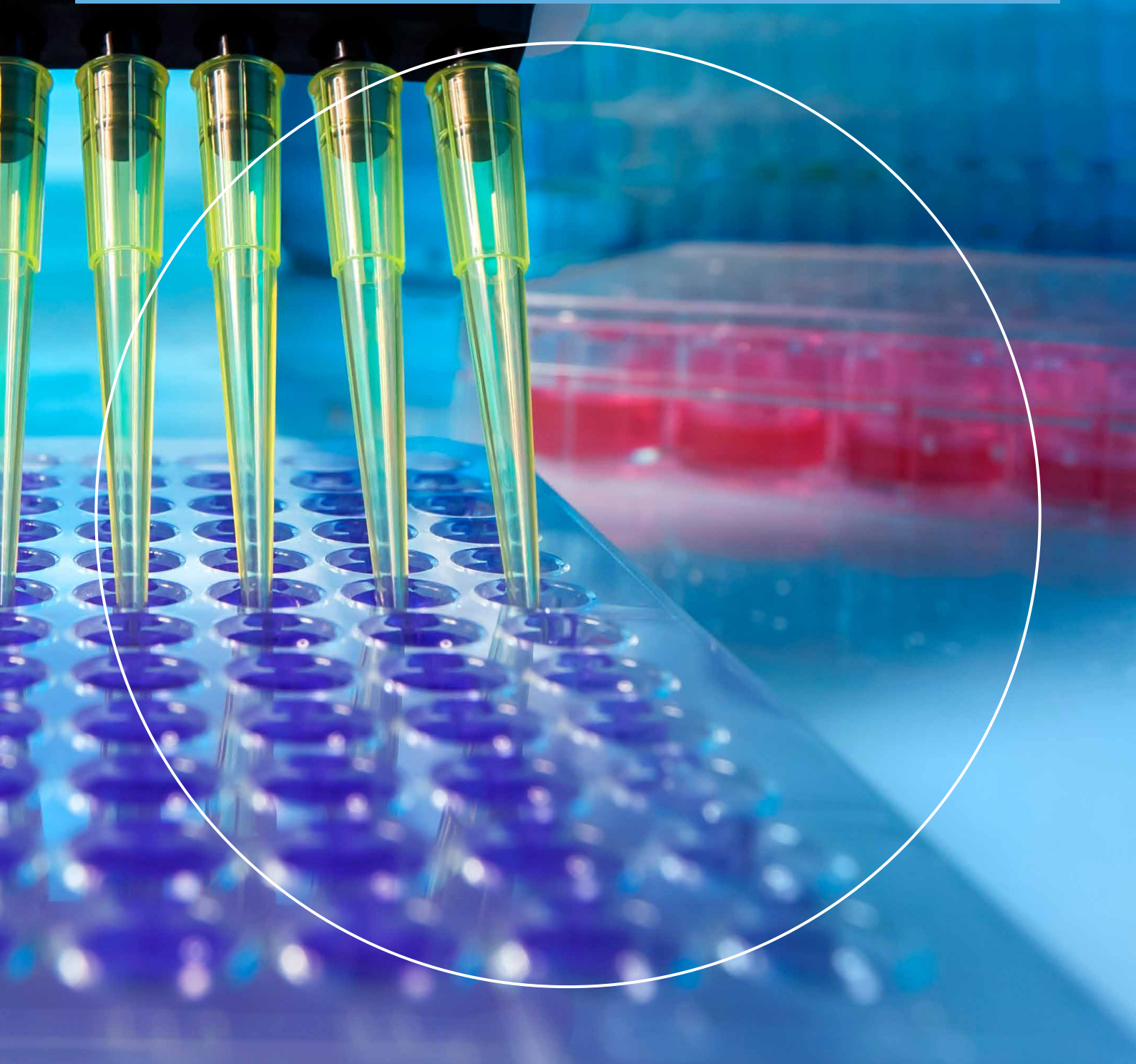


Evaluatie van sneltesten voor het meten van blauwalgtoxines in oppervlaktewater

Els Faassen, Naomi Dam, Inger Lise van der Graaf, Toine Bovee en Arjen Gerssen



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



Evaluatie van sneltesten voor het meten van blauwalgtoxines in oppervlaktewater

Els Faassen, Naomi Dam, Inger Lise van der Graaf, Toine Bovee en Arjen Gerssen

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Food Safety Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research.

Wageningen, maart 2022

WFSR-rapport 2022.011

Faassen, E., N. Dam, I.L. van der Graaf, T. Bovee, A. Gerssen, 2022. *Evaluatie van sneltesten voor het meten van blauwalgtoxines in oppervlaktewater*. Wageningen, Wageningen Food Safety Research, WFSR-rapport 2022.011. 58 blz.; 25 fig.; 20 tab.; 5 ref.

Projectnummer: 1217405501

Projecttitel: Kwaliteitsbeoordeling commerciële sneltesten voor blauwalgtoxines

Projectleider: Els Faassen

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/567017> of op <http://www.wur.nl/food-safety-research> (onder WFSR publicaties).

© 2022 Wageningen Food Safety Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research. Hierna te noemen WFSR.

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

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

Postbus 230, 6700 AE Wageningen, T 0317 48 02 56, E info.wfsr@wur.nl, www.wur.nl/food-safety-research. WFSR is onderdeel van Wageningen University & Research.

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

WFSR-rapport 2022.011

Verzendlijst:

- Aqualysis, Hans de Kok (hkok@aqualysis.nl)
- Aquon, Eppe Nieuwenhuis en Hans Massop (eppe.nieuwenhuis@aquon.nl, h.massop@aquon.nl)
- Hoogheemraadschap van Delfland, Rob Hoefnagel (rhoefnagel@hhdelfland.nl)
- Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Marian Bootink (marian.bootink@hdsr.nl)
- Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, Saskia Zierfuss (s.zierfuss@hnhk.nl)
- Hoogheemraadschap van Rijnland, Marco Vaartjes (marco.vaartjes@rijnland.net)
- Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, Jack Hemelraad (j.hemelraad@hhsk.nl)
- Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Bas van der Wal (b.van.der.wal@stowa.nl)
- Stichting Waternet, Ron van der Oost (ron.van.der.oost@waternet.nl)
- Stichting Waterproef, Willie van den Berg (w.vandenberg@waterproef.nl)
- Waterschap Brabantse Delta, Laura Seelen (l.seelen@brabantsedelta.nl)
- Waterschap De Dommel, Lotte Fleskens (lfleskens@dommel.nl)
- Waterschap Scheldestromen, Yvonne van Scheppingen (yvonne.vanscheppingen@scheldestromen.nl)
- Wetterskip Fryslân, Yvonne Wiersma (ywiersma@wetterskipfryslan.nl)

Inhoud

Woord vooraf	5
Samenvatting	7
Afkortingen	9
1 Aanleiding en doel onderzoek	11
1.1 Aanleiding	11
1.2 Doel	11
2 Technische achtergrond	12
2.1 Antilichaam binding en kruisreactiviteit	12
2.2 Principe veldtesten	13
2.3 Principe labtesten	16
2.4 Vaststellen van de prestatie van meetmethodes	17
2.4.1 Aantoonbaarheid	17
2.4.2 Juistheid en reproduceerbaarheid	18
2.4.3 Herhaalbaarheid	18
2.5 Effect van de meetonzekerheid op het toetsen aan richtlijnen	18
3 Opzet onderzoek	20
3.1 Selectie testen	20
3.2 Gebruikte standaarden	20
3.3 Overzicht experimenten en geëvalueerde kenmerken	20
3.4 Kosten	21
3.5 Doorlooptijd	21
3.6 Praktische uitvoerbaarheid	21
3.7 Meetbereik	22
3.8 Kruisreactiviteit	22
3.9 Aantoonbaarheid, juistheid, reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid	22
3.10 Effect zoutgehalte	23
3.11 Effect algendichtheid	23
3.12 Vergelijking met LC-MS/MS	23
3.13 Extractie efficiëntie	24
3.14 Dataverwerking	24
4 Resultaten veldtesten	25
4.1 Geselecteerde testen en hun eigenschappen	25
4.2 Doorlooptijd en kosten	27
4.3 Aantoonbaarheid	28
4.4 Effect zoutgehalte	32
4.5 Effect algendichtheid	33
4.6 Vergelijking met LC-MS/MS	33
4.7 Effect aflezer	35
4.8 Overzicht kenmerken en toepasbaarheid veldtesten	35
5 Resultaten labtesten	38
5.1 Vergelijking respons standaarden	38
5.2 Geselecteerde testen	38
5.3 Kruisreactiviteit	40
5.4 Aantoonbaarheid, juistheid, reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid	41

5.5	Effect zoutgehalte	42
5.6	Effect algendichtheid	44
5.7	Extractie efficiëntie	45
5.8	Vergelijking met LC-MS/MS	47
5.9	Overzicht kenmerken en toepasbaarheid labtesten	48
6	Vergelijking toepasbaarheid sneltesten en LC-MS/MS analyse	50
7	Conclusies en aanbevelingen	52
7.1	Conclusies	52
7.2	Aanbevelingen	53
8	Dankwoord	54
Literatuur		55
Bijlage 1	Flowschema's labtesten	56

Woord vooraf

Voor u ligt het rapport over de evaluatie van commerciële sneltesten voor het meten van blauwalgtoxines in oppervlaktewater. Het onderzoek is gefinancierd door de volgende waterschappen, waterschapslaboratoria en kenniscentra: Aqualysis, Aquon, Hoogheemraadschap van Delfland, Hoogheemraadschap De Stichtse Rijnlanden, Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier, Hoogheemraadschap van Rijnland, Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, Stichting Waternet, Stichting Waterproef, Waterschap Brabantse Delta, Waterschap De Dommel, Waterschap Scheldestromen en Wetterskip Fryslân. Aquon trad namens dit consortium op als opdrachtgever richting WFSR.

In het onderzoek zijn veld- en labtesten voor het meten van blauwalggifstoffen in oppervlaktewater geëvalueerd. Door inzicht te krijgen in het functioneren en de praktische toepasbaarheid van deze testen wordt een handreiking aan waterbeheerders gegeven om relatief eenvoudige meetmethoden in de eigen laboratoria op te zetten. Waterbeheerders worden daarmee minder afhankelijk van externe laboratoria en kunnen sneller inzicht krijgen in de giftigheid van wateren met blauwalgenbloei in hun beheersgebied.

Samenvatting

Aanleiding en doel onderzoek

Blauwalgen komen in veel Nederlandse oppervlaktewateren voor en kunnen potente gifstoffen (toxines) produceren. Het meten van deze toxines is een goede manier om de giftigheid van oppervlaktewater waarin blauwalgtoxines voorkomen in te schatten. Omdat de toxineconcentraties in oppervlaktewater sterk kunnen variëren in ruimte en tijd willen waterbeheerders snel over de meetresultaten kunnen beschikken. De meeste waterbeheerders kunnen zelf echter geen blauwalgtoxines meten. Momenteel zijn er zowel snelle veld- en labtesten beschikbaar om verschillende groepen blauwalgtoxines te meten. Er is echter weinig kennis over de praktische uitvoerbaarheid en betrouwbaarheid van deze testen.

Het doel van deze studie is om inzicht te krijgen over de werking, kosten en betrouwbaarheid van commercieel verkrijgbare veld- en labtesten voor het meten van blauwalgtoxines in oppervlaktewater. Hierbij zijn testen voor de belangrijkste toxinegroepen geëvalueerd: microcystines, cylindrospermopsines, anatoxines en saxitoxines.

Resultaten veldtesten

In dit onderzoek zijn drie veldtesten voor het meten van microcystines geëvalueerd en één test voor elk van de andere drie toxinegroepen. De veldtesten kunnen gebruikt worden voor het aantonen van toxines, maar zijn niet (erg) geschikt om de toxineconcentratie in het water in te schatten.

Eén microcystine test (BlueGreenTest van Salofa Oy) presteerde goed. De aantoonbaarheid was goed en de test kon microcystines zowel in zoet als zout water aantonen, alsook in zoet water met een verhoogde algendichtheid. De test had de kortste doorlooptijd (ca 30 minuten) en was het goedkoopst qua aanschaf (12 euro per stuk). De anatoxine en saxitoxine veldtesten (beide van Eurofins/Abraxis) presteerden vrij goed, maar beide testen meten alleen de in het water opgeloste toxines. Doordat de toxines in de blauwalgcellen door deze testen niet gemeten worden, kunnen de toxineconcentratie in het oppervlaktewater sterk onderschat worden en daarom zijn deze testen als zodanig niet geschikt voor het meten in oppervlaktewater. Twee microcystine testen en een cylindrospermopsine test (Eurofins/Abraxis) gaven zeer veel vals negatieve uitslagen. Twee van deze testen, één van elk toxine, zijn na doorontwikkeling door de leverancier nogmaals kort geëvalueerd. De microcystine test presteerde beter in dit korte experiment, de cylindrospermopsine test bleef slecht presteren.

Op dit moment is er dus alleen voor microcystines een goed werkende veldtest beschikbaar. De testen voor de andere toxinegroepen kunnen niet direct worden toegepast in oppervlaktewater (anatoxines en saxitoxines) of geven verkeerde resultaten (cylindrospermopsines). Daarnaast zijn de meeste veldtesten door de vele stappen tijdens de uitvoering, en daardoor de hoge doorlooptijd, minder geschikt om routinematig in het veld uit te voeren.

Resultaten labtesten

In dit onderzoek zijn vier labtesten voor microcystines geselecteerd voor evaluatie en één test voor elk van de overige drie toxinegroepen. De labtesten zijn ontworpen om naast het aantonen van toxines ook de toxineconcentratie in het water te meten. De betrouwbaarheid waarmee toxines konden worden aangetoond verschilde tussen de testen.

Zo gaven twee testen veel vals positieve uitslagen (33 en 76%) bij het meten van watermonsters waar geen toxines aan toegevoegd waren. Een andere test gaf 43% vals negatieve uitslagen voor monsters waaraan 0,1 µg/l saxitoxines waren toegevoegd. De betrouwbaarheid waarmee de toxineconcentratie door de verschillende testen werd ingeschat is bepaald door toxinemengsels toe te voegen aan verschillende oppervlaktewatermonsters en deze te meten. De betrouwbaarheid kon voor de meeste testen slechts indicatief bepaald worden vanwege het ontbreken van gecertificeerde standaarden voor veel van de gebruikte toxines. De (indicatieve) juistheid van de testen varieerde tussen de 66 en 212%, de (indicatieve)

reproduceerbaarheid tussen de 30 en 55%. Dit betekent dat sommige testen een redelijke schatting van de toxineconcentratie geven, maar dat een aantal testen hier te onnauwkeurig voor is.

De anatoxine labtest presteerde vrij goed op alle geteste aspecten, de meeste andere testen moeten nog geoptimaliseerd worden waardoor de prestatie naar verwachting zal verbeteren. Van de zeer gevoelige saxitoxine test wordt verwacht dat deze ook na optimalisatie geen betrouwbare concentratieschatting kan geven als er een toxinemengsel in het water aanwezig is.

Met de labtesten kan een serie van 30 monsters binnen een dag opgewerkt, gemeten en gerapporteerd worden. De geschatte kosten per monster variëren van 25 tot 95 euro, afhankelijk van de test en het gewenste resultaat (een indicatie van de aanwezigheid van toxines of een zo nauwkeurig mogelijke schatting van de concentratie).

Toepasbaarheid en vervolgstappen

Zowel de lab- als de veldtesten kunnen per test één toxinegroep meten. Als meerdere toxinegroepen gemeten moeten worden, moeten dus meerdere testen worden uitgevoerd en gaan de hierboven genoemde kosten per monster omhoog.

De in dit onderzoek uitgevoerde evaluatie is bedoeld om inzicht te krijgen in het functioneren van de verschillende testen. Als deze testen in de waterschapslaboratoria geïmplementeerd worden, moeten ze na eventuele optimalisatie gevalideerd worden. Omdat de testen verschillend reageren op verschillende toxines uit dezelfde toxinegroep en in het oppervlaktewater verschillende toxines tegelijk voor kunnen komen, is het belangrijk om deze validatie uit te voeren met verschillende toxinemengsels.

De testen zijn in dit onderzoek geëvalueerd voor het meten van toxines in oppervlaktewater met pelagische (in het water zwevende) algen. De werking in extreem hoge algendichtheden (drijfslagen) is niet onderzocht, ook is niet bepaald hoe de testen presteren als toxines in bentische (aan substraat gehechte) blauwalgen gemeten worden. Indien de testen gebruikt moeten worden voor het meten in drijfslagen of bentische blauwalgen, moet de opwerking worden geoptimaliseerd en moeten de testen voor deze monstertypen worden gevalideerd.

Bij het gebruik van de testen moet er rekening mee gehouden worden dat testen met een slechte reproduceerbaarheid niet goed gebruikt kunnen worden om de gemeten concentraties te toetsen aan richtlijnen.

Afkortingén

ANA	Anatoxine-a
hANA	Homo-anatoxine-a
CYN	Cylindrospermopsine
7-epi-CYN	7-epi-cylindrospermopsine
7-deoxy-CYN	7-deoxy-cylindrospermopsine
STX	Saxitoxine
dcSTX	Decarbamoyl-saxitoxine
NEO	Neo-saxitoxine
dcNEO	Decarbamoyl-neo-saxitoxine
GTX1	Gonyautoxine 1
GTX4	Gonyautoxine 4
GTX2	Gonyautoxine 2
GTX3	Gonyautoxine 3
GTX5	Gonyautoxine 5
dcGTX2	Decarbamoyl-gonyautoxine 2
dcGTX3	Decarbamoyl-gonyautoxine 3
C1	N-sulfocarbamoyl-gonyautoxine 2
C2	N-sulfocarbamoyl-gonyautoxine 3
MC	Microcystine
MC-LR	Microcystine-LR
MC-RR	Microcystine-RR
MC-LW	Microcystine-LW
MC-LF	Microcystine-LF
MC-YR	Microcystine-YR
MC-LA	Microcystine-LA
MC-LY	Microcystine-LY
dmMC-RR	[D-asp3]Microcystine-RR
dmMC-LR	[D-asp3]Microcystine-LR
NOD	Nodularine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
LFD	Lateral flow device
LC-MS/MS	Liquid chromatography - tandem mass spectrometry
EPA	Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

1 Aanleiding en doel onderzoek

1.1 Aanleiding

Blauwalgen komen in veel Nederlandse oppervlaktewateren voor en kunnen potente gifstoffen (toxines) produceren. Vanwege de giftigheid van blauwalgen zijn er in Nederland richtlijnen opgesteld voor het veilig gebruik van zwembadwater, irrigatiewater en water voor veedrenking [1, 2]. Daarnaast zijn recent door de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) richtlijnen voor onder andere recreatiewater gepubliceerd [3].

In Nederland wordt het risico van blauwalgen in oppervlaktewater traditioneel ingeschat met indirecte methodes, zoals het bepalen van de hoeveelheid door blauwalgen geproduceerd chlorofyl, het biovolume van potentieel toxine producerende blauwalgen of de dichtheid van een drijflaag. Als er heel weinig blauwalgen in het water aanwezig zijn (lage chlorofylconcentratie), is de kans op hoge concentraties toxines laag. Als er zoveel blauwalgen aanwezig zijn dat een dikke drijflaag is gevormd, is er een grote kans dat er veel toxines in het water aanwezig zijn. In de tussenliggende gevallen is de kans op toxines minder goed in te schatten op basis van indirecte methodes, en geeft het meten van de toxines zelf de meeste zekerheid.

Het meten van blauwalgtoxines is echter niet eenvoudig. Ten eerste kan de blauwalgdichtheid, en daarmee ook de toxineconcentratie, sterk variëren in ruimte en tijd, dit is echter een probleem dat ook bij de indirecte methodes speelt. Ten tweede zijn er honderden blauwalgtoxines. Een gangbare en betrouwbare manier om blauwalgtoxines te meten is analyse met een LC-MS/MS (Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry), hierbij wordt vloeistofchromatografie gekoppeld aan tandem massaspectometrie. Voor LC-MS/MS analyse is echter dure apparatuur en specialistisch opgeleid laboratorium personeel nodig, deze techniek wordt in Nederland daarom slechts in een beperkt aantal laboratoria toegepast. Daarnaast is de doorlooptijd van een serie monsters die met LC-MS/MS geanalyseerd worden ongeveer 36 uur, wat in sommige gevallen langer is dan wenselijk.

Waterschappen hebben behoefte aan snelle, relatief eenvoudig uit te voeren methodes om blauwalgtoxines in oppervlaktewater te meten. Hierbij wordt zowel gedacht aan testen die in het veld uitgevoerd kunnen worden en terplekke een uitslag geven als aan labtesten die binnen enkele uren uitgevoerd kunnen worden. Beide type testen zijn commercieel beschikbaar, maar de meeste waterschappen en waterschapslaboratoria hebben weinig ervaring met het uitvoeren van deze testen. Ook is niet bekend hoe praktisch en betrouwbaar deze testen zijn.

1.2 Doel

Het doel van deze studie is om inzicht te krijgen in de werking, kosten en betrouwbaarheid van commercieel verkrijgbare veld- en labtesten voor het meten van blauwalgtoxines in oppervlaktewater.

Hierbij is gezocht naar testen voor de volgende toxinegroepen: microcystines (MC's), cylindrospermopsines (CYN's), anatoxines (ANA's) en saxitoxines (STX'en). De veldtesten zijn zogenaamde lateral flow devices (LFD's), die qua opzet vergelijkbaar zijn met bijvoorbeeld zwangerschapstesten en COVID zelftesten. Voor de labtesten zijn Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA's) geselecteerd.

In deze studie is gekeken naar praktische aspecten zoals uitvoerbaarheid, doorlooptijd en kosten. Daarnaast is gekeken of de testen geschikt zijn voor het beoogde doel en hoe gevoelig en betrouwbaar de metingen zijn. Hierbij is ervan uitgegaan dat de testen worden gebruikt voor het meten van oppervlaktewater met pelagische (in het water zwevende) blauwalgen. De werking van de testen bij het meten van extreem hoge blauwalgdichtheden, zoals tijdens drijflogen op kan treden, is niet getest. Ook is er niet onderzocht of de testen toegepast kunnen worden voor het meten in bentische (aan substraat gehechte) blauwalgen.

2 Technische achtergrond

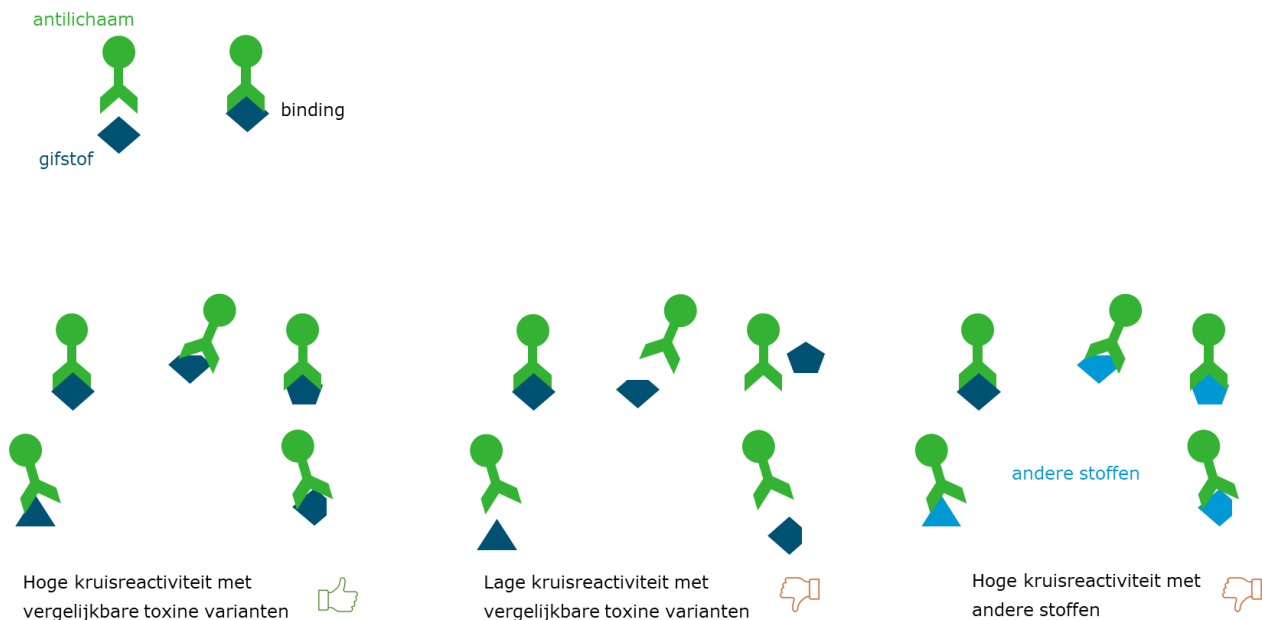
In dit hoofdstuk wordt technische achtergrondinformatie over de werking van de testen gegeven. Daarnaast wordt uitgelegd hoe de prestatie van meetmethodes bepaald kan worden, en welk effect de prestatie van de testen heeft op de toepasbaarheid.

2.1 Antilichaam binding en kruisreactiviteit

Zowel de geëvalueerde veld- als labtesten werken op basis van antilichamen. Een antilichaam is een eiwit dat zich aan specifieke stoffen, in dit geval toxines van blauwalgen, kan binden. Deze binding tussen de toxines en de antilichamen vormt de kern van de sneltesten.

Antilichamen binden in het ideale geval alleen aan de toxines waarop de test gericht is. Binden ze ook aan andere stoffen die in het monster aanwezig zijn, dan kan dit een vals positieve uitslag veroorzaken. Dit betekent dat de test onterecht een positieve uitslag geeft bij een negatief monster. Bindt een antilichaam niet, of niet voldoende aan een toxine, dan kan de testuitslag onterecht negatief zijn, de test geeft een vals negatieve uitslag.

Een antilichaam wordt vaak gemaakt op basis van één toxine, waaraan dit toxine over het algemeen goed zal binden. Als meerdere, vergelijkbare toxines met dit antilichaam gemeten worden, bindt het antilichaam soms beter of slechter aan vergelijkbare toxines. Zo bindt een antilichaam dat gemaakt is om aan microcystine-LR te binden, niet per definitie even goed aan andere microcystines. De mate waarin een antilichaam bindt aan andere stoffen dan het toxine waarvoor het is gemaakt, noemen we kruisreactiviteit (cross reactivity). In het voorbeeld van de microcystines heeft het antilichaam in het ideale geval 100% kruisreactiviteit met alle microcystine varianten en 0% met alle andere stoffen in het monster. De mate van kruisreactiviteit van het antilichaam voor vergelijkbare toxines bepaalt in grote mate hoe betrouwbaar de test is als er mengsels van toxines in het monster aanwezig zijn. De binding tussen een antilichaam en een toxine en verschillende vormen van kruisreactiviteit zijn weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1 Schematische weergave van de binding tussen een antilichaam en een toxine. Wanneer een specifiek antilichaam (bijvoorbeeld voor microcystine-LR) goed bindt met vergelijkbare toxines (in dit geval andere microcystines), is er sprake van een hoge kruisreactiviteit (links, gewenst). In het midden is een lage kruisreactiviteit te zien, waarbij er weinig of geen binding met vergelijkbare toxines plaatsvindt (ongewenst). Rechts is een hoge kruisreactiviteit te zien met andere stoffen dan de stoffen die de test zou moeten meten (ongewenst).

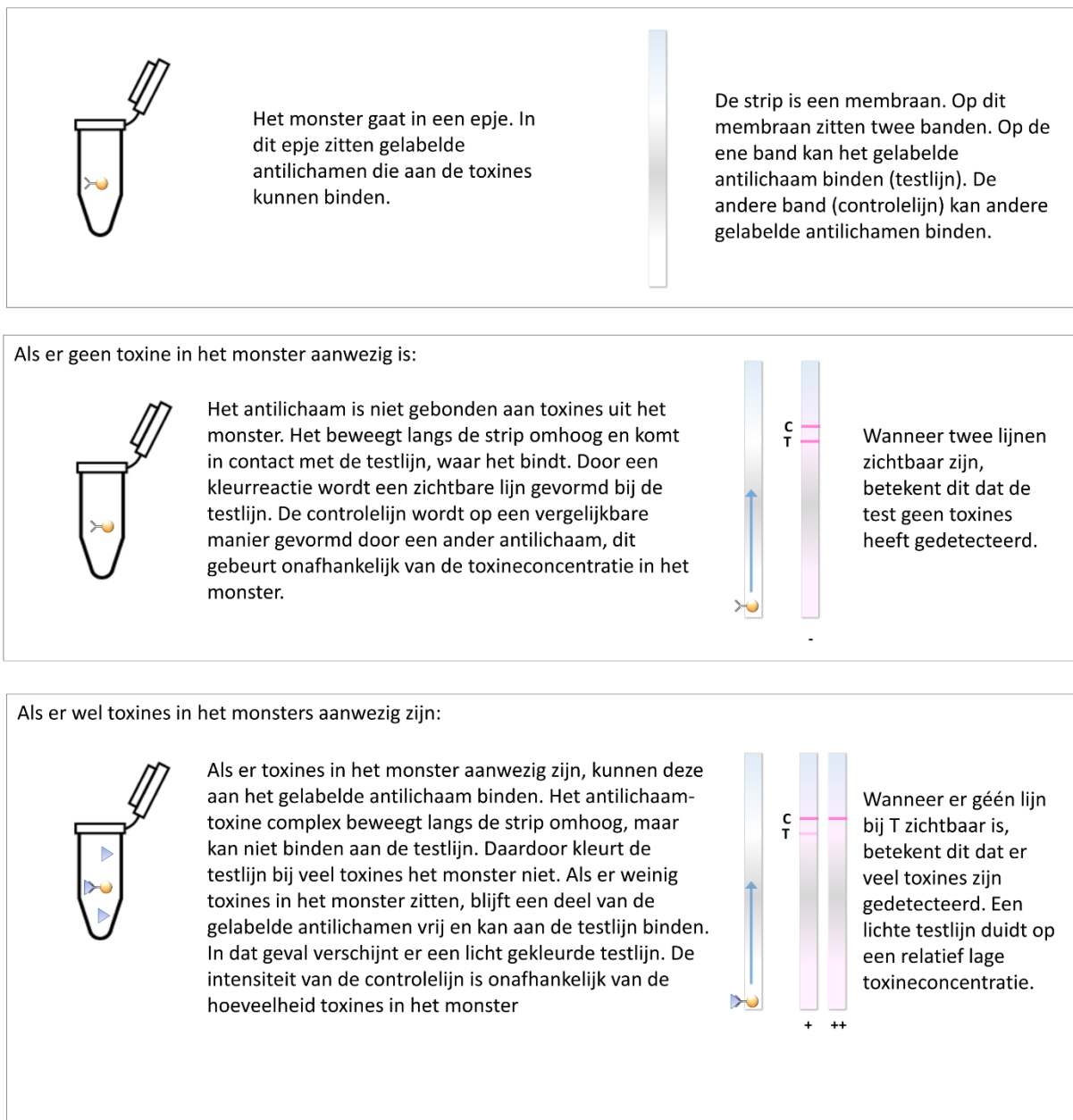
2.2 Principe veldtesten

Alle veldtesten die zijn geëvalueerd in dit onderzoek zijn zogenaamde Lateral Flow Devices (LFD's). Dit zijn testen die op een strip worden uitgevoerd, zoals een zwangerschapstest. Alle geëvalueerde veldtesten maken gebruik van antilichamen voor de detectie van de toxines. Of er wel of geen toxines zijn aangetoond kan worden afgelezen op een testlijn die op de strip verschijnt.

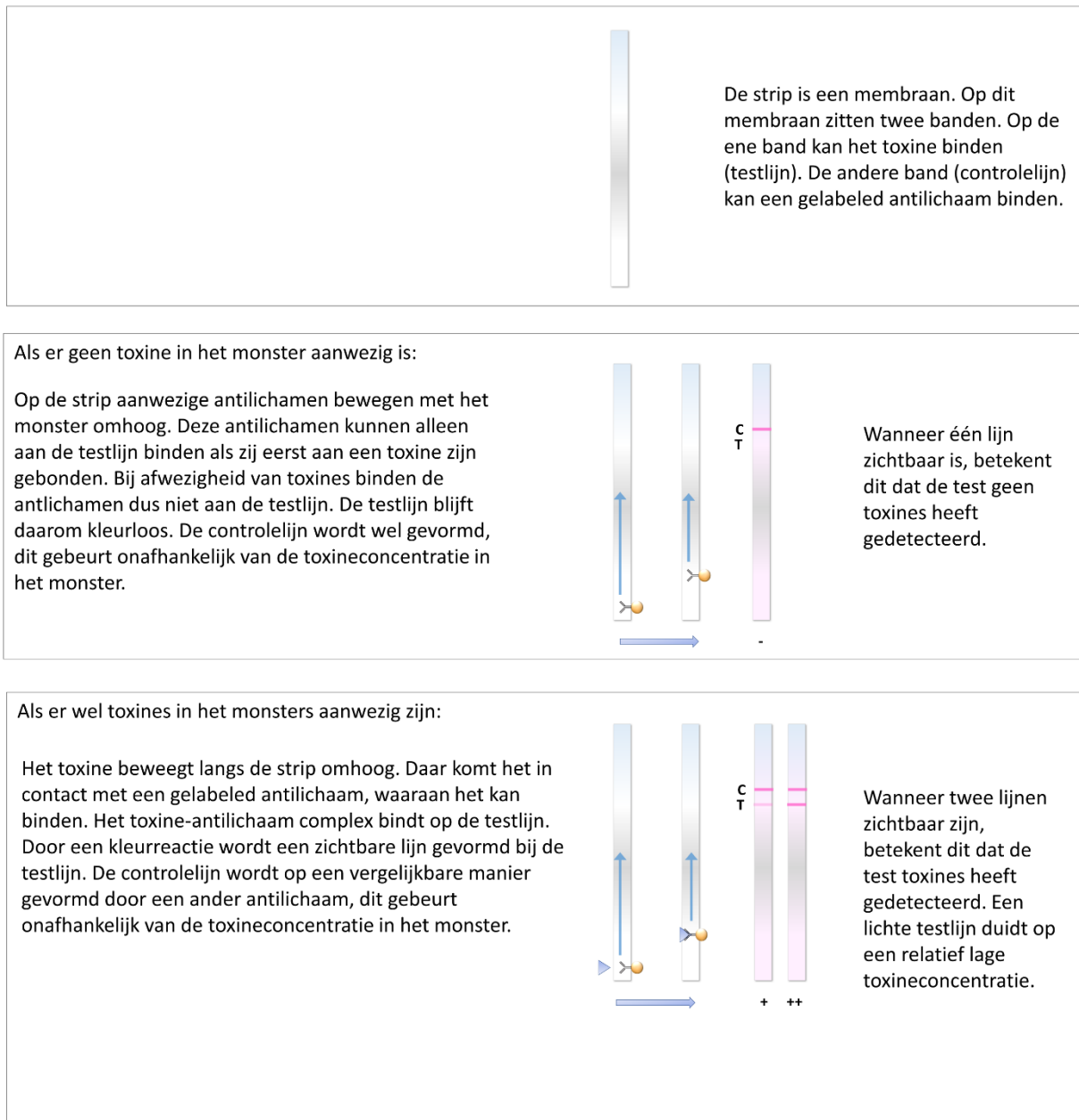
Hoewel alle testen gebaseerd zijn op de binding van toxines aan antilichamen, geven sommige testen (geproduceerd door Eurofins/Abraxis) een donkere testlijn als er geen toxines zijn gedetecteerd en is de testlijn licht of afwezig bij een hoge concentratie toxines. Bij de test van Salofa Oy is dit andersom, deze test geeft een donkere testlijn als er wel toxines aanwezig zijn.

In het eerste geval is er een zogenaamde competitieve opzet gebruikt. Een gelabeld antilichaam, dat op de testlijn een kleur kan geven, bindt aan de testlijn op de strip als er geen toxines aanwezig zijn. Zijn er wel toxines aanwezig, dan verdringen zij het gelabeld antilichaam op de testlijn, en wordt deze lichter of kleurloos (Figuur 2). In het geval van directe, indirecte of sandwich LFD's bindt juist het gelabelde antilichaam met toxine aan de testlijn. Testen die op deze technieken zijn gebaseerd geven dus een gekleurde lijn bij een positief monster. De test van Salofa Oy is op één van deze drie technieken gebaseerd, uit de handleiding kon niet worden opgemaakt op welke. Het principe van een sandwich LFD is weergegeven in Figuur 3.

Voordat het monster klaar is om gemeten te kunnen worden, moet het worden opgewerkt. Twee veldtesten hebben een conserveringsstap, zodat het monster enige tijd bewaard kan worden. Daarnaast bevatten de meeste testen een lyseerstap. Hierdoor worden de blauwalgcellen beschadigd, waardoor de toxines uit de cel in oplossing kunnen komen. Het is cruciaal dat dit gebeurt, omdat anders een groot deel van de toxines, namelijk de toxines in de cel, niet worden gemeten en de totale toxineconcentratie dus wordt onderschat. In de gebruikte testen vindt het lyseren plaats door een chemische reactie of door verhitting.



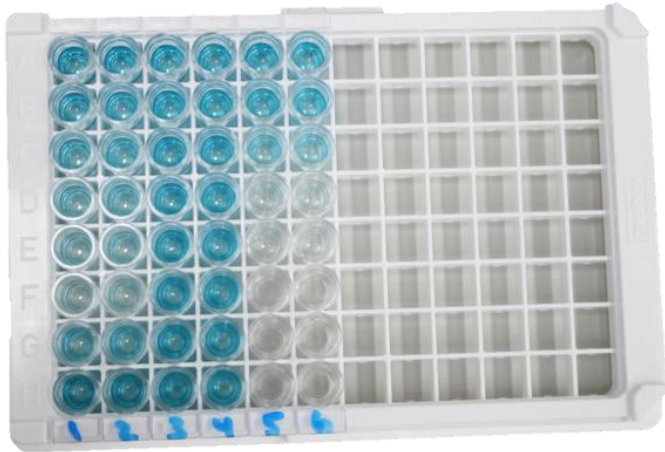
Figuur 2 Principe van competitieve veldtesten.



Figuur 3 *Principe van veldtesten gebaseerd op de sandwich techniek.*

2.3 Principe labtesten

De geëvalueerde labtesten zijn Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA's). In een ELISA wordt een toxine gebonden aan een antilichaam. In de test aanwezige enzym conjugaten geven een kleurreactie die correspondeert met de toxineconcentratie in het monster. Een ELISA wordt uitgevoerd in zogenaamde 96-wells platen (Figuur 4). Een well is een klein kommetje, waarin de reacties tussen de toxines, antilichamen en enzym conjugaten plaatsvinden. In praktijk wordt vaak in tweevoud gemeten, per monster worden dan twee wells gebruikt.

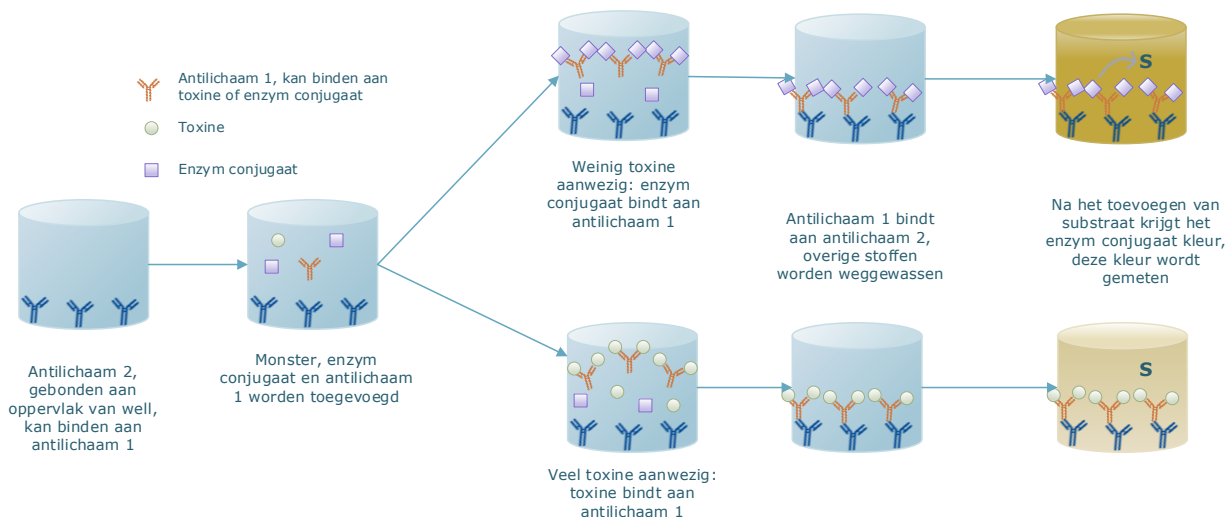


Figuur 4 96-wells plaat van een ELISA. In dit voorbeeld is slechts de helft van de wells in de plaat geplaatst, omdat het aantal te meten monsters beperkt was.

In elke well vindt een reactie tussen het toxine en een antilichaam plaats. Net als voor de veldtesten verschilt ook het ontwerp van de ELISA's. Alle in dit onderzoek geëvalueerde labtesten zijn direct of indirect competitieve ELISA's. In Figuur 5 is de werking van een direct competitieve ELISA schematisch weergegeven.

Bij een direct competitieve ELISA wordt het monster toegevoegd aan een well, waarna een enzym conjugaat wordt toegevoegd. Vervolgens wordt een antilichaam toegevoegd, waarbij competitie optreedt tussen de te meten toxines en het enzym conjugaat om bindingsplaatsen op het antilichaam. Dit antilichaam zal uiteindelijk binden aan een ander antilichaam, dat gebonden is aan het oppervlak van de well. Na een bepaalde incubatietijd wordt de plaat gewassen en daarmee worden alle ongebonden stoffen weggespoeld. Wanneer er weinig toxines aanwezig zijn, zal er meer enzym conjugaat gebonden zijn. Een substraat oplossing wordt toegevoegd, welke in combinatie met het enzym conjugaat een kleur zal ontwikkelen. Dit betekent dat bij afwezigheid van toxines of een lagere toxineconcentratie een intense kleur zal ontstaan door de aanwezigheid van meer enzym conjugaat. Bij een hoge toxineconcentratie zal geen kleuring ontstaan. In de 96-wells plaat in Figuur 4 heeft het monster in well H6 bijvoorbeeld een hoge toxineconcentratie, het monster in well H1 bevat weinig of geen toxines.

De toxineconcentratie in een monster wordt in ELISA's dus weergegeven door een meer of minder intense kleuring van de vloeistof in de wells. De kleurintensiteit van elke well wordt uitgelezen door middel van een plareader. Op elke 96-wells plaat wordt met behulp van standaarden een ijklijn gemaakt. Deze wordt gebruikt om de toxineconcentraties in de monsters te berekenen.



Figuur 5 Schematische weergaven van een direct competitieve ELISA.

2.4 Vaststellen van de prestatie van meetmethodes

Voordat meetmethodes kunnen worden gebruikt, moet aangetoond worden dat ze aan bepaalde criteria voldoen. Welke criteria dat zijn, is afhankelijk van het beoogde gebruik van de test. Zo moet een test waarmee de toxineconcentratie wordt ingeschat (een (semi-)kwantitatieve test) aan meer criteria voldoen dan een test die alleen wordt gebruikt voor het bepalen van de aan- of afwezigheid van toxines (een kwalitatieve test). Normaal wordt een methode ontwikkeld (of, in het geval van bestaande of commercieel beschikbare methodes, operationeel gemaakt in het eigen lab) en daarna gevalideerd. Tijdens de validatie worden de benodigde prestatiekenmerken vastgesteld. Na succesvolle validatie kan de methode toegepast worden.

In dit onderzoek zijn de sneltesten niet geoptimaliseerd, het protocol van de producent is overgenomen. Ook zijn ze niet gevalideerd, maar geëvalueerd. In deze evaluatie is wel een aantal prestatiekenmerken vastgesteld, in deze paragraaf wordt hier meer uitleg over gegeven.

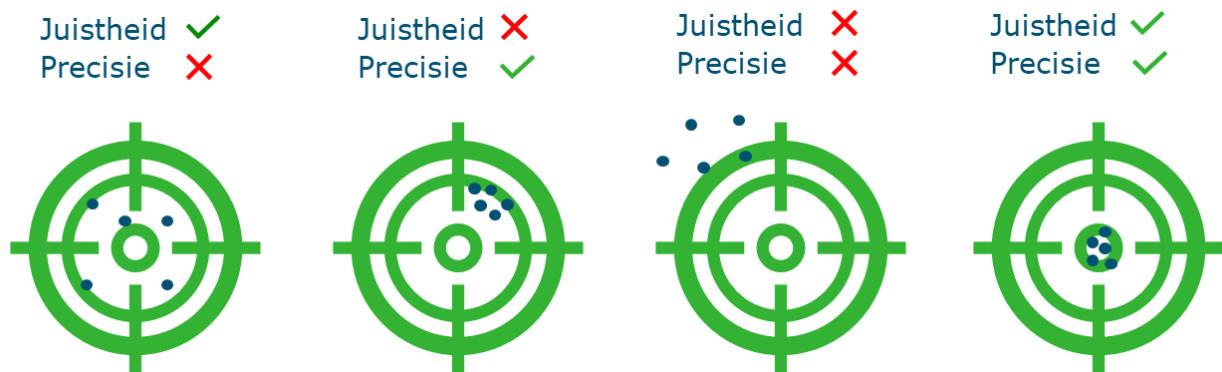
2.4.1 Aantoonbaarheid

De aantoonbaarheid is het vermogen van een test om onderscheid te maken tussen monsters waarin wel, geen of te weinig toxines aanwezig zijn. De aantoonbaarheid geldt voor het geteste niveau, zoals de ondergrens van de test of een richtwaarde waarop in praktijk getoetst moet worden. Aantoonbaarheid is het belangrijkste criterium voor kwalitatieve testen, maar wordt ook voor kwantitatieve testen bepaald, met name op de laagst kwantificeerbare concentratie. Omdat op antilichamen gebaseerde testen verschillend reageren op verschillende toxineconcentraties binnen een toxinegroep (paragraaf 2.1), moet de aantoonbaarheid voor verschillende individuele toxines of voor mengsels met verschillende samenstellingen worden bepaald.

Bij een kwalitatieve test met een meetbereik van 1 tot 50 µg/l kan bijvoorbeeld getoetst worden of de test inderdaad monsters waarin minder dan 1 µg toxine/l aanwezig is negatieve beoordeelt en of monsters met een concentratie hoger dan 1 µg/l een positieve testuitslag geven. Als deze test gebruikt moet worden om te bepalen of er meer of minder dan 20 µg toxine/l in een monster aanwezig is, zal dat niet zonder aanpassingen lukken. De test zal namelijk voor zowel monsters met een concentratie tussen de 1 en 20 µg/l een positieve uitslag geven, als ook voor monsters met een concentratie boven de 20 µg/l. In dit geval zal in praktijk het te meten monster 20 maal verdund moeten worden. Bij een juiste aantoonbaarheid zal het verdunde monster negatief testen bij een toxineconcentratie lager dan 20 µg/l in het originele monster, en positief testen als de oorspronkelijke concentratie hoger was.

2.4.2 Juistheid en reproduceerbaarheid

Voor kwantitatieve testen is het belangrijk om te weten hoe goed de toxineconcentratie kan worden ingeschat. Twee belangrijke prestatiekenmerken hiervoor zijn juistheid en reproduceerbaarheid. Juistheid betekent in hoeverre de gemiddelde gemeten waarde overeenkomt met de werkelijke waarde in het monster (Figuur 6). Juistheid wordt vaak uitgedrukt als percentage van de gemiddelde gemeten waarde ten opzichte van de werkelijke waarde. Precisie is een maat voor de spreiding van de resultaten (Figuur 6), om dit vast te stellen wordt vaak de reproduceerbaarheid bepaald. Deze spreiding kan door verschillende factoren worden veroorzaakt, zoals slordigheden in het uitvoeren van de test, verschillen in uitvoer door verschillende laboranten, verschillen tussen meetapparaten, verschillen in kruisreactiviteit tussen toxines en het effect van de monstersamenstelling op de testuitslag. De reproduceerbaarheid wordt meestal uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie van de gemeten waarden.



Figuur 6 Schematische weergave van juistheid en precisie.

Juistheid en reproduceerbaarheid worden vaak op meerdere niveaus bepaald, zoals het hoogste en laagste niveau waarop gekwantificeerd kan worden, een punt er tussenin of een concentratie die overeenkomt met een norm of richtlijn. Juistheid en precisie worden vaak bepaald door op verschillende dagen monsters van verschillende oorsprong op te werken en te meten. In het geval van op antilichamen gebaseerde testen is het belangrijk dat aan deze monsters toxinemengsels van verschillende samenstelling worden toegevoegd.

2.4.3 Herhaalbaarheid

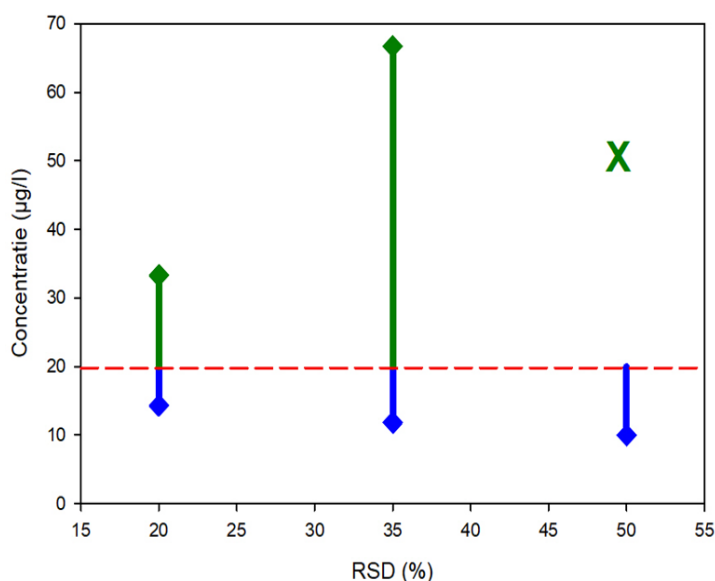
Herhaalbaarheid is een maat voor de spreiding die optreedt als hetzelfde monster meerdere malen wordt opgewerkt en gemeten. Herhaalbaarheid wordt doorgaans uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie en verschilt van reproduceerbaarheid omdat voor herhaalbaarheid de omstandigheden zoveel mogelijk gelijk gehouden worden (één monster, één toxinesamenstelling, één analist, één dag), terwijl voor reproduceerbaarheid de omstandigheden juist zoveel mogelijk worden gevarieerd. De herhaalbaarheid geeft inzicht in welk gedeelte van de spreiding in de resultaten veroorzaakt wordt door de opwerking en meting. De overige spreiding die bij het bepalen van de reproduceerbaarheid is geconstateerd kan dan worden toegeschreven aan verschillen tussen monsters, toxines, apparatuur etc. Dit onderscheid geeft richting aan methodeoptimalisatie als een test niet voldoet aan de criteria voor reproduceerbaarheid.

2.5 Effect van de meetonzekerheid op het toetsen aan richtlijnen

Tijdens het bepalen van de reproduceerbaarheid wordt de standaarddeviatie van de gemeten waarden bepaald. Als deze standaarddeviatie met een factor 2 wordt vermenigvuldigd, ontstaat de uitgebreide meetonzekerheid. Met deze uitgebreide meetonzekerheid kan worden vastgesteld of een gemeten waarde met ongeveer 95% zekerheid aan een norm of richtlijn voldoet. Hoe lager de reproduceerbaarheid (en hoe hoger dus de standaarddeviatie), hoe groter dit interval wordt.

In Figuur 7 wordt dit gedemonstreerd. Hierbij wordt de vraag behandeld op basis van welke meetwaarde vast kan worden gesteld of de toxineconcentratie in een monster onder of boven een richtlijn van 20 µg/l ligt. Als de methode een relatieve standaarddeviatie van 20% heeft, kan bij een meetwaarde van 14,3 µg/l met 95% zekerheid gesteld worden dat de toxineconcentratie onder de 20 µg/l ligt. De uitgebreide meetonzekerheid van deze methode op een meting van 14,3 µg/l is namelijk 2 maal 20% van 14,3 µg/l, dit is 5,7 µg/l. Als de meetwaarde (14,3 µg/l) en de uitgebreide meetonzekerheid (5,7 µg/l) opgeteld worden is de som 20 µg/l. Van alle meetwaarden op of onder 14,3 µg/l kan met deze methode dus met vrij grote zekerheid worden bepaald dat de betreffende monsters een toxineconcentratie onder de richtlijn hebben. Op een analoge wijze kan worden bepaald wanneer een meetwaarde met 95% zekerheid boven de richtlijn ligt. In dit geval moet de meetonzekerheid van de meetwaarde afgetrokken worden. In het hierboven beschreven voorbeeld liggen monsters met een meetwaarde van 33,3 µg/l of hoger met vrij grote zekerheid boven de norm.

Op het moment dat de reproduceerbaarheid van de methode slechter wordt, wordt de uitgebreide meetonzekerheid groter. Het gevolg is dat het de concentraties waarbij met enige zekerheid kan worden vastgesteld dat ze boven of onder een richtlijn liggen steeds verder van de waarde van de richtlijn komen te liggen. Bij een methode met een relatieve standaarddeviatie van 35% kan bij een meting van 11,8 µg/l gesteld worden dat de concentratie onder de richtlijn ligt, om te bepalen of een monster boven de richtlijn ligt is een concentratie van 66,7 µg/l nodig. Van de monsters met resultaten tussen de 11,8 en 66,7 µg/l kan dus niet met zekerheid worden gesteld of ze boven of onder de richtlijn liggen. Bij een methode met een relatieve standaarddeviatie van 50% is het nog wel mogelijk om een uitspraak te doen over monsters die onder de richtlijn liggen (in dit geval bij een meting van 10 µg/l), maar kan er geen uitspraak meer worden gedaan over monster met een meetwaarde boven de 10 µg/l (Figuur 7).



Figuur 7 Theoretisch voorbeeld van het effect van de reproduceerbaarheid (weergegeven als relatieve standaarddeviatie, RSD) op de beslissing of een monster een toxineconcentratie onder- of boven een richtlijn heeft. De diamanten geven de meetwaarde weer, de lijnen de uitgebreide meetonzekerheid. De rode stippellijn geeft de hypothetische richtlijn weer. Voor uitleg, zie tekst.

3 Opzet onderzoek

3.1 Selectie testen

In dit onderzoek zijn commercieel beschikbare LFD's en ELISA's voor het bepalen van blauwalgtoxines in water geselecteerd. De testen zijn gevonden door op internet te zoeken en wetenschappelijke literatuur te raadplegen. Bij de internet zoektocht is zowel gericht gekeken op websites van bekende producenten als ook breed gezocht met algemene zoektermen. Ook in de wetenschappelijke literatuur is met algemene zoektermen gezocht. Sneltesten die op andere technieken zijn gebaseerd, zoals receptor binding assays, zijn niet in deze studie meegenomen.

Bij de selectie van de gevonden testen is ten eerste gekeken of de testen voor oppervlaktewater geschikt zijn. Testen die ontworpen zijn voor andere soorten monsters, zoals schelpdieren, zijn niet meegenomen. Testen voor drinkwater zijn wel geselecteerd. Daarnaast moesten de testen binnen de studieperiode leverbaar zijn. Tenslotte moesten de testen voldoende van elkaar verschillen, van twee dezelfde testen die elk door een andere leverancier werden verkocht is er bijvoorbeeld maar één geselecteerd.

3.2 Gebruikte standaarden

In dit onderzoek is gebruik gemaakt van toxinestandaarden om de testmonsters te bereiden. De saxitoxine standaarden zijn afkomstig van de National Research Council in Canada en bevatten een gecertificeerde concentratie toxines. De andere standaarden zijn afkomstig van Enzo Life Sciences (MC's, NOD, CYN en ANA) en Eurofins/Abraxis (hANA, 7-epi-CYN en 7-deoxy-CYN), de concentratie van deze standaarden is niet gecertificeerd. Omdat tijdens de uitvoering van de experimenten bleek dat de standaarden die bij de labtesten waren geleverd niet altijd dezelfde respons gaven als de standaarden die gebruikt waren voor het maken van de monsters, zijn voor MC-LR, CYN en ANA gecertificeerde standaarden gekocht bij Eurofins/Abraxis. De respons van de standaarden uit de labtesten en de MC-LR, ANA en CYN standaarden gebruikt voor het maken van de monsters zijn met behulp van LC-MS/MS vergeleken met de respons van de gecertificeerde standaarden.

3.3 Overzicht experimenten en geëvalueerde kenmerken

De geselecteerde testen zijn op een aantal punten geëvalueerd (Tabel 1). Voor alle testen is gekeken naar de kosten, doorlooptijd en praktische uitvoerbaarheid.

De labtesten geven een inschatting van de toxineconcentratie in het monster. Voor de labtesten is daarom bepaald of ze de aan- en afwezigheid van toxines goed kunnen inschatten (aantoonbaarheid, Tabel 1), maar ook of de concentratie goed wordt ingeschat (juistheid, reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid). Sommige veldtesten kunnen ook een indicatie van de toxineconcentratie geven, maar hiervoor is het nodig om in het veld ook een serie standaarden te testen. Omdat dit naar onze inschatting in praktijk waarschijnlijk weinig zal gebeuren, is in deze studie alleen getest of de veldtesten de aan- en afwezigheid van toxines goed aantonen. Omdat voor de meting met de labtesten de toxines uit de cel vrijgemaakt moeten worden (extractie) en hier verschillende opties voor zijn, is hier ook kort naar gekeken. Voor sommige veldtesten is een extractiestap in het protocol opgenomen, extractie is voor de veldtesten dus niet verder onderzocht. Voor beide testen is het belangrijk om te weten hoe ze functioneren in wateren met veel algen of een verhoogd zoutgehalte. Het effect van de algendichtheid en het zoutgehalte is daarom zowel voor de veld- als de labtesten onderzocht.

Voor de meeste experimenten is gewerkt met een toxineconcentratie van 1 µg/l. Deze concentratie valt binnen het door de producenten opgegeven bereik van alle testen. Alleen het bereik van de saxitoxine labtest was lager dan 1 µg/l, deze test is geëvalueerd op een concentratie van 0,1 µg/l. In de volgende paragrafen is in meer detail uitgelegd hoe elke parameter is bepaald.

Tabel 1 In deze studie geëvalueerde parameters voor veld- en labtesten.

	Veldtesten	Labtesten
Kosten	V	V
Doorlooptijd	V	V
Praktische uitvoerbaarheid	V	V
Meetbereik	V	V
Kruisreactiviteit		V
Aantoonbaarheid	V	V
Juistheid		V
Reproduceerbaarheid		V
Herhaalbaarheid		V
Effect extractie		V
Effect zoutgehalte	V	V
Effect algendichtheid	V	V

3.4 Kosten

Voor de veldtesten zijn de kosten per test berekend. Hierbij is ervan uitgegaan dat er één teststrip per monster wordt gebruikt en dat de testen in een relatief grote verpakking (15 tot 20 testen) worden aangeschaft. Verzendkosten, manuren en de prijs voor optionele afleesapparatuur zijn niet in de prijs per monster meegenomen.

Voor de labtesten is ervan uitgegaan dat per analyse een hele 96-wells plaat wordt gebruikt. De prijs per monster hangt er vervolgens van af of elk monster eenmaal wordt gemeten, of dat er rekening moet worden gehouden met het meten van verdunningsreeksen of hermetingen. Om deze reden zijn er voor de labtesten twee scenario's uitgewerkt, één waarin elk monster eenmaal is gemeten en één waarbij voor elk monster drie verdunningen zijn ingezet. In beide scenario's is er vanuit gegaan dat elk monster en elke standaard in tweevoud op de 96-wells plaat wordt opgebracht zoals in de handleidingen van de testen is aangegeven.

3.5 Doorlooptijd

De doorlooptijd is geschat door de tijd die nodig is voor het uitvoeren van elke stap op te tellen bij de incubatietijd van de testen.

3.6 Praktische uitvoerbaarheid

Bij het beoordelen van de praktische uitvoerbaarheid is gekeken of er een duidelijk protocol was dat gevolgd kon worden. Voor de veldtesten is daarnaast beoordeeld of deze door ongeschoolde personen makkelijk uitvoerbaar en afleesbaar zijn. De labtesten zijn beoordeeld op hun uitvoerbaarheid door geschoolde laboranten.

3.7 Meetbereik

Het meetbereik van de veldtesten is overgenomen van de beschrijving van de producent, dit is niet specifiek getest in deze studie. Voor de labtesten is het meetbereik vastgesteld op basis van de met de testen meegeleverde standaarden. Hierbij is ervan uitgegaan dat de labtesten concentraties tussen de laagste en hoogste standaarden correct aan kunnen tonen.

3.8 Kruisreactiviteit

De kruisreactiviteit van de labtesten is bepaald door de andere toxines van een toxinegroep dan het toxine waarop de test is ontwikkeld (bijvoorbeeld 7-epi-CYN en 7-deoxy-CYN voor de cylindropermopsine test) in aparte oplossingen te meten (Tabel 2). Het resultaat van deze metingen is vervolgens vergeleken met het resultaat van het toxine waarop de test is ontwikkeld, het referentietoxine (in dit voorbeeld CYN).

Tabel 2 Referentietoxine per test en de overige toxines die zijn getest voor het bepalen van de kruisreactiviteit.

Test	Referentie toxine	Overige geteste toxines	Test concentratie ¹
Microcystines	MC-LR	dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW, NOD	1 µg/l
Cylindropermopsines	CYN	7-epi-CYN, 7-deoxy-CYN	1 µg/l
Anatoxines	ANA	hANA	1 µg/l
Saxitoxines	STX	C1/C2, GTX1/4, GTX2/3, GTX5, dcGTX2/3, dcSTX, NEO, dcNEO	0,1 µg/l

¹ molaire equivalenten van het referentietoxine.

3.9 Aantoonbaarheid, juistheid, reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid

Voor beide type testen is de aantoonbaarheid bepaald door op drie dagen elk 7 verschillende watermonsters te bereiden en te meten. Deze watermonsters werden gemaakt door aan kraanwater en verschillende oppervlaktewateren gekweekte, niet toxische, algen toe te voegen. Vervolgens is elk van de 21 watermonsters gesplitst en is aan één van de twee monsters toxines toegevoegd. Aan sommige monsters zijn individuele toxines toegevoegd, aan andere toxinemengsels. De toegevoegde toxines zijn dezelfde als de referentie toxines en de overige toxines uit Tabel 2. De toxineconcentratie per toxinegroep was 1 µg/l. Voor de STX labtest zijn de monsters voor analyse 10x verdund met de in de kit bijgeleverde verdunningsvloeistof.

Op elk van de drie dagen zijn 7 monsters met, en 7 monsters zonder toxines gemeten. Voor beide typen testen is bepaald of de testuitslag correct was (negatief bij een monster waaraan geen toxines waren toegevoegd en positief bij een monster waaraan wel toxines waren toegevoegd). De veldtesten zijn met het blote oog afgelezen. Omdat de interpretatie van de testen kan verschillen tussen personen, zijn deze testen waar mogelijk door twee personen afgelezen. De testen zijn altijd afgelezen door degene die ze heeft uitgevoerd, en vaak ook door een tweede persoon die niet wist welke monsters er waren gemeten. De resultaten zijn op aparte formulieren ingevuld en pas tijdens de data-evaluatie samengevoegd. De meeste testen kunnen ook digitaal, met behulp van een handmeter, worden uitgelezen. Het digitaal uitlezen is uitgevoerd door de persoon die de test heeft uitgevoerd, maar pas nadat de testen met het oog waren afgelezen.

Naast aantoonbaarheid, is voor de labtesten bepaald hoe goed de toxineconcentratie kon worden ingeschat. Hiervoor zijn de juistheid en de reproduceerbaarheid berekend. De juistheid is bepaald door hoe dicht de gemiddelde gemeten concentratie in de 21 positieve monsters bij de werkelijke toxineconcentratie ligt. De reproduceerbaarheid is bepaald door de spreiding van de 21 gemeten concentraties te berekenen. Omdat uit

de standaardvergelijking (paragraaf 5.1) bleek dat de respons van de MC-LR, CYN en ANA standaarden die gebruikt waren voor het maken van de monsters afweek van de respons van de referentiestandaard, is hiervoor gecorrigeerd in de berekening van de juistheid en reproduceerbaarheid.

De respons van de overige standaarden (7-epi-CYN, 7-deoxy-CYN, hANA, dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW en NOD) is niet gecorrigeerd. Voor de meeste van deze toxines zijn namelijk geen gecertificeerde standaarden beschikbaar. Voor MC-RR en NOD is dit wel het geval, maar deze waren niet aangeschaft tijdens de studie, omdat in eerste instantie de afwijking van respons van de referentietoxines (MC-LR, CYN en ANA) werd onderzocht. Voor STX'en hoefde geen correctie worden toegepast, omdat alle STX standaarden gecertificeerd zijn.

Tenslotte is voor de labtesten ook de herhaalbaarheid bepaald, hiervoor zijn twee maal 7 dezelfde watermonsters gemeten. Eén set van zeven monsters bestond uit ultrapuur water, van deze monsters wordt verwacht dat ze zo min mogelijk interferenties bevatten. De andere set bestond uit oppervlaktewater met niet-giftige algen, deze set bootst meer realistische monsters na. Aan beide sets zijn MC-LR, CYN, ANA en STX toegevoegd en de herhaalbaarheid is bepaald door de relatieve standaarddeviatie van de gemeten concentraties te meten.

3.10 Effect zoutgehalte

De werking van de testen in zout of brak water is bepaald door gefilterd zeewater (Noordzee) te verdunnen met ultrapuur water en aan deze verdunningsreeks MC-LR, CYN, ANA en STX toe te voegen. De verdunningsreeks bestond uit 0, 1, 2,5, 10 en 100% zeewater.

3.11 Effect algendichtheid

De werking van de testen in water met een hoge algendichtheid is bepaald door aan oppervlaktewater verschillende volumes van een dichte algenkweek (*Scenedesmus obliquus*, afkomstig van het laboratorium van de vakgroep Aquatische Ecologie en Waterkwaliteit van Wageningen University) toe te voegen. Aan deze monsters zijn vervolgens MC-LR, CYN, ANA en STX toegevoegd. De reeks monsters bestond uit 0, 1, 2, 5 en 10% algencultuur.

3.12 Vergelijking met LC-MS/MS

De resultaten van beide typen testen zijn vergeleken met die van de LC-MS/MS. Voor de LC-MS/MS analyses zijn de binnen WFSR ontwikkelde methodes (inclusief de extracties) gebruikt. Voor MC's, ANA's en CYN's zijn deze methodes gevalideerd en kwantitatief. De STX methode is afgeleid van een voor schelpdieren gevalideerde methode. Deze methode is kwalitatief, de verkregen concentraties zijn indicatief.

Voor dit experiment zijn vier blauwalgstammen afkomstig van het laboratorium van de vakgroep Aquatische Ecologie en Waterkwaliteit van Wageningen University gebruikt: de MC producerende *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 en CYA 140, de ANA's en CYN's producerende *Oscillatoria* PCC 6506 en de STX'en producerende *Cylindrospermopsis raciborskii* FR. Van deze culturen zijn op hetzelfde moment twee submonsters genomen. Eén submonster is opgewerkt voor LC-MS/MS analyse. Het andere monster is bevroren tot het opgewerkt kon worden voor analyse met de veld- en labtesten.

Op basis van de concentraties zoals bepaald met LC-MS/MS zijn de benodigde verdunningen voor de analyse met de veld- en labtesten bepaald. De monsters zijn geëxtraheerd door ze drie maal in te vriezen en te ontdooien waarna ze zijn verdund in water (MC's en CYN's) of verdunningsvloeistof behorende bij de labtesten (ANA's en CYN's). Voor het meten van deze monsters zijn verder de protocollen van de veld- en labtesten gevolgd.

3.13 Extractie efficiëntie

Voor de labtesten is de efficiëntie van het in de protocollen opgenomen extractieproces (driemaal invriezen-ontdooien) vergeleken met vereenvoudigde extractiemethoden die binnen WFSR gebruikt worden voor de LC-MS/MS metingen. Voor drie van de MC labtesten werd in de protocollen een alternatieve extractie methode beschreven: een door de leverancier ontwikkelde QuikLyse methode. Deze methode is ook getest. Omdat de extractie efficiëntie het best bepaald kan worden met algen waarin de toxines nog in de cel zitten, is voor dit onderdeel gebruik gemaakt van gekweekte, toxine producerende algen.

De algensuspensies zijn verdeeld over verschillende buizen. Drie buizen zijn vervolgens in de diepvries geplaatst tot ze bevroren waren en daarna ontdooid. Dit proces is nog tweemaal herhaald. Drie andere buizen zijn geëxtraheerd volgens de QuikLyse methode (alleen voor MC's). Hiervoor is 200 µl QuikLyse reagent A aan twee ml algensuspensie toegevoegd. Na 2 minuten schudden en 8 minuten incuberen is vervolgens 20 µl reagens B toegevoegd. Na weer 2 minuten schudden en 8 minuten incuberen is het monster gefiltreerd. Tenslotte zijn drie buizen geëxtraheerd door ze eerst te vriesdrogen en vervolgens op te lossen in 75% methanol (MC's), 0,1% mierenzuur (ANA's en CYN's) of 0,1 molair zoutzuur (STX'en). De buizen zijn vervolgens 10 minuten in een waterbad geplaatst (60 °C voor de MC's, 90 °C voor de andere toxines).

Na extractie zijn alle monsters tot de gewenste concentratie doorverdund met water (MC's en CYN's) of met verdunningsvloeistof (ANA's en STX'en). Voor de meting is met een pH papiertje gecontroleerd of de zuurgraad van de oplossingen binnen de range van de test lag.

3.14 Dataverwerking

De data zijn verwerkt in Excel. Statistische toetsen zijn uitgevoerd in Sigmaplot 14.5, grafieken zijn ook in dit programma gemaakt.

4 Resultaten veldtesten

4.1 Geselecteerde testen en hun eigenschappen

In totaal zijn 8 veldtesten gevonden voor het meten van blauwalgtoxines in water (Tabel 3). Eén test, nr 19, was op het moment van de studie niet leverbaar, deze is daarom niet meegenomen. De overige 7 testen zijn wel geëvalueerd. Zes van de zeven geselecteerde testen zijn geproduceerd door en besteld bij Eurofins/Abraxis. De andere test is geproduceerd door het Finse Salofa Oy en gekocht bij biobestrijding.nl.

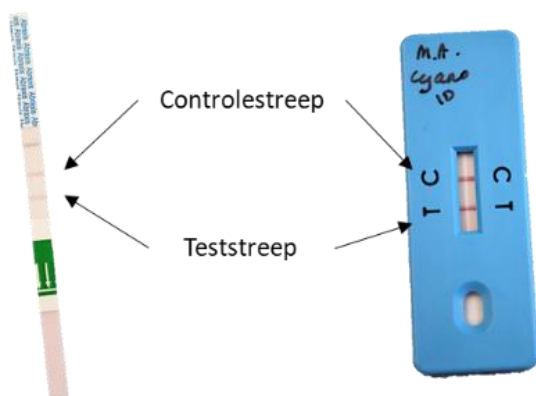
De twee MC testen van Eurofins/Abraxis (nummer 5 en 21) verschillen in gevoeligheid, waarbij test 21 gevoeliger is dan test 5 (Tabel 3). Voor elke onderzochte toxinegroep is minimaal één labtest geselecteerd voor het onderzoek. Alle geselecteerde testen waren binnen enkele weken na bestelling geleverd.

Tabel 3 *Gevonden en voor dit onderzoek geselecteerde veldtesten.*

Nr	Toxinegroep	Producent	Verkoper	Geselecteerd
5	Microcystines	Eurofins/Abraxis	Eurofins/Abraxis	Ja
14	Microcystines	Salofa Oy	Biobestrijding.nl	Ja
21	Microcystines	Eurofins/Abraxis	Eurofins/Abraxis	Ja
4	Cylindrospermopsines	Eurofins/Abraxis	Eurofins/Abraxis	Ja
3	Anatoxines	Eurofins/Abraxis	Eurofins/Abraxis	Ja
2	Saxitoxines	Eurofins/Abraxis	Eurofins/Abraxis	Ja
19	Saxitoxines	AquaBC Chile	AquaBC Chile	Nee

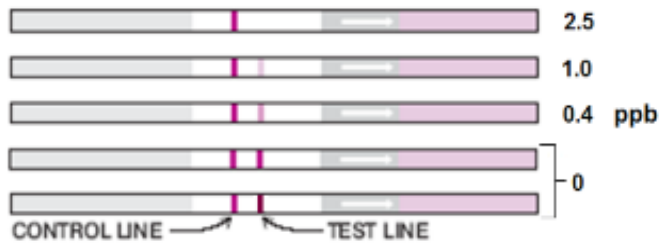
Als blauwalgtoxines in het veld gemeten worden, is het belangrijk dat de test een stap bevat waarin de blauwalgcellen kapot worden gemaakt (lyseren). Meestal bevinden de meeste toxines zich namelijk in de cel, dus als de cellen tijdens de meting intact blijven, zal de toxineconcentratie in water met algen onderschat worden. De MC en CYN veldtesten bevatten een lyseerstep. Test 14 maakt hiervoor gebruik van verhitting, testen 4, 5 en 21 maken gebruik van de chemische QuikLyse methode. De ANA en STX testen hebben geen lyseermethode.

Alle veldtesten bestaan uit strips, al dan niet in een plastic omhulsel, waarop twee strepen verschijnen. Eén streep, de controlestreep (C), geeft aan of de test goed is uitgevoerd. De andere streep, de teststreep (T), geeft aan of er toxines zijn aangetoond (Figuur 8).



Figuur 8 *Twee verschillende veldtesten. Links een strip van een Eurofins/Abraxis test, rechts de Salofa Oy MC test.*

In de handleidingen van de Eurofins/Abraxis testen staan kleurschema's die gebruikt kunnen worden om de concentratie in het water in te kunnen schatten (Figuur 9). Hiervoor moeten er echter standaarden mee worden genomen in de test. Dit houdt in dat er standaarden gekocht en verdund moeten worden en er meerdere testen per monsterlocatie uitgevoerd moeten worden. Dit is niet efficiënt en niet handig uit te voeren in het veld en zal naar verwachting in praktijk weinig gebeuren. Daarom is in deze studie alleen naar de aantoonbaarheid van toxines gekeken, en zijn de schattingen van de concentraties niet geëvalueerd.



Figuur 9 Kleurschema uit de handleiding van de anatoxine veldtest, de intensiteit van de teststreep kan gebruikt worden om de anatoxine concentratie in het water in te schatten mits er ook standaarden worden gemeten.

Alle testen kunnen worden afgelezen met het blote oog. De Eurofins/Abraxis testen kunnen daarnaast ook worden afgelezen met een draagbaar uitleesapparaat, de Abrascan. Dit apparaat maakt een foto van de strip en vergelijkt de intensiteit van de controle lijn en de testlijn (Figuur 10). De verhouding tussen deze twee lijnen bepaalt de testuitslag, die samen met de foto naar een computer kan worden geëxporteerd. Het meten met de Abrascan is eenvoudig en snel.



Figuur 10 Abrascan met teststrip (links), de uitgelezen teststrip (midden) en het uitleesscherm van de Abrascan met een CYN test (rechts).

Het concentratiebereik, zoals opgegeven door de producent, verschilt tussen de testen. De STX test is het meest gevoelig, de laagst meetbare concentratie is 0,2 $\mu\text{g/l}$. MC test 14 heeft het grootste meetbereik en kan de hoogste toxineconcentratie meten: 100 $\mu\text{g/l}$ (Tabel 4). Alle testen zijn volgens de opgave van de producent gevoelig genoeg om een toxineconcentratie van 1 $\mu\text{g/l}$ (de Nederlandse irrigatierichtlijn) te meten. Concentraties uit de veedrenkingsrichtlijn (40 μg toxine/l), het Nederlandse blauwalgenprotocol (10 en 20 μg MC/l) en de recente WHO richtlijnen voor water met een recreatieve functie (24 μg MC-LR/l, 6 μg CYN/l, 59 μg ANA/l en 30 μg STX/l) liggen boven het bereik van sommige testen. Om monsters aan deze richtlijnen

te kunnen toetsen zullen de betreffende monsters dus meestal moeten worden verdund. Van twee testen (4 en 5) is het opgegeven bereik niet duidelijk, verschillende handleidingen geven verschillende informatie.

Test 3, 4 en 5 zijn volgens de handleiding ongeschikt voor het meten in zeewater. Test 2 kan in zeewater meten, mits het 10 maal verdund wordt. Voor test 21 is een alternatief zeewater protocol beschikbaar, van test 14 is het niet bekend of deze in zeewater gebruikt kan worden (Tabel 4).

Tabel 4 Voor dit onderzoek geselecteerde veldtesten met enkele kenmerken.

Nr	Toxinegroep	Lyseerstep	Afreesbaarheid	Concentratie bereik ¹ (µg/l)	Geschikt voor zeewater? ¹
5	Microcystines	Ja	Digitaal en blote oog	1 – 10 ²	Nee
14	Microcystines	Ja	Blote oog	1 – 100	Onbekend
21	Microcystines	Ja	Digitaal en blote oog	0,5 – 5	Met alternatief protocol?
4	Cylindrospermopsines	Ja	Digitaal en blote oog	0,5 – 10 ²	Nee
3	Anatoxines	Nee	Digitaal en blote oog	0,4 – 2,5	Nee
2	Saxitoxines	Nee	Digitaal en blote oog	0,2 – 3	Tot 10% zeewater

¹ zoals aangegeven door de producent, ² verschillende handleidingen geven verschillende bereiken.

De testen bevatten alle materialen die nodig zijn de uitvoering. De enige materialen die niet bijgevoegd zijn, zijn flessen om het monster in te doen tijdens monsternamen en eventueel beschermende handschoenen. De test van Salofa Oy (nummer 14) bevat wel handschoenen, voor deze test moet een emmertje gebruikt worden om het testbuisje in onder te dompelen. Dit emmertje is niet meegeleverd.

4.2 Doorlooptijd en kosten

De geschatte doorlooptijd, de tijd die nodig is om de test uit te voeren en af te lezen, ligt tussen de 30 en 60 minuten (Tabel 5). Test 14 is de snelste test. Deze test maakt gebruik van verhitting van het monster. Nadat het monster afgekoeld is kan het direct op de teststrip worden aangebracht, welke na incubatie en drogen kan worden afgelezen (Figuur 11). De overige testen bevatten meer handelingen, waardoor met name de Eurofins/Abraxis testen met een lyseerstep (test 4, 5 en 21) een vrij lange doorlooptijd hebben (Figuur 11).

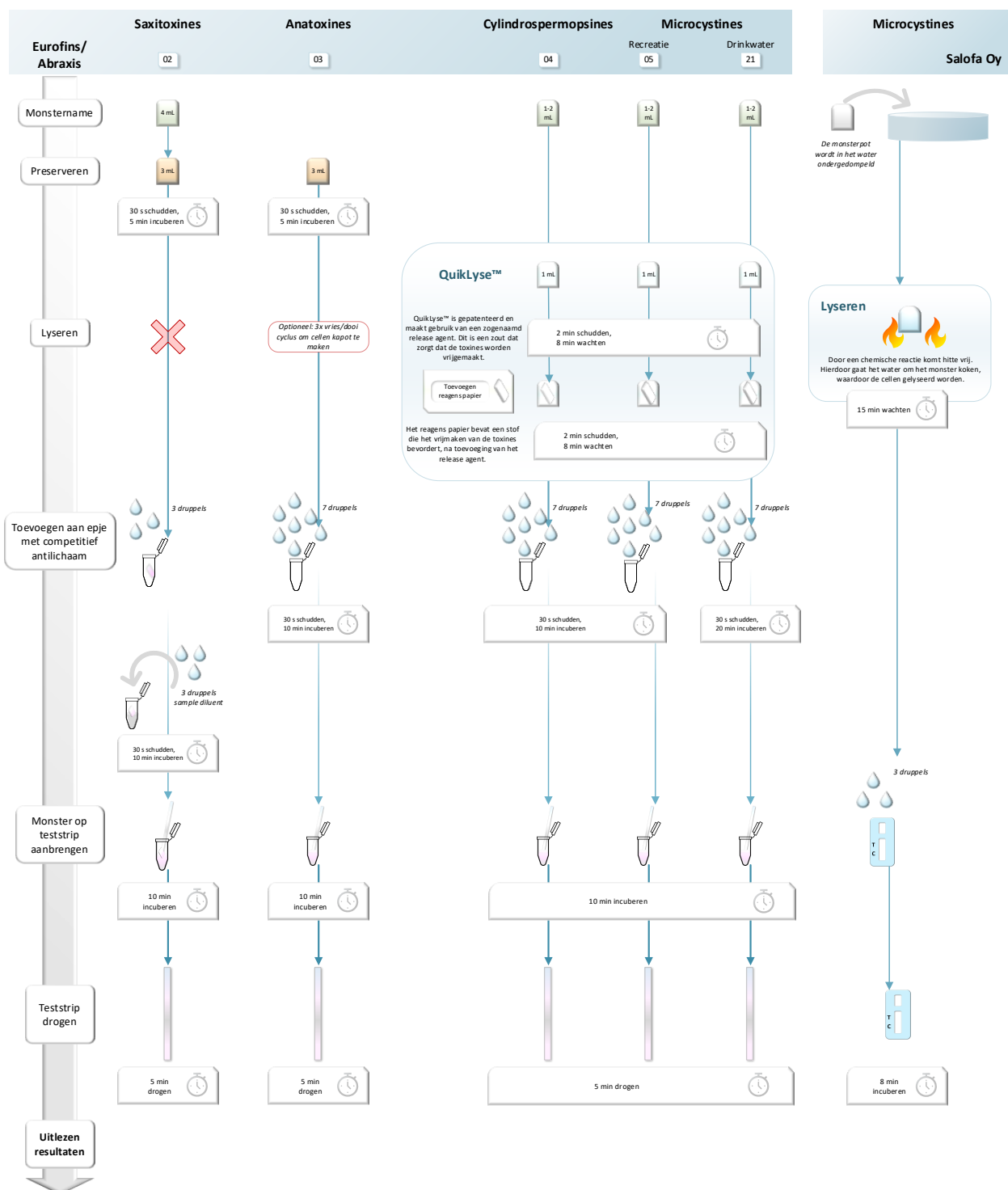
Test 14 is het goedkoopst, één test kost 12 euro (Tabel 5). De Eurofins/Abraxis testen kosten 29,75 euro per stuk. De uitvoeringskosten van de testen kunnen grofweg geschat worden door de prijs van de test op te tellen bij de personeelskosten. Hiervoor is de doorlooptijd vermenigvuldigd met het uurtarief van de uitvoerder (aansluiting: 70 euro per uur). Test 14 is door de lage prijs per teststrip en de korte doorlooptijd het goedkoopst om uit te voeren, test 21 is het duurst (Tabel 5).

De Abraxis, die gebruikt kan worden voor het uitlezen van alle Eurofins/Abraxis veldtesten, kost 3200 euro. Dit is niet in de prijzen uit Tabel 5 meegenomen.

Tabel 5 Doorlooptijden en prijzen van de geëvalueerde veldtesten.

Nr	Toxinegroep	Geschatte doorlooptijd (min)	Prijs per test ¹ (euro)	Geschatte uitvoeringsprijs ² (euro)
5	Microcystines	50	29,75 ³	88
14	Microcystines	30	12,00 ⁴	47
21	Microcystines	60	29,75 ³	100
4	Cylindrospermopsines	50	29,75 ³	88
3	Anatoxines	40	29,75 ³	76
2	Saxitoxines	40	29,75 ³	76

¹ inclusief btw, exclusief bezorgkosten, ² bij een uurtarief van 70 euro/uur, ³ bij aanschaf van 20 stuks, ⁴ bij aanschaf van 15 stuks.

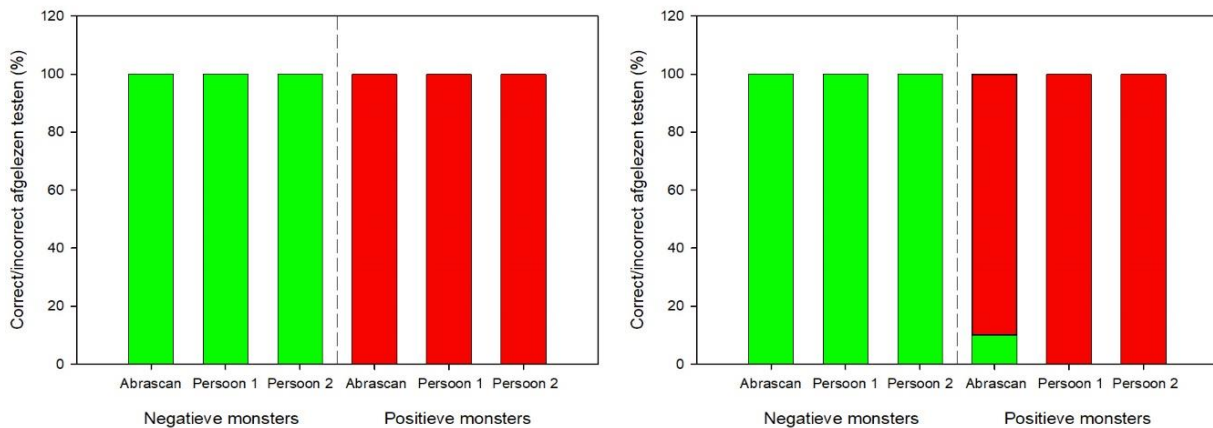


Figuur 11 Flowschema van de verschillende veldtesten.

4.3 Aantoonbaarheid

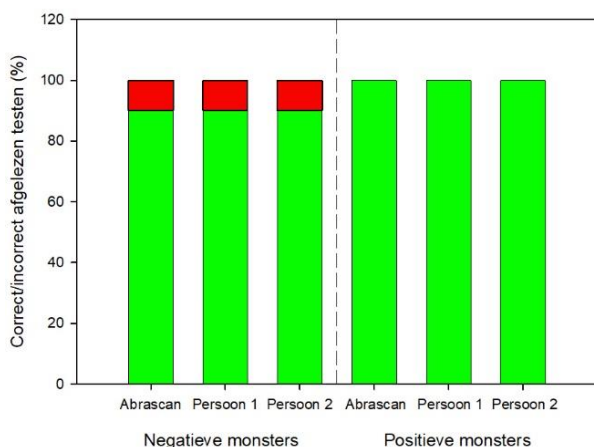
De aantoonbaarheid is bepaald door op drie dagen elk 7 monsters waaraan geen, en dezelfde 7 monsters waaraan wel toxines zijn toegevoegd te meten. Aan sommige monsters waren individuele toxines toegevoegd (bijvoorbeeld alleen MC-LR), andere monsters bevatten een mengsel (bijvoorbeeld MC-LW, dmMC-RR en NOD). De concentratie per toxinegroep was in elk monster 1 µg/l. De monsters bestonden uit wateren van verschillende oorsprong, al dan niet gemengd met niet giftige groen- of blauwalgen.

De twee MC testen van Eurofins/Abraxis (nummers 5 en 21), gaven bij nagenoeg alle geteste monsters, zowel die met als die zonder toxines, een negatief resultaat (Figuur 12). Omdat kon worden uitgesloten dat dit door een fout in bijvoorbeeld het toedienen van de toxines lag (MC test 14 en de MC ELISA's gaven wel een positief resultaat), is halverwege het aantoonbaarheidsexperiment gestopt met deze testen en is contact gezocht met de leverancier. Zij hebben de problemen met deze batch testen onderzocht en naar een oplossing gezocht.



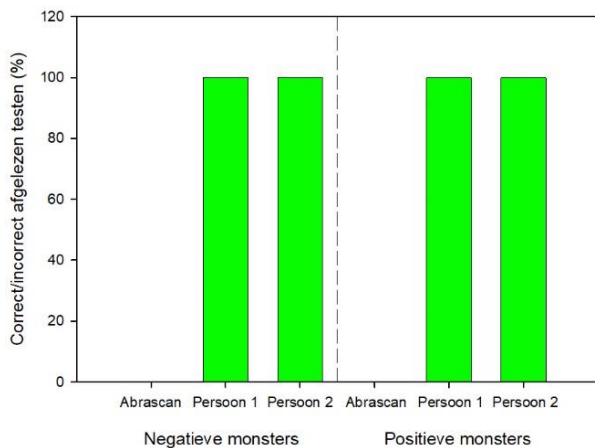
Figuur 12 Aantoonbaarheid van microcystines door test 5 (links) en test 21 (rechts) in het eerste experiment. Groen geeft aan welk deel van de monsters correct is aangetoond, rood geeft het incorrect aangetoonde deel aan.

In januari 2022 is een aantal nieuwe testen (nummer 21) ontvangen waar een kort aantoonbaarheids-experiment mee is uitgevoerd, er zijn 10 monsters zonder en tien monsters met toxines gemeten. De test presteerde deze keer beter: 1 van de 10 negatieve monsters gaf een vals positieve uitslag, en alle positieve monsters gaven een positieve uitslag (Figuur 13).



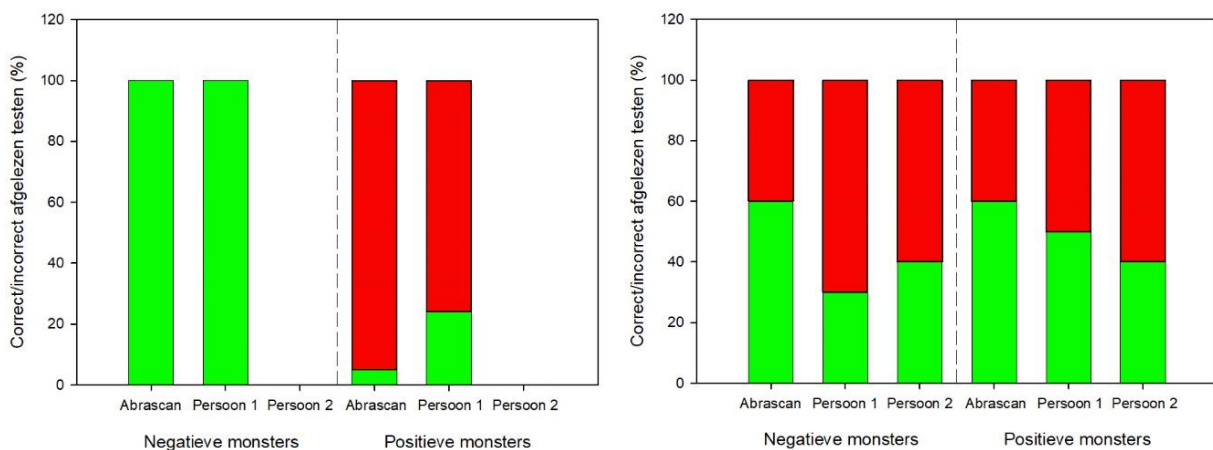
Figuur 13 Aantoonbaarheid van microcystines door test 21 in een tweede, kort experiment. Groen geeft aan welk deel van de monsters correct is aangetoond, rood geeft het incorrect aangetoonde deel aan.

Test 14 gaf volgens beide aflezers negatieve resultaten voor alle monsters waaraan geen MC's waren toegevoegd en positieve resultaten voor alle monsters waarin wel MC's aanwezig waren (Figuur 14).



Figuur 14 Aantoonbaarheid van microcystines door test 14. Groene staven geven aan welk deel van de monsters correct is aangetoond. Deze test kan niet door de Abrascan worden afgelezen.

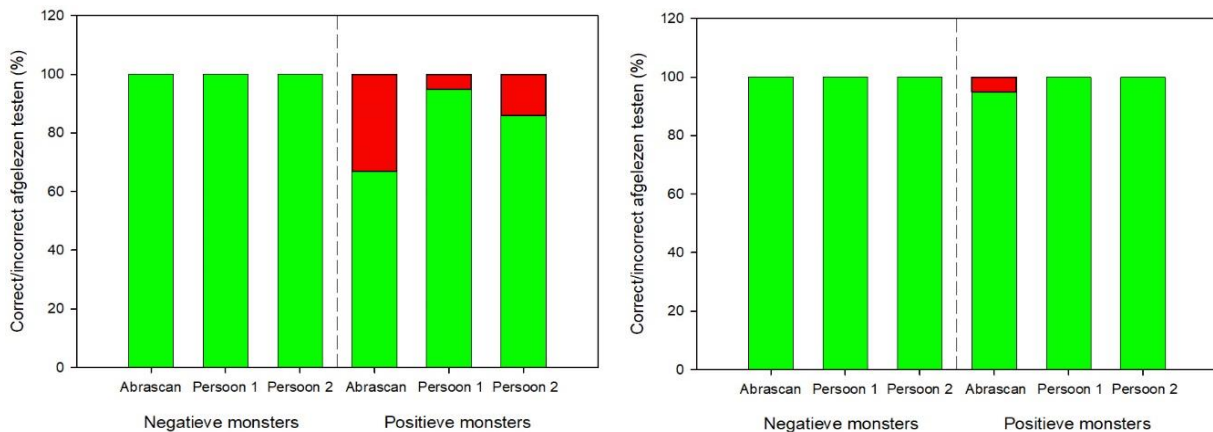
De cylindrospermopsine test gaf vergelijkbare problemen als de twee MC testen van Eurofins/Abraxis (Figuur 15). Ook dit probleem is gemeld bij de leverancier en in januari 2022 is een nieuwe batch ontvangen. Ook met deze batch is een kort aantoonbaarheidsexperiment uitgevoerd met 10 monsters met en 10 monsters zonder toxines. In dit tweede experiment gaf de test zowel veel vals positieve als vals negatieve uitslagen. Ook was er niet altijd overeenkomst in de uitslag van de Abrascan en de twee personen die de testen af hebben gelezen (Figuur 15).



Figuur 15 Aantoonbaarheid van cylindrospermopsines door test 4 in het eerste experiment (links) en in een kort tweede experiment (rechts). Groen geeft aan welk deel van de monsters correct is aangetoond, rood geeft het incorrect aangetoonde deel aan. Deze test is in het eerste experiment slechts door 1 persoon afgelezen.

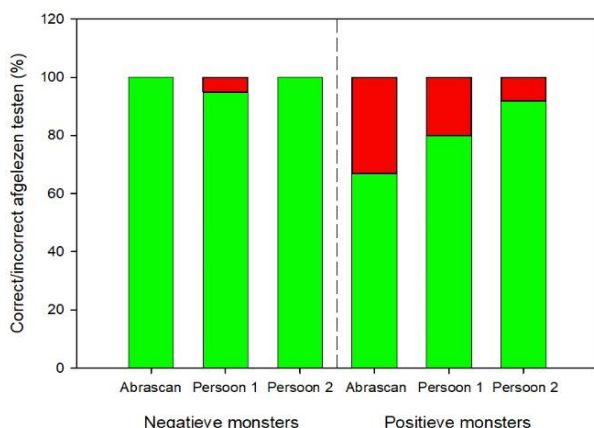
De twee Eurofins/Abraxis testen die geen lyseerstep bevatten (ANA en STX) presteerden beter dan de MC en CYN testen van dezelfde leverancier. De anatoxine test gaf volgens zowel de Abrascan als beide aflezers alle negatieve monsters goed weer (Figuur 16). Niet alle positieve monsters werden als zodanig aangemerkt, waarbij aflezen met het blote oog minder vaak in een vals negatieve uitslag resulteerde dan aflezen met de Abrascan. Na het uitvoeren van het eerste aantoonbaarheidsexperiment, werd duidelijk dat de standaard die

gebruikt is om de monsters te maken, een lagere concentratie had dan de ANA standaard van de labtest. Op dat moment was de standaardvergelijking met een gecertificeerde ANA standaard nog niet uitgevoerd. Er bestond een grote kans dat de monster in plaats van 1 µg/l, een toxineconcentratie bevatten die dicht bij de aantoonbaarheidsgrens van 0,4 µg/l lag. Daarom zijn de positieve monsters waar een negatieve testuitslag op kwam nogmaals gemaakt, nu met een driemaal zo hoge ANA concentratie. Deze monsters gaven allemaal een positief testresultaat. Het enige vals-negatieve resultaat komt van de Abrascaan voor een monster waaraan hANA was toegevoegd (Figuur 16).



Figuur 16 Aantoonbaarheid van anatoxines door test 3. In het linkerpaneel staan de resultaten van het oorspronkelijke experiment, in het rechterpaneel de resultaten waarbij aan sommige positieve monsters op een hogere ANA concentratie zijn gemaakt (zie tekst). Groen geeft aan welk deel van de monsters correct is aangetoond, rood geeft het incorrect aangetoonde deel aan.

Van de 21 negatieve STX monsters werd één monster door één persoon als positief aangemerkt, alle andere resultaten waren negatief (Figuur 17). De positieve monsters gaven een vals negatief percentage variërend tussen de 8% (uitlezer 2) en 33% (Abrascaan). Deze vals negatieve resultaten kwamen voor in de monsters waaraan toxines toegevoegd waren die in de labtesten een lage kruisreactiviteit hadden (paragraaf 5.3) en dus minder goed door het antilichaam herkend werden. Als de veld- en labtest op dezelfde antilichamen zijn gebaseerd, zou dit een logische verklaring voor het verhoogde percentage vals negatieve uitslagen zijn.



Figuur 17 Aantoonbaarheid van saxitoxines door test 2 (rechts). Groen geeft aan welk deel van de monsters correct is aangetoond, rood geeft het incorrect aangetoonde deel aan.

4.4 Effect zoutgehalte

De prestatie van de testen in brak en zout water is aangetoond door gefilterd zeewater in verschillende verhoudingen te mengen met ultrapuur water en daar toxines aan toe te voegen. Voor de ANA test is, vanwege onduidelijkheid over de concentratie van de gebruikte standaard, een hogere concentratie aan de monsters toegevoegd (ca 1,5 µg/l in plaats van 1 µg/l). De test is niet uitgevoerd voor MC test 5, omdat deze tijdens de aantoonbaarheidsexperimenten geen goede resultaten gaf. Voor MC test 21 en CYN test 4 is gebruik gemaakt van de testen die in januari 2022 door WFSR zijn ontvangen.

In de handleiding van MC test 5 staat vermeld dat deze test niet geschikt is voor het meten in brak water, maar dat daarvoor MC test 21 gebruikt moet worden, met een aangepast protocol. In de handleiding van test 21 staat hier echter niks over vermeld, deze test staat beschreven als geschikt voor het meten in drinkwaterbronnen. Het zeewater protocol waarnaar wordt gerefereerd bevat stappen die niet makkelijk in het veld kunnen worden uitgevoerd. Het is daarom onwaarschijnlijk dat dit protocol in het veld gevolgd gaat worden en daarom is het in deze studie niet getest.

Van de twee MC testen die in dit experiment zijn gebruikt, was voor één test (MC 14) niet duidelijk of deze ook geschikt was voor gebruik in zeewater. In alle monsters werd het toegevoegde MC-LR juist aangetoond door deze test. MC test 21 is volgens de normale handleiding uitgevoerd, de test toonde volgens zowel twee onafhankelijke aflezers als de Abrascan MC-LR correct aan in de monsters met 0, 2,5 en 10% zeewater. Het monster met 1% zeewater testte volgens alle drie de uitleesmanieren echter negatief, omdat hogere en lagere zoutconcentraties wel positief testten, is dit als een incidentele fout beschouwd. Bij 100% zeewater was de test volgens één aflezer en de Abrascan positief, maar volgens de tweede aflezer negatief. Omdat de uitslag van deze test niet eenduidig was, wat er op kan duiden dat de test aan zijn limiet zat, is dit resultaat als negatief geïnterpreteerd (Tabel 6).

CYN test 4 is volgens de producent niet geschikt voor zeewater. Deze test gaf positieve resultaten t/m 10% zeewater, het monster met 100% zeewater testte negatief. ANA test 3 is volgens de producent ook niet geschikt voor het testen van zeewater. Deze test gaf positieve resultaten t/m 10% zeewater. Bij het monster dat voor 100% uit zeewater bestond liep het monster niet meer omhoog door de strip, wat resulteerde in een ongeldig testresultaat. STX test 2 zou geschikt moeten zijn voor monsters tot 10% zeewater, in dit experiment testten alle monsters echter positief (Tabel 6). Indien het gebruik van deze test in zeewater wordt overwogen, is het aan te bevelen om eerst te vast te stellen of deze test even gevoelig is in zeewater en zoet water, en of de onderste detectiegrens van 0,2 µg/l gehaald wordt in zeewater.

Alle testen behalve de ANA test gaven een negatief resultaat bij de controlemonsters die bestonden uit 100% zeewater zonder toegevoegde toxines. De ANA test gaf een invalide resultaat omdat deze niet doorliep.

De handleidingen geven in de meeste gevallen een redelijk goede inschatting van de bruikbaarheid van de testen in brak water of zeewater. De meeste testen die volgens de handleiding niet geschikt zijn voor gebruik in zeewater functioneren wel in brak water, maar inderdaad niet in zeewater. De STX test presteerde beter in zeewater dan volgens de handleiding verwacht mocht worden (Tabel 6).

Tabel 6 Aantoonbaarheid in verschillende zeewaterverdunningen bij 1 µg toxine/l (MC, CYN, STX) en ca 1,5 µg/l (ANA).

Nr	Toxingroep	Geschikt voor zeewater? ¹	Zeewater test uitgevoerd?	Hoogste zeewater percentage waarbij testuitslag positief was
5	Microcystines	Nee	Nee	nvt
14	Microcystines	Onbekend	Ja	100%
21	Microcystines	Met alternatief protocol? ²	Ja	10% ³
4	Cylindrospermopsines	Nee	Ja	10%
3	Anatoxines	Nee	Ja	10%
2	Saxitoxines	Tot 10% zeewater	Ja	100%

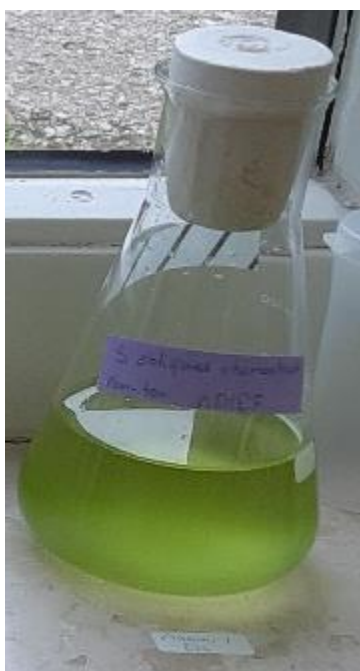
¹ volgens de producent, ² het is onduidelijk of deze test wel of niet aan te passen is voor brak en zout water, zie tekst 3 het monster met 1% zeewater werd door één aflezer als negatief beoordeeld.

4.5 Effect algendichtheid

In water met een dichte algenbloei kunnen veel organische stoffen voorkomen, zowel opgelost in het water als binnen in de algencellen. De kans dat deze stoffen het resultaat van de test verstoren is groter naarmate er meer van aanwezig zijn. Daarom is getest of de testen de toegevoegde toxines correct aan kunnen tonen als er veel algen in het monster aanwezig zijn. Voor dit experiment zijn verschillende volumes van een dichte groenalgcultuur toegevoegd (Figuur 18).

Deze test is uitgevoerd met MC test 14, STX test 2 en ANA test 3. De toegevoegde toxineconcentratie voor deze MC en STX testen was 1 µg/l, de ANA test is uitgevoerd op ca 1,5 µg/l. De testen die niet goed functioneerden in het initiële aantoonbaarheidsexperiment (MC testen 5 en 21 en CYN test 4) zijn niet meegenomen in dit experiment.

Alle drie de gebruikte testen gaven positieve resultaten in alle geteste monsters waar toxines aan waren toegevoegd. Ook gaven ze negatieve resultaten in de monsters die bestonden uit 10% algen zonder toegevoegde toxines. De testen presteerden dus goed in monsters met een verhoogde algendichtheid.



Figuur 18 Groenalgcultuur die gebruikt is voor dit experiment, de maximale algendichtheid in de testmonsters was 10% van deze cultuur.

4.6 Vergelijking met LC-MS/MS

Om de respons van de veldtesten te vergelijken met die van de LC-MS/MS, is een aantal toxineproducerende blauwalgculturen opgewerkt en met beide methodes gemeten. De LC-MS/MS methodes zijn kwantitatief en gevalideerd voor MC's, ANA's en CYN's. Voor STX'en geven ze slechts een indicatieve concentratie weer.

De culturen zijn eerst volgens de binnen WFSR ontwikkelde methodes opgewerkt en gemeten met de LC-MS/MS. Op basis van de berekende concentraties zijn verdunningen gemaakt waarvan de totaal-toxine concentratie binnen het bereik van de veldtesten zou moeten liggen.

Voor MC's zijn twee algenculturen gebruikt, in beide culturen was MC-LR het toxine met de hoogste concentratie (Tabel 7). Voor dit experiment is alleen MC test 14 gebruikt, omdat testen 5 en 21 geen goede resultaten gaven in het aantoonbaarheidsexperiment. De vier verdunningen met een totaal-MC concentratie rond de 1 en 10 µg/l werden alle aangetoond door test 14.

Tabel 7 Aantoonbaarheid van microcystine mengsels afkomstig van blauwalgculturen door MC test 14.

Cultuur	Toxinegroep	Concentratie in cultuur ¹ (µg/l)	Concentratie verdunning 1 (µg/l)	Concentratie verdunning 2 (µg/l)
1	dmMC-LR	84	1,4	0,14
1	MC-LR	420	7,0	0,70
1	MC-LW	31	0,5	0,05
1	MC-LY	20	0,3	0,03
1	MC-LF	40	0,7	0,07
1	Totaal MC's	600	10	1
1	Testresultaat		Aangetoond	Aangetoond
2	dmMC-LR	4	0,8	0,08
2	MC-LR	35	7,5	0,75
2	Totaal MC's	39	8,4	0,8
2	Testresultaat		Aangetoond	Aangetoond

¹ bepaald met LC-MS/MS, gecorrigeerd voor de respons van de MC-LR standaard.

Voor ANA's is een cultuur gebruikt die zowel ANA's als CYN's produceert. Omdat de CYN veldtest niet goed presteerde in het aantoonbaarheidsexperiment, is in dit experiment alleen naar de ANA's gekeken. De ANA concentratie in de cultuur was ongeveer 60 maal zo laag als de hANA concentratie (Tabel 8). De verdunningen met een totaal ANA's concentratie van 1 en 10 µg/l werden beide aangetoond door test 3.

Tabel 8 Aantoonbaarheid van anatoxine mengsels afkomstig van een blauwalgcultuur door ANA test 3.

Toxinegroep	Concentratie in cultuur ¹ (µg/l)	Concentratie verdunning 1 (µg/l)	Concentratie verdunning 2 (µg/l)
ANA	0,7	0,2	0,02
hANA	45	9,9	0,99
Totaal ANA's	46	10	1,0
Testresultaat		Aangetoond	Aangetoond

¹ bepaald met LC-MS/MS, gecorrigeerd voor de respons van de ANA standaard.

NEO was het toxine met de hoogste concentratie in de cultuur gebruikt voor de STX metingen (Tabel 9). De verdunningen met een indicatieve totaal-STX concentratie van 1 en 3 µg/l werden beide aangetoond door test 2.

Tabel 9 Aantoonbaarheid van saxitoxine mengsels afkomstig van een blauwalgcultuur door STX test 2.

Toxinegroep	Indicatieve concentratie in cultuur ¹ (µg/l)	Indicatieve concentratie verdunning 1 (µg/l)	Indicatieve concentratie verdunning 2 (µg/l)
STX	3,3	0,64	0,21
dcSTX	0,2	0,05	0,02
NEO	10,5	2,06	0,69
dcNEO	1,3	0,25	0,08
Totaal STX'en	15,2	3,0	1,0
Testresultaat		Aangetoond	Aangetoond

¹ bepaald met LC-MS/MS.

4.7 Effect aflezer

Tijdens de meeste experimenten zijn de testen door twee personen en, in het geval van de Eurofins/Abraxis testen, de Abrascan, afgelezen. In bijna alle gevallen kwamen de twee personen tot dezelfde resultaten. In het geval waar waarschijnlijk dicht bij de ondergrens van de testen moest worden gemeten (STX toxines met een lage kruisreactiviteit en ANA testen met een lage standaard) was er een kleine variatie tussen de twee personen. De Abrascan gaf in de meeste gevallen dezelfde resultaten als de personen, maar bij de monsters nabij de ondergrens van het bereik gaf de Abrascan vaker een negatieve testuitslag.

De Eurofins/Abraxis testen worden afgelezen door de intensiteit van de test en controlestreep te vergelijken. De Abrascan berekent de intensiteit van beide lijnen en vergelijkt ze, dit zou een objectiever resultaat moeten geven dan waarneming met het blote oog. In praktijk lijkt aflezing van het blote oog in de meeste gevallen dus ook een goed resultaat te geven.

4.8 Overzicht kenmerken en toepasbaarheid veldtesten

In deze studie zijn zes veldtesten geëvalueerd. Van de drie testen voor het bepalen van MC's scoorde één test (nummer 14) goed op alle geteste onderdelen. De test was het goedkoopst en snelst om uit te voeren en gaf voor alle geteste monsters correct aan of er wel of geen toxines aan toegevoegd waren. Ook in zeewater en bij een hoge algendichtheid toonde de test correct aan dat er toxines waren toegevoegd. Deze test is geproduceerd door Salofa Oy. De andere twee MC veldtesten (nummer 5 en 21) zijn geproduceerd door Eurofins/Abraxis. Deze testen vereisen meer handelingen dan test 14, waardoor de doorlooptijd hoger is. Daarnaast zijn de aanschafkosten hoger. Ook zijn de verschillende stappen in het veld lastig uit te voeren doordat er veel verpakkingsmateriaal en kleine onderdelen nodig zijn, dit speelt vooral bij slecht weer. Beide testen konden tijdens de eerste experimenten slecht toxines aantonen en de geëvalueerde batches waren dus ongeschikt voor gebruik. Van test 21 is een door de producent doorontwikkelde batch ontvangen, deze presteerde beter dan de oude batch, maar niet beter dan test 14 (Tabel 10).

De batch CYN veldtesten waar de eerste experimenten mee zijn uitgevoerd had vergelijkbare problemen als MC testen 5 en 21 en was ook ongeschikt voor gebruik. Ook van deze test is een door de producent doorontwikkelde batch ontvangen, deze presteerde in een tweede experiment weer niet goed (Tabel 10). Deze test is op dit moment dus niet geschikt om metingen mee uit te voeren.

Bij zowel de ANA als de STX veldtesten ontbreekt een stap om de algencellen in het veld kapot te maken (lyseren). Deze testen meten dus alleen de in het water opgeloste toxines, waardoor de totale toxineconcentratie in het oppervlaktewater ernstig kan worden onderschat. Zonder lyseerstap zijn deze testen dus niet geschikt voor het gebruik in oppervlaktewater. In monsters waarin alleen opgeloste toxines worden verwacht, zoals in drinkwater, kunnen testen zonder lyseerstap wel worden gebruikt. De ANA test presteert verder goed, alleen bij meer dan 10% zeewater functioneert de test niet meer. De STX veldtest is gevoelig (onderste detectiegrens 0,2 µg/l), maar niet alle monsters waaraan 1 µg toxine/l was toegevoegd zijn correct geïdentificeerd. Dit komt waarschijnlijk door de lage kruisreactiviteit van de in de test gebruikte antilichamen voor sommige toxines uit de STX groep (Tabel 15). Ook voor de ANA en STX testen geldt dat deze door het groot aantal stappen, kleine onderdelen en verpakkingsmaterialen die snel wegwaaien met name bij slecht weer wat lastig uit te voeren zijn in het veld.

Tabel 10 Overzicht van de kenmerken en prestaties van de geëvalueerde veldtesten. Grijs betekent: niet getest. Voor details per kenmerk/prestatie, zie tekst.

Nr	Toxinegroep	Lyseerstap	Bereik (µg/l)	Kosten aanschaf (euro)	Doorlooptijd (min)	Aantoonbaarheid	Zeewater	Algen dichtheid
5	MC's	Ja	1 - 10	29,75	50	slecht		
14	MC's	Ja	1 - 100	12,00	30	goed	100%	goed
21	MC's	Ja	0,5 - 5	29,75	60	slecht/vrij goed	10%	
4	CYN's	Ja	0,5 - 10	29,75	50	slecht	10%	
3	ANA's	Nee	0,4 - 2,5	29,75	40	goed	10%	goed
2	STX'en	Nee	0,2 - 3	29,75	40	vrij goed	100%	goed

Alle testen zijn met het blote oog af te lezen, als de testen door onafhankelijke aflezers werden beoordeeld kwamen zij in het overgrote deel van de monsters op dezelfde resultaten uit. Alle testen van Eurofins/Abraxis (nummers 2 t/m 5 en 21) konden ook met een Abrascan uitgelezen worden, dit ging makkelijk en snel. De Abrascan gaf een iets hoger percentage vals negatieve resultaten dan de aflezers.

Over het algemeen waren de handleidingen duidelijk en makkelijk te volgen. Wel werd het bereik van sommige testen soms onduidelijk aangegeven in de handleidingen.

Bij test 14 wordt in de instructies zowel gesproken van een blauwalgentest als een test op blauwalgtoxines (Figuur 19). De omschrijving van deze test is dus niet helemaal correct en niet eenduidig, wat tot verwarring bij met name minder in blauwalgen gespecialiseerde gebruikers kan veroorzaken.

Blauwalgtest voor het zelftesten op blauwalg

Blauwalg

Anders dan de naam doet denken, is de blauwalg geen alg en vaak niet blauw. Blauwalgen zijn microscopisch kleine bacteriën die altijd overal ter wereld in zoet, brak en zout water voorkomen. Vooral bij warm weer in de zomer ontwikkelt de groenblauwe of roodbruine blauwalg zich snel en kan er een groenige, stinkende sliblaag op het water komen. Mensen en dieren krijgen blauwalg binnen via de mond en oren. Blauwalg zorgt dan voor huidirritaties, hoofd- en oorpijn en maag- en darmproblemen. Huisdieren en kleine kinderen lopen het meest gevaar. Vaak trekken klachten na 2-3 dagen weg. Neem bij twijfel contact op met de huis- of dierenarts.

Hoe werkt het

Blauwalg doet eigenlijk geen kwaad. Het gif dat vrijkomt als de celwand kapotgaat, is de boosdoener. Blauwalg-bacteriën hebben CO₂ nodig en in een dikke sliblaag, sterven de ondersten snel af. Van bovenaf heeft de blauwalg last van Uv-straling, waardoor de wand kapotgaat. Onze blauwalgtest gaat na of het gif-stofje in het water zit. Door het water te verhitten, krijgen wij een beeld van alle gifstoffen die binnenin en buiten de blauwalg zitten. Bij een te hoge concentratie verschijnt een streepje bij de C én de T op de testplaat en binnen 15 minuten is duidelijk of er een blauwalg-probleem is.

UITZETINSTRUCTIE

- Vul de emmer met het (besmette) water (1) en dompel het kokertje voor 15 seconden schuin onder (2).
- Zet nu het met water gevulde kokertje in het gat in de verpakking (3). Hier begint een chemisch proces waarbij het water verhit wordt.
- Laat het kokertje 10 minuten in de verpakking staan (4) en afkoelen.
- Vul het pipetje met wat water uit de koker (5) en laat drie druppels op het kleine gaatje bij de testplaat vallen (6).
- Wacht 8-10 minuten. Staat er een streepje bij de C? Dan is er geen blauwalg. Bij een streepje bij de C én de T is er blauwalg in het water. Verschijnt er helemaal geen streepje, dan is de test mislukt.

BlueGreenTest®

BlueGreenTest® is a rapid test for detection of blue-green algae hepatotoxins in the water.

The test detects the following hepatotoxins:
MC-LR, dm-MC-LR, MC-RR, dm-MC-RR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-YR, MC-WR, MC-LW, Nod-R.

Kit for one or three tests

INSTRUCTIONS FOR USE

Figuur 19 Mogelijk verwarrend gebruik van de termen blauwalg en gifstoffen in de instructies van MC test 14.

Alle geëvalueerde veldtesten kunnen kwalitatief worden gebruikt; de aan- of afwezigheid van toxines kan binnen een bepaald bereik aangetoond worden. Voor de meeste testen kan volgens de producent de toxineconcentratie ook geschat worden, maar hiervoor moeten tegelijk met het watermonster meerdere standaardoplossingen met bekende toxineconcentraties worden gemeten. Dit is een methode die naar verwachting niet vaak in het veld zal worden uitgevoerd, omdat dit omslachtig en relatief duur is.

Het bereik van de meeste testen ligt onder de Nederlandse zwemwaterrichtlijn voor MC's, de Nederlandse veedrenkingsrichtlijn en de door de WHO voorgestelde richtlijnen voor recreatiewater. Dit betekent dat de testen concentraties (ver) onder deze richtlijnen aan kunnen tonen. Mocht het wenselijk zijn om te bepalen of de toxineconcentratie in een monster boven één van deze hogere richtlijnen ligt, dan kan een pragmatische aanpak gekozen worden. Het monster moet dan verdund worden voor de meting. Indien de gebruiker bijvoorbeeld wil weten of de MC concentratie boven de 20 µg/l ligt en de ondergrens van de gebruikte test is 1 µg/l, dan kan ervoor gekozen worden om het watermonster 20 maal te verdunnen. Als de testuitslag positief is, dan is er een grote kans dat de MC concentratie hoger is dan 20 µg/l.

Alle veldtesten zijn ontworpen voor het meten van één toxinegroep (MC's en NOD, CYN's, ANA's en STX'en). Indien op meerde toxines getest moet worden, moeten er dus verschillende testen op hetzelfde monster worden uitgevoerd.

5 Resultaten labtesten

5.1 Vergelijking respons standaarden

De respons van MC-LR, ANA en CYN standaarden van de labtesten zijn vergeleken met gecertificeerde standaarden en de standaarden gebruikt voor het maken van de monsters. De respons van de standaarden van de labtesten varieerde tussen de 86 en 108% van de respons van de gecertificeerde standaarden. Deze afwijking is relatief klein en hiervoor is niet gecorrigeerd in de berekeningen van de resultaten. De standaarden gebruikt voor het maken van de monsters weken meer af (Tabel 11), voor deze afwijking is gecorrigeerd bij het berekenen van de juistheid en reproduceerbaarheid.

Tabel 11 Respons van bij de testen horende standaarden en standaarden gebruikt voor het maken van de monsters ten opzichte van een gecertificeerde standaard.

Toxine	Test	Respons test standaard (%) ¹	Respons standaard voor maken monster (%) ¹
MC-LR	MC 1	108	130
MC-LR	MC 9	97	130
MC-LR	MC 10	89	130
MC-LR	MC 16	86	130
CYN	CYN 8	99	136
ANA	ANA 6	88	52

¹ Gemiddelde van 4 metingen.

5.2 Geselecteerde testen

In totaal zijn er 11 labtesten (ELISA's) gevonden. De meeste testen waren MC testen. MC test 1 leek niet op de andere MC testen en is daarom geselecteerd. Deze test is niet bij de leverancier (Envirologix), maar bij een Duitse tussenpersoon (Aokin) besteld. De MC testen 9, 13 en 20 leken op basis van de handleiding dezelfde test te zijn. Van deze drie testen is er maar één test geselecteerd voor het onderzoek. Uit praktische overwegingen is ervoor gekozen om de door Eurofins/Abraxis geleverde test (nummer 9) te selecteren, bij deze leverancier zijn namelijk nog andere testen gekocht. Daarnaast is test 9 door de Amerikaanse Environmental Protection Agency (EPA) gecertificeerd. Eurofins/Abraxis heeft vier MC ELISA's beschikbaar. Test 9 en 10 verschillen in het gebruikte antilichaam, en zijn daarom beide geselecteerd. Test 16 lijkt op het zelfde antilichaam als test 9 gebaseerd te zijn, maar is gevoeliger en zou volgens de handleiding ook geschikt zijn voor zeewater. Deze test is daarom ook geselecteerd. Test 17 lijkt aangepast voor toepassing in de staat OHIO, maar lijkt op basis van de handleiding erg op test 9. Deze test is niet geselecteerd.

Voor ANA en CYN was elk slechts één ELISA labtest beschikbaar, deze testen worden geproduceerd door Eurofins/Abraxis en zijn beide geselecteerd.

Voor STX'en zijn twee labtesten beschikbaar, één van Creative Diagnostics en één van Eurofins/Abraxis. Beide testen leken op basis van de handleiding echter dezelfde te zijn, dus ook hier is uit praktische overwegingen alleen die van Eurofins/Abraxis geselecteerd (Tabel 12).

Alle geselecteerde testen waren leverbaar. De testen die bij Eurofins/Abraxis waren besteld werden binnen enkele weken geleverd, MC test 1 had een langere levertijd door vertragingen bij de leverancier.

Tabel 12 *Gevonden en voor dit onderzoek geselecteerde labtesten.*

Nr	Toxinegroep	Producent	Omschrijving	Geselecteerd
20	Microcystines	Creative Diagnostics	MC ADDA ELISA	Nee
13	Microcystines	Enzo Life Sciences	MC ADDA ELISA	Nee
1	Microcystines	Envirologix	Quantiplate kit for microcystins	Ja
9	Microcystines	Eurofins/Abraxis	MC ADDA ELISA	Ja
10	Microcystines	Eurofins/Abraxis	MC Monoclonal ELISA	Ja
16	Microcystines	Eurofins/Abraxis	MC ADDA ELISA SAES	Ja
17	Microcystines	Eurofins/Abraxis	MC ADDA ELISA OH	Nee
8	Cylindrospermopsines	Eurofins/Abraxis	CYN ELISA	Ja
6	Anatoxines	Eurofins/Abraxis	ANA ELISA	Ja
18	Saxitoxines	Creative Diagnostics	STX ELISA	Nee
12	Saxitoxines	Eurofins/Abraxis	STX ELISA	Ja

Het concentratiebereik van de testen is in deze studie gedefinieerd door de concentratie van de meegeleverde standaarden. Hierbij is er aangenomen dat deze standaarden het bereik vertegenwoordigen waarbinnen de test (semi)kwantitatief is, dus waarbinnen een goede schatting van de toxineconcentratie gegeven kan worden. De Eurofins/Abraxis testen hebben volgens de producent een iets lagere detectiegrens dan de onderste meegeleverde standaard. Op deze detectiegrens kan een toxine wel aangetoond worden, maar kan de concentratie niet worden geschat. Omdat er geen standaarden op het niveau van de onderste detectiegrens waren meegeleverd met de kit, kon dit niet geverifieerd worden en zijn in Tabel 13 de concentraties van de standaarden als bereik gehanteerd.

De meeste geselecteerde testen hadden een meetbereik rondom een toxineconcentratie van 1 µg/l, de STX test was gevoeliger met een maximale concentratie van 0,4 µg/l (Tabel 13).

Voor het uitvoeren van de labtesten moeten de algencellen kapot gemaakt worden (lyseren) zodat de toxines uit de cellen in oplossing komen en gemeten kunnen worden. Een eenvoudige manier, die ook in de handleiding van de testen beschreven staat, is het driemaal bevriezen en ontdooien van het monster. De Eurofins/Abraxis MC testen (9, 10 en 16) hebben daarnaast nog als optie om een chemische lyseerstep (QuikLyse) uit te voeren in plaats van driemaal in te vriezen en ontdooien (Tabel 13).

Drie testen (MC test 16 en de ANA en STX test) zijn volgens de producent geschikt voor het meten in zeewater. Van test 1 is dit niet bekend. In de overige drie testen (MC testen 9 en 10 en de CYN test) kan tot 2,5 of 20% zeewater gemeten worden, of kan een aangepast zeewaterprotocol gevolgd worden.

Tabel 13 *Voor dit onderzoek geselecteerde labtesten met enkele kenmerken.*

Nr	Toxinegroep	Concentratie bereik ¹ (µg/l)	QuikLyse?	Geschikt voor zeewater? ²	Aanschaf prijs ³ (euro)	Prijs per monster ⁴ (euro)	Prijs per monster ⁵ (euro)
1	MC's	0,2 – 2	Nee	Onbekend	465	26	79
9	MC's	0,15 – 5	Optioneel	Tot 2,5% of ⁶	535	29	90
10	MC's	0,15 – 5	Optioneel	Tot 20% of ⁶	510	29	88
16	MC's	0,05 – 5	Optioneel	Ja	575	30	93
8	CYN's	0,05 – 2	Nee	Tot 20% of ⁶	535	30	90
6	ANA's	0,15 – 5	Nee	Ja	595	31	95
12	STX'en	0,02 – 0,4	Nee	Ja ⁶	535	29	90

¹ op basis van de bij de test geleverde standaarden, ² volgens opgave producent, ³ inclusief btw, exclusief bezorgkosten, ⁴ verkennende serie,

⁵ (semi)kwantitatieve serie, ⁶ met aangepast protocol.

De labtesten zijn binnen enkele uren uit te voeren (Bijlage 1) hiervoor is geschoold personeel nodig. De prijzen van de testen variëren van 465 euro (MC test 1) tot 595 euro (ANA). De kosten van de analyse per monster zijn geschat op basis van de aanschafprijs van de test en de benodigde manuren. Overige kosten zijn in deze prijs niet meegerekend. Er is hierbij aangenomen dat één persoon 1 werkdag bezig is met de

monsters voor te bewerken, de test uit te voeren en de data te verwerken. Daarnaast is aangenomen dat deze persoon 80 euro per uur kost. In het verkennende scenario is elk monster in tweevoud gemeten, zoals aangegeven in het protocol. Afhankelijk van hoeveel standaarden er bij de test zitten, kunnen er per testplaat dan 39 tot 43 monsters worden gemeten. De kosten per monster liggen dan tussen de 26 en 31 euro (Tabel 13). In dit scenario is de kans echter groot dat de toxineconcentratie in sommige monsters buiten het vrij beperkte bereik van de testen ligt. Mocht het belangrijk zijn om de concentratie in het monster in te kunnen schatten, dan kan per monster een aantal verdunningen ingezet worden, of kunnen monsters uit de verkennende serie verdund worden en opnieuw worden gemeten. In het geval van een (semi)kwantitatieve serie kunnen er ongeveer 13 monsters per plaat geanalyseerd worden, wat resulteert in kosten tussen de 79 en 95 euro per monster (Tabel 13).

5.3 Kruisreactiviteit

De kruisreactiviteit is bepaald door de respons van het toxine waar de test op gebaseerd is (bijvoorbeeld MC-LR voor de MC testen) te vergelijken met de respons van andere toxines uit dezelfde groep (in dit voorbeeld: andere MC's en NOD). Bij een kruisreactiviteit van 100% geeft een toxine hetzelfde signaal als het toxine waar de test op is gebaseerd. Bij een lagere kruisreactiviteit is de test minder gevoelig voor dit toxine en is het signaal dus lager. Bij een hogere kruisreactiviteit is de test gevoeliger voor het andere toxine dan voor het toxine waar de test op is gebaseerd. De kruisreactiviteit van de individuele toxines kan gebruikt worden om te voorspellen hoe de testen reageren op toxinemengsels. Als een monster bijvoorbeeld voornamelijk toxines bevat met een lage kruisreactiviteit zal de test waarschijnlijk een lager resultaat geven dan op basis van de concentraties verwacht zou worden.

Bij het bepalen van de kruisreactiviteit wordt de relatieve respons van de testen op verschillende standaarden bepaald. Van een groot aantal standaarden (dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dmMC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW, NOD, 7-epi-CYN, 7-deoxy-CYN en hANA) is de exacte concentratie niet bekend (paragraaf 3.2). De berekende kruisreactiviteiten moeten daarom als indicatief beschouwd worden.

In test 1 hebben de toxines waar het aminozuur arginine in voorkomt (dit wordt aangeduid met een R in de naam van de MC's, NOD bevat ook arginine) een kruisreactiviteit van 72% of hoger, toxines zonder arginine (MC-LW, MC-LF, MC-LA en MC-LY) hebben een kruisreactiviteit van 24% of lager. Test 9 en 16 zijn waarschijnlijk op hetzelfde antilichaam gebaseerd. Dit is terug te zien in de kruisreactiviteit, deze vertoont grofweg een vergelijkbaar patroon tussen de beide testen, waarbij de kruisreactiviteit van test 16 meer afwijkt van de 100% dan bij test 9. Test 10 is op een ander antilichaam gebaseerd dan test 9 en 16 en geeft dus ook andere kruisreactiviteiten. Van de 4 MC testen ligt de gemiddelde kruisreactiviteit van de individuele toxines voor test 10 het dichtst bij 100% (Tabel 14).

Tabel 14 (Indicatieve) Kruisreactiviteit (%) van MC's en NOD ten opzichte van MC-LR in de MC labtesten.

test	MC-RR	MC-LW	MC-LF	MC-YR	MC-LA	MC-LY	dmMC-RR	dmMC-LR	NOD
1	147	24	11	99	7	7	72	154	154
9	64	111	76	61	108	76	71	143	103
10	80	121	125	96	159	77	62	135	115
16	38	110	41	34	75	38	74	179	69

De CYN labtest had een indicatieve kruisreactiviteit van 60% voor 7-epi-CYN en 76% voor 7-deoxy-CYN. Deze test lijkt het meest gevoelig voor het toxine waarop de test is gebaseerd (CYN).

De ANA labtest had een indicatieve kruisreactiviteit van 128% voor hANA. Deze test herkent beide anatoxine varianten dus nagenoeg even goed.

De STX test had hoge kruisreactiviteit voor GTX 2/3, GTX 5 en dcSTX. dcSTX is een van de meest giftige saxitoxines, GTX 2,3 en 5 zijn minder giftig (Tabel 15). De twee andere toxines met een relatief hoge

toxiciteit (NEO en GTX 1) hebben minder dan 20% kruisreactiviteit. Dit geldt ook voor een aantal minder toxische saxitoxines. De kruisreactiviteit van de test is dus niet gerelateerd aan de toxiciteit van de verschillende saxitoxines. Van deze test wordt verwacht dat deze bepaalde saxitoxine mengsels slechter aan kan tonen dan andere.

Tabel 15 Kruisreactiviteit en de relatieve toxiciteit van STX varianten ten opzichte van STX.

	NEO	dcNEO	GTX 1/4	GTX 2/3	dcGTX 2/3	C 1/2	GTX5	dcSTX
Kruisreactiviteit test 12 (%)	< 20	< 20	< 20	130	< 20	< 20	130	90
Relatieve toxiciteit (-)[4]	1	0,4	1 / 0,7	0,4 / 0,6	0,2 / 0,3	- / 0,1	0,1	1

5.4 Aantoonbaarheid, juistheid, reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid

De aantoonbaarheid is bepaald door 21 monsters zonder toegevoegde toxines en 21 monsters met toegevoegde toxines te meten. Aan de monsters zijn individuele toxines of mengsels van toxines toegevoegd. Voor de berekening van de juistheid en reproduceerbaarheid is het nodig om de exacte concentratie van alle standaarden te kennen. Omdat dit voor de MC, ANA en CYN testen niet het geval is, moeten de berekende juistheid en reproduceerbaarheid voor deze testen als indicatief worden beschouwd. Om de gevonden waarden voor de prestatiekenmerken in perspectief te plaatsen, zijn ook de eisen die aan instrumentele analyses, zoals LC-MS/MS analyses, worden gesteld genoemd. Afhankelijk van de techniek en de te analyseren stof zijn hier verschillende richtlijnen voor. Voor blauwalgtoxines gelden geen specifieke voorschriften. De in deze paragraaf genoemde waarden zijn afkomstig uit de richtlijnen voor methodes voor pesticide analyse in voedsel en diervoeder. Deze richtlijnen zijn relatief ruim ten opzichte van sommige andere stoffen [5].

De MC testen hadden weinig vals negatieve resultaten, alleen test 1 en 16 gaven voor 1 van de 21 monsters een vals negatief resultaat. Test 10 was de enige MC test die vals positieve resultaten gaf, namelijk bij 7 van de 21 monsters (33%, Tabel 16). De gevonden concentraties in deze monsters varieerden van net boven de detectiegrens (0,15 µg/l) tot 1 µg/l. Ter vergelijking: bij het valideren van instrumentele analytische methodes, zoals LC-MS/MS, wordt vaak aangehouden dat maximaal 1 van de 21 geteste monsters vals positief of vals negatief mag testen.

De indicatieve juistheid (de mate voor het correct inschatten van de toegevoegde toxineconcentratie) was goed voor testen 1 en 10. Testen 9 en 16 schatten de toxineconcentratie gemiddeld te hoog in. Hoewel deze juistheden indicatief zijn door het ontbreken van zekerheid over de concentratie van sommige gebruikte standaarden, valt wel op dat er flinke verschillen zitten tussen de vier MC labtesten. Zo geeft test 16 gemiddeld genomen een ruim tweemaal zo hoge concentratie als test 1. Voor instrumentele methodes wordt een juistheidinterval van 60-120% geaccepteerd voor monsters met een lage concentratie [5].

De herhaalbaarheid (de spreiding in resultaten wanneer hetzelfde monster in meervoud wordt opgewerkt en gemeten) was goed voor testen 1 en 9, en acceptabel voor testen 10 en 16. De spreiding in de resultaten als 21 verschillende monsters worden gemeten (reproduceerbaarheid) was ook acceptabel voor de MC testen, test 10 presteerde het best met een indicatieve reproduceerbaarheid van 30%. Voor pesticide analyses op lage concentraties wordt 30% als bovengrens voor de reproduceerbaarheid gebruikt [5]. Test 16 had een slechte indicatieve reproduceerbaarheid (48%, Tabel 16).

Tabel 16 Aantoonbaarheid, (indicatieve) juistheid, herhaalbaarheid en (indicatieve) reproduceerbaarheid van de labtesten op een toxineconcentratie van 1 µg/l (MC's, CYN, ANA) of 0,1 µg/l (STX). RSD is relatieve standaarddeviatie.

Test	Vals negatief (%)	Vals positief (%)	Juistheid (%)	Herhaalbaarheid in water (RSD, %)	Herhaalbaarheid in water met alg (RSD, %)	Reproduceerbaarheid (RSD, %)
MC 1	5	0	93	10	8	39
MC 9	0	0	151	13	9	34
MC 10	0	33	91	8	21	30
MC 16	5	0	212	22	23	48
CYN 8	0	76	57	14	9	31
ANA 6	0	0	104	4	5	30
STX 12	43	0	66	4	6	55

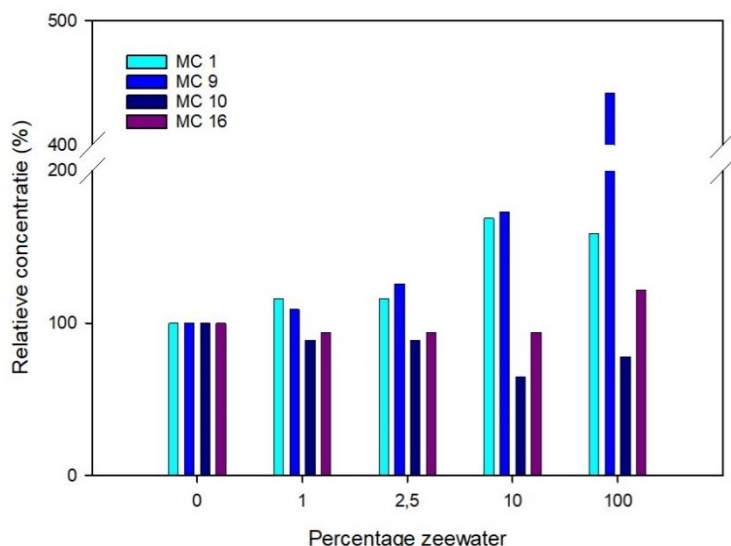
De CYN test gaf geen vals negatieve resultaten. Wel gaf deze test voor 16 van de 21 monsters (76%) een vals positief resultaat, waarbij de concentratie van 15 monsters tussen de laagste en tweede standaard lag. Voor deze test lijkt het dus beter om de detectiegrens te verhogen van 0,05 naar 0,10 µg/l. In dat geval zou de test slechts 1 vals positief resultaat hebben gegeven. De concentraties in de monsters worden gemiddeld te laag ingeschat, op 57% van de toegevoegde concentratie. Dit is grotendeels te verklaren door de lagere kruisreactiviteit van de test voor 7-epiCYN en 7-deoxyCYN (paragraaf 5.3). De indicatieve reproduceerbaarheid van deze test is acceptabel (Tabel 16).

De ANA test had alle negatieve en positieve monsters correct geïdentificeerd. De indicatieve juistheid van deze test was ook goed met 104%. Ook de herhaalbaarheid was goed, en de indicatieve reproduceerbaarheid was acceptabel (Tabel 16).

De STX test gaf voor 9 van de 21 monsters een vals negatief resultaat. Dit waren de monsters waaraan (mengsels van) toxines toegevoegd waren waarvoor de test een lage kruisreactiviteit heeft (Tabel 15). Door deze lage kruisreactiviteit voor sommige toxines was de juistheid ook vrij laag (66%, Tabel 16). Door het verschil in kruisreactiviteit vertoonde de test ook veel spreiding als er verschillende monsters met verschillende toxinemengsels gemeten werden, de reproduceerbaarheid was slecht (55%). Herhaaldelijk opwerken en meten van hetzelfde monsters resulteerde juist in zeer weinig spreiding, de herhaalbaarheid was goed (Tabel 16).

5.5 Effect zoutgehalte

De MC testen reageerden verschillend op hoge percentages zeewater. Bij 1 en 2,5% zeewater was de gemeten MC-LR concentratie voor alle testen ongeveer gelijk aan de meting in zoet water (0% zeewater in Figuur 20). Testen 1 en 9 gaven vanaf 10% zeewater een verhoogd signaal, terwijl het signaal van test 10 juist daalde. Test 16 gaf nagenoeg hetzelfde signaal in zoetwater en zeewater. Van test 1 is niet in de handleiding aangegeven of deze in zeewater gebruikt kan worden. Test 9 kan volgens de handleiding tot 2,5% zeewater gebruikt worden, daarboven moet een alternatief protocol gebruikt worden. Test 10 is volgens de handleiding te gebruiken tot 20% zeewater, daarboven moet ook een alternatief protocol worden toegepast. Test 16 is volgens de handleiding geschikt voor zeewater. Het alternatieve protocol dat voor testen 9 en 10 wordt beschreven lijkt vrij bewerkelijk om uit te voeren en is niet getest in deze studie.

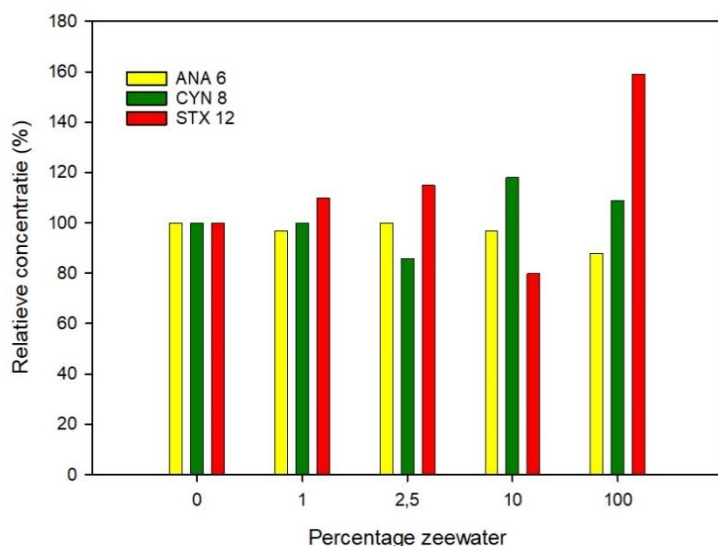


Figuur 20 Respons van de MC labtesten op een toenemend percentage zeewater. De gemeten concentraties zijn uitgedrukt ten opzichte van het monster met 0% zeewater. Alle monsters zijn in enkelvoud gemeten.

De ANA test is volgens de handleiding bruikbaar in 100% zeewater. Dit komt overeen met de resultaten in Figuur 21, de test gaf een vergelijkbare respons bij alle geteste percentages zeewater.

De respons van de CYN test was variabel, maar vertoonde geen duidelijke trend met het percentage zeewater. Volgens de producent kan deze test gebruikt worden tot 20% zeewater, anders moet er een alternatief protocol worden gebruikt.

De STX test gaf een redelijk constante respons in de monsters met 0, 1, 2,5 en 10% zeewater. Bij 100% zeewater nam de respons toe (Figuur 21). Het is niet bekend tot welk percentage zeewater deze test bruikbaar is, wel geeft de producent aan dat voor zeewater een alternatief protocol gebruikt moet worden.

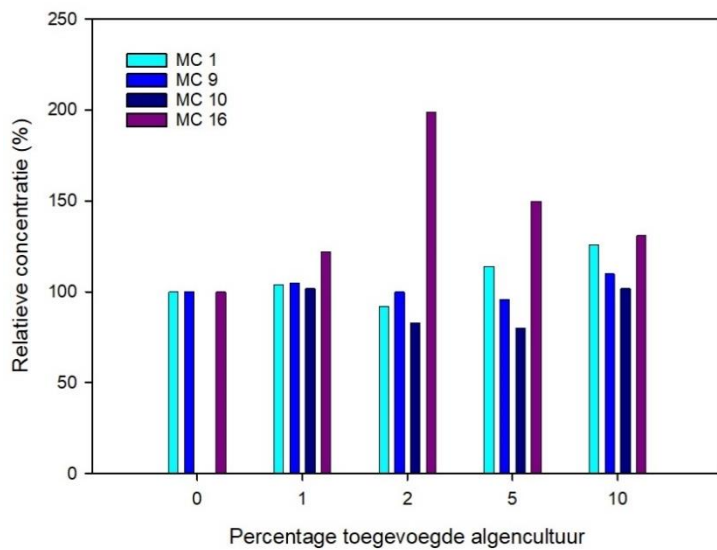


Figuur 21 Respons van de ANA, CYN en STX labtesten op een toenemend percentage zeewater. De gemeten concentraties zijn uitgedrukt ten opzichte van het monster met 0% zeewater. Alle monsters zijn in enkelvoud gemeten.

Dit experiment is bedoeld om een grove indicatie te geven hoe de testen presteren in brak en zout water. Om een meer gedetailleerd beeld te krijgen moeten er kleinere stappen tussen de verschillende zeewaterverduunningen worden getest, en moet elk monster minimaal in drievoud worden gemeten, zodat verschillen statistisch kunnen worden getoetst.

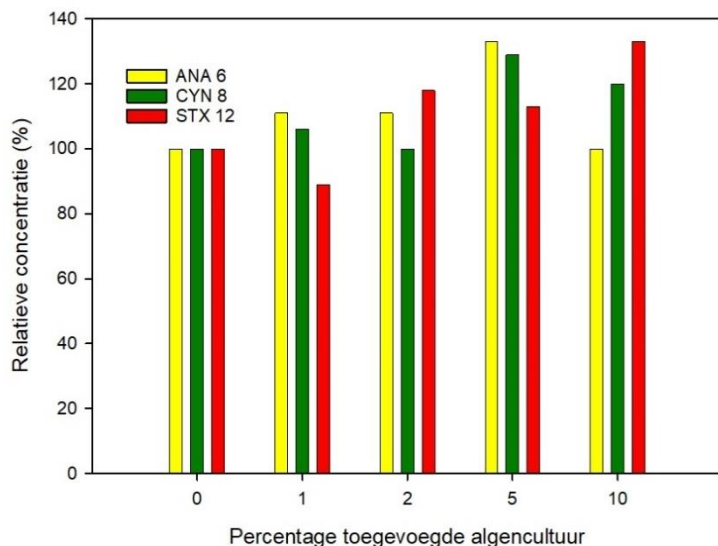
5.6 Effect algendichtheid

De MC testen 1, 9 en 10 leken hetzelfde te presteren in monsters met en zonder toegevoegde groenalgen (Figuur 22). Ook test 16 vertoonde geen duidelijke trend, wel was er erg veel variatie in de gemeten concentraties, dit was echter niet gecorreleerd aan de hoeveelheid toegevoegde algen en leek dus ergens anders door veroorzaakt te worden.



Figuur 22 Respons van de MC labtesten op een toenemend percentage toegevoegde groenalgencultuur. De gemeten concentraties zijn uitgedrukt ten opzichte van het monster zonder algen. Alle monsters zijn in enkelvoud gemeten. Test 10 gaf een afwijkende respons bij 0% alg, voor deze test is de respons van water met 0% zout als referentie gebruikt (paragraaf 5.5).

Net als bij de MC testen, leken ook de ANA, CYN en STX testen vergelijkbaar te presteren voor monsters met en zonder toegevoegde algen (Figuur 23).



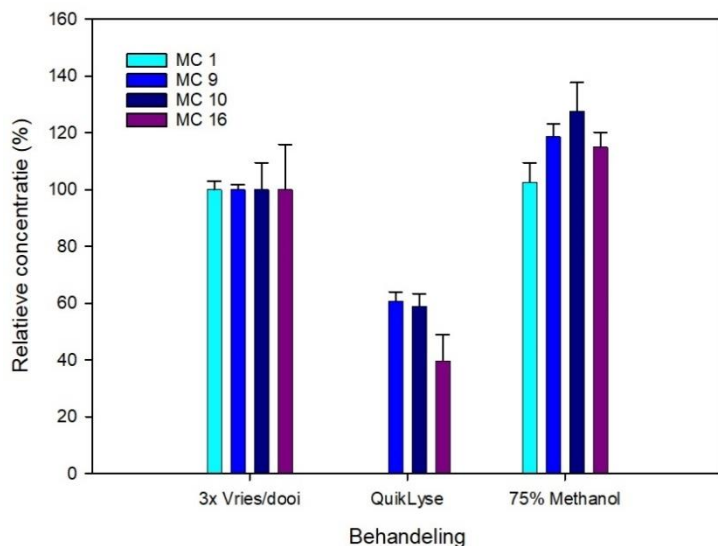
Figuur 23 Respons van de ANA, CYN en STX labtesten op een toenemend percentage toegevoegde groenalgencultuur. De gemeten concentraties zijn uitgedrukt ten opzichte van het monster zonder algen. Alle monsters zijn in enkelvoud gemeten.

5.7 Extractie efficiëntie

De standaard extractiemethode voor de MC testen is driemaal bevriezen en ontdooien van het monster. Daarnaast is voor testen 9, 10 en 16 een chemische lyseermethode (QuikLyse) beschreven. Het effect van beide extractiemethodes is getest tegen een versimpelde extractiemethode die voor de bij WFSR gebruikte LC-MS/MS analyse wordt toegepast. In deze versimpelde extractie zijn de monsters met 75% methanol geëxtraheerd bij 60 °C.

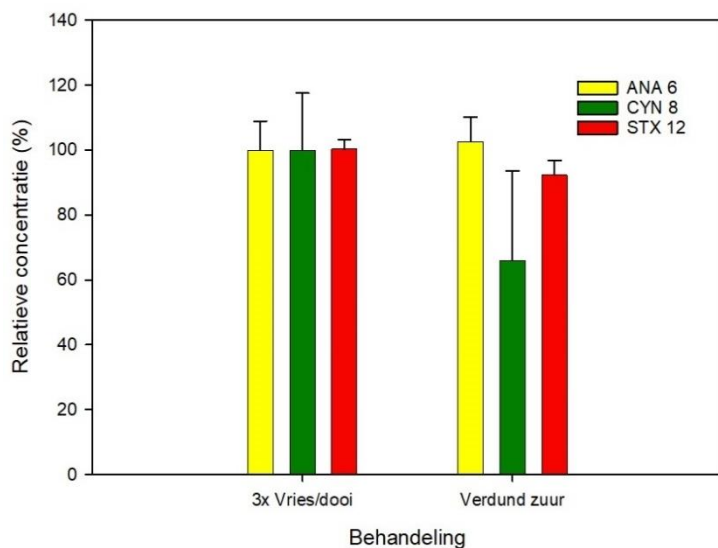
De QuikLyse extractie geeft voor de testen 9, 10 en 16 een lagere respons dan extractie door middel van driemaal vriezen en ontdooien (t-test, $p < 0,001$, $n = 9$). Gemiddeld is de respons van de QuikLyse extractie 53% van de respons van driemaal vries-dooien. De vereenvoudigde 75% methanol extractie heeft een wat hogere opbrengst dan de vries-dooi methode (116%, t-test, $p < 0,001$, $n=12$, Figuur 24).

De eenvoudig uit te voeren vries-dooi methode geeft een lagere opbrengst dan de extractie met 75% methanol. Een nadeel van de methanol methode is echter dat de extracten voor analyse sterk doorverdund moeten worden, omdat de testen niet om kunnen gaan met hoge percentages methanol. De QuikLyse extractie geeft een duidelijk lagere opbrengst dan de twee andere methodes en is daarom niet aan te bevelen.



Figuur 24 Effect van verschillende extractiemethodes op de respons van de MC labtesten. De gemeten concentraties zijn uitgedrukt ten opzichte van driemaal vries/dooien. Error bars geven standaarddeviaties van het gemiddelde aan, $n=3$. De QuikLyse methode is niet uitgevoerd voor test 1.

Voor de ANA, CYN en STX testen is driemaal vries/dooien vergeleken met een extractiemethode in verdund zuur bij 90 °C. Voor alle drie de testen was er geen verschil tussen beide extractiemethodes (t-testen, $p < 0,05$, $n=3$, Figuur 25). De CYN test gaf in 1 van de 3 replica's voor de verdund zuur methode een afwijkende waarde (34%, de andere twee waarden waren 82%).



Figuur 25 Effect van verschillende extractiemethodes op de respons van de ANA, CYN en STX labtesten. De gemeten concentraties zijn uitgedrukt ten opzichte van driemaal vries/dooien. Error bars geven standaarddeviaties van het gemiddelde aan, $n=3$.

Ook voor de ANA, CYN en STX testen voldoet de in de handleidingen beschreven vries-dooi methode. Extractie met verdund zuur geeft ook een goede opbrengst, maar het extractiemiddel is te zuur voor sommige testen, waardoor verdunning voorafgaand aan de analyse nodig is.

5.8 Vergelijking met LC-MS/MS

Twee extracten van blauwalgculturen zijn verdund tot een totaal MC concentratie van ca 0,1, 1 en 10 µg/l en gemeten met de vier MC labtesten. Cultuur 1 produceert voornamelijk MC-LR en kleinere hoeveelheden dmMC-LR, MC-LW, MC-LY en MC-LF. Cultuur 2 produceert MC-LR en een kleinere hoeveelheid dmMC-LR (Tabel 7).

De verdunningen met de hoogste concentraties liggen boven het bereik van de labtesten, dit was ook verwacht op basis van de LC-MS/MS resultaten. De verdunning met een totaal MC concentratie van ongeveer 1 µg/l valt binnen het bereik van de testen. De uitkomst van de labtesten is structureel lager dan die van de LC-MS/MS (51-94%, Tabel 17). Test 16 geeft in beide monsters de hoogste concentratie, test 1 geeft de laagste concentraties. Dit komt overeen met de juistheid (Tabel 16), ook in dat experiment gaf test 16 gemiddeld genomen de hoogste concentraties en test 1 de laagste. Test 16 geeft een positief resultaat voor het meest verdunde monster (totaal MC concentratie ca 0,1 µg/l), deze test is met een ondergrens van 0,05 µg/l gevoeliger dan de andere drie labtesten. Test 10 geeft voor het meeste verdunde monster van cultuur 2 ook een positief resultaat, terwijl de geschatte concentratie in dat monster onder de detectiegrens van deze test ligt. In het aantoonbaarheidsexperiment gaf test 10 vaak vals positieve uitslagen (Tabel 16), dat lijkt ook in dit experiment te zijn gebeurd.

Tabel 17 Vergelijking van de respons van de LC-MS/MS en de MC labtesten bij het meten van verdunningen van twee verschillende blauwalgextracten.

Cultuur	Analyse techniek	Concentratie verdunning 1 (µg/l)	Concentratie verdunning 2 (µg/l)	Concentratie verdunning 3 (µg/l)
1	LC-MS/MS ¹	10	1,0	0,10
1	Labtest MC 1	> 2	0,55	< 0,2
1	Labtest MC 9	> 5	0,86	< 0,15
1	Labtest MC 10	> 5	0,80	< 0,15
1	Labtest MC 16	> 5	0,92	0,06
2	LC-MS/MS ¹	8,4	0,84	0,08
2	Labtest MC 1	> 2	0,43	< 0,2
2	Labtest MC 9	> 5	0,57	< 0,15
2	Labtest MC 10	> 5	0,54	0,35
2	Labtest MC 16	> 5	0,70	0,06

¹ gecorrigeerd voor de respons van de MC-LR standaard.

De cultuur die gebruikt is voor het bepalen van de CYN's en ANA's heeft een CYN's profiel dat voor 71% uit 7-epi-CYN bestaat, 28% uit CYN en 1% uit 7-deoxy-CYN. De labtest geeft correct aan dat het minst verdunde monster boven het bereik van de test ligt. De verdunning met een totaal CYN concentratie van ca. 0,9 µg/l wordt hoger ingeschat door de labtest (1,9 µg/l). Het meest verdunde monster valt ook binnen het bereik van de test, maar voor dit monster is de overschatting nog groter (Tabel 18).

Dezelfde blauwalg produceert ook ANA's, waarbij hANA het meest voorkomende toxine is, het toxineprofiel bestaat uit 98% hANA en 2% ANA. De ANA labtest geeft conform de verwachting aan dat de meest en minst verdunde monsters buiten het testbereik liggen. De concentratie van het middelste monster wordt vergelijkbaar ingeschat door de LC-MS/MS (1,0 µg/l) en de labtest (1,3 µg/l, Tabel 18).

Ondanks dat NEO de meest voorkomende variant was in de cultuur gebruikt voor de STX labtest en dit toxine een lage kruisreactiviteit heeft (Tabel 15), komen de schattingen van de LC-MS/MS en de STX labtest erg goed overeen. De hoogste en laagste verdunningen liggen zoals verwacht buiten het bereik van de test, en de concentratie van het middelste monster wordt door beide technieken gelijk ingeschat op 0,1 µg/l (Tabel 18).

Tabel 18 Vergelijking van de respons van de LC-MS/MS en de CYN, ANA en STX labtesten bij het meten van verdunningen van twee verschillende blauwalgextracten.

Cultuur	Toxine	Analyse techniek	Concentratie verdunning 1 (µg/l)	Concentratie verdunning 2 (µg/l)	Concentratie verdunning 3 (µg/l)
3	CYN's	LC-MS/MS ¹	9,1	0,9	0,09
3	CYN's	Labtest CYN 8	> 2	1,9	0,28
3	ANA's	LC-MS/MS ²	10	1	0,1
3	ANA's	Labtest ANA 6	> 5	1,3	< 0,15
4	STX'en	LC-MS/MS ³	1,0	0,1	0,01
4	STX'en	Labtest STX 12	> 0,4	0,1	< 0,02

¹ gecorrigeerd voor de respons van de CYN standaard, ² gecorrigeerd voor de respons van de ANA standaard, ³ geschatte concentratie.

5.9 Overzicht kenmerken en toepasbaarheid labtesten

In deze studie zijn zeven labtesten geëvalueerd. De testen waren binnen enkele weken leverbaar, één van de testen had eenmalig een langere levertijd door problemen bij de leverancier. Voor MC's zijn er meerdere labtesten op de markt, voor ANA's, CYN's en STX'en is elk slechts één test beschikbaar.

De testen zijn vergelijkbaar qua aanschafprijs (465-595 euro) en zijn alle binnen enkele uren uit te voeren. De meeste testen zijn vrij gevoelig, het testbereik ligt onder de meeste richtlijnen, zoals de MC richtlijn voor zwemwater, de WHO normen voor recreatie water en de Nederlandse veedrenkingsrichtlijn. Om hogere concentraties juist in te kunnen schatten met deze testen zullen de monsters voorafgaand aan de analyse verdund moeten worden. De testen kunnen gebruikt worden om te verkennen in welke monsters veel of weinig toxines zitten. De kosten liggen dan rond de 30 euro per monster. Als de concentratie in de monsters gerichter bepaald moet worden, zullen vaak verdunningen gemeten moeten worden. Hierdoor gaat de kostprijs omhoog naar ca 90 euro per monster. Als monstervoorbewerking voldoet het driemaal bevroren en ontdooien van het monster, maar meer gespecialiseerde extractiemethoden kunnen ook worden toegepast. De doorlooptijd van een serie van 30 monsters (van aankomst op het lab tot rapportage) wordt voor deze testen geschat op 1 werkdag.

In de handleidingen van de labtesten wordt gemeld dat de test als screeningsmethode moet worden gebruikt, en dat positieve resultaten bevestigd moeten worden met een alternatieve techniek. Dit wordt bevestigd door de resultaten van de betrouwbaarheidscriteria. De meeste labtesten voldeden niet aan alle betrouwbaarheidscriteria zoals die voor instrumentele analyses, zoals LC-MS/MS, worden gehanteerd. Alleen de ANA veldtest lijkt wel aan deze criteria te voldoen, hoewel de juistheid en reproduceerbaarheid niet precies vastgesteld kunnen worden door het ontbreken van een referentiestandaard voor hANA. Dit betekent dat een bepaalde mate van onzekerheid bij het interpreteren van de labtesten geaccepteerd moet worden, en dat in het geval er beslissingen op basis van deze metingen genomen worden, moet worden overwogen of een bevestiging met bijvoorbeeld LC-MS/MS nodig is.

Voor de meeste afwijkingen kan verdere optimalisatie waarschijnlijk leiden tot betere prestaties van de testen. Zo kan voor testen die vaak vals positieve resultaten geven (MC 10, CYN 8) bepaald worden of het verhogen van de onderste detectielimiet leidt tot minder vals positieve uitslagen. Bij testen die vaak vals negatieve resultaten vertonen (STX 12) kan worden gekeken of dit probleem nog steeds optreedt als hogere toxineconcentraties worden gemeten. Voor aantoonbaar stelselmatig afwijkende juistheid kan gecorrigeerd worden bij de dataverwerking. Een slechte reproduceerbaarheid is moeilijk te corrigeren. In eerste instantie moeten alle stappen tijdens de monstervoorbewerking en -analyse onder de loep genomen worden en waar mogelijk geoptimaliseerd om spreiding te minimaliseren. Het deel van de variatie dat wordt veroorzaakt door kruisreactiviteit van het antilichaam voor de verschillende toxinevarianten is echter inherent aan de test en dus niet te veranderen. Een goede reproduceerbaarheid is noodzakelijk om een goede uitspraak te doen over

de toxineconcentratie in het monster (paragraaf 2.5). De reproduceerbaarheid van de verschillende testen is dus vrij bepalend voor de toepassingsmogelijkheden, testen met een slechte reproduceerbaarheid kunnen niet gebruikt worden om de toxineconcentratie nauwkeurig in te schatten. Daarom kunnen deze testen slecht aangeven of een gemeten concentratie met enige zekerheid boven een richtlijn ligt.

De MC testen presteerden verschillend op verschillende betrouwbaarheidsaspecten (aantoonbaarheid, juistheid, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid). MC 10 gaf veel vals positieve uitslagen, de aantoonbaarheid van de andere drie testen was vrij goed of goed. De juistheid kon alleen indicatief bepaald worden, deze verschilde sterk tussen de testen. Test 16 gaf gemiddeld een ruim tweemaal hoger resultaat dan test 1. De spreiding tussen de verschillende monsters (indicatieve reproduceerbaarheid) was acceptabel (test 10) tot groot (test 16). Test 16 lijkt op basis van onze studie niet de meest betrouwbare test voor het bepalen van toxineconcentraties. Deze is wel de enige die zonder extra voorbereidingen zeewater kan meten. Voor de andere testen moet het zeewater doorverdund worden, of moet een ander protocol worden gevolgd (Tabel 19).

De CYN labtest zal vanwege het groot aantal vals positieve uitslagen voor gebruik geoptimaliseerd moeten worden. De juistheid van deze test lijkt laag, dit komt door een lagere respons van de test op de 7-epi-CYN en 7-deoxy-CYN standaarden. Omdat de precieze concentratie van deze standaarden echter niet bekend is, is de juistheid niet met zekerheid vast te stellen. De reproduceerbaarheid van de test lijkt acceptabel (Tabel 19), deze is echter ook berekend zonder de exacte concentratie van de 7-epi-CYN en 7-deoxy-CYN standaarden te kennen.

De ANA labtest presteert goed, de indicatieve juistheid is goed en de reproduceerbaarheid is acceptabel. Deze test kan toegepast worden in zowel zoet- als zoutwater (Tabel 19).

De STX test is erg gevoelig, maar heeft een lage kruisreactiviteit voor een aantal STX varianten. Hierdoor worden op de geteste concentratie (0,1 µg/l) veel vals negatieve uitslagen verkregen. Om dezelfde reden is de juistheid van de test laag en de reproduceerbaarheid slecht. Het aantal vals positieven zal naar verwachting afnemen als hogere concentraties gemeten worden, maar de juistheid en reproduceerbaarheid kunnen naar verwachting niet substantieel worden verbeterd door methode optimalisatie, omdat deze te wijten zijn aan de verschillen in kruisreactiviteit voor de verschillende toxines (Tabel 19).

Tabel 19 Overzicht kenmerken en prestaties van de labtesten.

Nr	Toxinegroep	Concentratie bereik (µg/l)	Prijs per monster (euro)	Aantoonbaarheid	(Indicatieve) Juistheid (%)	(Indicatieve) reproduceerbaarheid (RSD, %)	Geschikt voor zeewater?	Algen-dichtheid
1	MC's	0,2 – 2	26-79	Vrij goed	93	39	Tot 2,5%	Goed
9	MC's	0,15 – 5	29-90	Goed	151	34	Tot 2,5%	Goed
10	MC's	0,15 – 5	29-88	Matig	91	30	Tot 2,5 -20%	Goed
16	MC's	0,05 - 5	30-93	Vrij goed	212	48	Ja	Goed
8	CYN's	0,05 – 2	30-90	Matig	57	31	Tot 20 - 100%	Goed
6	ANA's	0,15 – 5	31-95	Goed	104	30	Ja	Goed
12	STX'en	0,02 – 0,4	29-90	Matig	66	55	Tot 2,5%	Goed

6 Vergelijking toepasbaarheid sneltesten en LC-MS/MS analyse

Verschillende testen hebben verschillende toepasbaarheden. Hieronder zijn de toepasbaarheid van de lab- en veldtesten vergeleken, en is als referentie een gangbare techniek (LC-MS/MS) meegenomen (Tabel 20). Voor dit voorbeeld zijn de LC-MS/MS methodes zoals ze bij WFSR worden gebruikt genomen. Verschillende laboratoria hebben verschillende LC-MS/MS methodes, maar de kenmerken zullen op hoofdlijnen vergelijkbaar zijn.

De veldtesten zijn het meest geschikt voor het bepalen van de af- en aanwezigheid van toxines in individuele monsters. De labtesten en LC-MS/MS zijn meer geschikt voor monsterseries. Alle labtesten kunnen de aan- en afwezigheid van toxines bepalen, en de meer nauwkeurige testen kunnen ook een schatting van de concentratie per toxinegroep geven. Zo zal een MC labtest een concentratie geven uitgedrukt als MC-LR equivalenten. De LC-MS/MS bepaalt de concentratie van individuele toxines (MC-LR, MC-RR, MC-LW etc) en geeft daarmee meer informatie dan de labtest. Ook kan de LC-MS/MS met grotere nauwkeurigheid de concentratie bepalen, alleen de STX analyse kan op de LC-MS/MS vrij onnauwkeurig zijn.

De veldtest is het snelst, afhankelijk van het type test is de doorlooptijd 30 minuten tot een uur. De geschatte doorlooptijd van de labtest voor een serie van 30 monsters is één dag. De LC-MS/MS methode heeft meer meettijd nodig en de dataverwerking kost ook meer tijd. Voor deze techniek is de doorlooptijd anderhalve dag.

Waar een veldtest door iedereen uit te voeren zou moeten zijn, is voor een labtest geschoold laboratoriumpersoneel nodig. Het uitvoeren van een LC-MS/MS analyse is vrij specialistisch werk en vraagt dus ook verdere specialisatie van het labpersoneel. In analogie kunnen de labtesten met relatief goedkope en eenvoudige apparatuur uitgelezen worden, maar is een LC-MS/MS een duur apparaat.

Er is op dit moment slechts één goed functionerende veldtest commercieel beschikbaar, dit is een MC test. De ANA en STX testen presteren redelijk, maar deze testen beschikken niet over een lyseerstap, waardoor de toxines in het veld niet uit de blauwalgcellen los gemaakt kunnen worden. Zonder lyseerstap zijn deze testen ongeschikt voor het gebruik in oppervlaktewater. Labtesten zijn voor alle vier de toxinegroepen beschikbaar, de prestaties van de verschillende testen variëren van goed tot matig. Voor alle toxinegroepen zijn LC-MS/MS methodes beschikbaar, de STX methode geeft alleen wat onnauwkeurigere schattingen van de concentraties. De juistheid en reproduceerbaarheid van de andere LC-MS/MS methodes is beter dan die van de labtesten.

Uitvoering van de goedkoopste veldtest kost ongeveer 50 euro per monster, deze prijs is gebaseerd op de aanschaf van de test en de benodigde manuren voor de uitvoering. De goedkoopste test is ook de enige goed presterende test. De andere veldtesten zijn duurder in uitvoering door de hogere aanschafprijs en langere doorlooptijd. De labtesten kunnen op twee manieren worden gebruikt: om alle monsters eenmaal te meten en een grof idee te krijgen van de toxineconcentratie (screening) of een meer gerichte inschatting van de toxineconcentratie. Voor dat laatste moeten vaak verdunningsseries ingezet worden, waardoor er minder monsters per test uitgevoerd kunnen worden en de prijs omhoog gaat. De geschatte prijs van een screening van 30 monsters, waarin alleen de manuren en de aanschaf van de test zijn meegenomen, is ongeveer 40 euro per monster. Bij een gerichtere schatting van de concentratie loopt dit op naar ongeveer 90 euro per monster. De LC-MS/MS is iets duurder per monster. De prijs van de LC-MS/MS analyse is wel anders berekend, hier zit onder andere de afschrijving van het apparaat, het gebruik van het lab en de overhead van de organisatie in. Daarnaast worden de ANA's en CYN's analyse in één methode uitgevoerd.

De hierboven genoemde prijzen en doorlooptijden zijn gebaseerd op het meten van een enkele toxinegroep (MC's, CYN's, ANA's of STX'en). Als er meerdere toxinegroepen moeten worden gemeten, moeten hiervoor meerdere testen uitgevoerd worden. Hierdoor zal er meer personeel tegelijk ingezet moeten worden (als de doorlooptijd hetzelfde moet blijven) en gaan ook de kosten van het aanschaffen van de testen omhoog.

Tabel 20 *Vergelijking toepasbaarheid veldtesten, labtesten en LC-MS/MS analyse.*

	Veldtest	Labtest	LC-MS/MS
Meest geschikt voor	Individuele monsters	Monsterseries	Monsterseries
Uitkomst	Aan/afwezigheid toxinegroep	Schatting concentratie per toxinegroep of aan/afwezigheid	(Schatting) concentratie per toxine
Doorlooptijd	30-60 minuten	1 dag	1,5 dag
Expertise	Niet nodig	Labpersoneel	Gespecialiseerd labpersoneel
Beschikbaar voor	MC (ANA, STX)	MC, ANA, CYN, STX	MC, ANA, CYN, STX
Kosten per monster per toxinegroep (euro)	50-100	Ca. 40 (screening) Ca. 90 (schatting concentratie)	Ca. 140 (ANA en CYN één groep)

7 Conclusies en aanbevelingen

7.1 Conclusies

Op dit moment is er één goede en praktische veldtest voor het meten van MC's in oppervlaktewater commercieel beschikbaar (de BlueGreenTest van Salofa Oy). Deze test heeft een bereik van 1 tot 100 µg/l en geeft alleen een kwalitatieve inschatting (toxines zijn wel of niet aangetoond). De test kost 12 euro en heeft een doorlooptijd van een half uur. Eén van de andere twee getoetste MC veldtesten, de test voor recreatie water van Eurofins/Abraxis, voldeed niet. De andere Eurofins/Abraxis test, voor drinkwater bronnen, voldeed in eerste instantie ook niet. Na doorontwikkeling door de leverancier leek de prestatie verbeterd, maar met deze test zijn geen uitgebreide experimenten meer uitgevoerd om dit vast te stellen. Beide Eurofins/Abraxis MC testen zijn duurder en lastiger in gebruik dan de test van Salofa Oy.

Voor CYN is er momenteel geen goed functionerende veldtest commercieel beschikbaar, de geëvalueerde test van Eurofins/Abraxis voldeed niet. De prestaties van de ANA veldtest (Eurofins/Abraxis) waren goed, maar deze test heeft geen lyseerstap. Zonder lyseerstap is de test niet geschikt voor het meten van ANA's in oppervlaktewater. De STX veldtest (Eurofins/Abraxis) presteerde redelijk, maar ook deze test heeft geen lyseerstap en is daarom niet als zodanig toepasbaar voor het meten in oppervlaktewater. Daarnaast zijn de ANA en STX veldtest, net als de overige veldtesten van Eurofins/Abraxis vrij bewerkelijk, waardoor ze minder geschikt zijn voor routinematige metingen.

Door het ontbreken van zekerheid over de concentratie van enkele van de gebruikte standaarden, kon de betrouwbaarheid van de MC, CYN en ANA labtesten slechts indicatief ingeschat worden. De vier geteste MC labtesten vertoonden grote onderlinge verschillen in aantoonbaarheid, juistheid en reproduceerbaarheid, maar er was geen test die op alle criteria duidelijk beter was dan de rest. De ADDA SAES ELISA van Eurofins/Abraxis gaf de minst goede resultaten qua betrouwbaarheid, maar is wel de enige test die in zeewater uitgevoerd kan worden. De overige drie MC testen (ADDA ELISA en monoclonal ELISA van Eurofins/Abraxis en de Quantiplate kit for microcystins van Envirologix) hadden een hogere betrouwbaarheid. De aantoonbaarheid van de monoclonal ELISA moet voor gebruik geoptimaliseerd worden. Voor de andere twee testen leek de juistheid (ADDA ELISA) en reproduceerbaarheid (Quantiplate) onvoldoende. Of dit werkelijk zo is kan alleen worden bepaald als de concentratie van de gebruikte standaarden beter kan worden ingeschat, hiervoor moeten meer gecertificeerde standaarden beschikbaar komen.

De enige beschikbare CYN labtest (Eurofins/Abraxis) zal met name vanwege het groot aantal vals positieve uitslagen voor gebruik geoptimaliseerd moeten worden. De enige beschikbare ANA labtest (Eurofins/Abraxis) presteert goed op alle geteste kenmerken. De STX labtest (Eurofins/Abraxis) is erg gevoelig, maar heeft door een lage kruisreactiviteit voor een aantal STX varianten een lage juistheid en slechte reproduceerbaarheid. Dit is inherent aan het gebruikte antilichaam en daardoor niet te verbeteren door optimalisatie in het lab van de gebruiker.

De goed presterende labtesten kunnen gebruikt worden voor het schatten van de toxineconcentratie in het monster. De uitslag van de goed presterende labtesten is onnauwkeuriger dan die van de meeste instrumentele analyses, zoals de LC-MS/MS. Daarnaast geven labtesten minder informatie, het resultaat is een schatting van de concentratie per toxinegroep. Met instrumentele analyses wordt de concentratie per individueel toxine bepaald. Met de labtest kan binnen een dag een serie van 30 monsters opgewerkt, gemeten en gerapporteerd worden, de kosten per monster liggen dan ongeveer tussen de 40 euro (screening) en 90 euro (schatting concentratie). Testen met een slechte reproduceerbaarheid, zoals de STX test, kunnen niet worden gebruikt om een goede schatting van de concentratie te maken.

Alle geëvalueerde testen zijn gericht op elk één toxinegroep. Als er meerdere toxinegroepen in een monster gemeten moeten worden, moeten dus meerdere testen uitgevoerd worden.

7.2 Aanbevelingen

De in dit project uitgevoerde evaluatie is bedoeld om inzicht te krijgen in welke commercieel beschikbare sneltesten goed en minder goed presteren, zodat waterbeheerders en laboratoria een gefundeerde keuze kunnen maken over welke testen ze willen gaan gebruiken. De evaluatie is nadrukkelijk geen validatie van de testen. Als waterbeheerders of laboratoria ervoor kiezen om testen te gaan gebruiken, zullen deze waar nodig geoptimaliseerd moeten worden, en in alle gevallen gevalideerd. Daarnaast moet een kwaliteitsborgingsysteem voor de testen worden opgezet.

Voor veldtesten, die gebruikt kunnen worden om de aan- of afwezigheid van toxines aan te tonen, is het belangrijk om de aantoonbaarheid te testen op het gewenste niveau. Hiervoor moeten zowel negatieve als positieve monsters gebruikt worden. Omdat de testen verschillend reageren op verschillende toxinevarianten moet de aantoonbaarheid voor de verschillende toxinevarianten (individueel of in mengsels van verschillende samenstelling) worden bepaald.

Voor sommige labtesten zal het protocol nog moeten worden geoptimaliseerd, bijvoorbeeld om het aantal vals positieve uitslagen te reduceren. Daarnaast is er ruimte om de extractieprocedure desgewenst aan te passen. Als het protocol is vastgesteld dienen ook de labtesten te worden gevalideerd. Indien deze worden gebruikt om toxineconcentraties in te schatten, omvat de validatie minimaal de volgende aspecten: het vaststellen van de laagste en hoogste concentratie waarop de toxineconcentratie kan worden ingeschat en het bepalen van de aantoonbaarheid, juistheid en reproduceerbaarheid. Omdat de kalibratiecurves van dit soort labtesten niet lineair zijn, is het verstandig om aantoonbaarheid, juistheid en reproduceerbaarheid op minimaal drie punten uit te voeren: de laagst aantoonbare concentratie, het midden van de kalibratiecurve en de hoogst aantoonbare concentratie. Omdat ook labtesten verschillend reageren op individuele toxines, moet de validatie met meerdere toxines, in verschillende mengsels, worden uitgevoerd.

Na de validatie van de labtesten kan de meetonzekerheid berekend worden. Op basis van deze meetonzekerheid kan bepaald worden of de testen geschikt zijn voor het inschatten van de toxineconcentratie, en bij welke gemeten concentratie met relatieve zekerheid bepaald kan worden of de toxineconcentratie in het monster boven of onder de richtlijn ligt.

De testen zijn geëvalueerd voor het meten van toxines in pelagische blauwalgen. In drijfslagen is de blauwalgendichtheid veel hoger dan de algendichtheden waarbij deze studie is uitgevoerd. Mochten de testen gebruikt worden voor het meten in (onverdunde) drijfslagen, dan moet eerst getest worden of deze verhoogde algendichtheid geen negatief effect op de werking van de testen heeft. In praktijk zal het echter vaak zo zijn dat een drijfslaagmonster vanwege de zeer hoge toxineconcentratie sterk verdund moet worden voor meting en de algendichtheid in het te meten monster dus lager is dan in de drijfslaag.

Ook het gebruik van de testen in bentische blauwalgen is niet geëvalueerd. Voor het meten in bentische blauwalgen zal het monsternamen- en extractieprotocol moeten worden aangepast. Daarbij kan het raadzaam zijn om de hoeveelheid ingewogen monster te optimaliseren en standaardiseren. Het geoptimaliseerde protocol moet voor gebruik per test vervolgens gevalideerd worden.

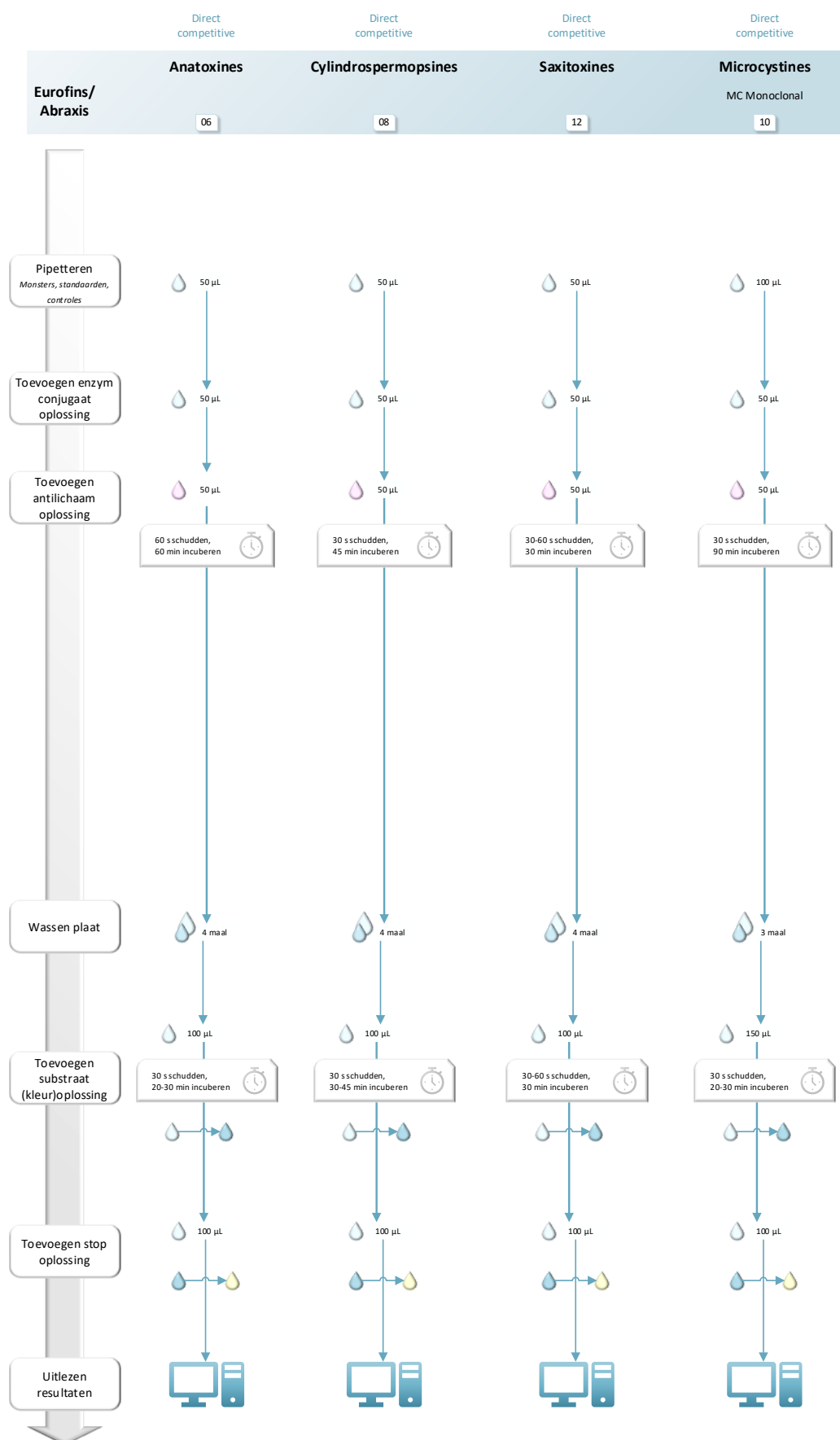
8 Dankwoord

Wendy Beekman en Miquel Lüring (vakgroep Aquatische Ecologie en Waterkwaliteitsbeheer, Wageningen University) worden bedankt voor het mogen gebruiken van enkele algenculturen voor deze studie.

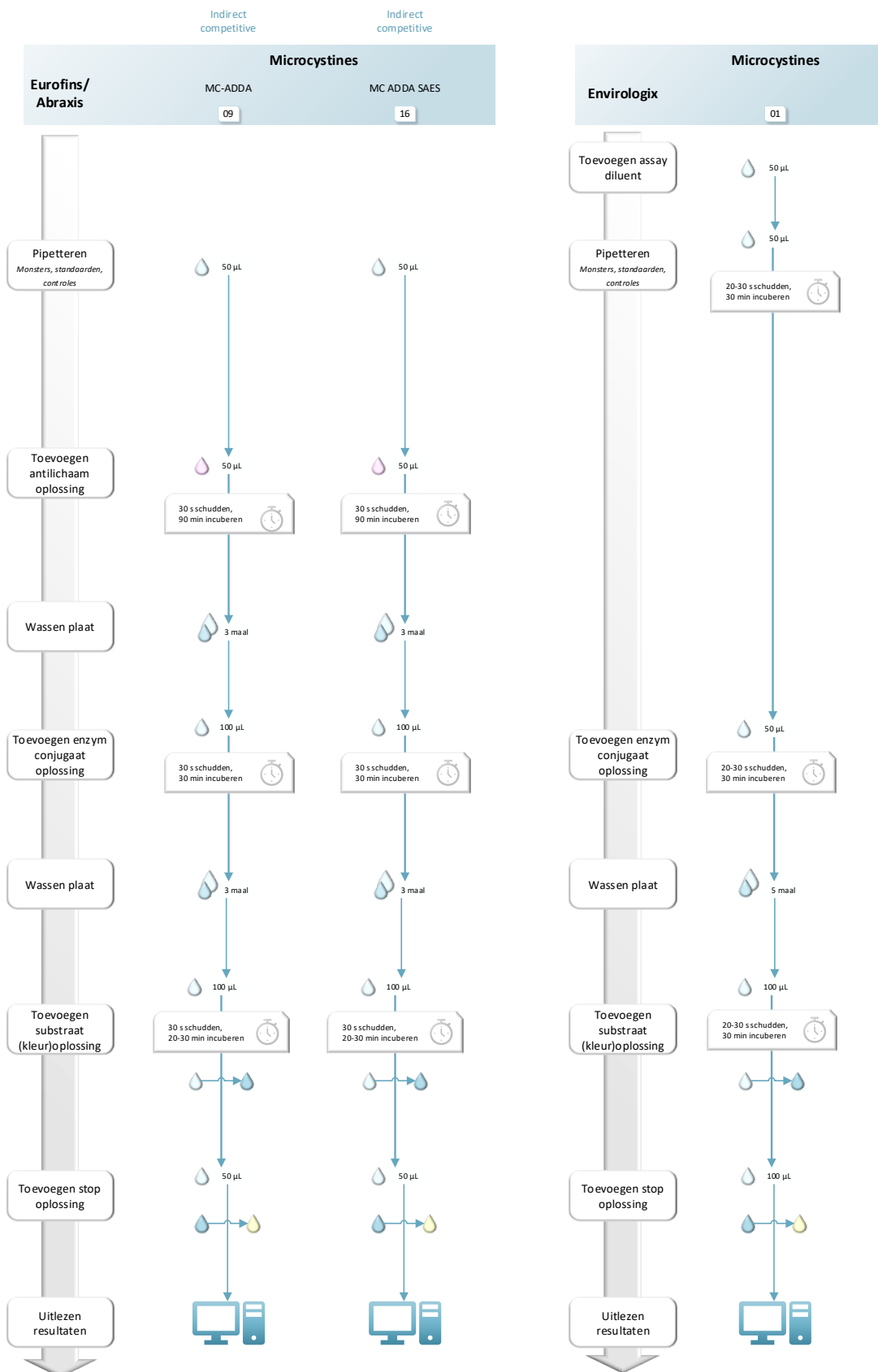
Literatuur

1. Rijksinstituut_voor_Volksgezondheid_en_Milieu, *Blauwalgenprotocol 2020*. 2020.
2. Waterstaat, M.v.I.e., *QenA Landbouw 22/08/18*. 2018.
3. Organisation, W.H., *Toxic cyanobacteria in water*. Second edition ed, ed. I. Chorus and M. Welker. 2021.
4. European_Food_Safety_Authority, *Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group*. The EFSA Journal, 2009. **1019**: p. 1-76.
5. SANTE, *Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-approval Control and Monitoring Purposes (SANTE/2020/12830, Rev.1)*. 2021.

Bijlage 1 Flowschema's labtesten



Figuur B1.1 Flowschema's labtesten.



Figuur B1.1 (vervolg) Flowschema's labtesten.

Wageningen Food Safety Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
wur.nl/food-safety-research

WFSR-rapport 2022.011



De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

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



Wageningen Food Safety Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
wur.nl/food-safety-research

WFSR-rapport 2022.011

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

