

> Retouradres Postbus 43006 3540 AA Utrecht

**Aan de Inspecteur-Generaal van de Nederlandse
Voedsel- en Warenautoriteit**

**Van de directeur bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering**

**Advies over de gezondheidskundige waarde van
TTX in oesters en mosselen**

**Bureau Risicobeoordeling &
onderzoeksprogrammering**

Catharijnesingel 59
3511 GG Utrecht
Postbus 43006
3540 AA Utrecht
www.nvwa.nl

Contactpersoon

T 088 223 33 33
risicobeoordeling@vwa.nl

Onze referentie

NVWA/BuRO/2017/263

Datum

6 juni 2017

Aanleiding

Op 9 februari 2016 heeft Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering (BuRO) advies uitgebracht over de risico's van tetrodotoxines (TTX) in mosselen en oesters (BuRO, 2016).

In dit advies wordt gesteld dat als wordt aangenomen dat een persoon van 60 kg 400 g schelpdiervlees consumeert, bij een gehalte hoger dan 20 microgram TTX per kg mossel- of oestervlees al effecten kunnen optreden.

Op basis van dit advies heeft de NVWA een limietwaarde van TTX van 20 microgram/kg gehanteerd voor Nederlandse productiegebieden voor levende tweekleppige weekdieren. Dit getal was gebaseerd op de toenmalige detectielimiet voor het kunnen detecteren van TTX in mossel- of oestervlees en gekoppeld aan het hanteren van het voorzorgsprincipe. Toen was het nog niet goed mogelijk om een goed onderbouwd maximaal toelaatbaar gehalte TTX in mosselen- en/of oestervlees af te leiden op basis van toxicologische studies.

Verder adviseerde BuRO het onderwerp op de internationale agenda te plaatsen en via de Europese Commissie (EC) een EFSA-opinie op te stellen. Deze opinie is inmiddels gepubliceerd (EFSA CONTAM Panel, 2017). De EFSA-opinie heeft gebruikgemaakt van recent toxicologisch onderzoek van Abal et al. (2017).

In 2016 heeft BuRO de Universiteit Utrecht gevraagd interspecies-onderzoek te doen naar de *in vitro* neurotoxiciteit van TTX. Met de resultaten van dit onderzoek zou het mogelijk kunnen zijn een betere onderbouwing voor een maximaal toelaatbaar gehalte TTX in mossel- en/of oestervlees af te leiden. Dat onderzoek is inmiddels afgerond en gepubliceerd (Kasteel en Westerink, 2017).

Voor BuRO was de totstandkoming van de EFSA-opinie en de publicatie van het onderzoek van de Universiteit Utrecht aanleiding voor onderzoek naar het aanscherpen van haar advies van 2016 over het maximaal toelaatbare gehalte van TTX in mossel- en/of oestervlees.

Onderzoeksvragen

BuRO heeft het Front Office Voedsel- en Productveiligheid (FO) de volgende vragen gesteld:

- 1 Is de gezondheidkundige waarde uit de EFSA-opinie voldoende wetenschappelijk onderbouwd?
- 2 Is de afgeleide norm (concentratie TTX in mosselvlees) in deze opinie voldoende wetenschappelijk onderbouwd?
- 3 Zijn de gegevens uit de publicatie van de Universiteit van Utrecht (Kasteel en Westerink, 2017) in de opinie (voldoende) meegenomen? Zo niet: zal het meewegen van de gegevens van het desbetreffende rapport aanleiding kunnen geven tot een wijziging in de gezondheidkundige waarde of in de afgeleide norm?

Aanpak

BuRO heeft de EFSA-opinie, het onderzoek van de Universiteit Utrecht en de antwoorden van het FO gebruikt voor het afleiden van een maximaal toelaatbaar risiconiveau van TTX in mossel- en/of oestervlees. De methodologie is die zoals beschreven in ECHA (2012) en EFSA (2012).

Daarnaast heeft BuRO deelgenomen aan de 'Expert Meeting on Tetrodotoxin in marine bivalves' op 2 mei 2017 in Wageningen om zich te laten informeren door de aanwezige deskundigen.

Onderzoeksresultaten

Uit de onderzoeken van EFSA en de Universiteit Utrecht blijkt dat het op basis van nieuwe experimentele toxicologische gegevens nu wel mogelijk is om een maximaal toelaatbaar risiconiveau van TTX in mossel- en/of oestervlees af te leiden. Dit maximaal toelaatbare risiconiveau is vastgesteld op 44 microgram TTX/kg mossel- en/of oestervlees.

Uit het onderzoek blijkt echter dat er nog verschillende onzekerheden zijn. Zo is er nog onzekerheid over de opzet van en de geen-effect dosis uit de studie van Abal et al. (2017), die de basis vormt van het maximaal toelaatbare risiconiveau van TTX. Verder zijn er nog onzekerheden omtrent de verschillen in gevoeligheden tussen proefdier en de mens, over kwetsbare groepen bij de mens en over de invloed van andere toxische stoffen en medicijnen op de neurotoxische werking van TTX. Gezien deze onzekerheden wordt een voorlopig maximaal toelaatbaar risiconiveau voorgesteld.

Gebaseerd op de onderzoeksresultaten, luiden de antwoorden op de onderzoeksvragen als volgt.

- 1 Is de gezondheidkundige waarde uit de EFSA-opinie voldoende wetenschappelijk onderbouwd?

Ja, maar er zijn nog resterende onzekerheden.

- 2 Is de afgeleide norm (concentratie TTX in mosselvlees) in deze opinie voldoende wetenschappelijk onderbouwd?

Ja, maar er zijn nog resterende onzekerheden.

3 Zijn de gegevens uit de publicatie van de Universiteit van Utrecht (Kasteel en Westerink, 2017) in de opinie (voldoende) meegenomen? Zo niet: zal het meewegen van de gegevens van het desbetreffende rapport aanleiding kunnen geven tot een wijziging in de gezondheidkundige waarde of in de afgeleide norm?

Nee, de gegevens van de Universiteit van Utrecht zijn niet meegenomen, maar zouden niet tot een andere conclusie hebben geleid. Weliswaar wordt het onderzoek door het FO als waardevol gezien, maar er kan op basis van dit *in vitro* onderzoek geen uitspraak worden gedaan over de vergelijking tussen mens en proefdier *in vivo*.

Conclusies

- Door nieuw toxicologisch onderzoek blijkt dat er een maximaal toelaatbaar risiconiveau van 44 microgram TTX/kg in mossel- en/of oestervlees kan worden afgeleid, die in plaats komt van de limietwaarde van 20 microgram TTX/kg. Er zijn echter nog verschillende onzekerheden. Toch blijken verschillende afleidingsmethodieken ongeveer op hetzelfde maximaal toelaatbare risiconiveau uit te komen en blijkt de waarde uit de EFSA-opinie daarom voldoende beschermend voor de mens.
- De onzekerheden in de toxicologische onderbouwing van het risiconiveau moeten nog verder worden onderzocht.

Advies

Aan de inspecteur-generaal van de NVWA

- Verhinder dat schelpdieren (mosselen en oesters) waarin minimaal 44 microgram TTX/kg is aangetroffen in de handel komen.

Ten slotte, BuRO zal initiatief nemen om onderzoek uit te laten voeren om de onzekerheden in de toxicologische onderbouwing beter in kaart te brengen. Ik sluit niet uit dat dit kan resulteren in een nader advies over de gezondheidkundige waarde van TTX in schelpdieren.

Hoogachtend,

prof. dr. Antoon Opperhuizen

directeur bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Onderbouwing

I. Stand van zaken follow-up advies BuRO van 9 februari jl over TTX in schelpdieren

Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering (BuRO) heeft op 9 februari 2016 een advies uitgebracht over de risico's van tetrodotoxines (TTX) in mosselen en oesters (referentie NVWA/BuRO/2016/79). Dit advies luidde:

1. *Het onderwerp op de internationale agenda plaatsen en via de Europese Commissie een EFSA opinie op te laten stellen. Vervolgens moet worden bepaald of (geharmoniseerde) maatregelen noodzakelijk zijn ter bescherming van de volksgezondheid;*
2. *BuRO adviseert tot het moment dat er een EFSA opinie is en (geharmoniseerde) maatregelen zijn ingesteld om schelpdieren (mosselen en oesters) waarin TTX is aangetroffen vanuit het voorzorgsprincipe niet in de handel te brengen. Dit in de geest van de wet conform EU verordening 853/2004.
Het hanteren van het voorzorgsprincipe is ingegeven doordat het niet mogelijk is om een goed onderbouwd maximaal toelaatbaar gehalte in mosselen – en/of oestervlees af te leiden; het acute effect bij een geringe blootstelling zeer ernstig tot dodelijk kan zijn; de waarden voor TTX waarbij toxicologische effecten van minimaal tot letaal te verwachten zijn liggen dicht bij elkaar en er zijn nog zoveel onzekerheden.*
3. *Om een adequaat risicogericht monitoringsprogramma in te stellen op zowel nationaal als internationaal (EU) niveau.*
4. *Nader onderzoek in stellen naar de herkomst van TTX in schelpdieren (mosselen en oesters) in Nederlandse mossel- en oesterpercelen waarbij ook gekeken wordt naar de relatie van algenbloei en de aanwezigheid van TTX als ook seizoen gebondenheid van het voorkomen van TTX.*

De stand van zaken is als volgt.

Ad 1

In 2016 heeft Nederland het onderwerp op de Europese agenda geplaatst en heeft de Europese Commissie (EC) de 'Working Group Bivalve Molluscs' bijeen geroepen. De EC heeft vervolgens EFSA gevraagd een opinie over TTX op te stellen. De vraag van de EC is te vinden op de website van EFSA: EFSA-Q-2016-00399: Request for a scientific opinion on the evaluation of the toxicity of Tetrodotoxins (TTX) and TTX-analogues in bivalve molluscs and marine gastropods, die beschikbaar is via: <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/wicket/page?8>. EFSA heeft dat verzoek opgepakt en heeft die opinie inmiddels afgerond en gepubliceerd (EFSA CONTAM Panel, 2017).

Ad 2

De NVWA heeft in de geest van de algemene levensmiddelenverordening (vo178/2002) een notificatie gedaan, die stelt: "De Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) zal in Nederland het gehalte TTX dat betrouwbaar en reproduceerbaar kan worden bepaald met de gebruikte analysemethode, zijnde groter of gelijk aan 20 µg/kg (LOQ/bepalingsgrens), als limiet hanteren voor

Nederlandse productiegebieden (en indien van toepassing voor verwatergebieden) voor levende tweekleppige weekdieren voor het nemen van maatregelen." De notificatie staat open voor opmerkingen van andere Europese lidstaten als onderdeel van de stand still die door de Europese Commissie binnen de notificatie is opgelegd. Nederland handhaaft de norm voor TTX op basis van het voorzorgsprincipe zoals beschreven in artikel 7 van de Verordening 178/2002. Inmiddels heeft de EC aangegeven dat Nederland de beleidslijn mag publiceren. Nederland publiceert deze vervolgens nog niet in afwachting van het EFSA advies en het nieuwe advies van BuRO over TTX. Zo lang Nederland de beleidslijn nog niet heeft gepubliceerd is de procedure voor de EC nog niet afgerond.

Ad 3

De NVWA heeft inmiddels een nationaal risicogericht monitoringsprogramma ingesteld. Op internationaal niveau is binnen de Europese Unie verder aandacht gevraagd voor intensievere monitoring. O.a. Ierland en het Verenigd Koninkrijk hebben dit opgepakt.

Ad 4

De Productenorganisatie van de Nederlandse mosselcultuur (PO Mosselcultuur) i.s.m. de Nederlandse Oester Vereniging heeft IMARES gevraagd brononderzoek te gaan doen. Daarnaast heeft de Tweede Kamer in vervolg op het Verlengd Algemeen Overleg over de NVWA, een motie van Geurts (CDA), Dijkgraaf (SGP) en Graus (PVV) over TTX in oesters/mosselen aangenomen. Die motie vraagt de regering zo snel mogelijk samen met het bedrijfsleven een kennisprogramma op te zetten ten behoeve van een zo adequaat mogelijke normstelling. De sector werkt het onderzoeksplan verder uit waarbij EZ en VWS adviseren.

II. Het TTX-onderzoek van de Universiteit Utrecht

Opdracht

BuRO heeft de volgende opdracht gegeven aan de Universiteit Utrecht:

- Een kritisch oordeel van een neurotoxicoloog over de verschillende aannamen van BuRO, met name:
 - o Is de waarde van 4 microgram per kilogram mens een geschikte laagste dosis waarbij effecten zijn vermeld in de mens?
 - o Kan er een concentratie o.b.v. lichaamsgewicht van de mens worden afgeleid waar geen effecten van TTX zijn te verwachten?
 - o Zijn de gehanteerde veiligheidsfactoren van 3 en 10 te verdedigen, met inachtneming van de steilheid van de dosis-respons curve van TTX?
- Een experimentele studie naar de vergelijkbaarheid van de neurotoxiciteit in *in vitro* in ratten zenuwcellen en *in vitro* in humane zenuwcellen.

Opzet onderzoek

De Universiteit Utrecht heeft in de literatuur gezocht naar (humane) toxicologische data om een uitspraak te doen naar interspecies verschillen in gevoeligheid voor TTX. Hierbij is ook naar de invloed van TTX op de remming van de activiteit van natrium-ionkanalen in zenuwcellen gekeken. In de literatuur is ook gezocht naar de beschikbare humane vergiftigingsgevallen en zijn de concentraties TTX in urine en bloed vergeleken in relatie tot de mate van vergiftiging.

Vervolgens is experimenteel het effect gemeten op de neurale elektrische activiteit, met behulp van een microelectrode array (MEA), in primaire rat corticale culturen en in 'human-induced pluripotent stem cell (hIPSC)-derived iCell®' neuronen in co-cultuur met hIPSC-derived iCell® astrocyten.

Resultaten

Het literatuuronderzoek laat zien dat TTX de natrium-ionkanalen remt, hetgeen resulteert in een inhibitie van neurotransmissie. Er zijn maar een beperkt aantal (humaan) toxicologische data beschikbaar en nog minder betrouwbare 'no-observed-adverse-effect-levels (NOAELs)' of 'lowest observed adverse-effect-levels (LOAELs)'.

Het experimentele onderzoek laat zien dat TTX de activiteit remt van de primaire rat corticale culturen en de 'human-induced pluripotent stem cell (hIPSC)-derived iCell®' neuronen in co-cultuur met hIPSC-derived iCell® astrocyten, met IC50 waarden van respectievelijk 6,7 en 9,7 nM. Deze verschillen wijzen op kleine interspecies verschillen tussen de mens en de rat en pleit voor het benutten van toxicologische data van de rat voor de risicobeoordeling van de mens.

Op basis van de *in vitro* remming op verschillende type natrium-ionkanalen, andere toxicologische gegevens en de experimentele gegevens is een 'acute reference dose' van 1,33 µg/kg lichaamsgewicht afgeleid. De onderzoekers geven aan dat de zoogdierstudie een betrouwbaarder toxicologisch uitgangspunt biedt dan de informatie voor de mens. Zij gebruiken een veiligheidsfactor 10 om van de acute toxiciteit (LD50 van 400 mg/kg) over te gaan naar een 'lowest observed adverse effect level (LOAEL) waarde van 40 mg/kg. Vanwege de steile dosis-respons-curve en de relatie met humane bloedwaarden vinden de onderzoekers dit te verantwoorden. Vervolgens passen zij een veiligheidsfactor van 3 toe om over te gaan van een LOAEL naar een 'no observed adverse effect level (NOAEL)' waarde van 13,33 mg/kg for TTX in de mens. Ten slotte wordt nog een veiligheidsfactor van 10 toegepast om rekening te houden met gevoelige groepen, resulterend in een ARfD voor TTX van 1,33 mg/kg lg.

Voor een persoon van 60 kg, die 400 g schelpdiervlees consumeert, komt dit overeen met een maximaal toelaatbaar gehalte van 200 µg/kg (Kasteel en Westerink, 2017).

Antwoord op de vragen

Een kritisch oordeel van een neurotoxicoloog over de verschillende aannamen van BuRO, met name:

- *Is de waarde van 4 microgram per kilogram mens een geschikte laagste dosis waarbij effecten zijn vermeld in de mens?*
- *Kan er een concentratie o.b.v. lichaamsgewicht van de mens worden afgeleid waar geen effecten van TTX zijn te verwachten?*
- *Zijn de gehanteerde veiligheidsfactoren van 3 en 10 te verdedigen, met inachtneming van de steilheid van de dosis-respons curve van TTX?*

Vooraf aan de studie heeft de neurotoxicoloog aangegeven de gehanteerde veiligheidsfactoren te kunnen verdedigen. Op basis van de literatuurstudie en de

experimenten heeft de neurotoxicoloog een concentratie van 1,33 mg/kg lg voorgesteld waar geen effecten van TTX zijn te verwachten.

Een experimentele studie naar de vergelijkbaarheid van de neurotoxiciteit in vitro in ratten zenuwcellen en in vitro in humane zenuwcellen.

De experimentele studie laat zien dat *in vitro* er grote vergelijkbaarheid is in de gevoeligheid van TTX voor rattenzenuwcellen en humane zenuwcellen.

III. Een evaluatie van de EFSA opinie

Samenvatting EFSA-opinie

Het EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA TTX-werkgroep) heeft de volgende bevindingen gedaan in de betreffende opinie over TTX (EFSA CONTAM Panel, 2017) na het verzoek van de Europese Commissie om een wetenschappelijke opinie over de volksgezondheidsrisico's van TTX en zijn analogen in mariene tweekleppigen en gastropoden.

- a. Tetrodotoxin (TTX) en zijn analogen worden geproduceerd door mariene bacteriën en zijn aangetroffen in mariene tweekleppigen en gastropoden in verschillende Europese wateren.
- b. Er is geen wetenschappelijke ondersteuning in de literatuur voor een minimale letale dosis voor de mens van 2 mg, zoals in verschillende reviews is genoemd. Casuïstiek geeft aan dat serieuze effecten bij de mens kunnen optreden vanaf een dosis van 0,2 mg of hoger, overeenkomend met 4 µg/kg lichaamsgewicht (lg). Er is echter grote onzekerheid over de daadwerkelijke blootstelling van die personen.
- c. Op basis van een acute orale toxiciteitstudie bij muizen is een 'acute reference dose' (ARfD) afgeleid van 0,25 µg/kg lg voor de groep van TTX en zijn analogen. Deze ARfD is afgeleid van een dosis bij muizen van 25 µg/kg lg, waarbij geen apathie optrad, en waar een standaard veiligheidsfactor van 100 is gebruikt.
- d. Voor de verschillende TTX-analogen is bepaald dat de relatieve potentie voor toxiciteit lager is dan TTX, maar met een grote mate van onzekerheid.
- e. Gebaseerd op de gegeven monitoringsdata van TTX in tweekleppigen en de consumptiegegevens van Engeland, Griekenland en Nederland, zijn de gemiddelde en 95P blootstellingsconcentraties geschat op respectievelijk 0,00-0,09 en 0,00-0,03 µg/kg lg.
- f. Als een portie van 400 g tweekleppigen, met uitzondering van oesters, wordt geconsumeerd in combinatie met de ARfD voor de groep van TTX en analogen, is geschat dat een concentratie van 44 µg TTX equivalenten/kg schelpdiervlees niet tot schadelijke effecten bij de mens leidt.
- g. Vloeistofchromatografie gekoppeld met tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS) is de meest geschikte methode voor het identificeren en kwantificeren van TTX en zijn analogen, met LOQs (Limit of Quantification) tussen de 0,1 en 25 µg/kg.

Door EFSA benoemde onzekerheden

In de EFSA-opinie is in tabelvorm een lijst opgenomen van onzekerheden rondom de risicobeoordeling van TTX. Deze lijst is hieronder weergegeven (Tabel 1).

Tabel 1. Samenvatting belangrijkste onzekerheden in EFSA's TTX beoordeling (EFSA CONTAM Panel, 2017)

Bron van onzekerheid	Richting ^A
Afleiding van de ARfD op basis van de muizenstudie	+/-
Niet meenemen van gastropoden in de blootstellingschatting	-
Niet meenemen van TTX analogen in de blootstellingschatting	-
Relatieve potentie van TTX en sommige analogen	+/-
Voorkomen gegevens niet representatief voor de EU	+/-
Niet-representatieve bemonsteringsstrategie	+
Aanname van 400 g portiegrootte	+/-
P95 blootstellingschatting gebaseerd op slechts beperkt aantal consumptiepeilingen	-

A: + = kans op overschatten van blootstelling risico; - = kans op onderschatten van blootstelling/risico; +/- = kans op onder- of overschatting van blootstelling/risico

Aanbevelingen EFSA

EFSA beveelt het volgende aan:

- Om een betrouwbaarder blootstellingsbeoordeling te kunnen doen, zijn er meer monitoringsdata nodig van TTX en zijn analogen, in de eetbare gedeeltes van mariene tweekleppigen en gastropoden van verschillende EU wateren.
- Er zijn monitoringsdata nodig van gastropoden uit verschillende EU Lidstaten.
- Data van concentraties van TTX en zijn analogen dienen verkregen te worden met goedgekeurde en gevalideerde chemisch-analytische methoden. Daarbij zijn gecertificeerde standaarden en referentiematerialen nodig voor TTX en zijn analogen.
- Informatie over de lotgevallen van TTX en zijn analogen gedurende het kookproces is nodig om de blootstellingsschatting te kunnen verfijnen.
- Studies naar de bronnen en de kritieke factoren die leiden tot ophoping van TTX in mariene tweekleppigen en gastropoden zijn nodig.
- Nadere informatie over de toxicokinetiek van TTX en zijn analogen is nodig.
- Nadere informatie over de acute orale TTX en zijn analogen is nodig. Ook chronische effecten moeten worden onderzocht.
- Gegeven de hoge mate van onzekerheid omtrent de relatieve potentie van de TTX analogen, is adequaat en goed beschreven bewijs nodig voor het inschatten van die relatieve potentie, bij voorkeur na orale toediening.
- Omdat STX (saxotoxine) en TTX en zijn analogen dezelfde werkingsmechanismen blijken te hebben, zou de mogelijkheid van één gezondheidkundige waarde voor die twee stoffen onderzocht moeten worden.

Evaluatie EFSA-opinie

Het Front Office Voedsel- en Productveiligheid (FO) geeft aan dat zij op basis van de Abal et al. (2017) studie tot een andere referentiewaarde komen (FO, 2017, zie Bijlage 1). Het FO is het eens met het EFSA CONTAM Panel (2017) dat deze nieuwe studie een betere basis vormt voor risicobeoordeling dan de humane gegevens, zoals eerder door FO (FO, 2015) en in het BuRO-advies van 2016 is

gebruikt. Het FO concludeert dat er te kleine verschillen zijn tussen de doses waar letaliteit is waargenomen en die waarbij apathie optrad, waarbij het feit dat de experimenten slechts 2 uur duurden en dat ook de overlevende muizen na 2 uur werden geofferd, geen inzicht gaven in het verder verloop na het optreden van apathie.

FO (2017) merkt verder op dat de EFSA opinie de resultaten van Kasteel en Westerink (2017) niet heeft kunnen meenemen. FO beoordeelt deze studie als goed uitgevoerd en de studie geeft een goed inzicht in de interspecies gevoeligheidsverschillen in de *in vitro* remming van de neuronale activiteit in rattencellen en humane cellen. FO concludeert echter dat deze studie onvoldoende geschikt is om de veiligheidsfactor voor interspecies verschillen aan te passen.

IV. Een maximaal toelaatbaar risiconiveau van TTX in schelpdiervlees

Achtereenvolgens worden de voorstellen voor een maximaal toelaatbaar risiconiveau van TTX in mossel- en/of oestervlees van BuRO (2016) en van EFSA (2017) toegelicht. Hierna worden ook de memo van Rietjens en Murk (2017) en de risicobeoordeling van het Front Office Voedsel- en Productveiligheid (Bijlage 1; FO, 2017) besproken. Daarna volgt het voorstel van BuRO voor een maximaal toelaatbaar risiconiveau, met een bespreking van de resterende onzekerheden.

BuRO-advies van februari 2016

In het advies van BuRO betreffende de aanwezigheid van TTX in mosselen en oesters is er van uitgegaan dat schadelijke effecten op kunnen treden bij mensen als ze een dosis van 0,2 mg TTX consumeren. Dit was gebaseerd op incidenten met TTX in vooral Aziatische landen. Een dosis van 0,2 mg, voor een Aziatisch persoon van 50 kg, komt overeen met 4 µg/kg lichaamsgewicht (lg). Deze waarde van 4 µg/kg lg wordt genoemd in het advies van het RIVM-RIKILT Front Office Voedsel- en Productveiligheid (FO, 2015), dat als bijlage was opgenomen bij het advies van BuRO (2016). De waarde van 4 µg/kg lg is de laagste dosis waarbij effecten zijn vermeld. Het betreft dus een Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL). In de normering van stoffen in levensmiddelen wordt echter uitgegaan van een No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), oftewel een hoogste dosis waarbij geen effecten zijn aangetoond. Voor TTX bij mensen is deze NOAEL niet bekend. Die waarde is natuurlijk lager dan de LOAEL van 4 µg/kg lg, maar onduidelijk is hoeveel lager dit zal zijn. In de toxicologie kan hierover niet altijd iets gezegd worden.

Om de schadelijke effecten voor mensen uit te rekenen wordt vaak verondersteld dat een westerse mens ongeveer 60 kg weegt, ongeveer 400 gram mossel- of oestervlees eet, dat de stof volledig uit voedsel wordt opgenomen, en dat de stof in het menselijk lichaam volledig wordt herverdeeld. In deze redeneringen zitten nogal wat aannames die voor TTX ter discussie kunnen staan. Mensen met een groter gewicht eten in absolute zin meestal iets meer, maar kinderen met een laag gewicht consumeren vaak relatief meer als gecorrigeerd wordt voor lichaamsgewicht. Beide situaties zouden risicoverhogend of verlagend kunnen werken afhankelijk van de wijze waarop de stof in het lichaam wordt verdeeld, of de stof door het lichaam wordt afgebroken en hoe de stof toxicologisch werkt. Voor TTX is onbekend of lichaams grootte of relatieve voedselinname van invloed

is op het actuele risico. Om rekening te houden met deze onzekerheid, dient een veiligheidsmarge te worden geïntroduceerd.

Aangenomen wordt dat TTX die in mosselen en oesters aanwezig is voor de volle 100% wordt opgenomen in het menselijk lichaam na de consumptie. Of deze aanname correct is, is onbekend. Waarschijnlijk zal de werkelijke opname lager liggen, afhankelijk van de samenstelling van de maaltijd. Ook hier is helaas niets van bekend voor TTX. De werkelijke opname kan er echter wel voor zorgen dat een bepaalde hoeveelheid TTX in sommige gevallen bij mensen wel, en in andere gevallen geen schadelijke effecten veroorzaakt.

Een belangrijke, maar onrealistische aanname voor TTX is dat de stof na opname in het menselijk lichaam evenredig verdeeld wordt in het lichaam. Dezelfde hoeveelheid TTX wordt dan in een groot lichaam meer 'verdund' dan in een klein lichaam. Als de stof echter alleen actief zou zijn in de maag of darm, of in het bloed, dan zijn de verschillen tussen grote en kleine mensen veel minder. Feitelijk is dat TTX niet in vetweefsel ophoopt, en dat dus een grote hoeveelheid vet niet helpt bij 'het verdunnen'. TTX werkt op redelijke korte termijn en vooral in lichaamsdelen die goed doorbloed zijn zoals longen. Na een maaltijd zou dus de dosis in bepaalde organen veel hoger kunnen zijn dan op basis van het gehele lichaamsgewicht geschat wordt. Dit wordt extra belangrijk als consumenten in bepaalde organen een mogelijk extra gevoeligheid hebben voor TTX. Mensen met een onderliggend hart- en bloedvatenprobleem, met een longaandoening of bijvoorbeeld met reeds beschadigde zenuwcellen (onder meer door diabetes, dat verder voor een verminderde uitscheiding zou kunnen zorgen) zouden hierdoor extra kwetsbaar kunnen zijn. Verder kunnen mensen al snel na vergiftiging verlamingsverschijnselen ondervinden in het gezicht, omdat TTX ook vanuit de mond in het omringende weefsel kan worden opgenomen en daar de zenuwen – in de mond en het gezicht- kan verlammen.

Samenvattend zijn er verschillende factoren die aanleiding geven een veiligheidsmarge te nemen voor verschillen tussen mensen. De veiligheidsmarge die BuRO hiervoor gebruikt heeft, is een factor 10 voor deze intraspecies verschillen.

In het geval van TTX is door BuRO uitgegaan van een factor 3 tussen de NOAEL en de LOAEL. Dit is een kleine factor, voor veel stoffen wordt een factor 10 of meer gebruikt. Dit hangt af van de experimentele gegevens die beschikbaar zijn. BuRO gebruikt deze kleine factor desondanks toch omdat het aanneemt dat er een steil verband is tussen dosering en effect. Verhogen van de hoeveelheid TTX in de mens van 4 naar 8 µg/kg lg zorgt op basis van die aanname voor een zeer sterke stijging van de ernst van het effect. Een nog iets grotere verhoging zorgt al snel voor sterfte. Evenzeer redeneert BuRO dat een verlaging van de dosis onder de 4 µg/kg lg al snel zou kunnen leiden tot een situatie van 'geen waarneembaar effect'. De aard van de toxicologische werking van TTX ondersteunt deze gedachte. TTX is vooral een neurotoxische stof die werkt op de ionen-kanalen in zenuwen die de werking van spieren aansturen. Er zijn veel stoffen, inclusief medicijnen, die werken op deze ionen-kanalen, en in veel gevallen is er een zeer steile dosis-effect relatie.

Bij veiligheidsbeleid en preventie wordt meestal een veel grotere onzekerheidsfactor gebruikt. Vaak heeft dit te maken met extrapolaties tussen proefdieren en mensen, tussen vrouwen en mannen, tussen jong en oud. Omdat de 4 µg/kg lg een dosering is bij mensen, is de onzekerheidsfactor voor dier-mens extrapolatie niet nodig. Voor zover bekend zijn er geen verschillen in gevoeligheid tussen jonge en oude mensen en tussen mannen en vrouwen. Hier is in ieder geval verder geen rekening mee gehouden; de factor 10 zou dit moeten afdekken. BuRO kiest dus voor deze smalle veiligheidsmarge.

Met de veiligheidsmarges van de factor 3 en de factor 10 komt BuRO uit op een veiligheidsmarge van 30. Uitgaande van een effectdosering van 4 µg/kg lg (mens), en 240 microgram voor een mens per maaltijd, zou de TTX concentratie in de mosselen en oesters onder de $600/30 = 20$ microgram per kg mossel- of oestervlees moeten zijn, bij een portie van 400 g schelpdiervlees. Dit is een concentratie waarbij effecten nog niet uit te sluiten zijn.

De in 2016 gevonden TTX-concentraties in mosselen en oesters zijn in een aantal gevallen aanmerkelijk hoger. Van de 24 positief bevonden mossel- en oestermonsters is de hoogste gevonden concentratie 253 µg/kg en de 99-percentiel en 95-percentielwaarden zijn respectievelijk 245 en 211 µg/kg (NB Hierbij is geen rekening gehouden met het aantal monsters, noch met de concentraties die onder de detectielimiet zijn gemeten!). Deze concentraties zijn veel hoger dan hetgeen BuRO als veilig heeft beoordeeld. Ze zijn echter nog wel lager dan de concentratie van 600 µg/kg, waarbij effecten zijn gerapporteerd, al is de herkomst van dat getal zeer onduidelijk. De marges zijn echter buitengewoon smal. Bovendien is het zeker niet uitgesloten dat er ook mosselen of oesters zijn die nog hogere concentraties zouden kunnen bevatten.

Het BuRO-advies van 2016 geeft dus een maximale waarde van een maximaal toelaatbaar risiconiveau: zelfs bij een gehalte van 20 microgram TTX per kg mossel- of oestervlees zijn effecten nog niet uit te sluiten, aangenomen dat een persoon van 60 kg 400 g schelpdiervlees consumeert.

EFSA-opinie 2017

EFSA heeft op basis van een acute orale toxiciteitstudie bij muizen een ARfD afgeleid van 0,25 µg/kg lg voor de groep van TTX en zijn analogen. Deze ARfD is afgeleid van een dosis bij muizen van 25 µg/kg lg, waarbij geen apathie optrad. Vervolgens is een standaard veiligheidsfactor van 100 gebruikt, die is opgebouwd uit een interspecies en een intraspecies component van ieder een factor 10. Als een portie van 400 g tweekleppigen, met uitzondering van oesters, wordt geconsumeerd in combinatie met de ARfD voor de groep van TTX en analogen, is geschat dat een concentratie van 44 µg TTX equivalenten/kg schelpdiervlees niet tot schadelijke effecten bij de mens leidt.

De veiligheidsfactoren 10 zijn als volgt opgebouwd (en dienen met elkaar te worden vermenigvuldigd) (Tabel 2):

Tabel 2. Veiligheidsfactoren voor kinetiek en dynamiek (EFSA, 2012)

	Interspecies	Intraspecies
Kinetiek	4	3,16
Dynamiek	2,5	3,16
Totaal	10	10

Bij het afleiden van een ARfD voor een acuut werkende stof, zoals TTX, dient de meest kritische effect-parameter, niet zijnde letaliteit, te worden gekozen en vervolgens te worden gedeeld door de relevante veiligheidsfactoren: een factor 10 voor interspecies verschillen, een factor 10 voor intraspecies verschillen en een of meer veiligheidsfactoren voor andere factoren zoals de betrouwbaarheid van een studie, de duur van de blootstelling, etc. EFSA is niet ingegaan op een afwijking van het gebruik van de standaard veiligheidsfactoren, noch heeft EFSA aangegeven of er aanvullende veiligheidsfactoren nodig zijn.

De EFSA-opinie van 2017 geeft dus een maximaal toelaatbaar risiconiveau van 44 µg TTX equivalenten/kg schelpdiervlees, aangenomen dat een persoon van 70 kg 400 g schelpdiervlees consumeert.

Memo Rietjens en Murk (2017)

Op 2 mei heeft Wageningen University & Research een Expert Meeting georganiseerd, waar onder meer de EFSA CONTAM Panel (2017) opinie is bediscussieerd. Naar aanleiding van de discussies van die dag hebben de hoogleraren Rietjens en Murk een memo (Bijlage 2) opgesteld, met daarin een overzicht (Tabel 3) van de verschillende benaderingen voor het afleiden van een veilig gehalte van TTX in schelpdiervlees. In onderstaande tabel zijn die benaderingen samengevat. Ten tijde van het opstellen van dit overzicht beschikte Rietjens en Murk nog niet over het rapport van het FO (2017).

In deze memo lichten Rietjens en Murk kort toe hoe die verschillende benaderingen tot stand zijn gekomen. De benadering van BuRO (2016), gebaseerd op FO (2015) is in het huidig advies voldoende toegelicht. Rietjens en Murk (2017) beoordelen de schattingsmethode die door FSA (2016) is gebruikt als wetenschappelijk niet valide, omdat de LOAEL van 4 µg/kg lg voor TTX in de mens veel lager is dan de laagste 5^e percentielwaarde van 150 µg/kg lg uit de Cramer Class III database. De benadering van Kasteel en Westerink (2017) is in het huidig advies voldoende toegelicht. In de door Rietjens en Murk gecorrigeerde benadering van Kasteel en Westerink (2017) hebben zij aangenomen dat er geen interspecies verschillen zijn voor wat betreft de dynamiek, maar nog wel verschillen zijn voor de kinetiek en hebben daarom een extra veiligheidsfactor 4 toegepast. Rietjens en Murk hebben als laatste benadering gekozen voor een combinatie van EFSA (2017) en de gecorrigeerde benadering van Kasteel en Westerink (2017), waarbij ze uitgaan van de NOAEL voor apathie uit de muizenstudie van Abal et al. (2017), waarbij de veiligheidsfactor van 10 voor intraspecies én waarbij alleen de veiligheidsfactor van 4 voor interspecies verschillen voor kinetiek worden meegenomen.

Tabel 3. Overzicht van verschillende benaderingen voor het afleiden van een veilig gehalte van TTX in schelpdiervlees (naar: Rietjens en Murk, 2017)

Bron	Veilig gehalte µg /kg lg	Veilig gehalte µg /kg schelpdiervlees	Commentaar
BuRO (2016)	0,133	20	LOAEL human 4 µg/kg lg/d, VF=30
FSA (2016)	1,5	262	TTC benadering Cramer Class III
Kasteel en Westerink (2017)	1,33	200	LD50 letaliteit 400 µg/kg lg/d, met aanname geen species verschillen, VF=300
Kasteel en Westerink (2017), gecorrigeerd	0,33	50	LD50 letaliteit 400 µg/kg lg/d, met aanname wel species verschillen (alleen kinetiek), VF=1200
EFSA (2017)	0,25	44	NOAEL apathie muizen 25 µg/kg lg/d, VF=100
EFSA (2017) en Kasteel en Westerink (2017)	0,63	110	NOAEL apathie muizen en geen species verschillen in dynamiek, VF=40

LOAEL = Lowest Observed Adverse Effect Level

LD50 = Lethal Dose for 50% of the population

NOAEL = No Observed Adverse Effect Level

TTC = Threshold of Toxicological Concern

VF = Veiligheidsfactor

Na het verschijnen van de memo van Rietjens en Murk (2017) heeft er nog een email discussie plaatsgevonden tussen verschillende deskundigen. Die discussie heeft de volgende argumenten opgeleverd:

- Duidelijk aangegeven moet worden op basis van welke lichaamsgewichten de benaderingen zijn gebeurd (soms is dat 60 en soms 70 kg) en dat er wordt uitgegaan van een consumptie van 400 g mossel- of oestervlees, bij het omrekenen van de ARfD naar een maximaal gehalte in schelpdiervlees
- De betekenis van de diverse veiligheidsfactoren: echte verschillen, variabiliteit of onzekerheid
- Er twijfel is of de interspecies veiligheidsfactor van 2,5 voor dynamiek kan worden weggelaten, vanwege het feit dat er maar één *in vitro* studie is en er meer dynamiek stappen zijn betrokken bij het toxisch effect van TTX dan alleen het remmen van zenuwcellen
- Hoewel er inderdaad maar één *in vitro* studie is gedaan, zijn er tientallen *in vitro* studies voor wat betreft het vergelijk van rat en mens voor specifieke subtypen natrium-kanalen, die geen van alle een noemenswaardig rat/mens verschil laten zien.

FO (2017)

Het FO gaat uit van een BMDL10¹ van 112 µg/kg lg voor sterfte als referentiepunt voor het afleiden van een indicatief maximaal toelaatbaar risiconiveau van TTX. Het FO beveelt vervolgens aan een veiligheidsfactor van 10 te gebruiken voor de ernst van het effect naast de standaard veiligheidsfactor van 100 (10 voor interspecies en 10 voor intraspecies verschillen). Dit leidt dan tot een indicatieve waarde van 0,11 µg/kg lg. Het FO gebruikt deze waarde om dit om te rekenen naar een indicatief gehalte van 19,3 µg/kg in schelpdiervlees, voor een persoon van 70 kg die een portie van 400 g eet. Een kind van 20 kg zou niet meer dan 115 g van een schelpdiervlees met dit gehalte aan TTX mogen consumeren.

Voorstel maximaal toelaatbaar risiconiveau TTX in schelpdiervlees

Op basis van het voorgaande stelt BuRO voor als referentiepunt voor de afleiding van een maximaal toelaatbaar risiconiveau de BMDL10 van 112 µg/kg lg (FO, 2017) voor sterfte te gebruiken. BuRO steunt daarmee niet de redenering van EFSA CONTAM Panel (2017) om apathie als eindpunt uit de studie van Abal et al. (2017) als referentiepunt te gebruiken. In de Abal et al. (2017) studie kan namelijk geen onderscheid worden gemaakt tussen reversibele en irreversibele apathische effecten gegeven de tijdsduur van het experiment: er kon niet worden nagegaan of apathie overging in letaliteit of herstel.

Het gebruik van de 'bench mark dose' (BMD) methodiek maakt weliswaar beter gebruik van alle sterftegegevens uit de studie, maar door de opzet van de studie, leidt ook de BMD-methode tot een zekere mate van onzekerheid. De studie kent namelijk relatief grote en ook verschillende stapgroottes in de doseringen, terwijl van TTX is bekend dat die een zeer steile dosis-respons curve geeft. Om een betrouwbaarder referentiepunt te verkrijgen zijn voor TTX daarom zeer kleine stapgroottes nodig in de dosering.

Als vervolgens een veiligheidsfactor van 3 zou worden gebruikt voor de ernst van het effect naast de standaard veiligheidsfactor van 100 (10 voor interspecies en 10 voor intraspecies verschillen), leidt dit tot een indicatieve waarde van 0,37 µg/kg lg. BuRO stelt de factor 3 voor in plaats van de factor 10 van FO (2017), om meer gebruik te maken van de gegevens over de steilheid van de dosis-respons curve uit Kasteel en Westerink (2017) en andere studies. De factor 10 beneden de BMDL10 zit ver beneden de waarde van de dosis van de Abal et al. (2017) studie waar al geen effecten zijn waargenomen.

De studie van Kasteel en Westerink (2017) laat weliswaar zien dat er nauwelijks verschillen bestaan tussen de gevoeligheid van mensen en rattenzenuwen voor TTX, zowel in een experimenteel neurale systeem als in andere *in vitro* studies bij geïsoleerde natriumionkanalen, waar TTX op ingrijpt, maar er blijven nog onzekerheden over het volledig mogen weglaten van een veiligheidsfactor voor deze dynamiek.

¹ BMDL10 = The lower 95% confidence interval of a benchmark-dose representing a 10% response (e.g., tumour response upon lifetime exposure), i.e. the lower 95% confidence interval of a BMD10

Duidelijk is dat de verschillende indicatieve waarden, zoals afgeleid door het FO (2015) op basis van humane gegevens (0,13 µg/kg lg), de ARfd, die door het EFSA CONTAM Panel (2017) (0,25 µg/kg lg) op basis van de muizenstudie van Abal et al. (2017) en de huidige afgeleide indicatieve waarde van 0,37 µg/kg lg, op basis van de muizenstudie van Abal et al. (2017) slechts weinig verschillen, ondanks de verschillende afleidingsbenaderingen.

BuRO kiest er daarom voor de waarde die door EFSA is voorgesteld over te nemen en stelt, conform EFSA CONTAM Panel (2017) een maximaal gehalte TTX voor van 44 µg/kg, uitgaande van een volwassene van 70 kg die 400 g mossel- of oestervlees consumeert.

Onzekerheden

In het afgelopen jaar is duidelijk geworden dat er weliswaar vooruitgang is geboekt om een betrouwbaarder maximaal risiconiveau TTX af te leiden in schelpdiervlees, door de studie van Abal et al. (2017) naar de orale toxiciteit van TTX in muizen. Ook is duidelijker dat naast eerdere vergeefse pogingen vanuit Nederland om uit Japan nadere informatie te halen, dit ook EFSA niet is gelukt. Er is dus momenteel geen verdere onderbouwing van een veilige grens voor TTX op basis van humane gegevens te verkrijgen.

Desalniettemin blijven er nog een aantal onzekerheden over voor wat betreft de afleiding van een maximaal toelaatbaar risiconiveau:

- Er is nog steeds onzekerheid over een betrouwbare referentiewaarde. In de studie van Abal et al. (2017) is weliswaar de orale toxiciteit bestudeerd, maar de opzet van de studie, een up-and-down procedure, geeft geen duidelijk beeld van die dosis waarbij geen effecten zijn te verwachten. Bovendien is TTX toegediend via gavage, waarbij mogelijke nadelige effecten die kunnen ontstaan bij normale opname via het voer vanuit de mond, wellicht niet zijn opgetreden.
- Interspecies verschillen tussen proefdier en de mens. Hoewel de studie van Kasteel en Westerink (2017) informatie aandraagt over kleine *in vitro* verschillen in gevoeligheid tussen rat en mens, wordt er door deskundigen getwijfeld aan de overeenkomsten in gevoeligheid *in vivo*, er is daar onvoldoende kennis over.
- Intraspecies gevoeligheidsverschillen: welke verschillen in gevoeligheid kunnen er optreden bij de mens.
- Tenslotte is er nog de onzekerheid over de invloed van verschillende mariene toxines, die aangrijpen op hetzelfde toxicologisch gevoelige punt, de natrium-ionkanalen. EFSA (2017) geeft aan dat er verschillende TTX-analogen zijn die dat doen en wellicht ook saxitoxine. Daarnaast kan bij de mens ook worden gedacht aan specifieke medicijnen of andere middelen die kunnen interfereren met de neurotoxische werking van TTX.

Gezien deze onzekerheden is het gebruik van het voorzorgsbeginsel verder te rechtvaardigen en dus geen kleinere veiligheidsfactoren te gebruiken bij de afleiding van een maximaal toelaatbaar risiconiveau van TTX in schelpdiervlees.

Onderzoeksvragen

Afgaande op de onzekerheden is nader onderzoek nodig naar een betrouwbare referentiewaarde uit een orale toxiciteitsstudie. Verder is nadere informatie over de interspecies verschillen tussen proefdier en de mens van belang. Ook is onderzoek naar intraspecies verschillen bij de mens en de invloed van andere middelen die de neurotoxische werking van TTX kunnen beïnvloeden nodig.

Literatuur

- Abal P, Louzao MC, Antelo A, Alvarez M, Cagide E, Vilariño N, Vieytes MR and Botana LM (2017). Acute oral toxicity of tetrodotoxin in mice: determination of lethal dose 50 (LD50) and No Observed Effect Level (NOAEL). *Toxins*, 9, 75. doi: 10.3390/toxins9030075
- Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A (2014). Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*, 6, 693-755; doi:10.3390/toxins6020693
- BuRO (2016). Advies over tetrodotoxines (TTX) in mosselen en oesters. Bureau risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit. Februari 2016. Referentie: NVWA/BuRO/2016/79.
- ECHA (2012). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. ECHA-2010-G-19-EN, November 2012. Available online: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r8_en.pdf/e153243a-03f0-44c5-8808-88af66223258
- EFSA (2012). Scientific Committee; Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 2012;10(3):2579. [32 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2579. Available online: www.efsa.europa.eu
- EFSA CONTAM Panel (2017). Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Bruschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L, Nebbia CS, Oswald IP, Rose M, Roudot A-C, Schwerdtle T, Vleminckx C, Vollmer G, Wallace H, Arnich N, Benford D, Botana L, Viviani B, Arcella D, Binaglia M, Horvath Z, Steinkellner H, van Manen M and Petersen A (2017). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal* 2017;15(4):4752, 65 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4752
- FO (2015). Front Office Voedsel- en Productveiligheid. Beoordeling tetrodotoxines in schelpdieren 02-11-2015 (definitieve versie, herzien). Beschikbaar via: <https://www.nvwa.nl/documenten/risicobeoordeling/voedselveiligheid/archief/2016m/beoordeling-tetrodotoxines-in-schelpdieren>.
- FO (2017). Front Office Food and Product Safety. Assessment of the EFSA opinion on tetrodotoxine (TTX) and TTX-analogues in marine bivalves and gastropods.
- FSA (2016). Provisional risk assessment to support risk management options for tetrodotoxin. Food Standard Agency. Beschikbaar via: <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/uk-provisional-risk-assessment-july-2016.pdf>
- Kasteel EEJ, Westerink RHS (2017). Comparison of the acute inhibitory effects of Tetrodotoxin (TTX) in rat and human neuronal networks for risk assessment purposes. *Toxicology Letters* 270, 12-16.

Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum

6 juni 2017

Onze referentie

NVWA/BuRO/2017/263

Rietjens IMCM, Murk TJ (2017). Possible safety levels for risk assessment TTX.
Memo geschreven n.a.v. Expert Meeting on Tetrodotoxin in marine bivalves,
Wageningen, 2 mei 2017.

Bijlage 1. Front Office Food and Product Safety. Assessment of the EFSA opinion on tetrodotoxine (TTX) and TTX-analogues in marine bivalves and gastropods. 2017.

Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering

Datum

6 juni 2017

Onze referentie

NVWA/BuRO/2017/263

Bijlage 2. Memo van Prof dr IMCM Rietjens en Prof dr TJ Murk, 8 mei 2017

**Possible safety levels for risk assessment TTX
Prof dr Ivonne MCM Rietjens and Prof dr Tinka J Murk**

At the present state-of-the-art several risk assessment approaches for defining a safe level of exposure to TTX have been reported, resulting in different possible safety levels for TTX. There is consensus in all evaluations that TTX is not of concern for genotoxicity so safe levels of exposure can be defined. Current evaluations all focus on defining a so-called acute reference dose (ARfD) for acute effects. The Table below provides an overview of the resulting safe levels of TTX in shell fish for human consumption, obtained following the different approaches.

Important to note is that the values in italics are determined before publication of Abal et al. (2017). The regular procedure to define an ARfD would be to select the NOAEL for the most critical endpoint in an acute animal study and divide that by an uncertainty factor (UF) of 10 for interspecies differences (differences between the experimental animals and human) and by another uncertainty factor of 10 for intraspecies differences (differences between humans). Without further considerations, based on Abal et al. (2017) who derived a NOAEL of 75 µg/kg bw for apathy as the most sensitive endpoint, this would result in an ARfD of 0.75 µg/kg bw, so 132 µg/kg shellfish meat.

Table: Overview of the possible safety levels for risk assessment TTX as presented in the lecture.

Values in italics were determined before the publication of Abal et al. (2017).

	Safe level µg/kg bw	Safe level µg/kg shellfish	comment
<i>BuRO (NL)</i>	<i>0.133</i>	20	<i>LOAEL human 4 µg/kg bw.day & UF 30</i>
<i>UK FSA</i>	<i>1.5</i>	262	<i>TTC approach Cramer Class III</i>
<i>Kasteel & Westerink</i>	<i>1.33</i>	200	<i>LD50 lethality 400 µg/kg bw.day assuming no species differences UF 300</i>
<i>Kasteel & Westerink corrected</i>	<i>0.33</i>	50	<i>LD50 lethality "" UF 1200</i>
EFSA	0.25	44	NOAEL apathy mice 25 µg/kg bw.day UF 100
EFSA and Kasteel & Westerink	0.63	110	NOAEL apathy mice no species differences in dynamics UF 40

NB: LOAEL = lowest observed adverse effect level, NOAEL = no observed adverse effects level, LD50= lethal dose for 50% of the individuals.

Further considerations on these possible approaches presented in the lecture were as follows:

- The evaluation by BuRO (RIVM-RIKILT 2015) concluded on a safe level in shellfish of 20 µg/kg (19.5 mg/kg when rounding up the intake to 0.13 µg/kg bw), that was derived from a LOAEL in human of 4 µg/kg bw using an UF of 30

(3 from LOAEL to NOAEL and 10 for intraspecies differences). BuRO proposed to apply a zero tolerance for TTX in shellfish, which in practice results in the LOQ of 20 µg/kg.

- The evaluation by the UK FSA (FSA, 2017) used the so-called Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach assuming (based on a Toxtree analysis) that TTX would fit into Cramer Class III. A closer analysis of the database underlying the definition of the TTC of 90 µg/person for Cramer Class III reveals that the LOAEL of 4 µg/kg bw for TTX in human is much lower than the lowest 5th percentile NOAEL of Cramer Class III reference compounds (150 µg/kg bw). It is therefore doubtful whether for TTX the TTC approach can be applied.
- The ARfD value suggested by Kasteel and Westerink (2017) of 200 µg/kg, was derived using an LD50 of 400 µg/kg bw for lethality in mammals (mainly mice). It is to be noted that lethality is not the most sensitive critical endpoint of TTX and therefore considered less suitable as a point of departure for the risk assessment. Starting with the LD50 of 400 µg/kg and using an UF of 300 (10 for LD50 to LOAEL, 3 for LOAEL to NOAEL and 10 for intraspecies differences) a safe level of intake of 1.33 µg/kg bw and the value of 200 µg/kg in shellfish is obtained. In this evaluation the UF for interspecies differences was omitted since it was argued that human and experimental animals are equally sensitive to the adverse effects of TTX because i) in in vitro studies the sodium channels that are affected, including those of human, show a similar sensitivity, and ii) the minimum lethal dose levels in mammals (rat, guinea pigs, mouse, dogs and cats), following subcutaneous injection, are similar.
- Considering these arguments that differences in sensitivity of different species towards TTX may be limited, one should conclude that these data support that the toxicodynamics (the interaction of the toxic compound with the body and the process of generating the toxic effect) might be similar, whereas it is not known whether upon oral intake also the kinetics (absorption, distribution, metabolism and excretion) of TTX are similar. This implies that leaving out the full UF of 10 for interspecies differences is not adequate. This UF of 10 for intraspecies differences is composed of a factor 2.5 for differences in dynamics and a factor 4 for differences in kinetics. This implies that if similar dynamics of TTX can be expected in animals and humans one could propose to use a lower UF of 4 for the interspecies differences in kinetics, leaving out the factor 2.5 for toxicodynamics. This would result in "corrected" values for the Kasteel & Westerink approach of 0.33 µg/kg bw and 50 µg/kg shellfish, although it would leave the issue of using lethality as the critical effect.
- Recently an EFSA opinion (Knutsen et al., 2017) was published using results from a newly reported mouse bioassay (Abal et al. 2017) from which EFSA derived a NOAEL of 25 µg/kg bw for apathy as the point of departure for the risk assessment. EFSA did not use the NOAEL of the study of 75 µg/kg established by the study authors (Abal et al. 2017), because a BMDL10 derived from the data in the study for lethality amounted to 112 µg/kg bw and was considered too close to this NOAEL and because the group size was only nine mice. Using an UF of 100, consisting of 10 for interspecies differences and 10 for intraspecies differences, the NOAEL of 25 µg/kg bw resulted in an ARfD of 0.25 µg/kg bw and a safe level of 44 µg/kg shellfish.
- Finally one could consider to use the arguments provided in Kasteel & Westerink to argue that using the same point of departure as selected by EFSA one could lower the uncertainty factor from 100 to 40 taking out the factor 2.5 for intraspecies differences in toxicodynamics of TTX. This would result in an ARfD of 0.63 µg/kg bw and a safe level of 110 µg/kg shellfish.

It can be concluded that it would be of use to further evaluate the data on possible species differences in the sensitivity towards TTX to further investigate whether these would indeed provide adequate evidence for the limited species differences in toxicodynamics, and thus could support this lowering of the UF.

References

Abal P, Louzao MC, Antelo A, Alvarez M, Cagide E, Vilariño N, Vieytes MR and Botana LM (2017) Acute Oral Toxicity of Tetrodotoxin in Mice: Determination of Lethal Dose 50 (LD50) and No Observed Adverse Effect Level (NOAEL). *Toxins* 9, 75 doi:10.3390/toxins9030075

FSA (Food Standard Agency) (2017) Provisional risk assessment to support risk management options for tetrodotoxin. Available from: <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/uk-provisional-risk-assessment-july-2016.pdf>

Kasteel EEJ and Westerink RHS (2017) Comparison of the acute inhibitory effects of Tetrodotoxin (TTX) in rat and human neuronal networks for risk assessment purposes. *Toxicology Letters*, 270, 12–16

Knutsen et al. (2017) Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal*, 15: 4752

RIVM-RIKILT (2015). Risk assessment of tetrodotoxins in shellfish . Available online: https://www.google.nl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0ahUKEwj1pPeRzd_SAhUDCBoKHdhzAioQFggMAI&url=https%3A%2F%2Fwww.nvwa.nl%2Fbinaries%2Fnvwa%2Fdocumenten%2Frisicobeoordeling%2Fvoedselveiligheid%2Farchief%2F2016m%2Fbeoordeling-tetrodotoxines-in-schelpdieren%2FBeoordeling%2Btetrodotoxines%2Bin%2Bschelpdieren-1.pdf&usg=AFQjCNGABUZP6eZcyhb588I0AnMW6HLN-Q (in dutch