



# Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- p. 4 Analyse van glyceroltriheptanoaat in dierlijke bijproducten
- p. 7 Vitaminen
- p. 12 Glyfosaat in al zijn toestanden
- p. 17 Migratierisico's in traditionele, metalen theepotten
- p. 19 Voedselallergieën
- p. 24 NRL-GGO: het GMOSeek onderzoeksproject (2009 – 2011) voor het opsporen van GGO's
- p. 28 Naar een betere Europese samenwerking binnen het domein van de plantaardige quarantaine
- p. 30 Nieuws van het Europees Referentie Laboratorium voor Melk en Melkproducten (EU-RL MMP), Parijs, 2011
- p. 36 Workshops & Symposia



## LabInfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

## Redactiegroep

Dirk Courtheyn, Mieke De Mits, Conny De Schepper, Alain Dubois, Marc Evrard, Alain Laure, Bert Vandenborre, Mieke Van de Wiele, Eva Wevers en Marie-Christine Wilem

## Auteurs van dit nummer

Geert De Poorter, Eva Wevers, Mieke Vanbrabant, Séverine Goscinny, Vincent Hanot, Fabien Bolle, Valéry Dumont, Sylvia Broeders, Elodie Barbau-Piednoir, Guillaume Mbongolo Mbella, Nina Papazova, Antoine Pouppez, Nancy Roosens, Isabel Taverniers, Marc De Loose, Frédéric Debode, Gilbert Berben, Eric Janssen, Thibaut Olivier, Anne Chandelier, Stéphan Steyer, Véronique Ninane en Koen De Reu

## Vertaling

Vertaaldienst van het Agentschap  
Redactiegroep en medewerkers van het Bestuur Laboratoria

## Foto's en illustraties

Aangebracht door de laboratoria

## Vormgeving

Gert Van Kerckhove

## Redactieadres

LabInfo  
p.a. D. Courtheyn  
FAVV  
AC-Kruidtuin – Food Safety Center  
4de verdieping, bureel K04/120218  
Kruidtuinlaan 55  
1000 Brussel  
Tel.: 02.211.87.33  
dirk.courtheyn@favv.be

Beste lezer,

Ik wil dit editoriaal beginnen met u een gelukkig en gezond 2012 toe te wensen. "Als het met de gezondheid goed gaat, dan komt al de rest vanzelf" is het spreekwoord. 2011 is verlopen zoals een roller coaster: met hoogte- maar vooral dieptepunten. De toekomst ziet er volgens analisten somber uit maar we mogen ons niet blijven focussen op doemberichten. Het is onze plicht om te blijven innoveren en om creatief te zijn in ons denken en handelen, alleen zo kan toegevoegde waarde op allerlei vlakken gecreëerd worden. Het FAVV en DG Laboratoria willen daaraan meewerken.

In het schrijven van mijn nieuw management- en operationeel plan heb ik vele gesprekken gevoerd met enerzijds de gebruikers van testresultaten van labs die analyses in het officiële controleprogramma en het auto controle programma uitvoeren en anderzijds met de labmanagers van deze erkende labs zelf.

Wat daaruit vooral naar voren kwam is dat de gebruikers nog sneller de resultaten willen hebben aan een nog goedkopere prijs. De labmanagers zijn vooral op zoek naar stabiele wetgeving, met duidelijke normen en snel beschikbare methoden die nauwkeurige resultaten opleveren.

In se niets nieuws onder de zon dus maar om dit te vertalen in concrete objectieven, dat is een andere zaak. Ik wil u alvast kennis laten nemen met een aantal belangrijke initiatieven die ik wil nemen om aan deze verzuchtingen te beantwoorden.

Alle methoden en bijhorende validatiedossiers (behalve deze van de verboden stoffen) die de FAVV labs gebruiken zullen in de loop van 2012 gepubliceerd worden op het beschermde Intralab. Externe erkende labs kunnen dan in deze snel evoluerende wereld gemakkelijk een methode terugvinden en bovendien hoeven ze ook geen dure en tijdrovende validatiedossiers meer op te stellen; een implementatievalidatie zal –in de meeste gevallen– volstaan. De werking van de Nationale Referentielaboratoria zal op een meer marktconforme manier gereguleerd worden met een nog betere kwaliteitsbewaking. De NARVAL applicatie, waarbij normen en actielimieten kunnen geconsulteerd worden, zal verder uitgebouwd worden. Deze applicatie biedt meer rechtszekerheid aan derde labs in het kader van de meldingsplicht en kan ook gebruikt worden in de consultancy die zij geven aan hun klanten want het matrix/parameter/norm-actielimiet verhaal in de wereld van de voedselveiligheid is complex en ingewikkeld.

En last but not least worden onderhandelingen aangeknoopt met PT-providers om resultaten rechtstreeks in onze Foodlims PT module te injecteren zodat de erkende labs aan trendanalyse kunnen doen zonder resultaten te moeten overtikken. Zo wordt administratieve vereenvoudiging en het elektronische labo meer en meer een realiteit.

Deze "elektronische" Labinfo bevat weerom een reeks interessante artikels, veel ouderwets leesplezier ...

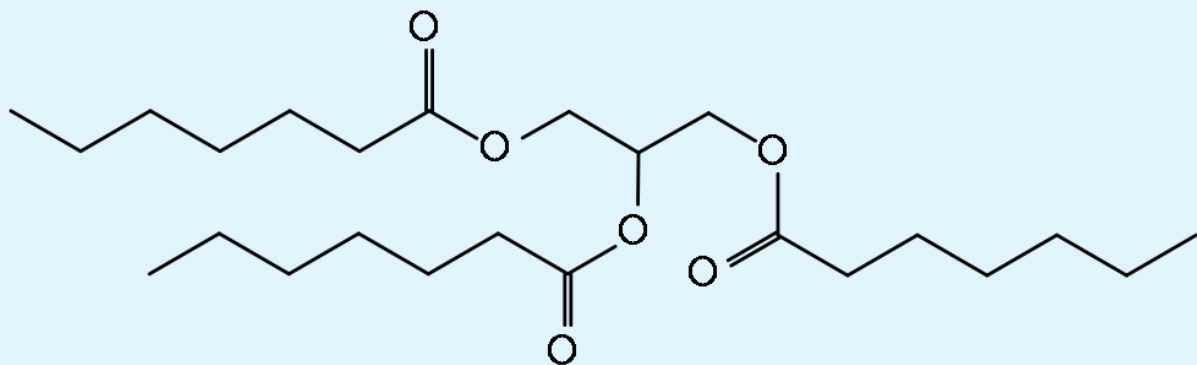
**Geert De Poorter**

Directeur-generaal Laboratoria

# Analyse van glyceroltriheptanoaat in dierlijke bijproducten

In de jaren negentig is gebleken dat bepaalde overdraagbare dierziekten (bijvoorbeeld OSE: overdraagbare spongiforme encefalopathie) verspreid kunnen worden door dierlijke bijproducten. Bovendien kan kannibalisme (het voederen van eiwitten verkregen uit kadavers van dezelfde diersoort) een extra risico vormen voor de verspreiding van ziekten. Om te voorkomen dat bijproducten die niet bestemd zijn voor menselijke consumptie opnieuw in de voedselketen terechtkomen, werd Verordening 1774/2002 (Europese Gemeenschappen, 2002) opgesteld. Dierlijke bijproducten worden volgens Verordening 1774/2002 ingedeeld in drie categorieën: categorie 1 (hoog risico), categorie 2 (gemiddeld risico) en categorie 3 (laag risico).

Op vraag van DG Health and Consumer Protection (DG SANCO) heeft het Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements van de Europese Commissie (IRMM) de karakteristieken van verschillende substanties die geschikt zijn om gebruikt te worden als merker voor dierlijke bijproducten van categorie 1 en categorie 2 geëvalueerd. In 2002 stelde het IRMM voor om glyceroltriheptanoaat (GTH) als merker te gebruiken. GTH bleek immers de ideale kandidaat te zijn. GTH is een vet dat bestaat uit 3 C7-vetzuren (n-heptaanzuur) die veresterd zijn met glycerol. GTH komt bijgevolg niet voor in de natuur. De structuurformule is weergegeven in figuur 1. De fysico-chemische eigenschappen van GTH zorgen ervoor dat het makkelijk mengt met vetten en producten die vet bevatten. Bovendien kan GTH na toevoeging niet verwijderd worden. Het is een veilig en niet-toxisch product dat reeds gebruikt wordt in de voedingsindustrie voor andere toepassingen zoals het merken van boter. GTH is daarnaast een erg stabiele substantie die weerstaat aan een hittebehandeling met stoomdruk bij 133°C zoals deze wordt toegepast in de vetsmelterij-industrie. GTH is commercieel verkrijgbaar als een heldere transparante vloeistof. De kostprijs is laag en er moet niet veel van toegevoegd worden (wettelijke vereiste 250 mg/kg vet). Er bestaat immers een gevoelige en eenvoudige methode om GTH te analyseren.



Figuur 1: Structuurformule van glyceroltriheptanoaat

De analysemethode werd ontwikkeld door het IRMM en is geschikt voor de bepaling van GTH in diermelen en dierlijke vetten. De methode bestaat uit drie basisstappen: (i) een extractie van de vetfractie met petroleumether (enkel bij diermelen); (ii) opzuivering van het geëxtraheerde vet (bij diermelen) of van het dierlijke vet (bij vetmonsters) en (iii) bepaling van de GTH-concentratie door middel van gaschromatografie. Voor de detectie kan gebruik gemaakt worden van twee detectoren, namelijk Flame Ionisation Detector (FID) of massaspectrometrie (MS). FID is enkel geschikt voor kwantificatie van GTH in de doelmaterialen (categorie 1 en categorie 2 diermelen en dierlijk vet). Met MS kan daarentegen ook de afwezigheid van GTH in dierlijke bijproducten van categorie 3 aangetoond worden.

Uit de in-huis validatie van het IRMM, waarbij verschillende prestatiekenmerken (zoals robuustheid, gevoeligheid, precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid) en juistheid) bepaald werden, blijkt dat deze methode geschikt is voor het beoogde doel.

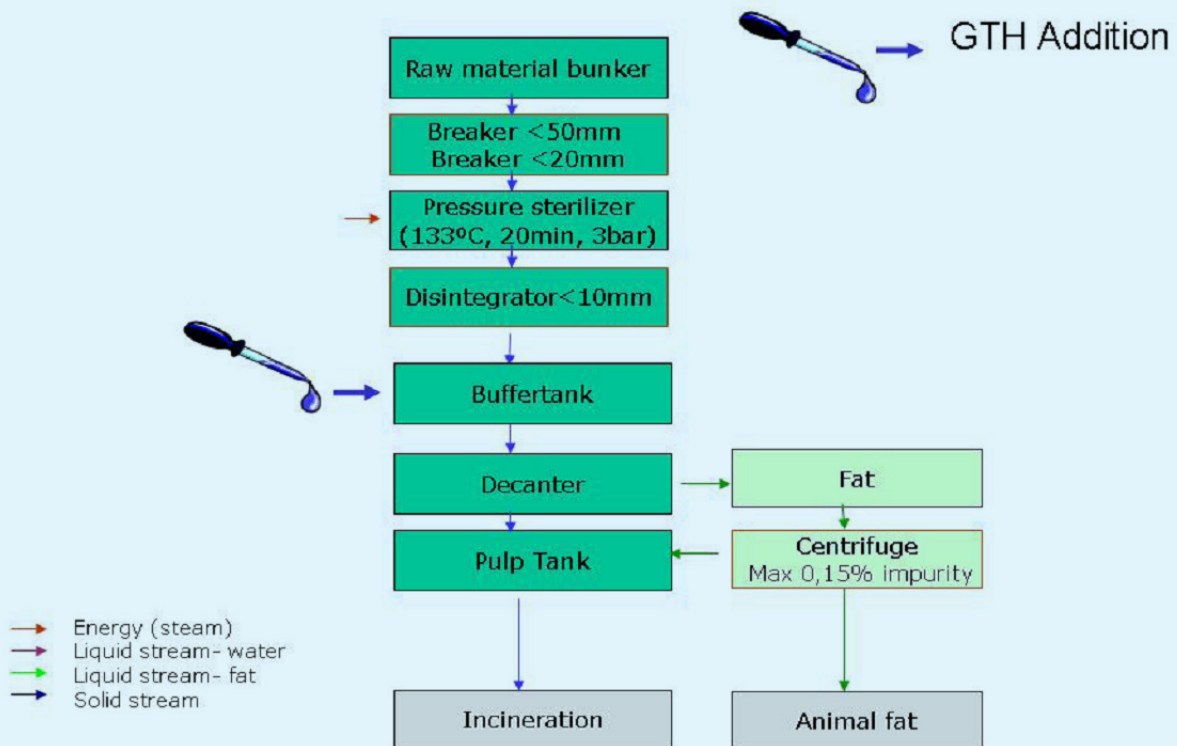
Na het op punt stellen van de analysemethode voor de bepaling van GTH, werd een implementatiestudie uitgevoerd in samenwerking met verschillende vetsmelterijen in Europa. Het doel van deze studie was om na te gaan of de toepassing van GTH als merker in dierlijke bijproducten van categorie 1 en categorie 2 haalbaar is in de praktijk en dit onder realistische omstandigheden. De studie werd uitgevoerd door IRMM en CCL Research (Coöperatief Centraal Laboratorium) in nauwe samenwerking met DG SANCO en EFRA (European Fat Processors and Renderers Association).

Voor elke vetsmelterij bleek GTH detecteerbaar in een hoge concentratie in de eindproducten (diermeel en vet). Het GTH-gehalte bevond zich ruim boven de aantoonbaarheidsgrens. Deze resultaten tonen aan dat GTH volledig mengbaar is met vet en dit zowel in het merken van diermeel als van vet. Een stabiliteitsstudie toonde ook aan dat GTH stabiel is in diermeel bij kamertemperatuur gedurende minstens 58 weken. Uit de resultaten van de implementatiestudie kan bijgevolg besloten worden dat GTH een geschikte en in de praktijk bruikbare merker is voor categorie 1 en categorie 2 materialen.

Op basis van het rapport van deze studie keurde de Europese Commissie het gebruik van het GTH-merkersysteem op 11 september 2007 goed (Europese Commissie, 2007). Op 5 december 2007 werd ten slotte Verordening 1432/2007 gepubliceerd (Europese Unie, 2007) die op 1 juli 2008 in werking trad. Volgens deze verordening dienen dierlijke bijproducten van categorie 1 en categorie 2 permanent gemerkt te worden met GTH. Het merken van dergelijke materialen verzekert de identificatie en de traceerbaarheid van producten die vernietigd moeten worden en zeker niet meer in de voedselketen terecht mogen komen. Daarnaast wordt het risico op fraude geëlimineerd. Het toevoegen van GTH dient te gebeuren op een zodanige wijze dat de verwerkte producten een minimumconcentratie van ten minste 250 mg GTH per kg vet bevatten. Bovendien moet GTH homogeen verdeeld zijn in de stof en moet het toegevoegd worden nadat de producten een voorafgaande sanerende warmtebehandeling bij een kerntemperatuur van ten minste 80°C hebben ondergaan. Experimenten op laboschaal toonden immers aan dat GTH niet stabiel is in rauwe dierlijke bijproducten. GTH wordt afgebroken door enzymen afkomstig uit het maagdarmkanaal. Deze enzymen worden echter inactief vanaf het moment dat de dierlijke bijproducten een temperatuur van 80°C bereiken. GTH wordt bijgevolg ook niet toegevoegd in de slachthuizen, maar pas in de verwerkingsbedrijven. In figuur 2 is een voorbeeld van een vetsmeltproces weergegeven. Het moment van GTH-toevoeging wordt aangeduid door het pipetje.



## Wet Rendering Process Batch, Natural fat, Pre-pressure



Figuur 2: Schematische voorstelling van een voorbeeld van een vetsmeltproces. Het punt waar GTH toegevoegd wordt is weergegeven met een pipetje.

Tot slot werd er overgegaan tot de validatie van de analysemethode aan de hand van een interlaboratoriumstudie waaraan ook het FLVVT (Federaal Laboratorium voor de Veiligheid van de Voedselketen Tervuren) deelnam. Het doel van deze studie bestond eruit om de performantiekarakteristieken van de methode voor de bepaling van GTH te bepalen. De studie werd uitgevoerd door 20 officiële laboratoria uit 13 lidstaten, zodat deze laboratoria onmiddellijk na het afronden van de studie konden starten met het controleren van het juiste gebruik van GTH door de vetsmeltindustrie. Er werden aanvaardbare waarden gevonden voor de precisie en de juistheid van de methode. Hieruit werd besloten dat de analysemethode geschikt is voor het beoogde doel.

Meer informatie over GTH, de officiële analysemethode en de rapporten van de implementatiestudie en de interlaboratoriumstudie zijn terug te vinden op de website van het IRMM.

([http://www.irmm.jrc.be/activities/marker\\_for\\_animal\\_by\\_products/Pages/index.aspx](http://www.irmm.jrc.be/activities/marker_for_animal_by_products/Pages/index.aspx))

Eva Wevers  
eva.wevers@favv.be

# Vitaminen

## Definitie

Vitaminen zijn essentiële organische voedingsstoffen, die in tegenstelling tot andere voedingsstoffen (koolhydraten, vetten, eiwitten) geen energie of bouwstoffen leveren, maar die wel noodzakelijk zijn voor een goed verloop van de stofwisseling in het lichaam. Vitaminen komen voor in tal van natuurlijke voedselbronnen. Het zijn micronutriënten, dit zijn voedingsstoffen waarvan dagelijks slechts een kleine hoeveelheid (enkele mg of µg) dient te worden opgenomen via de voeding omdat ze door het organisme niet of in onvoldoende mate gesynthetiseerd worden. Voor elk vitamine bestaat er een Aanbevolen Dagelijkse Hoeveelheid (ADH). De werkelijk benodigde hoeveelheid per individu wordt bepaald door verschillende factoren, zoals leeftijd, geslacht, omgeving, gezondheidstoestand en stress. Een onevenwichtige voeding of bepaalde aandoeningen kunnen leiden tot een vitaminedeficiëntie en eventuele gebreksziekten. De inname van voedingssupplementen of verrijking van voedingsmiddelen en industriële diervoeders met vitamines kan een tekort vermijden bij mens en dier.

## Classificatie en functie

De chemische en fysiologische eigenschappen van vitamines zijn zeer uiteenlopend. Tot op heden zijn er 13 vitamines bekend, waarbij elk vitamine een groep van structureel gelijkaardige organische verbindingen met variërende biologische activiteit vertegenwoordigt, de zogenaamde vitameren. Provitaminen zijn vitamineprecursoren, dit zijn natuurlijk voorkomende componenten die door het normale lichaamsmetabolisme worden omgezet in 'echte' vitamines.

Men deelt de vitamines op in twee groepen op basis van hun oplosbaarheids-eigenschappen. De vetoplosbare vitamines omvatten de vitamines A, D, E en K en ongeveer 50 carotenoïden. De groep van wateroplosbare vitamines bestaat uit vitamine C (ascorbinezuur) en alle B-vitamines, met name thiamine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3), pantotheenzuur (B5), pyridoxine (B6), biotine (B8 of H), foliumzuur (B11 of B9) en cyanocobalamine (B12). De oplosbaarheids-eigenschappen bepalen ook de distributie van vitamines in verscheidene voedselgroepen en hebben directe gevolgen voor de toegepaste analytische methoden. Vetoplosbare vitamines komen vooral voor in vetrijke levensmiddelen en kunnen in het vetweefsel en de lever worden opgeslagen. De wateroplosbare vitamines B en C komen voor in allerlei voedingsmiddelen. Het lichaam kan deze vitamines (behalve vitamine B12) niet goed opslaan en een teveel verlaat het lichaam via urine of zweet.

Vitamines zijn regulatoren van synthese- en degradatieprocessen en vormen de bouwstenen van co-enzymen, hormonen en andere stoffen. Ze spelen een rol bij de groei, het herstel en het goed functioneren van het lichaam en hebben vooral een katalytische functie. De meeste wateroplosbare vitamines worden in vivo omgezet in co-enzymen die in samenwerking met metabolische enzymen een cruciale rol spelen in het katabolisme van voedingsstoffen om zo energie voor het organisme te produceren. Enkele vitamines worden aangemaakt in het lichaam (door darmflora bacteriën en in de huid onder invloed van zonlicht). Planten beschikken over de capaciteit om zelf vitamines te synthetiseren, met uitzondering van B12, en zij doen dan ook dienst als belangrijkste bron van deze essentiële voedingscomponenten.

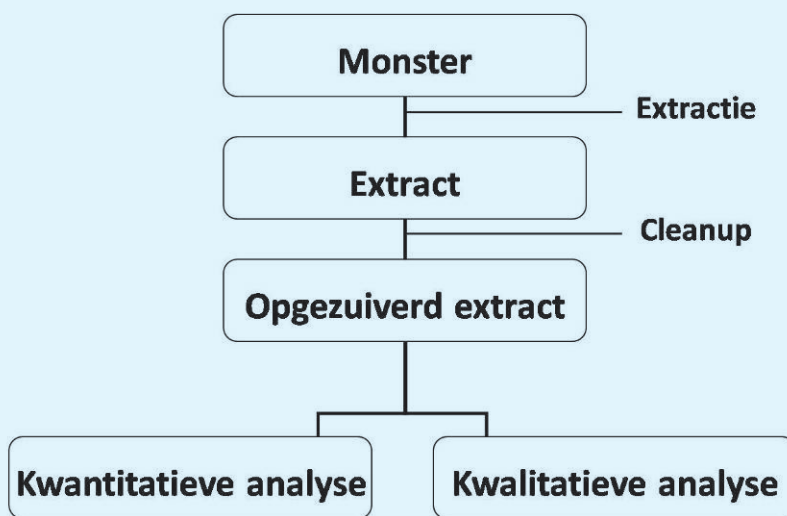
De meeste vitamines zijn zeer instabiele verbindingen en worden snel afgebroken door hun gevoeligheid voor verhitting, oxidatie, straling, vochtgehalte, wateractiviteit, pH, afbraakenzymen en katalytische effecten van metalen. Om de stabiliteit te verhogen worden meestal afgeleide verbindingen gebruikt voor de toevoeging van vitamines aan diervoeders en levensmiddelen.



## Analyse van vitaminen

Naast bioassays voor het bepalen van de werkelijke nutritionele waarde van een vitamine in een product, wordt er voor de analyse van verrijkte diervoeders en levensmiddelen voornamelijk een beroep gedaan op in vitro analysetechnieken zoals microbiologische assays (MBAs) of fysico-chemische analysemethoden zoals HPLC. Fysico-chemische assays laten de kwantificatie toe van de hoofdbestanddelen die verantwoordelijk zijn voor de biologische activiteit en kunnen een hoge graad van precisie vertonen.

Momenteel is (ultra) high performance liquid chromatography, (U)HPLC, de voorkeursmethode voor de bepaling van het gehalte aan vitaminen. HPLC kan gebruikt worden tijdens de monstervoorbereiding om de extracten op te zuiveren of om de componenten te scheiden en te kwantificeren. MBAs werden ontwikkeld in het begin van de jaren '40 en vormen nog dikwijls de officiële methoden voor de bepaling van verschillende B-vitaminen, maar ook hier is HPLC en LC-MS aan een opmars bezig. De algemene analytische procedure voor microbiologische en fysico-chemische assays kan ingedeeld worden in een aantal belangrijke stappen: monsternamen, extractie, eventuele opzuivering, meting en berekening van het resultaat.



Figuur 1: Algemeen schema van de analyseprocedure

## Extractie van vitaminen

De analyses starten met een extractie van de vitaminen uit de matrix om het meten ervan mogelijk te maken. De gekozen methode voor extractie is afhankelijk van het vereiste resultaat, de aard van de matrix, de aanwezige natuurlijke of synthetische vorm van de vitaminen, interfererende bestanddelen, bestandheid van de vitamine tegen warmte en extreme pH-waarden en de selectiviteit en specificiteit van de gebruikte analytische methode. Het is essentieel voor een succesvolle bepaling dat de vitaminen kwantitatief geëxtraheerd worden uit de matrix in een vorm die accuraat kan gemeten worden door de gebruikte analysetechniek. Een efficiënte extractieprocedure homogeniseert en concentreert het monster, isoleert het analyt uit zijn binding met proteïne, elimineert zoveel mogelijk gekende interfererende substanties en vernietigt endogene enzymactiviteit. Extractiemethoden voor vitaminen uit voedingsmatrices zijn o.a. zure of alkalische hydrolyse (verzeping), enzymatische hydrolyse, directe solventextractie en 'solid-phase' extractie.

## Vloeistofchromatografie, geschikt of niet?

HPLC kan gebruikt worden voor de bepaling van toegevoegde vitaminen in verrijkte voedingsmiddelen en diervoeders. De bepaling van natuurlijk voorkomende vitaminen via HPLC is complexer omwille van de verschillende vitameren en bijgevolg is er nood aan meer complexe extractieprocedures om rekening te houden met de gebonden vormen. HPLC is onvoldoende gevoelig voor een accurate meting van de extreem lage gehalten aan vitamine B12 en B8 in voeding. HPLC is ook een populaire techniek voor de bepaling van vitamine C, ondanks de lage absorptie van dehydroascorbinezuur en diens gebrek aan elektrochemische activiteit. HPLC garandeert echter niet dat er rekening wordt gehouden met alle biologisch actieve vormen van een vitamine die zouden worden gemeten tijdens een microbiologisch assay en, in dit opzicht, kan de inherente specificiteit van HPLC leiden tot een onderschatting van de totale vitamineactiviteit.

Het gebruik van 'reversed phase'-HPLC kolommen die geschikt zijn voor zowel 100% organische als 100% waterige mobiele fases, laten de scheiding toe van sterk polaire analyten in waterige mobiele fases en hydrofobe analyten in organische mobiele fases. Ze zijn bijgevolg geschikt voor de scheiding van zowel vetoplosbare als wateroplosbare vitaminen en maken de gelijktijdige bepaling van bepaalde vitaminecombinaties mogelijk. De recente methoden zijn vooral gericht op de snelle en efficiënte gelijktijdige bepaling van zoveel mogelijk vitaminen in zoveel mogelijk matrices. Het vinden van een geschikte extractiemethode, de eliminatie van matrixeffecten en optimalisatie van HPLC condities vormen echter een grote uitdaging voor de gelijktijdige bepaling van vitaminen. De meest gebruikte detectiemethoden zijn UV- en fluorescentiedetectie, waarbij FL-detectie een hogere gevoeligheid vertoont. Fotodiode array detectie biedt dan weer de mogelijkheid om analyten te identificeren via UV-absorptie op verschillende golflengten en kan tegelijk de piekzuiverheid testen. Een meer recente ontwikkeling is het gebruik van LC-MS als een gevoelig en selectief middel voor de bepaling van één of meer vitaminen in voeding.

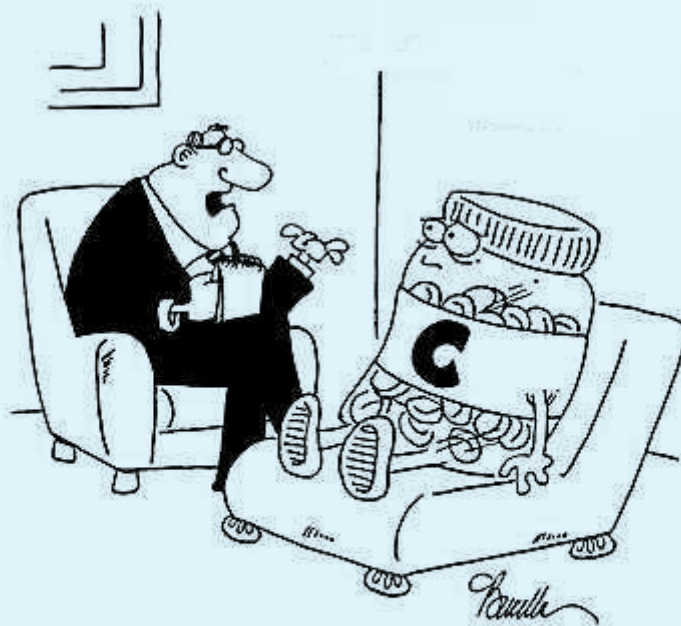


## *Vitaminen, toekomstmuziek*

De komende jaren zal er vanuit de Europese wetgeving steeds meer nadruk gelegd worden op de nauwkeurige bepaling van de soorten vitamines en vitamineconcentraties aanwezig in voedingsmiddelen (voedingssupplementen, zuigelingenvoeding, babyvoeding, ...). De introductie van meer strikte regelgeving maakt de ontwikkeling van goed gevalideerde internationaal aanvaarde analytische methoden met hoge nauwkeurigheid en precisie nog meer noodzakelijk. Het is echter niet duidelijk of de huidige gestandaardiseerde methoden kunnen gebruikt worden voor de bepaling van bepaalde vitamines in bepaalde matrices. De ontwikkeling van nieuwe methoden voor de analyse van vitamines verloopt echter zeer traag, vooral voor de wateroplosbare vitamines. Een harmonisatie en/of uitbreiding van de huidige gestandaardiseerde methoden en matrices van de verschillende officiële organisaties zou al een eerste stap zijn om aan de nieuwe regelgeving te voldoen en om het overzicht over de beschikbare methoden te behouden.

Mieke Vanbrabant, FLWT  
mieke.vanbrabant@favv.be





"You have a fear of Thiamine, Riboflavin,  
Niacin, etc.,...better known as a  
Vitamin B Complex."

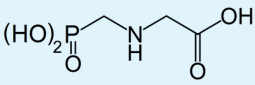


# Glyfosaat in al zijn toestanden

S. Gosciny en V. Hanot  
Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid  
Dienst pesticiden

## Een succesvolle molecule

Sinds glyfosaat in 1974 voor het eerst op de markt kwam, is het de meest gebruikte fytosanitaire component ter wereld geworden (een miljoen ton verkocht in 2010). Zijn toenemende populariteit hangt nauw samen met zijn doeltreffendheid in de landbouw, de lage kostprijs en vooral het gunstige toxicologische profiel (zie cv). Het voornaamste afbraakproduct van glyfosaat is aminomethylfosfonzuur (AMPA) dat dezelfde chemische en toxicologische eigenschappen bezit als de moedermolecule. In voedingsmiddelen wordt AMPA slechts in 2 % van de gevallen opgespoord, wat verklaart dat de maximale residugrens alleen voor glyfosaat geldt. Wegens dezelfde analytische problemen werden de werkwijzen voor de bepaling van glyfosaat ook voor AMPA op punt gesteld. Zo krijgt men niet alleen meer gegevens voor de risico-evaluatie maar is men ook klaar, als de definitie van het residu in de toekomst zou wijzigen, zonder een bijkomende ontwikkelings- en validatiefase te moeten doorlopen.

<b>Glyfosaat</b>	
<b>Curriculum Vitae</b>	
<b>Chemische</b>	<b>Eigenschappen</b> $C_3H_8NO_3P = N$ - (fosfonomethyl)glycine Moleculaire massa = 169,07 pKa: 0,78-2,29-5,96-10,98 zwak organisch zuur oplosbaarheid in water: 12 g/L op 25°C
<b>Werkings</b>	<b>mechanisme</b> Remt het enzym 5-enolpyruvylshikimaat-3-fosfaatsynthase (EPSPS) dat betrokken is in de metabolische weg van shikiminezuur. Deze weg is afwezig bij dieren, wat een verklaring kan zijn voor de hoge DL <sub>50</sub> via orale weg: <ul style="list-style-type: none"><li>• Vrouwelijk geit 3.530 mg/kg</li><li>• Vrouwelijke rat 2.686 mg/kg</li></ul>
<b>Gebruik</b>	<b>in de landbouw</b> Systemisch breedspectrum herbicide waardoor het zeer soepel in het gebruik is: op alle soorten gewassen, en voor het onderhoud van stadsruimten (groene ruimten, tuinen, wegen, spoorwegen). Massaal gebruik bij genetisch gewijzigde gewassen
<b>Toxicologie</b>	<b>Afbraak</b> Matig persistent in de bodem, halfwaardetijd van 20 tot 100 dagen, het ondergaat een microbiële degradatie die het uiteindelijk in kooldioxide en eenvoudige niet-organische bestanddelen metaboliseert. Door het massale gebruik wordt het 'relatief weinig toxische' aspect voor het milieu in twijfel getrokken. <b>Blootstelling</b> Weinig oplosbaar in vetten en dus weinig risico op bioaccumulatie. Het wordt via orale weg onvolledig geabsorbeerd (15 tot 40 %).

## Een 'diva' in de analytische scheikunde

In vergelijking met andere herbiciden is glyfosaat het moeilijkst te analyseren. Dat komt door de fysisch-chemische eigenschappen die elke fase van de analyse bemoeilijken:

### *De voorbereiding van het monster*

Glyfosaat is zeer polair, oplosbaar in water en niet-oplosbaar in organische oplosmiddelen waardoor de mogelijkheden voor extractie beperkt zijn. Daarom moet in deze fase onvermijdelijk water worden gebruikt. In het extract vindt men echter ook alle andere water oplosbare componenten van de matrix (suikers, aminozuren, zouten, ...) die met de bepaling van het glyfosaat gaan interfereren. Een zuiveringsfase op kolom is moeilijk vanwege de amphotere aard van glyfosaat. Een zuivering van het type vloeistof-vloeistofextractie is minder moeilijk qua rendement en daarom de meest verspreide optie in de literatuur. Ze vereist echter meer handelingen en verlengt de duur van de analyse.

### *Scheiding en opsporing*

Niet alleen zijn deze componenten zeer polair en ionisch maar ze bezitten bovendien geen chromofore groepen, waardoor ze met fluorescentie of via absorptie in ultraviolet licht niet kunnen worden opgespoord. In deze fase van de analyse moet er een moeilijke keuze gemaakt worden: derivatiseren of niet?

Met de derivatiseringstechniek kunnen bestanddelen geanalyseerd worden die niet direct met gas (GC) en vloeibare (LC) chromatografie kunnen worden geanalyseerd. Per chemische reactie voegt men een agens (chromofoor) toe op een of meer porties van de doelmolecule. De gederivatiseerde component vertoont veranderingen in zijn eigenschappen ten gunste van zijn analyse. In het geval van glyfosaat krijgt hij door de derivatisering een chromofoor, vermindert het zijn polariteit en maakt het, in functie van het gekozen derivatiseringsreagens zelfs zijn GC-analyse mogelijk. Deze techniek wordt niet op prijs gesteld door analisten omdat ze de optimalisatie van verschillende parameters vereist (temperatuur, reactietijd, concentratie en zuiverheid van het reagens, manipulatie-tijd van de laborant). Als men deze zware stap wil vermijden, zijn er interessante opties te vinden in vloeistof chromatografie zoals hydrofiele interactievloeistofchromatografie (HILIC), ionenchromatografie (IC) of de baseparing van ionen die aan zeer polaire en ionische moleculen zijn aangepast. De sterkte van deze scheidingstechnieken hangt echter grotendeels af van een doorgedreven zuivering of vereist een hoge verdunningsfactor van het extract en dus een zeer gevoelig detectiesysteem. Derivatisering of directe analyse hebben elk hun voor- en nadelen. De techniek moet rationeel gekozen worden als men tot een rendabele werkwijze wil komen. In beide gevallen is detectie via massaspectrometrie mogelijk en aanbevolen om problemen met interferentie en gevoeligheid te vermijden die met andere detectoren (UV, elektrochemische, ...) optreden.

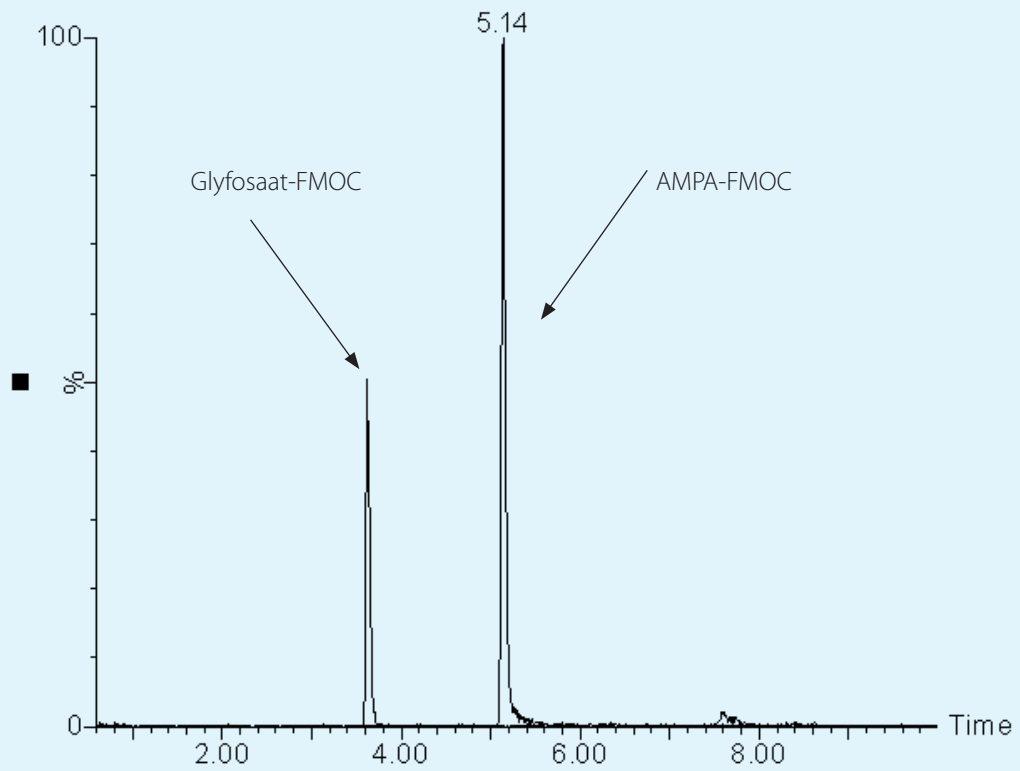


## Achter de schermen van een methode

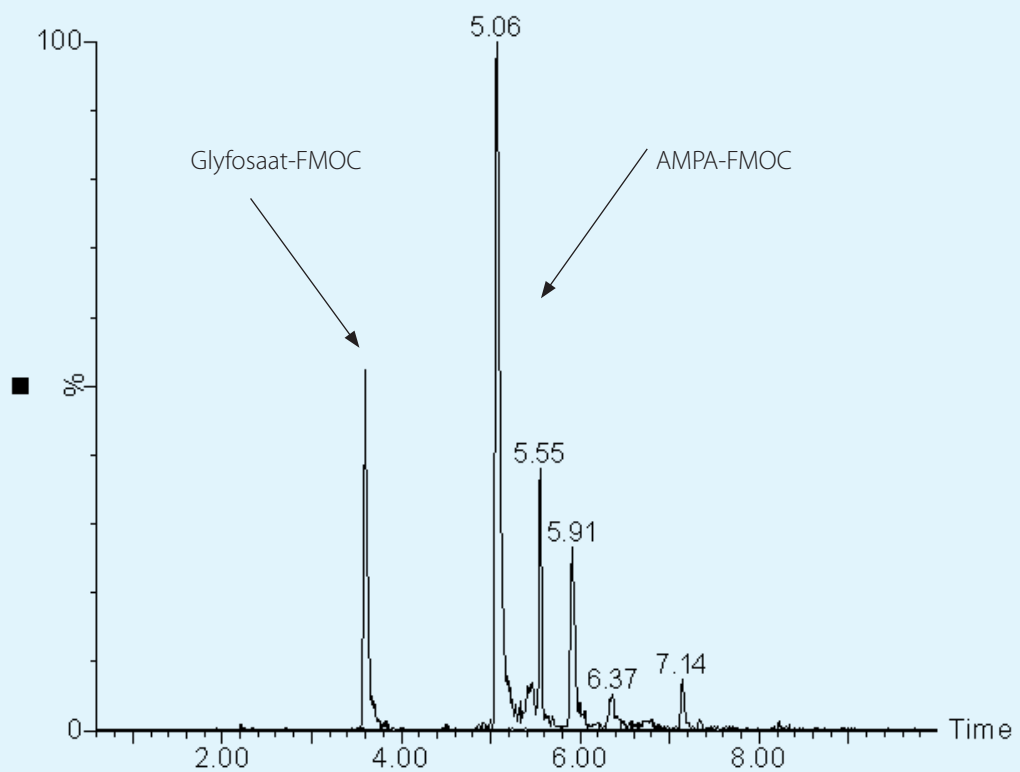
Sinds begin 2011 zijn alle laboratoria die bij het Europese controleplan betrokken zijn verplicht om glyfosaat in graangewassen te analyseren. Die verplichting vertaalt zich in de noodzaak om een sterke en gevalideerde analysemethode te ontwikkelen die gemakkelijk in de routineanalyses van het laboratorium geïntegreerd kan worden. In dit kader heeft het WIV in samenwerking met het AGES-laboratorium (het Oostenrijkse Agentschap voor gezondheid en voedselveiligheid) een analysemethode van glyfosaat en zijn metabooliet AMPA op punt gesteld. De directe analysemethoden (zonder derivatiseren) zijn misschien zeer aantrekkelijk omdat ze geen beheer van de derivatiseringsreactie vereisen, maar ze leggen chromatografische veranderingen (mobiele fasen, kolommen, duur van de inwerkingstelling) op die niet noodzakelijk compatibel zijn met de routineanalyses. We hebben de voorkeur gegeven aan een protocol dat toelaat om de instrumentele voorwaarden van de multi-residu-analyses te behouden (klassieke C18 kolom en mobiele water-methanol fasen gebufferd met ammoniumacetaat met een  $\text{pH} \pm 6$ ). Het is dus de optie met een derivatiseringsstap die werd gekozen. Het gekozen reagens is 9-fluorenylmethyl-chloroformaat (FMOC) dat dankzij de hydrofobe groep toelaat om de polariteit van de doelmolecule te verlagen en dus zijn retentie op een reversed phase C18 kolom (zie chromatogram) en de molmassa te verhogen zodat de MS/MS-detectie vergemakkelijkt. FMOC zal zich op de aminefunctie plaatsen door een HCl-molecule vrij te maken. De reactie moet in een basisch milieu plaatsvinden (men gebruikt een boraatbuffer-Na  $\text{pH}=9$ ) om het gevormde zuur te neutraliseren en de reactie in de richting van de vorming van glyfosaat-FMOC te bevorderen. Helaas is FMOC niet specifiek voor glyfosaat maar reageert het met alle aminefuncties en sterk met water. De reagensconcentratie was bepalend om een solide methode te verkrijgen, daarom is de gekozen concentratie (1 mg/ml) sterk overdreven en garandeert ze:

- dat het surrogaat en de doelbestanddelen niet concurreren en op gelijke wijze met FMOC reageren;
- dat de reactie met het water en de amines van het extract niet giftig is voor de doelbestanddelen.

Het overschot van het reagens wordt met dichloormethaan weggewassen en het resultaat van de reactie wordt direct gefilterd voordat het geïnjecteerd wordt.



Figuur 1: UPLC-ESI+MS/MS chromatogram van glyfosaat-FMOC en AMPA-FMOC in een kalibratie-oplossing van 100 µg/kg



Figuur 2: UPLC-ESI+MS/MS chromatogram van glyfosaat-FMOC en AMPA-FMOC in een monster haver belast op 10 x LOQ (200 µg/kg)



## Een methode 'op maat'

De methode werd gevalideerd met naleving van de richtlijnen van het document SANCO/10684/2009. Bijgevolg:

- is er geen matrixeffect aanwezig, de ijklijn wordt dus voorbereid door de bestanddelen buiten de matrix te derivatiseren en dekt een gamma concentraties van 20 µg/kg tot 500 µg/kg;
- zijn de omstandigheden van de derivatisering goed aangepast omdat men rendementen met grenskwantificaties bekomt (20 µg/kg) van 101,1 % (RSD van 6,9 %) en 112,9 % (RSD van 11,9 %) respectievelijk voor glyfosaat en AMPA.

De bepaling van sporen glyfosaat is zeker complex. Als de analyse echter verstandig gekozen wordt, komt men tot zeer goede resultaten. In ons geval heeft de keuze om via isotopische verdunning te kwantificeren toegelaten om goed zichtbare rendementen te verkrijgen zonder zich zorgen te maken over eventuele verliezen in de snelle fase (1 min) van simultane extractie-zuivering. De derivatisering is een succes omdat ze toelaat om de analyse van glyfosaat gemakkelijk in te passen na routineanalyses zonder verandering op het instrumentele niveau, wat een gewaardeerde tijdwinst oplevert.

Severine.Gosciny@wiv-isp.be

Vincent.Hanot@wiv-isp.be

# Migratierisico's in traditionele, metalen theepotten



Het gebruik van traditionele theepotten heeft in Brussel een loodvergiftiging veroorzaakt bij een volledige familie. Verschillende staalnames op theepotten werden uitgevoerd door het WIV (Wetenschappelijk Instituut voor de Volksgezondheid) in samenwerking met het Brussels Intercommunaal Laboratorium voor Chemie en Bacteriologie en heeft het FAVV (Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen) een recall uitgevoerd.

De concentratie van de toxische metalen (lood en nikkel) die migreren naar de thee toe blijken bijzonder alarme-rend en dragen duidelijk bij tot grote vergiftigingsrisico's.

Gezien de gemeten waarden, staat het vast dat het gebruik van deze theepotten in bepaalde gevallen aanleiding kan geven tot grote chronische loodvergiftigingen.

Immers de overschrijding van de toxicologische referentiewaarden voor lood en nikkel zijn zeer verontrustend. Alhoewel de gestelde hypothesen zeker niet maximalistisch willen zijn, tonen ze aan dat er een mogelijkheid bestaat dat de Aanbevolen Dagelijkse Hoeveelheid (ADH) voor lood tot 90 maal wordt overschreden.

Bepaalde factoren zoals het langer laten staan van de thee (migratie tot 9 maal hoger na 1 uur ten opzichte van 15 minuten) kunnen de problematiek nog erger maken.

Het gebruik van citroen toont ook een verergering aan vermits de niveaus van migratie tot 10 maal hoger kunnen liggen ten opzichte van thee natuur.

Er dient ook aandacht besteed te worden aan de hoogste risicogroepen, zoals bijvoorbeeld aan kinderen (zie bovenstaande casus) vermits deze laatste nog gevoeliger zijn dan volwassenen aan loodvergiftiging door de hogere opname van lood (5 maal hoger).



Tabel 1:

De onderstaande tabel geeft de concentraties aan van lood teruggevonden in de onderzochte theepotten; de opname gebaseerd op een verbruik van vier tassen per dag en de procentuele ADH dat dit verbruik met zich meebrengt.

Lood (hypothese 4 tassen/dag [800 mL]) en verblijf van 15 minuten in de theepot				
nr.	Type thee in de theepot	mg/L	mg/dag	% ADH
Theepot nr.1	Thee natuur	1,74	1,4	<b>650</b>
Theepot nr.2	Thee natuur	0,84	0,7	<b>314</b>
Theepot nr.3	Thee natuur	0,71	0,6	<b>264</b>
Theepot nr.4	Thee natuur	0,18	0,1	66
Theepot nr.5	Thee natuur	1,19	1,0	<b>444</b>
Theepot nr.6	Thee natuur	0,10	0,1	36
Theepot nr.7	Thee natuur	1,49	1,2	<b>557</b>
Theepot nr.8	Thee natuur	0,32	0,3	<b>118</b>
Theepot nr.9	Thee natuur	0,20	0,2	73
Theepot nr.10	Thee natuur	0,34	0,3	<b>129</b>
Theepot nr.11	Thee natuur	4,90	3,9	<b>1830</b>
Theepot nr.1	Thee citroen	23,97	19,2	<b>8961</b>
Theepot nr.2	Thee citroen	9,10	7,3	<b>3400</b>
Theepot nr.3	Thee citroen	8,30	6,6	<b>3101</b>
Theepot nr.4	Thee citroen	10,21	8,2	<b>3816</b>
Theepot nr.5	Thee citroen	13,12	10,5	<b>4905</b>
Theepot nr.6	Thee citroen	1,07	0,9	<b>399</b>
Theepot nr.7	Thee citroen	16,12	12,9	<b>6027</b>
Theepot nr.8	Thee citroen	0,38	0,3	<b>142</b>
Theepot nr.9	Thee citroen	0,42	0,3	<b>157</b>
Theepot nr.10	Thee citroen	0,65	0,5	<b>243</b>
Theepot nr.11	Thee citroen	17,60	14,1	<b>6578</b>

In een gezamenlijk advies (Sci Com 06-2011 en CSS N°8726) goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité van het FAVV op 24 juni 2011 en gevalideerd door de Hoge Gezondheidsraad (HGR) op 6 juli 2011, is het volgende besloten: "Hoewel enkel een uitgebreide studie, inclusief biomonitoring, ondubbelzinnig het risico verbonden aan het gebruik van traditionele, messing theepotten kan weergeven, wordt geadviseerd om het gebruik van dergelijke theepotten af te raden en de verkoop ervan te verbieden. Bovendien blijken naast dergelijke theepotten, ook andere contactmaterialen (keramische potten of schalen zoals bv. tajine) waarvan het gebruik eerder cultureel bepaald is, belangrijke risicofactoren voor de blootstelling aan metallische elementen (lood in het bijzonder) te zijn. Bijgevolg is een gerichte communicatie die wijst op de risico's van dergelijke contactmaterialen ten stelligste aangewezen. Daarenboven dient in het FAVV controleprogramma de nodige aandacht besteed te worden aan de migratie van metallische elementen (lood, maar ook andere zoals nikkel) uit soortgelijke ambachtelijke voorwerpen 2/12 (bv. messing, geëmailleerd gietijzer) en keramische materialen die met voeding in contact komen."

Fabien Bolle, ISP  
fabien.bolle@wiv-isp.be

# Voedselallergieën

## Een probleem voor de volksgezondheid

Voedselallergieën zijn een belangrijk probleem voor de volksgezondheid, dat sinds een aantal jaren steeds ernstiger wordt. Het probleem treft 2 tot 3 % van de wereldbevolking en de prevalentie bij kinderen bereikt 6 à 8 %. Daarenboven werd in de loop van de laatste tien jaar een verhoging in ernst en frequentie van de allergische reacties vastgesteld (Hoge Gezondheidsraad, publicatie N°8513). Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie zouden voedselallergieën het vierde grootste probleem voor de volksgezondheid zijn.

Voedselallergieën moeten worden onderscheiden van voedselintoleranties, zoals lactose-intolerantie of coeliakie. Allergieën zijn abnormale IgE-afhankelijke immunologische reacties tegen een voedingsmiddel. Intoleranties zijn ofwel niet-immunologische reacties zoals bijvoorbeeld in geval van lactose-intolerantie (bij personen met lactase deficiëntie), ofwel immunologische maar niet IgE-afhankelijke reacties zoals bij gluten intolerantie of coeliakie.

De symptomen zijn uiteenlopend (huiduitslag, diarree, constipatie, enz.) en kunnen ernstig zijn, zoals ademhalingsproblemen, cardiovasculaire problemen of anafylactische shock. Overlijdens ten gevolge van allergische reacties zijn eveneens beschreven. Minimale hoeveelheden, van een grootteorde van mg proteïnen, kunnen reacties uitlokken bij gevoelige patiënten. Enkel het volledig weren van het allergene levensmiddel kan bij patiënten allergische reacties vermijden. Voor hen is het dus van primordiaal belang over een correcte en volledige etikettering van hun voeding te beschikken. De Europese Richtlijn 2007/68/EC verplicht de etikettering van 14 ingrediënten op voorverpakte producten:

- Granen die gluten bevatten (dit zijn tarwe, rogge, gerst, haver, spelt, kamut en hybride soorten ervan)
- schaaldieren
- eieren
- vissen
- pinda
- soja
- melk
- schaalvruchten [ dit zijn amandelen (*Amygdalus communis* L.), hazelnoten (*Corylus avellana*), noten (*Juglans regia*), cashewnoten (*Anacardium occidentale*), pecannoten [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], bresilliennenoten (*Bertholletia excelsa*), pistachenoten (*Pistacia vera*), macademia noten of Queensland noten (*Macadamia ternifolia*) ]
- selder
- mosterd
- sesam
- weekdieren
- lupinen
- sulfieten

en hiervan afgeleide producten (op enkele uitzonderingen na).

Deze wetgeving beoogt allergenen die bewust aan het product zijn toegevoegd. Maar deze allergenen kunnen ook effectief onbedoeld worden toegevoegd door kruiscontaminatie tussen verschillende productielijnen, bijvoorbeeld via de grondstoffen of via het personeel. Deze allergenen vormen een risico voor de allergische consument. Teneinde de aanwezigheid van deze allergenen te kunnen nagaan, is het noodzakelijk over betrouwbare en geldige analytische werktuigen te beschikken.



## De analysemethoden

De twee belangrijkste analytische technieken die op dit ogenblik worden gebruikt voor het opsporen van allergenen zijn: PCR (Polymerase Chain Reaction) en immunochemische methoden zoals ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) of (Lateral Flow Device). Tabel 1 geeft een vergelijking van deze twee technieken. PCR is gebaseerd op specifieke DNA-detectie van het allergeen in het geteste product. Het voordeel ervan is dat het een techniek is met grote specificiteit. Hierdoor kunnen echter zwaar geraffineerde producten die nog DNA maar geen proteïnen van het allergeen bevatten als positief worden gedetecteerd terwijl ze geen risico inhouden voor de allergische consument. Daarnaast zijn er producten, zoals melk, eieren en levensmiddelenextracten, die een zeer lage hoeveelheid DNA bevatten in verhouding tot proteïnen. Deze zijn bijgevolg niet detecteerbaar door middel van PCR.

Immunochemische methoden zijn gebaseerd op de interactie tussen antilichamen en hun antigenen, in dit geval de proteïnen van het allergene voedingsmiddel. ELISA is tegenwoordig de meest gebruikte methode voor de detectie van allergenen. Het is een eenvoudige, snelle, gevoelige (in de grootteorde van mg/kg) en specifieke techniek. Er zijn verschillende benaderingen gekozen bij de ontwikkeling van ELISA technieken voor allergeen-detectie. De antilichamen zijn ofwel gericht tegen specifieke proteïnen, al dan niet met een allergeen potentieel, ofwel tegen extracten van oplosbare proteïnen. In tegenstelling tot detectie van DNA, kan detectie van proteïnen interpretatie geven over het potentieel risico voor de allergische consument. Maar er zijn proteïnen die gevoelig zijn aan productiebehandelingen (koken, sterilisatie, fermentatie) en die kunnen gedeeltelijk gedegradeerd of omgezet zijn. Ze kunnen daardoor niet meer detecteerbaar zijn door het antilichaam van de test, terwijl hun allergene karakter blijft of zelfs toeneemt. Neo-allergenen kunnen eveneens gevormd worden door transformatie van levensmiddelen zoals beschreven ten gevolge van het roosteren van pinda's. Een ander probleem met immunochemische methodes is de mogelijkheid van de antilichamen om proteïnestructuren te herkennen die gelijkaardig zijn aan de bedoelde proteïnen. Men spreekt in dit geval van kruisreactiviteit wat aanleiding kan geven tot vals positieve resultaten. Dit kan bijvoorbeeld voorkomen binnen de familie van de schaalvruchten, die gelijkaardige proteïnen bezitten.

LFD zijn snelle testen (5-10 min). Wanneer het allergeen aanwezig is in het staal, zal een gekleurde streep verschijnen op de dipstick. Deze testen vertonen wel nog problemen bij controle van allergenen in voedingsmiddelen ten gevolge van talrijke vals positieve resultaten en een gebrek aan reproduceerbaarheid.

Massaspectrometrie (MS) wordt meer en meer beschreven in de literatuur als methode om een oplossing te bieden ten aanzien van de nadelen van de andere twee methoden: o.a. specificiteit, doelgerichtheid op allergene proteïnen en mogelijkheid om meerdere allergenen simultaan te analyseren. Na extractie worden de proteïnen geknipt door een enzym (voornamelijk trypsine) ter vorming van peptiden. Deze worden vervolgens chromatografisch gescheiden en geïdentificeerd met behulp van een massaspectrometer. De effectiviteit van de extractie en matrixinterferenties zijn de twee voornaamste parameters die de gevoeligheid van deze techniek beperken. Daarenboven behoeft deze methode kostelijk materiaal en zeer bekwaam personeel. Ze wordt bijgevolg nog niet in routine toegepast.

## Het tekort aan gegevens

Op dit ogenblik zijn er erg weinig validatiegegevens beschikbaar om de resultaten bekomen met deze methoden te vergelijken. Dit is zeer zeker te wijten aan het gebrek op internationaal niveau van geharmoniseerde validatieprotocollen en het gebrek aan erkend referentiemateriaal. Standaarden worden inderdaad door de onderzoeksteams specifiek voor de gebruikte test ontwikkeld. Een protocol voor geharmoniseerde validatie werd gepubli-

ceerd voor methoden voor detectie van allergenen met behulp van ELISA (Abbott et al., 2010). Het gebruik van referentiestandaarden en geaddeerde referentiematerialen wordt aanbevolen. Maar een perfect representatief materiaal is zeldzaam. Het eiwitprofiel van allergene voedingsmiddelen varieert o.a. afhankelijk van de soort, de klimatologische condities, de plaats van kweek en het transformatieproces. Daarenboven kan, afhankelijk van de matrix, het allergeen ruw (melkpoeder in sojamelkpoeder) of getransformeerd (melkpoeder in brooddeeg voor het bakken) teruggevonden worden. Verschillende internationale projecten (MoniQA, Europrevall) hebben het ontwikkelen van voorbeeldmateriaal, representatief voor kruiscontaminaties die kunnen plaatsvinden, als doel (Dumont et al., 2010). Resultaten van interlaboratoriumvalidaties op basis van het geharmoniseerd protocol zouden moeten worden gepubliceerd teneinde de gebruikte ELISA methoden te kunnen vergelijken.

## Conclusies

De laatste jaren is er belangrijke vooruitgang geboekt binnen het veld van voedselallergieën, zowel op klinisch gebied, als op gebied van evaluatie aan de hand van analytische hulpmiddelen, en beheer van het risico op kruiscontaminaties in de levensmiddelenindustrie.

Talrijke zaken moeten nog onderzocht worden, waaronder de bepaling van detectielimieten voor analytische methoden in functie van drempelwaarden voor klinische gevoeligheid, en de interpretatie en correlatie tussen verschillen analytische meettechnieken.

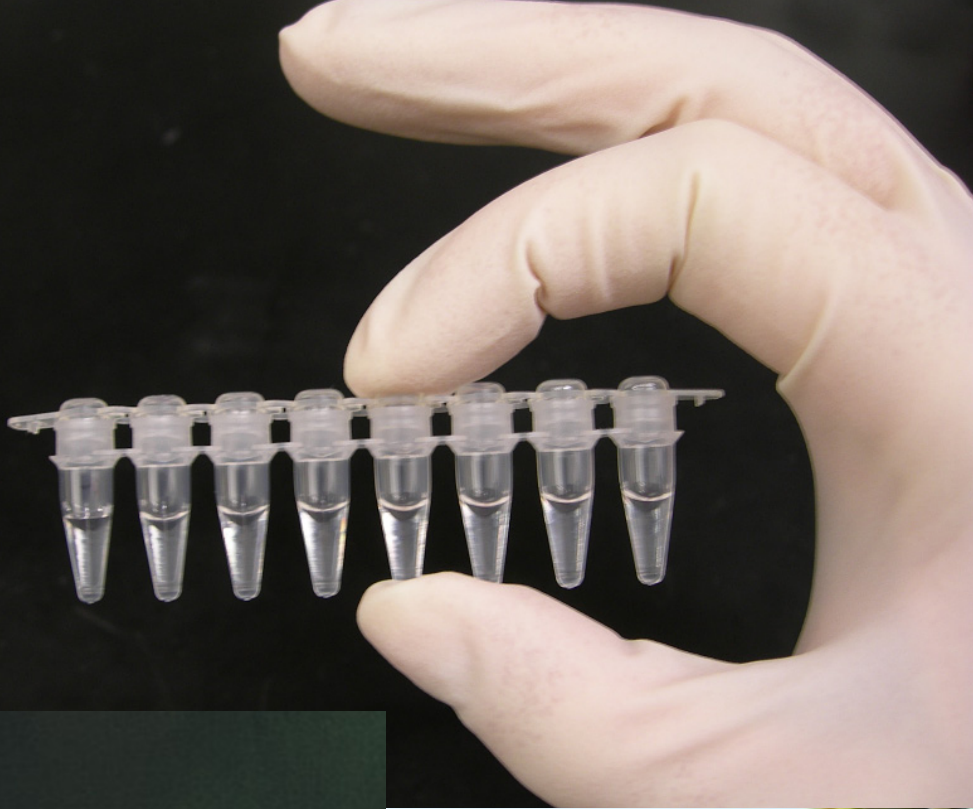
Daarom heeft het FAW de CER groep en het ILVO-T&V aangesteld als Nationaal Referentie Laboratorium, met als belangrijkste taken antwoorden te vinden op deze vragen.

Tabel 1: Vergelijking van de twee belangrijkste analysetechnieken voor allergenen. (Kerbach et al., 2009)

	<b>Immunochemisch</b>	<b>PCR</b>
Detectie	Proteïnen	DNA
Specificiteit	Kruisreactiviteit mogelijk	Zeer specifiek
Gevoeligheid	Grootteorde van 1 mg/kg	Grootteorde van 10 mg/kg
Gebruiksgemak	Eenvoudig en snel	Meer arbeidsintensief
Beïnvloeding van het signaal	Biologische variatie Klimatologische variatie Effectiviteit van de extractie Wijzigingen (glycosylatie, fosforylatie, etc.) ten gevolge van behandelingen tijdens de productie Matrix effect	Stabiel genotype  Effectiviteit van de extractie DNA stabiel bij hoge temperaturen maar fragmenteert mogelijk bij lage pH Matrix effect – PCR-inhibitors in de matrix

### Referenties

- Kerbach S., Alldrick A.J., Crevel R.W.R., Dömötör L., DunnGalvin A., Mills E.N.C., Pfaff S., Poms R.E., Popping B., Tömösközi S. (2009) Managing food allergens in the food supply chain – viewed from different stakeholders perspectives. *Qual. Assurance & Safety of Crops & Foods* 1(1), 50-60
- Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B., Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M., Wehling P., Taylor S.L., Poms R.E., Delahaut P. (2010) Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int* 93(2), 442-450
- Dumont, V., Kerbach, S., Poms, R., Johnson, P., Mills, C., Popping, B., Tömösközi, S. and Delahaut, P. (2010), Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2(4), 208–215.





# NRL-GGO: het GMOSeek onderzoeksproject (2009 – 2011) voor het opsporen van GGO's

WIV: Sylvia Broeders, Elodie Barbau-Piednoir, Guillaume Mbongolo Mbella, Nina Papazova, Antoine Pouppez en Nancy Roosens

ILVO: Isabel Taverniers en Marc De Loose

CRA-W: Frédéric Debode, Gilbert Berben en Eric Janssen

## Inleiding

Het GMOseek onderzoeksproject (SAFEFOODERA: "Food Safety – forming a European platform for protecting consumers against health risks") werd gefinancierd door de Europese Commissie in het kader van het ERA-NET platform voor de bescherming van de consument tegen gezondheidsrisico's en liep van 1 juni 2009 t/m 31 mei 2011. Bij het project waren zes Europese partners uit verschillende lidstaten betrokken: het Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W, BE), het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO, BE), het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP, BE), het Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL, DE), het Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection (JRC-IHCP, IT) en het Nacionalni Inštitut za Biologijo (NIB, SI). De drie Belgische laboratoria die deelnamen aan het project vormen samen het Nationaal Referentielaboratorium voor genetisch gewijzigde organismen (NRL-GGO). Het project bestond uit verschillende onderdelen ('work packages', WP) en elk laboratorium nam deel aan minstens twee ervan. Het onderwerp van het project was het opsporen van genetisch gewijzigde organismen (GGO's). Als we rekening houden met de uitgebreide reglementering voor GGO's, het snel groeiende aantal toegelaten GGO's dat op de markt komt en het toenemende risico om niet-toegelaten GGO's aan te treffen, is het noodzakelijk om nieuwe opsporingsmethoden te ontwikkelen en om de bestaande methoden te verfijnen. De belangrijkste resultaten van het project zijn:

- Opstellen van een gegevensbestand dat alle beschikbare informatie bevat over bestaande GGO's,
- Ontwikkelen van een bio-informatiesysteem dat toelaat om een maximaal aantal in de EU toegelaten GGO's te selecteren op basis van de screening van een optimale groep genetische elementen,
- Ontwikkeling en in-house validatie van de SYBRGreen qPCR screening methoden,
- Ontwikkeling en in-house validatie van TaqMan qPCR screening methoden,
- Ontwikkeling en in-house validatie van een pentaplex qPCR screening methode,
- Overdracht van de nieuwe qPCR screening methoden naar een andere partner,
- Opstellen van een document met richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve PCR methoden.

Hierna wordt een bondig overzicht gegeven van het werk uitgevoerd door de drie Belgische NRL-GGO laboratoria.

## Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP)

Het GGO-laboratorium van het Platform Biotechnologie en moleculaire Biologie van het WIV-ISP was betrokken bij de onderdelen WP2 en WP4 van het GMOseek project.

Bij WP2 bestond het aandeel van het laboratorium in de extractie en karakterisatie van het genomisch DNA (gDNA). Daartoe werd Gecertificeerd Referentiemateriaal (CRM) aangeschaft en werd het gDNA geïsoleerd met behulp van extractiemethoden die op Europees niveau toegepast worden. Het laboratorium kon aantonen dat het gDNA dat uit de verschillende matrices geëxtraheerd werd voldoende was om de behoeften van de partnerlaboratoria te dekken bij de ontwikkeling van hun methoden, dat de kwaliteit ervan goed was en dat er geen inhibitie optrad. Het geëxtraheerde gDNA werd onder de partners verdeeld volgens hun behoefte. Daarnaast werd er ook voor elke ontwikkelde methode een plasmide ontworpen en gevalideerd door het GGO laboratorium.

Voor WP4 ontwikkelde en valideerde het GGO laboratorium drie nieuwe screeningmethoden voor de genetische elementen pNOS, pFMV en Cry3Bb die aangetroffen worden in verscheidene GGO events (GGO lijnen). Deze methoden laten toe om meer GGO events te dekken en om het discriminerend vermogen van het vroeger gevalideerde en gepatenteerde 'Combinatory SYBRGreen qPCR screening' (CoSYPS) systeem te verhogen. Dat systeem maakt het mogelijk om vast te stellen welke GGO events er mogelijk kunnen aanwezig zijn in een monster aan de hand van een combinatie van genetische elementen en wordt toegepast voor de routine-analyse van monsters voedingsmiddelen en voeders in het GGO laboratorium onder ISO 17025 accreditatie. Voor elke nieuwe genetische merker kon het GGO laboratorium aantonen dat de parameters die tijdens de in-house validatie beoordeeld moesten worden, binnen de criteria vielen. Alle informatie werd verzameld in een validatiedossier. Als laatste stap werden de drie methoden overgedragen aan het partnerlaboratorium JRC-IHCP samen met het nodige materiaal en het te volgen analyseprotocol. Vergelijking van de resultaten van beide laboratoria toonde de reproduceerbaarheid van de drie methoden aan, wat belangrijk is in het kader van de harmonisatie van detectiemethoden waar de EU naar streeft.

Tot slot kan er besloten worden dat de drie nieuwe screeningmethoden geschikt waren voor het opsporen van GGO's in monsters voedingsmiddelen en voeders en geïntegreerd konden worden in het CoSYPS systeem, wat een efficiëntere GGO detectie moet toelaten qua kosten en tijd.

## Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO)

ILVO droeg bij aan drie onderdelen van het GMO-seek project : WP1 : Bio-informatica, WP3 : DNA gebaseerde hybridisatiemethoden en WP4 : Referentiematerialen en Richtlijnen voor validatie.

In het kader van WP1 werd in-house het "GMOmatrix" databestand ontwikkeld dat de relevante informatie bevat van alle GGO events die wereldwijd bestaan. Regelmatige controle en bijhouden van dit bestand was een van de taken waar het ILVO actief bij betrokken was. Om de zes maanden werden alle GGO events (records) in het databestand gecontroleerd op volledigheid en juistheid, fouten werden aangegeven en nieuwe gegevens over gekende GGO events of nieuwe GGO events werden aan het bestand toegevoegd. Daarbij vormde dit databestand de basis voor de ontwikkeling van nieuwe bio-informaticatools die nuttig zijn bij de keuze en het ontwerp van methodieken voor de screening van GGO's als een eerste stap in de testprocedures van de officiële laboratoria. De taak binnen WP3, aangeduid als 'NAIMA platforms for multiplex screening on microarray', had als doel het optimaliseren en evalueren van de NASBA-Integrated Multiplex Amplification (NAIMA) screening technologie die ontwikkeld werd door het NIB (Ljubljana, Slovenië). Na optimalisatie en in-house validatie aan het NIB, trad het ILVO op als transfer laboratorium om de hexaplex methode verder uit te testen. Het ILVO voerde amplificatiereacties (NASBA) uit evenals hybridisatie van de reacties op vooraf ontworpen micro-arrays met materiaal en volgens de precieze protocols van het NIB. De micro-arrays werden teruggestuurd naar het NIB voor uitlezen en de analyse van de gegevens. Wegens de beperkte robuustheid en de moeilijke overdracht en invoering van de technologie in het algemeen, werd het NAIMA multiplex platform niet in aanmerking genomen voor verdere inter-laboratoriumtesten.



## Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W)

De Unité Authentification et traçabilité van het CRA-W droeg bij tot het succes van het project door zijn medewerking aan WP1, WP2 en WP4 (ontwikkeling van plasmide referentiemateriaal).

WP1 van het project bestond uit het opstellen van een GGO matrix met alle verzamelde informatie over de genen, promotors en terminators die gebruikt worden in GGO constructs. CRA-W leverde de matrix met de informatie die ze ter beschikking had en nam deel aan de theoretische en praktische controle van de informatie. Het CRA-W ontwikkelde ook enkele eenvoudige Excel-tools voor het opzoeken van gegevens in de matrix of voor ondersteuning bij het nemen van beslissingen. Deze tool zal vrij toegankelijk zijn en zal zeer nuttig zijn voor controle- of onderzoekslaboratoria.

Bij WP2 was de doelstelling de ontwikkeling van nieuwe screeningmethoden. In deze context ontwikkelde het CRA-W nieuwe screeningmethoden op basis van de real-time PCR techniek met TaqMan probes. Twee methoden gericht op de Ubiquitine-promotor van maïs (pUbi) en de terminator E9 van de erwt (tE9) werden ontwikkeld en in-house gevalideerd waarbij rekening gehouden werd met de acceptatiecriteria zoals specificiteit, gevoeligheid, detectielimiet, de efficiëntie van de amplificatie en de fractie aan vals positieve en vals negatieve resultaten. De pUbi en tE9 methoden werden met succes overgedragen naar het LGL laboratorium voor evaluatie. Anderzijds evalueerde het CRA-W de simplexmethode (het p35S-nptII overgangsg gebied) en de multiplexmethoden (duplex PAT/bar, triplex p35S/tNOS/CTP2-CP4-EPSPS, pentaplex PAT/bar/p35S/tNOS/CPT2-CP4-EPSPS) die ontwikkeld werden door het LGL.

Er werden nog twee bijkomende methoden ontwikkeld door het CRA-W die geëvalueerd werden op een aantal acceptatiecriteria. Om vals positieve resultaten met de merker tE9 in een voedingsmiddel te vermijden wegens de aanwezigheid van erwt (de tE9 terminator is afkomstig van de erwt), werd een specifiek doelwit voor het opsporen van erwt ontwikkeld. Tenslotte werd ook een screeningtest voor de Cry1Ab genen ontwikkeld en de variatie van die doelwitsequentie werd onderzocht in de verschillende GGO events waarvoor referentiemateriaal beschikbaar was.

## Alle partners

De drie NRL-GGO laboratoria samen met de drie andere partners waren betrokken bij WP4 dat betrekking had op het opstellen van algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve multiplex methoden voor GGO's. Op basis van de officiële IUPAC, ISO en Codex Alimentarius richtlijnen werd een document opgesteld met betrekking tot de overeengekomen eisen die gesteld worden aan methode ontwikkeling en in-house validatie voor een GGO screening methode. Daarbij werd men het er ook over eens dat aan deze criteria moet voldaan worden vooraleer een methode volledig gevalideerd kan worden in een officiële vergelijkende inter-laboratorium test.



De projectmedewerkers

Sylvia.Broeders@wiv-isp.be  
isabel.taverniers@ilvo.vlaanderen.be  
Debode@cra.wallonie.be



# Naar een betere Europese samenwerking binnen het domein van de plantaardige quarantaine

T. Olivier, A. Chandelier, S. Steyer  
CRA-W: Unité Biologie des nuisibles et biovigilance

Alhoewel de Europese Unie beschikt over een gemeenschappelijke regelgeving betreffende de bescherming tegen het binnenbrengen van voor planten en plantaardige producten schadelijke organismen sinds 1976, blijft de geharmoniseerde toepassing van deze regelgeving bij de verschillende lidstaten nog steeds een onmogelijke onderneming.

Immers, deze harmonisatie botst op verschillende obstakels die tevens uitdagingen zijn voor de verschillende actoren betrokken in het domein van de quarantaine maatregelen in de plantaardige sector.

Deze zijn onder andere: het ontbreken van een Europees referentielaboratorium met betrekking tot de plantaardige quarantaine, de moeilijkheid om de wetgeving snel aan te passen aan opkomende plantenziekten en schadelijke organismen, de druk van de vrije wereldhandel, het veranderend klimaat, de uitdaging van de integratie van nieuwe lidstaten, maar vooral het ontbreken van een fytosanitaire risicoanalyse (PRA Pest Risk Analysis) op Europees niveau voor de meeste quarantaine organismen opgelijst in de Richtlijn 2000/29/EG.

Laten we ook niet vergeten dat de omzetting van een richtlijn met betrekking tot de plantaardige quarantaine nog steeds een verantwoordelijkheid is van de diverse overheden. De Nationale Instellingen voor Plantenbescherming (NPPOs) moeten een evenwicht vinden tussen de bescherming van hun nationale landbouw en de vrije markteconomie, uitgedragen door de Wereld Handels Organisatie (WTO) en de Europese Unie. Dit evenwicht moet de sanitaire en fytosanitaire maatregelen van de WTO in acht nemen (akkoord SPS - Sanitary and Phytosanitary Measures) die vereisen dat de invoerbepalingen met betrekking tot de quarantaine moeten berusten op een transparante wetenschappelijke analyse (PRA). Voor de tak van de geobserveerde invoer, heeft deze analyse tot doel dat er enerzijds een fytosanitaire risico-evaluatie wordt uitgevoerd, die bestaat in het vastleggen door wetenschappelijk onderbouwde bewijzen van de waarschijnlijkheid dat een nieuw schadelijk pathogeen met betrekking tot de landbouw en milieu wordt ingevoerd en zich verspreid in een afgebakende territoriale zone, en anderzijds, het beheer van de fytosanitaire risico's dat eruit bestaat om concrete maatregelen te voorzien om te vermijden dat een pathogeen opduikt en zich vestigt met betrekking tot de gevolgen op economisch vlak en milieu.

Het is in deze moeilijke context dat er onlangs verschillende Europese initiatieven zijn opgestart om een harmonisatie van het Europese beleid met betrekking tot de uniformisering van de Europese PRA. De Europese Commissie en de Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EFSA: European Food Safety Authority), in nauwe samenwerking met de verschillende NPPOs en met de Europese en Mediterrane organisatie voor de Bescherming van de Planten (OEPP – EPPO) waren de drijvende krachten voor deze initiatieven die uitmondten in het subsidiëren van verschillende onderzoeksprojecten.

Gezien de centrale rol van de PRA's in de harmonisatie met betrekking tot het beleid betreffende de plantaardige quarantaine in de Unie, heeft de Europese Commissie beslist elk onderzoeksproject dat betrekking heeft op deze

thematiek te financieren. Het betreft enerzijds het project PRATIQUE dat aansluit bij het 7de kaderprogramma voor technologisch onderzoek en ontwikkeling (FP7) en anderzijds het project PRIMA PHACIE gefinancierd door de EFSA. Het project PRATIQUE heeft als doel om de procedures van de PRA's in die zin te verbeteren, dat ze betrouwbaarder worden en praktischer voor de uiteindelijke gebruikers. Deze verbetering gaat, onder andere, over het opzetten van een gestructureerde inventaris van noodzakelijke gegevens voor de PRA's voor de EU en een betere integratie van de notie onzekerheid in het finaal resultaat van de PRA's.

In het project PRIMA PHACIE worden meerdere PRA-methodologiën getest op schadelijke organismen die opgenomen zijn in verschillende biologische rijken met als doel de robuustheid van de PRA's na te gaan. Het objectief is om één of meerdere methodologiën te selecteren die in de toekomst door de EFSA kunnen gebruikt worden om zo zijn rol als evaluator van het fytosanitaire risico in te toekomst te kunnen opnemen voor de EU en dit in samenwerking met expertengroepen en de OEPP.

Om deze PRA's op te starten en met wetenschappelijke gegevens te voeden achtte de Europese Commissie het wenselijk om, via de financiering van het onderzoeksproject EUPHRESKO II (een vervolg op een eerste project met dezelfde naam), een zelfdragende netwerkstructuur op te richten van de verschillende onderzoekscentra en van Europese geldschieters, teneinde een vereniging op te richten van expertise en financiering van de verschillende Lidstaten, problemen van dubbel werk en onsamenhangendheden te vermijden en nieuwe problematieken op te sporen. Deze structuur, waarin het Belgische Referentielaboratorium (CRA-W en ILVO) is vertegenwoordigd, zal dus een lobby rol spelen bij de Commissie teneinde het beleid van de Commissie met betrekking tot de financiering en de keuze van de PRA's te richten tot de thematieken geïdentificeerd door het netwerk van de experts betrokken in EUPHRESKO.

Tenslotte is er nog het project Q-BOL, eveneens gefinancierd door de Europese Commissie via FP7, dat mikt op de ontwikkeling van genetische barcodes voor de precieze en snelle identificatie van de quarantaine organismen en dus de verbetering van de monitoring van het Europees grondgebied.

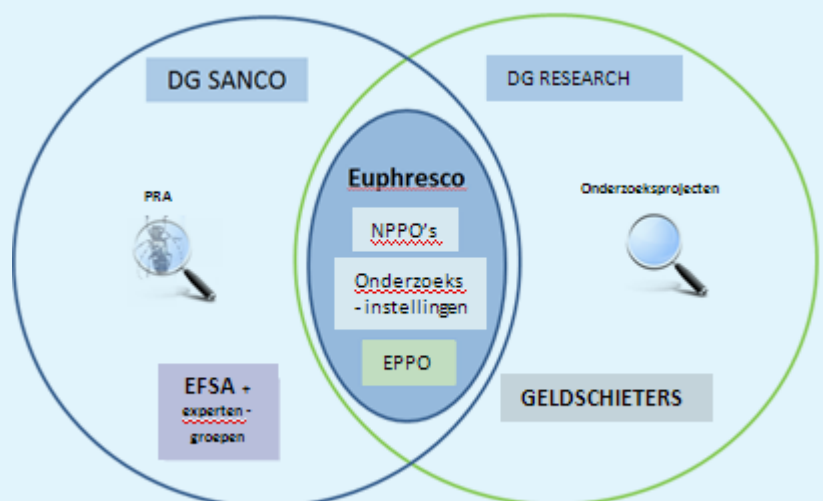
Om te besluiten, zelfs indien de exacte rol van de verschillende deelnemers hierboven aangehaald nog moet vastgelegd worden, constateert men toch de zelfbevestiging van de beide sterk gekoppelde netwerken (figuur 1).

Ten eerste is het netwerk van de PRA's samengesteld uit enerzijds, het Directoraat Generaal Health and Consumer Protection (DG SANCO) in samenwerking met de NPPO's als beheerder van de fytosanitaire risico's in de EU en anderzijds, de EFSA ondersteund door de OEPP en zijn expertengroepen voor de evaluatie van deze risico's.

Het tweede netwerk, dat men zou kunnen definiëren als het netwerk 'onderzoek plantaardige quarantaine', is samengesteld uit enerzijds, de structuur EUPHRESKO in samenwerking met de EPPO en anderzijds, de nationale geldschieters en het Directoraat Generaal Onderzoek en Innovatie (DG RESEARCH). Dit laatste netwerk zal de Europese PRA's, die ten laste zijn van het eerste netwerk, initiëren en voeden.

Vanuit de in dit artikel vermelde projecten, wordt er dus een eerste aanzet gegeven naar een toekomstig Europees netwerk voor onderzoek in de fytopathologische quarantaine.

Figuur 1: Schema van de twee verbonden netwerken PRA's en Onderzoek in plantaardige quarantaine



t.olivier@cra.wallonie.be



# Nieuws van het Europees Referentie Laboratorium voor Melk en Melkproducten (EU-RL MMP), Parijs, 2011

Koen De Reu\* & Véronique Ninane\*\*

\*ILVO-T&V, Instituut voor Landbouw en Visserijonderzoek – Eenheid Technologie en Voeding, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle

\*\*CRA-W, Département Valorisation des Productions, 24 Chaussée de Namur, B-5030 Gembloux

## Inleiding

Het EU-RL MMP organiseert elk jaar een workshop voor de nationale referentielaboratoria (NRL). De jongste sessie, die op 2 en 3 mei 2011 plaatsvond, handelde over het hele analysedomein dat onder de bevoegdheid van het EU-RL MMP valt. De gemaakte vooruitgang en de noden op analytisch en wetgevend vlak met betrekking tot het totaal kiemgetal, het somatisch celgetal en de alkalisch fosfatase bepaling kwamen hierbij aan bod in presentaties en overleg.

## Doorlichting van de Europese Referentielaboratoria (EU-RLs)

Klaus Kostenzer, de aanwezige vertegenwoordiger van DG-SANCO van de Europese Commissie (EC), leidde de workshop in met een gedetailleerd bespreking van de recente evaluatie (audit), uitgevoerd door de EC, van de activiteiten en de werking van de verschillende EU-RLs. De werking van het EU-RL MMP werd daarbij als goed tot zelfs zeer goed beoordeeld.

## Uitvoering van interlaboratoriumproeven (ringonderzoeken)

De werkwijze bij de organisatie van interlaboratoriumvergelijkingen (ringonderzoeken) door de nationale referentielaboratoria kwam vervolgens uitgebreid aan bod.

Soraya Amarouche van het Franse Laboratoire National de Métrologie et d'essai (LNE) schetste bij wijze van introductie op dit uitgebreid agendapunt de normerende context van dit onderwerp en gaf in het kort uitleg bij de normen ISO 17043 (2010): Algemene eisen voor ringtesten, en ISO 13528 (2005): Statistische methoden die bij interlaboratoriumvergelijkingen kunnen gebruikt worden. Laatstgenoemde norm vormt een aanvulling op de ISO Gids 43 aangezien hij een gedetailleerde beschrijving geeft van de statistische methoden die moeten gebruikt worden bij de evaluatie van interlaboratoriumproeven en aanbevelingen doet in verband met het gebruik ervan. De norm vermeldt onder meer een indicatieve drempelwaarde om de homogeniteit van monsters te beoordelen; Soraya Amarouche onderstreepte evenwel dat die niet altijd bruikbaar is en daarom ook, mits onderbouwing, kan worden aangepast.

De praktische organisatie van interlaboratoriumproeven werd besproken door de vertegenwoordigers van twee NRL's, Karin Knappstein (MRI, Kiel, Duitsland) van het Duitse NRL en Koen De Reu (ILVO-T&V, Melle, België) van het

Belgische NRL, alsook door Thomas Berger van Agroscope (Liebefeld-Posieux, Zwitserland). De aanpak van de interlaboratoriumproeven was voor elk van de sprekers verschillend: 1) onderlinge vergelijking van routineapparatuur, 2) vergelijking van de routinemethode met de referentiemethode of 3) bepaling van de waarde van een referentiemateriaal. Koen De Reu (ILVO-T&V) gaf verder ook uitleg over de werkwijze voor de beoordeling van de prestaties van het Belgische NRL bij middel van prestatie-indicatoren en over het financiële bestraffingsstelsel dat eraan verbonden is. Bij de uiteenzettingen bleek dat het Belgische stelsel helemaal mee is met de Europese ontwikkelingen op het gebied van analytische begeleiding en referentiewerking. De vertegenwoordigers van alle lidstaten waren onder de indruk van de volledigheid van de voorgestelde interlaboratoriumproeven in België en van het feit dat alle interlaboratoriumproeven uitgevoerd in het kader van de uitbetaling van de rauwe melk onder accreditatie gebeuren. Er werden na de uiteenzetting van Koen De Reu dan ook heel wat vragen gesteld. In het kader van de organisatie van interlaboratoriumproeven kwamen tijdens de workshop nog diverse studies uitgevoerd door het EU-RL MMP aan bod inzake de stabiliteit van de hiervoor gebruikte monsters. Het EU-RL MMP dient namelijk werkwijzen te onderzoeken en vast te leggen voor bewaring en transport van monsters die geschikt zijn voor verdeling over geografisch ver van elkaar verwijderde laboratoria. Daarbij werd bijvoorbeeld de stabiliteit van rauwe geitenmelkmonsters, met of zonder de toevoeging van bewaarmiddelen, bij 12 °C getoetst over een periode van 10 dagen (Rabed Miled, ANSES, Parijs). Uit die studie blijkt dat door toevoeging van een mengsel van boorzuur, glycerol en kaliumsorbitaat het totaal kiemgetal van rauwe geitenmelk stabiel blijft. Het EU-RL MMP plant eveneens een onderzoek naar de geschikte bewaarmethode voor rauwe koemelkmonsters voor de bepaling van het somatisch celgetal tijdens interlaboratoriumvergelijkingen. Het project werd besproken door Alexandra Cauquil, ANSES, Parijs en zal aangevuld worden met de methode gebruikt door de Belgische NRLs. Deze laatste informatie werd aangebracht door Koen De Reu. Tot slot werd uitleg gegeven bij het protocol voor het controleren van de homogeniteit en de stabiliteit van de melkmonsters die worden verdeeld bij de door het EU-RL MMP opgezette interlaboratoriumproef met het oog op de bepaling van de alkalische fosfatase (Caroline Vignaud, ANSES, Parijs).

## Totaal kiemgetal

Wat de bepaling van het totaal kiemgetal van rauwe melk betreft, blijven de validatie van alternatieve methoden en de vaststelling van de conversietabel tussen de routine resultaten en de referentieresultaten een centrale plaats bekleden. Het totaal kiemgetal van rauwe melk kan wordt geteld bij middel van een alternatieve methode als die werd gevalideerd ten aanzien van de referentiemethode, met inachtneming van de voorschriften van norm ISO 16140. De vastgestelde voorschriften van de norm ISO 16140 zijn niet echt geschikt en zijn weinig duidelijk voor de specifieke matrix, rauwe melk. Ter verduidelijking vulde het EU-RL MMP de voorschriften daarom aan met specifieke normen voor melk, nl. de normen FIL/IDF 161 die thans worden herzien (ISO 16297 en 128), en werkte het een praktische synthese uit van de aspecten waarop men moet steunen om elk van de in norm ISO 16140 vermelde punten bij de validatie te respecteren (Véronique Deperrois, ANSES, Parijs).

Wat de conversietabel voor de alternatieve methoden betreft, is het zo dat het totaal kiemgetal van rauwe melk wordt bepaald met behulp van instrumentele methoden. In elk van de landen worden ook specifieke conversietabellen toegepast. Op de vorige vergadering werd voorgesteld om een werkgroep op te richten die zou moeten nagaan of harmonisering van de conversietabellen binnen de EU mogelijk is (Ninane & Werbrouck, 2010). Het EU-RL MMP heeft de haalbaarheidsstudie opgestart en stelde daarbij drie statistische benaderingen vast die in aanmerking kunnen komen om de incidentie van de regionale factor (geografische oorsprong) op de conversietabel te bepalen (Laurent Guillier, ANSES, Parijs). Er zal aan de leden van de werkgroep worden gevraagd om een bijdrage te leveren aan het verdere verloop van de studie. Véronique Ninane vertegenwoordigd het Belgische NRL in die werkgroep.

Tot slot heeft het EU-RL MMP een onderzoek aangevat met als doel de conversiefactoren van de Bactocount (Bentley, USA) te bepalen voor het tellen van het totaal kiemgetal in rauwe geitenmelk (Rabed Miled, ANSES, Parijs).



## Het somatisch celgetal

Bij de besprekingen over het somatisch celgetal ging het vooral over de bekwaamheid van de referentielaboratoria om de microscopische methode toe te passen die beschreven staat in norm ISO 13366-1, de referentiemethode voor die parameter. Om de capaciteit van het Europese analyzenetwerk om die methode toe te passen te evalueren, organiseerde het EU-RL MMP eind 2010 een interlaboratoriumproef (Alexandra Cauquil, ANSES, Parijs). Uit die proef blijkt dat 85 % van de deelnemende laboratoria, waaronder het Belgische NRL, de methode op een behoorlijke manier toepassen. Een precieze omschrijving, vastgesteld met de hulp van het EU-RL MMP, van de moeilijkheden die de achterblijvende laboratoria ondervinden zou dat percentage moeten doen stijgen. De resultaten van de proef tonen ook aan dat de globale prestaties van het Europese netwerk op het vlak van herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor de bepaling van het somatisch celgetal verbeterd zijn in vergelijking met de voorgaande proef (2008). Het EU-RL MMP is van plan die prestaties nog meer te verbeteren door het organiseren van een praktische opleiding.

Daarnaast zou de uitbouw van een structuur voor het aanmaken van referentiemateriaal voor het tellen van somatische cellen ertoe moeten bijdragen om zowel de prestaties van de referentiemethode als de overeenstemming tussen de routinemethoden te verbeteren. De International Dairy Federation (IDF) en het International Committee for Animal Recording (ICAR, Italië) werken samen aan de ontwikkeling van een dergelijke organisatiestructuur, een zogenaamd referentiesysteem (Thomas Berger, Ascroscope, Liebefeld-Posieux, Zwitserland). Het Belgische NRL is via Véronique Ninane (CRA-W), die actief deelneemt aan deze werkgroep van de IDF en het ICAR, betrokken bij de ontwikkeling van dat referentiesysteem.

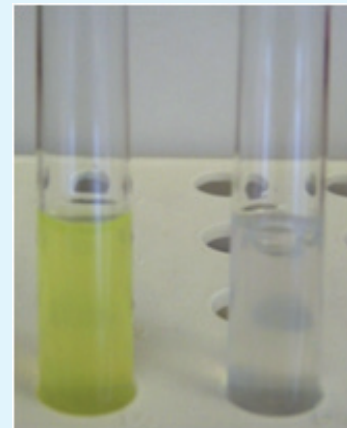
## Alkalisch fosfatase bepaling

In verband met de alkalisch fosfatase bepaling, waarvan de activiteit wordt gebruikt om goede pasteurisatie aan te tonen, werden verscheidene analyseaspecten onderzocht.

Een ervan is de validatie van de in norm ISO 11816-1 (2006) beschreven fluorometrische methode voor toepassing op geitenmelk. Het EU-RL MMP organiseerde in 2010 een interlaboratoriumproef om de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid van de methode in geitenmelk te bepalen. Bij die proef waren 22 laboratoria betrokken, waaronder het ILVO-T&V voor het Belgische NRL. De proef had betrekking op 6 activiteitsniveaus van alkalisch fosfatase (Anne-Cécile Boitelle, ANSES, Parijs). De kwaliteit van de resultaten van die interlaboratoriumproef is zodanig dat ze kan worden gebruikt voor de validatie van de methode, wat het beoogde doel was.



Figuur 1: Fluorophos toestel met incubatorblok voor bepaling alkalisch fosfatase activiteit



Figuur 2: Positief monster (links) en negatief monster (rechts) bij de bepaling van het alkalisch fosfatase gehalte



Een ander aspect dat in deze sessie werd besproken is de restactiviteit van alkalisch fosfatase in gepasteuriseerde geitenmelk en meer in het bijzonder de wettelijk aanvaardbare activiteitsgrenswaarde. Concreet onderzocht het EU-RL MMP de mogelijkheid om op geitenmelk de grenswaarde van 350 mU/l toe te passen die door de EU al werd vastgesteld voor koemelk. Uit dat onderzoek blijkt dat de alkalisch fosfatase-activiteit na pasteurisatie van geitenmelk doorgaans inderdaad onder de voor koemelk vastgelegde grenswaarde ligt maar dat die grenswaarde wordt overschreden in geitenmelk die afkomstig zou zijn van twee lidstaten (Marina Nicolas, ANSES, Parijs). Het wetgevendende initiatief ligt bij DG SANCO dat nu over voldoende gegevens beschikt om zich uit te spreken over de grens voor het alkalisch fosfatase gehalte in gepasteuriseerde geitenmelk.

De vastlegging van een activiteitsgrenswaarde voor uit gepasteuriseerde melk bereide kaas stond eveneens op de lijst van onderwerpen die op de workshop werd behandeld. De aanneming van een grenswaarde steunt op de inventarisering van de in de praktijk vastgestelde waarden en op de capaciteit van de laboratoria om de alkalische fosfatase-activiteit in kaas te bepalen. In 2009 organiseerde het EU-RL MMP, met als doel de analysecapaciteit van het NRL-netwerk te verbeteren, een praktijk sessie over de norm ISO 11816-2 (die toen werd herbekeken) die de referentiemethode voor die parameter in kaas beschrijft. In aansluiting daarop werd het vermogen van de NRL's om de methode toe te passen geëvalueerd aan de hand van een interlaboratoriumproef. Vier van de 19 deelnemende laboratoria bekwamen onvoldoende resultaten, werden opnieuw gebriefd en vervolgens onderworpen aan een nieuwe evaluatietest. Na die twee leer- en evaluatiesessies werden 17 laboratoria, waaronder het ILVO-T&V voor het Belgische NRL, in staat bevonden om de alkalische fosfatase-activiteit in kaas correct te bepalen. De inventaris van de in de praktijk vastgestelde waarden van alkalische fosfatase restactiviteit kan thans verder worden aangevuld zodat hij de reële toestand voor kaas in Europa correct weergeeft (Marina Nicolas, ANSES, Parijs). Het EU-RL MMP stelde intussen voor om een werkgrenswaarde van 10 mU/g aan te nemen die eventueel nog kan worden bijgesteld. Die waarde werd reeds uitgetest op enkele kazen.

Het Zwitserse laboratorium Agroscope testte de grenswaarde bijvoorbeeld uit op een aantal Zwitserse kazen van koemelk en paste daarbij de referentiemethode nauwgezet toe (Charlotte Egger, Agroscope, Liebefeld-Posieux, Zwitserland). Alle kazen van rauwe of gethermiseerde melk die werden onderzocht vertoonden een activiteit van meer dan 10 mU/g, terwijl de meeste kazen van gepasteuriseerde melk een alkalische fosfatase restactiviteit hadden van minder dan 10 mU/g. Er was een zachte kaas, Limburger, die een alkalische fosfatase restactiviteit vertoonde van meer dan 10 mU/g hoewel hij werd gemaakt van gepasteuriseerde melk. De oppervlakteflora had in dit geval een aandeel in de gemeten alkalische fosfatase-activiteit: wanneer die activiteit werd gemeten na verwijdering van een dikkere korstlaag dan wat de norm voor deze kaasvoorschrift (0,5 cm in plaats van "zo dun mogelijk") was ze wel degelijk kleiner dan 10 mU/g. Het belang van de plaats waar het monster in de kaas wordt genomen werd overigens aangetoond aan de hand van grote wielen (80-100 cm diameter) kaas van gethermiseerde melk: de wielen zijn zo groot dat de kaas in het midden lang genoeg warm blijft om de alkalische fosfatase te deactiveren op de manier zoals dat bij pasteurisatie gebeurt.

Terwijl voor de Zwitserse kazen een aanpassing van de norm op het eerste gezicht voldoende lijkt om de voorgestelde grenswaarde aanvaardbaar te maken, is dat niet het geval voor andere kaasvoorschriften. Het EU-RL MMP toonde immers aan dat het fabricageproces van bepaalde kazen aan de oorsprong kan liggen van een wijziging van de alkalisch fosfatase-activiteit en kan leiden tot een foute interpretatie van het resultaat (Marina Nicolas, ANSES, Parijs). Zo wordt tijdens het fabricageproces van kazen van het mozzarellatype de alkalisch fosfatase in sommige gevallen geïnactiveerd, wat leidt tot een activiteit van minder dan 10 mU/g hoewel de kaas werd bereid uit rauwe melk. Ook werd nogmaals gewezen op het omgekeerde geval, namelijk een uit gepasteuriseerde melk bereide kaas met een alkalische fosfatase-activiteit van meer dan 10 mU/g. Er werd in dat geval een activiteit van meer dan 10 mU/g gemeten tot in de kern van de kaas en niet alleen aan de oppervlakte zoals bij Limburger kaas; het verwijderen van een dikkere korstlaag lost het probleem dan ook niet op. Naar alle waarschijnlijkheid zou ook hier de microflora aan de oorsprong liggen van die abnormaal hoge alkalische fosfatase-activiteit.

Wat de analyse betreft is het zo dat de ISO 11816-2 methode voor het bepalen van alkalische fosfatase in kaas nog

moet worden gevalideerd. Het EU-RL MMP plant in dat opzicht in 2011 de uitvoering van een voorbereidende studie over de karakterisering van de methode en in 2012 het interlaboratoriumgedeelte van de validatie. Om de pasteurisatie te controleren van melk van andere diersoorten, bijvoorbeeld kamelenmelk, wordt gedacht aan andere alkalische fosfasemarkers zoals lactoperoxidase of  $\gamma$ -GT.

#### Referentie

Ninane V. & Werbrouck H. (2010). Workshop van Melk en Melkproducten voor de NRL's, Parijs, 2010. Labinfo FAWV, 5, 25-27.

ninane@cra.wallonie.be

koen.dereu@ilvo.vlaanderen.be



## Workshops & Symposia

Datum	Onderwerp	Plaats	Meer informatie (website)
26.01.2012	Workshop Nieuwe EU-wetgeving: Wat verandert er op het etiket?	De Biltse Hoek, de Bilt, the Netherlands	<a href="http://www.fooddoctors.com/Workshops/Programma.pdf">http://www.fooddoctors.com/Workshops/Programma.pdf</a>
31.01-1.02.2012	Second International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP-2)	Bruges, Belgium	<a href="http://www.ordibo.be/htc/">http://www.ordibo.be/htc/</a>
1-3.02.2012	Twelfth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-12)	Bruges, Belgium	<a href="http://www.ordibo.be/htc/">http://www.ordibo.be/htc/</a>
13-14.02.2012	3rd International Fresenius FEED Conference Efficacy – Claims – Mode of Action	Cologne, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=306">http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=306</a>
28-29.02.2012	10th International Fresenius Conference "Food Safety and Dietary Risk Assessment"	Mainz, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/2030">http://www.akademie-fresenius.com/2030</a> This conference will provide you with an up-to-date overview on the subject of assessing the risks of pesticide residues in food.
11-15.03.2012	Pittcon 2012	Orlando, FL, USA	Pittcon is the world's largest annual conference and exposition for laboratory science.
20-23.03.2012	IDF Regional Conference on Domestic Milk Supply and Demand Systems : Sharing Success Beyond Challenges!	Seoul, Korea	<a href="http://www.2012idfrc.or.kr/">http://www.2012idfrc.or.kr/</a>
20-21.03.2012	International Fresenius Conference The New Food Information Regulation	Cologne, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=312">http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=312</a> For professionals working in food manufacturing and in the food trade industry as well as in food law and in the regulatory affairs field.
Spring of 2012	4th International Fresenius Conference "Health Claims"	Germany	European and international specialists, with backgrounds in the industry, the legal field and the monitoring authorities, will discuss all the latest Health Claims developments. For more information: Telephone +49 231 75896-54 or <a href="mailto:astaudenmaier@akademie-fresenius.de">astaudenmaier@akademie-fresenius.de</a> .
19/04/2012	AOAC-LL Symposium: "Food Allergens"	Breda, the Netherlands	<a href="http://www.aoaclowlands.nl">www.aoaclowlands.nl</a>

20-24.05.2012	IDF International Symposium on Cheese Ripening and Technology	Madison, Wisconsin, USA	<a href="http://www.idfcheeseus2012.com/">http://www.idfcheeseus2012.com/</a>
21-25.05.2012	QBOL EPPO Conference on DNA Barcoding and diagnostic methods for plant pests	Haarlem, the Netherlands	<a href="http://www.eppo.org">www.eppo.org</a>
22.05.2012	64th International Symposium on Crop Protection	Gent, Belgium	<a href="http://www.iscp.ugent.be/">http://www.iscp.ugent.be/</a>
June 2012	2nd Global conference on GMO analysis	Como, Italy	<a href="http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/">http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/</a>
4-8.06.2012	2012 IDF/ISO Analytical Week	Tel Aviv, Israel	<a href="http://www.idf-iso-analytical-week.org">http://www.idf-iso-analytical-week.org</a>
19-21.06.2012	IDF/INRA International Symposium on Spray Dried Dairy Products	St. Malo, France	<a href="http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123">http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123</a> <a href="http://www.colloque.inra.fr/sddp2012">http://www.colloque.inra.fr/sddp2012</a>
25-26.06.2012	14th International Fresenius AGRO Conference Behaviour of Pesticides in Air, Soil and Water	Mainz, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?thema=3&amp;kurs=295">http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?thema=3&amp;kurs=295</a>
25-28.06.2012	9th European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2012)	Vienna, Austria	<a href="http://www.ages.at/ages/eprw2012/">http://www.ages.at/ages/eprw2012/</a> The European Pesticide Residue Workshop (EPRW) is the premier European meeting for the presentation and discussion of the latest concepts and developments in the field of pesticide residues in food and drink.
Summer of 2012	5th International Fresenius Conference "Food Allergens"	Mainz, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?thema=3&amp;kurs=294">http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?thema=3&amp;kurs=294</a>
Summer of 2012	2nd International Fresenius Conference "Residues of Food Contact Materials in Food"	Germany	This conference is primarily aimed at food and packaging producers concerned with the safety and quality of food and packaging materials. For more information: Telephone +49 231 75896-82 or <a href="mailto:smummenbrauer@akademie-fresenius.de">smummenbrauer@akademie-fresenius.de</a> .
1-4.07.2012	Second International Woody Ornamental Symposium	Gent, Belgium	<a href="http://www.ilvo.vlaanderen.be/woodyornamentals2012">http://www.ilvo.vlaanderen.be/woodyornamentals2012</a>
12-17.08.2012	58th ICoMST International Congress of Meat Science and Technology	Montréal, Canada	<a href="http://www.biocircle-project.eu/media/6894/icomst_2012_brochure_belgique.pdf">http://www.biocircle-project.eu/media/6894/icomst_2012_brochure_belgique.pdf</a>
26-31.08.2012	32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POP's) - DIOXIN 2012	Cairns, Australia	<a href="http://www.dioxin2012.org/">http://www.dioxin2012.org/</a>
11-13.09.2012	Fourth international conference on Feed Safety – Methods and Challenges	Beijing, P.R. China	<a href="http://www.feedsafety.org/">http://www.feedsafety.org/</a>



20-21.09.2012	17th Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	<a href="http://www.bsfm.be">www.bsfm.be</a>
30.09-3.10.2012	126th AOAC Annual Meeting & Exposition	Las Vegas, USA	<a href="http://www.aoac.org">http://www.aoac.org</a>
3-9.11.2012	IDF World Dairy Summit	Cape Town, South Africa	<a href="http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123">http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123</a>
5-9.11.2012	7th Conference of The World Mycotoxin Forum® and XIIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins	Rotterdam, the Netherlands	<p><a href="http://www.wmfmeetsiupac.org/html/welcome.asp">http://www.wmfmeetsiupac.org/html/welcome.asp</a></p> <p>This unique combined event, WMF meets IUPAC, will build on the success of the previous conferences which were held separately all over the world.</p> <p>The aim of WMF meets IUPAC is to increase awareness of human and animal health risks due to natural toxicant contamination in agricultural commodities and seafood, and of potential risk management options, technologies and strategies for minimized contamination. The event will focus in particular on mycotoxins, phycotoxins and plant toxins.</p>
7-10.05.2013	EuroFoodChem XVII	Istanbul, Turkey	<p><a href="http://www.arber.com.tr/eurofoodchemxvii.org/index.php/home">http://www.arber.com.tr/eurofoodchemxvii.org/index.php/home</a></p> <p>with state-of-the-art knowledge and applications in food chemistry and complementary disciplines</p>
25-29.08.2013	24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)	Perth Exhibition Centre, Perth, Western Australia	<a href="http://www.waavp.org/">http://www.waavp.org/</a>
October 2013	IDF World Dairy Summit	Yokohama, Japan	<a href="http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123">http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123</a>





# Labinfo