk groeiende (*Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Cylindrospermopsis*, *Coelasmaerium*, *Nodularia*, *Nostoc* en *Gleotrichi*), doordat er veel onderzoek verricht wordt op dit gebied (90;91). Tot op heden zijn veertig van de tweeduizend cyanobacteriesoorten geïdentificeerd als toxigeen (92). Toxines van cyanobacteriën en algen kunnen in relatief kleine hoeveelheden al letaal zijn.

In overeenstemming met de planten en schimmels is de biosynthetischeroute voor cyanotoxines gecodeerd door meerdere genen. De betrokken genen liggen in clusters, waarbij het ontbreken of uitschakelen van één gen de productie van de cyanotoxine kan blokkeren. De LD<sub>50</sub> waarden van cyanotoxines liggen vaak in de orde van µg/kg in tegenstelling tot de meeste toxische metabolieten van planten en schimmels die minder toxisch zijn. Op basis van de werking van de toxines kunnen ze ingedeeld worden in hepatotoxines, neurotoxines en dermatotoxines.

Het meest bestudeerde cyanotoxine is microcystine. Dit hepatotoxine is een cyclische peptide dat geproduceerd kan worden door de geslachten *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaena* en *Oscillatoria*. Hepatotoxines veroorzaken schade aan de lever. Er zijn ruim 60 varianten van microcystine in de literatuur bekend, waaronder nodularine. De biosynthese van microcystine is genetisch opgehelderd en bestaat uit tien genen gelegen in een gencluster van ongeveer 55 kb (93). Het uitschakelen van één gen kan de productie van microcystine al blokkeren (91).

Saxitoxine is een alkaloïde en blokkeert het neuromusculaire systeem. Het neurotoxine wordt onder andere geproduceerd door cyanobacteriën van de geslachten *Anabaena*, *Oscillatoria* en *Aphanizomenon*, maar ook door dinoflagellaten. De biosyntheseroute van saxitoxine is nog geheel onbekend (91). Andere neurotoxines van dinoflagellaten zijn ciguatoxine, maitotoxine en brevetoxine (94). Hiernaast kunnen ook diatomeeën neurotoxines produceren, zoals het aminozuur 'domoic acid' van *Pseudo-nitzschia multiseries* (95).



**Bijlage 4: R-TECS Database**

LD<sub>50</sub> lijst voor toxines volgens de Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) van het National Institute for Occupational Safety and Health, USA, 3 december 1998 (20).

<b>Toxine</b>	<b>Soort</b>	<b>Route<sup>1</sup></b>	<b>LD<sub>50</sub> in µg/kg</b>
Abrin	muis	IP	20
Abrin reconstituted (A +B mix)	muis	IP	6
Abrin A	muis	IP	10
Abrin B	muis	IP	25
Abrin C	muis	IP	16
Abrin D	muis	IP	31
<i>Clostridium botulinum</i> (natural product)	muis	SC	0,00003
<i>C. botulinum</i> neurotoxin	muis	IP	0,0002
<i>C. botulinum</i> toxin A	muis	IP	0,0012
<i>C. botulinum</i> toxin B	muis	IP	0,0012 – 0,002
<i>C. botulinum</i> toxin C1	muis	IV	0,0011
<i>C. botulinum</i> toxin C2	muis	IP	0,0012
<i>C. botulinum</i> toxin D	muis	IP	0,0004
<i>C. botulinum</i> toxin E	muis	IP	0,0011
<i>C. botulinum</i> toxin F	muis	IV	0,0025
<i>Clostridium perfringens</i>	muis	IP	0,1
Conotoxins - GI, GIIIA, GIIIB, GIVA MI, MVIIA, MVIIIB, SIA, SVIB	muis	IP	12 – 30
Diacetoxyscirpenol	muis	IP	7839
Ricine	muis	IP	2
Ricine A	muis	IP	5
Ricine B	muis	IP	35
Ricine C	muis	IP	17,5
Ricine D	muis	IP	6,2
Ricine D alanine-chain protein	muis	IP	300
Ricine D isoleucine-chain reduced	muis	IP	29
Ricine, reduced	muis	IP	200
Ricine, total hydrolysate	muis	IP	4,1
Ricine toxin -Con A	muis	IP	41500
Saxitoxin, Saxitoxin hydrate	muis	IP	8
Saxitoxin dihydrochloride, hydrochloride	muis	IP	8
Saxitoxin p-bromobenzenesulfonate	muis	IP	10
Shiga toxin	muis	IP	0,25
<i>Shigella shiga</i> neurotoxin	muis	IP	1,35
<i>Staphylococcus</i> enterotoxin	muis	IP	1333
<i>Staphylococcal</i> enterotoxin B	aap	IP	25
<i>Staphylococcus</i> enterotoxin F	konijn	SC	2
	konijn	IV	10

T-2 toxin	muis	IP	3000
T-2 toxin tetraol	muis	IP	11000
T-2 hemisuccinate	muis	IP	7500
Tetrodotoxin	muis	IP	8
Tetrodotoxin citrate, 2 hydroxy	rat	IV	0,008
Tetrodotoxin 4,9-anhydro	muis	OR	16900
	muis	IV	986
Tetrodotoxin 4,9 anhydro,8,8-diacetate	muis	IP	>50000
Tetrodotoxin 4-amino- 4-deoxy	muis	OR	26100
	muis	IV	477
Deoxytetrodotoxin	muis	OR	2700
	muis	IV	41,7
Methoxytetrodotoxin	muis	OR	12700
	muis	IV	322
Ethoxytetrodotoxin	muis	IP	692

---

<sup>1</sup> IP = intraperitoneaal, IV = intraveneus, OR = oraal, INH = inhalatie, SC = subcutaan

**Bijlage 5: LD<sub>50</sub> lijsten**

Lijst met LD<sub>50</sub> waarden van diverse toxines afkomstig uit scorpioenen, spinnen, vissen, slangen en insecten (21-37). Gebruikte afkortingen: SC = subcutaan IM = intramusculair, IP = intraperitoneaal, IV = intraveneus

<b>Schorpioenen</b>	<b>Route van toediening met LD<sub>50</sub> waarde in mg/kg</b>			
	SC	IM	IV	IP
<i>Androctonus australis</i>	0.32			
<i>Androctonus crassicauda</i>	0.40			
<i>Androctonus amoreuxi</i>	0.75			
<i>Androctonus mauretanicus</i>	0.31			
<i>A. mauretanicus mauretanicus</i>	0.32			
<i>Androctonus bicolor</i>			1.21	
<i>Androctonus aeneas aeneas</i>	0.31			
<i>A. oeneas oeneas</i>	0.31			
<i>Buthus occitanus tunetanus</i>	0.90			
<i>Buthus occitanus paris</i>	4.15			
<i>Buthus occitanus</i>	0.9		1.44	
<i>Buthiscus bicalcaratus</i>	0.60			
<i>Buthacus leptochelys</i>	0.765		5.62	
<i>Buthacus arenicola</i>	3.5		3.25	
<i>Buthotux minax</i>	4.25			
<i>Centruroides exilicauda</i>	1.12-1.46			1.1-1.90
<i>Centruroides limpidus</i>	0.69		1.56	
<i>Centruroides limpidus tecomanus</i>	0.69			
<i>Centruroides noxius</i>			0.31	
<i>Centruroides suffusus</i>				0.43
<i>Centruroides santa maria</i>	0.385			
<i>Compsobuthus acuticarinatus</i>			0.75	
<i>Centruroides margaritatus</i>	59.9			
<i>Compsobuthus matheisseni</i>			4.94	
<i>Hadogenes spp</i>	1800			
<i>Hadrurus arisonensis</i>	198			168
<i>Hottentotta saulcyi</i>			1.01	
<i>Hottentotta judaicus</i>			7.94	
<i>Hemiscorpius lepturus</i>			5.81	
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	0.25			
<i>Mesobuthus eupeus</i>			1.45	
<i>Opisththalmus sp.</i>	600		625	
<i>Odontobuthus doriae</i>			0.19	
<i>Parabuthus transvaalicus</i>	4.25			
<i>Parabuthus spp</i>	35-100			
<i>Pandinus exitialis</i>	40			
<i>Scorpio maurus</i>	141.6		9.37	
<i>Tityus serrulatus</i>	0.43			
<i>Tityus bahiensis</i>	9.35		1.38	
<i>Tityus trinitatis</i>	2.00			

<b>Insecten</b>	<b>Route van toediening met LD<sub>50</sub> waarde in mg/kg</b>			
	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	IP mg/kg
<i>Aphidoletes spp.</i>			2.5	
<i>Apis mellifera</i>			2.8	
<i>Cyrtops iheringi</i>		17	7.5	
<i>Dasymutilla klugii</i>			71	
<i>Latrodectus mactans tredecimgluttatus</i>	0.90			
<i>Ostostigmus scabricauda</i>		3.5	0.6	
<i>Pogonomyrmex maricopa</i>			0.12	
<i>Pogonomyrmex spp.</i>			0.66	
<i>Polistes canadensis</i>			2.4	
<i>Scolopendra subspinipes</i>		60	2.35	
<i>Scolopendra viridicornis</i>		12.5	1.5	
<i>Scolopocryptos ferrugineus</i>		19.5	8	
<i>Vespula squamosa</i>			3.5	

<b>Vissen</b>	<b>Route van toediening met LD<sub>50</sub> waarde in mg/kg</b>			
	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	OR mg/kg
<i>Pterois spp</i>	4.4		1.1	
<i>Synanceja spp</i>	0.8		0.2	
<i>Diodon hystrix</i>				0.008

<b>Slangen</b>	<b>Route van toediening met LD<sub>50</sub> waarde in mg/kg</b>			
	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	IP mg/kg
<i>Acalyptophis peroni</i>	0.079			
<i>Acanthophis antarcticus</i>	0.5		0.25	
<i>Agkistrodon bilineatus taylori</i>			2.4	2.3
<i>Agkistrodon bilineatus</i>			2.4	1.155
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	25.6		10.9	10.9
<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>		20		
<i>Agkistrodon contortrix mokasen</i>			2.7	4.222
<i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>			2.044	4.844
<i>Agkistrodon piscovorus</i>	25.8		4	5.1
<i>Aipysurus duboisi</i>	0.044			
<i>Aipysurus eydouxi</i>			4	
<i>Aipysurus laevis</i>	0.264	0.09		
<i>Atractaspis dahomeyensis</i>			2.24	
<i>Atractaspis engaddensis</i>			0.25	
<i>Atropoides nummifer</i>			2.4	



<b>Slangen</b>	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	IP mg/kg
<i>Atropoides picadoi</i>			1.6	
<i>Austrelaps superbus</i>	0.5			0.28
<i>Bitis arietans</i>		2	1.32	
<i>Bitis caudalis</i>			1.2	
<i>Bitis gabonica</i>	12.5	5.2	6.722	1.589
<i>Bitis nasicornis</i>		8.6	1.1	
<i>Bothriechis schlegeli</i>	33.2		1.6	
<i>Bothrops alternatus</i>	15.8		1.96	
<i>Bothrops asper</i>			1.244	2.844
<i>Bothrops atrox</i>	22		2.835	3.8
<i>Bothrops colombiensis</i>			2.3	
<i>Bothrops jararaca</i>	7		1.1	
<i>Bothrops jararacussu</i>	13		0.46	
<i>Bothrops neuwiedi</i>	14.2		2.3	
<i>Boulengeria annulata</i>	0.143			
<i>Boulengeria christyi</i>	0.12			
<i>Bungarus caeruleus</i>	0.365		0.169	0.089
<i>Bungarus fasciata</i>	3.6		1.289	1.55
<i>Bungarus multicinctus</i>	0.108		0.113	0.08
<i>Calloselasma rhodostoma</i>	23.4		5.2	4.9885
<i>Causus rhombeatus</i>	15		8.75	
<i>Cerastes cerastes</i>	15		0.5	0.3
<i>Cerastes cornutus</i>			5.05	
<i>Cerastes vipera</i>			0.64	0.25
<i>Crotalus adamanteus</i>	14.6		1.65	2.295
<i>Crotalus atrox</i>	18.5	20	2.72	5.588
<i>Crotalus basiliscus</i>	2.8			
<i>Crotalus catalinensis</i>		10.9		4.1
<i>Crotalus cerastes</i>				4
<i>Crotalus durissus durissus</i>			1.244	0.667
<i>Crotalus durissus terrificus</i>			0.262	0.216
<i>Crotalus durissus totonacus</i>				2.5
<i>Crotalus enyo enyo</i>		4.6		
<i>Crotalus exul</i>	9.92	9.2	2.17	3.9
<i>Crotalus horridus horridus</i>	3.1		2.107	2.272
<i>Crotalus intermedius</i>			1.58	
<i>Crotalus lepidus klauberi</i>	23.95		9	
<i>Crotalus mitchelli mitchelli</i>		0.3		0.18
<i>Crotalus mitchelli pyrrhus</i>		9.6		2.7
<i>Crotalus polystictus</i>	13.3		3.37	
<i>Crotalus pricei pricei</i>		11.5	3.07	
<i>Crotalus scutulatus salvini</i>			0.24	
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>			0.189	0.159
<i>Crotalus tigris</i>	0.21		0.056	
<i>Crotalus viridis caliginis</i>				2.26
<i>Crotalus viridis concolor</i>			0.0825	0.2
<i>Crotalus viridis helleri</i>			1.135	2.44
<i>Crotalus viridis lutosus</i>				2.2

<b>Slangen</b>	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	IP mg/kg
<i>Crotalus viridis viridis</i>			1.01	2
<i>Crotalus willardi willardi</i>			1.61	
<i>Cryptophis nigrescens</i>	2.67			
<i>Daboia russelii formosensis</i>	1.37		0.4	0.489
<i>Daboia russelii russelii</i>	0.75		0.133	0.4
<i>Daboia russelii siamensis</i>			2.11	
<i>Deinagkistrodon acutus</i>	9.2		0.38	
<i>Demansia olivacea</i>	714.2			
<i>Dendroaspis angusticeps</i>	3.05		1.3	0.117
<i>Dendroaspis jamesoni</i>	1		0.72	0.414
<i>Dendroaspis polylepis</i>	0.32		0.25	0.941
<i>Dendroaspis viridis</i>	0.7		0.8	0.33
<i>Dispholidus typus</i>			0.72	
<i>Echis carinatus multisquamatus</i> (Iran)			3.26	
<i>Echis carinatus</i> <i>sochureki</i> (Pakistan)			2.98	
<i>Echis carinatus</i>	0.151			2.15
<i>Echis coloratus</i>			0.575	0.263
<i>Echis ocellatus</i> (Nigeria)			2.71	
<i>Echis pyramidium</i> (Egypt)			0.65	
<i>Echis pyramidium</i> (Kenya)			0.94	
<i>Echis pyramidium</i> (Saudi Arabian)			1.67	
<i>Emydocephalus annulatus</i>	25			
<i>Enhydrina schistosa</i>	0.1125		0.26	0.107
<i>Eristicophis macmohoni</i>			7.5	
<i>Gloydius blomhoffi</i>	20			
<i>Gloydius halys</i>			9.75	
<i>Hemachatus haemachatus</i>	2.65		1.5	
<i>Hoplocephalus stephensi</i>	1.36			
<i>Hydrophis belcheri</i>		0.155		
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	0.464		0.456	0.24
<i>Hydrophis elegans</i>	0.26	0.21		
<i>Hydrophis fasciatus</i>			0.175	
<i>Hydrophis klossi</i>				0.365
<i>Hydrophis major</i>	0.193			
<i>Hydrophis melanosoma</i>	0.111	0.082		0.4
<i>Hydrophis nigrocinctus</i>	0.343			
<i>Hydrophis ornatus</i>		0.12	2.2	
<i>Hydrophis spiralis</i>				0.315
<i>Hydrophis stricticollis</i>	0.164			
<i>Kerilia jerdoni</i>				0.53
<i>Lachesis muta</i>	36.9		4.51	6.17
<i>Lapemis hardwicki</i>	0.541		0.8	0.26
<i>Laticauda colubrina</i>	0.435		0.4	
<i>Laticauda laticauda</i>			0.163	
<i>Laticauda semifasciata</i>	0.273		0.34	
<i>Macrovipera lebetina</i>	16		0.8	

<b>Slangen</b>	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	IP mg/kg
<i>Micrurus alleni</i>			0.74	0.705
<i>Micrurus annulatus hertwigi</i>			1.76	0.951
<i>Micrurus dumarillii</i>			1.02	0.96
<i>Micrurus frontalis frontalis</i>				0.592
<i>Micrurus fulvius</i>	1.3		0.3	
<i>Micrurus micrurus anomalus</i>				0.118
<i>Micrurus nigrocinctus</i>			0.394	0.701
<i>Micrurus spixi obscurus</i>				1.16
<i>Naja atra</i>	0.29		0.345	
<i>Naja haje</i>	1.15		0.96	0.185
<i>Naja kaouthia</i>			0.373	0.225
<i>Naja melanoleuca</i>			0.6	0.324
<i>Naja naja</i>	0.45		0.35	0.315
<i>Naja nigricollis</i>		0.44	1.15	0.4
<i>Naja nivea</i>	0.72		0.57	0.4
<i>Naja oxiana</i>			0.96	
<i>Naja pallida</i>				2
<i>Notechis a. niger</i>	0.131			
<i>Notechis a. occidentalis</i>	0.194			
<i>Notechis a. serventyi</i>	0.338			
<i>Notechis scutulatus</i>	0.214		0.04	
<i>Ophiophagus hannah</i>	1.7		1.31	1.644
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	0.025			
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	0.106		0.013	0.009
<i>Pelamis platurus</i>	0.067		0.22	
<i>Porthidium nasuta</i>			4.6	
<i>Praescutata viperina</i>			4.5	
<i>Pseudechis australis</i>	1.94		0.3	
<i>Pseudechis colletti</i>	2.38			0.84
<i>Pseudechis guttatus</i>	2.13			
<i>Pseudechis papuanus</i>	1.09			
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	2		0.54	
<i>Pseudocerastes fieldi</i>			0.275	0.02
<i>Pseudocerastes persicus</i>			15.26	1.0
<i>Pseudonaja affinis</i>	0.66			
<i>Pseudonaja nuchalis</i>	0.473			
<i>Pseudonaja textilis</i>	0.0365		0.01	
<i>Rhabdophis subminiatus</i>			1.29	
<i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	24.3		12.59	6.822
<i>Thelotornis kirtlandi</i>			1.01	
<i>Trimeresurus albolabris</i>	12.75		0.37	
<i>Trimeresurus elegans</i>			5.225	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>			3.689	5.07
<i>Trimeresurus gramineus</i>	8.6			
<i>Trimeresurus macrosquamatus</i>			5.225	
<i>Trimeresurus okinavensis</i>			3	15
<i>Trimeresurus stejnegeri</i>			5.225	
<i>Tropidolaemus wagleri</i>	6.19		0.7833	3.58

<b>Slangen</b>	SC mg/kg	IM mg/kg	IV mg/kg	IP mg/kg
<i>Vipera ammodytes</i>	6.59		0.8	0.415
<i>Vipera aspis</i>		4.7	1	
<i>Vipera berus</i>	6.45		0.55	
<i>Vipera bornmuelleri</i>	6.25		0.605	1.92
<i>Vipera latifi</i>	4.61		0.348	2.07
<i>Vipera palaestinae</i>	9.4		0.3	1.9
<i>Vipera xanthina</i>			6.7	
<i>Walterinnesia aegyptia</i>	0.4		0.48	0.133

## **Bijlage 6: Mogelijke carcinogenen**

Hieronder worden (mogelijke) carcinogene substanties weergegeven die geclassificeerd zijn door het IARC (47).

### Geproduceerd door schimmels:

Aflatoxine B1

Aflatoxine M1

Sterigmatocystine

Ochratoxine A

Fumonisine B1

### Geproduceerd door (blauw)algen:

Microcystine