



# Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- p. 4 Ringonderzoeken
- p. 7 Microbiologie
- p. 16 Zware metalen
- p. 20 Trichinen
- p. 22 Genetisch gemodificeerde organismen
- p. 24 Dioxinen en DL-PCB
- p. 31 Melk en melkproducten
- p. 34 Workshops & Symposia



## **Labinfo**

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid  
verschijnt tweemaal per jaar

## **Redactiegroep**

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

## **Auteurs van dit nummer**

Geert De Poorter, Franck Defejjt, Alain Dubois, Kristien Orye, Nadine Botteldoorn,  
Sarah Denayer, Kim Heylen, Katelijne Dierick, Inge Van Hauteghem, Leen Claes, Didier Breyer,  
Nancy Roosens, Gilbert Berben, Isabel Taverniers, Marc Van den Bulcke, Myriam Sneyers,  
Jean-François Focant, Séverine Gosciny en Koen De Reu.

## **Vertaling**

Vertaaldienst van het Agentschap  
Redactiegroep

## **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 409  
Kruidtuinlaan 55,  
1000 Brussel  
Tel.: 02.211.87.33  
dirk.courtheyn@favv.be

Beste lezer,

Dit is alweer de derde elektronische nieuwsbrief over het reilen en zeilen in de laboratoriumwereld van het FAVV die voor u ligt.

De economische crisis heeft ook in de laboratoriumwereld hard toegeslagen: marges verminderen, overnames van te kleine laboratoria manifesteren zich en de concurrentie tussen de labs wordt groter. Ook in de ons omringende landen wordt het volume aan analyses kleiner waardoor buitenlandse laboratoria meer en meer hun pijlen richten op de Belgische markt.

Concurrentie is de hoeksteen van innovatie en zorgt voor het broodnodige "entrepreneurship". Het is de taak van de overheid om een wettelijk kader te creëren waarbinnen dan de spelers kunnen opereren. Het Koninklijk Besluit over de Autocontrole van 2003 wordt herzien en zal in zijn nieuwe versie de verplichting opnemen voor laboratoria die analyses uitvoeren in het kader van de autocontrole van bedrijven om deel te nemen aan interlaboratoriumvergelijkingen. Het FAVV zal daarvoor een positieve lijst ter beschikking stellen van goedgekeurde aanbieders/organisatoren van interlaboratoriumvergelijkingen. Dit is een eerste stap in het nog meer verzekeren van de nauwkeurigheid van analysesresultaten die door de operatoren actief in de agro-voedingssector gebruikt worden in het kader van hun HACCP systeem.

Daarnaast zal in het eerste semester 2010 een webgebaseerd Dashboard ter beschikking gesteld worden van alle erkende laboratoria. Zij zullen daar hun eigen opgegeven KPI's (waaronder doorlooptijd) kunnen consulteren. Dit kadert binnen een ruimer begrip, met name het CRM: Customer Relation Management. Alzo wordt de wisselwerking tussen het Bestuur Laboratoria van het FAVV en de externe laboratoria verder geoptimaliseerd en dit met de meest moderne communicatiemiddelen.

De erkenningsprocedure voor externe laboratoria blijft "succes" hebben: het aantal externe laboratoria die een deel van de analyses in het kader van het officiële controleprogramma van het FAVV willen binnenhalen blijft in stijgende lijn gaan. Recent zijn er laboratoria uit Nederland en Frankrijk bijgekomen. Het totale aantal bedraagt momenteel 59. De volledige lijst kan u consulteren op <http://www.favv-afsc.fgov.be/laboratoria/erkendelaboratoria/algemeenheden/>. Maar er zijn ook plichten verbonden aan deze erkenning. Ik hanteer steeds het principe: "vertrouwen is goed maar controle is beter". Het is dan ook logisch dat laboratoria die de regels van het spel niet willen volgen een sanctie oplopen. Dit kan de labs die wel de regels naleven alleen maar ten goede komen.

Ik wens u veel leesplezier toe en -ook al is het nog een beetje vroeg- prettige eindejaarsfeesten.

Geert De Poorter  
Directeur-generaal Laboratoria

# Ringonderzoeken

## Interlaboratoriumproef over de fysisch-chemische eigenschappen van een formulering van een bestrijdingsmiddel

DG Laboratoria besloot in 2007 een Business Unit (BU) PT Schemes op te richten die als opdracht kreeg een inventaris op te maken van alle noden aan interlaboratoriumproeven voor de analyses die worden uitgevoerd in zowel de interne als de externe laboratoria. Het was de bedoeling om in de mate van het mogelijke tests die niet bij de traditionele organisatoren beschikbaar waren intern op te zetten. Deelneming aan interlaboratoriumproeven is immers een absolute voorwaarde voor accreditatie.

De BU besloot daarom een interlaboratoriumproef uit te voeren op de fysisch-chemische eigenschappen van een formulering van een bestrijdingsmiddel. Dat soort geschiktheidsbeproeving wordt immers door geen van de gebruikelijke organisatoren aangeboden. Bij de test was in de eerste plaats het federaal laboratorium voor voedselveiligheid van Luik betrokken, het enige federale laboratorium dat geaccrediteerd is voor de controle op de kwaliteit van fytofarmaceutische producten.

Bij de organisatie van die eerste proef heeft de Business Unit PT Schemes het aantal deelnemers bewust laag gehouden en beperkte zij zich tot Europa. De gekozen formulering (een herbicide in de vorm van een waterige oplossing) bood als voordeel dat ze volkomen homogeen en stabiel was en een welbekende werkzame stof bevatte die met een officiële methode kan worden geanalyseerd.

Diverse typische parameters van de formulering moesten worden onderzocht (gehalte aan werkzame stof, dichtheid, pH en schuimvorming).

13 laboratoria bleken geïnteresseerd te zijn in deelneming aan de eerste proef. De monsters werden in oktober 2008 verzonden. De uiterste datum voor mededeling van de resultaten was vastgelegd op 1 februari 2009.

De monsters werden zodanig bereid dat de matrixgebonden variabiliteit zo klein mogelijk was zodat zij slechts een te verwaarlozen weerslag had op de prestaties van de laboratoria.

Homogeniteitstests (op basis van de pH van de formulering) werden tweemaal uitgevoerd, voor en na herverpakking, op willekeurig uitgekozen deelmonsters.

De statistische verwerking gebeurde conform de voorschriften van ISO-norm 13528 : 2005. De bedoeling ervan was om eventuele trends te helpen opsporen en een vergelijking van de resultaten mogelijk te maken. Wij gebruikten als prestatie-indicator de als volgt vastgelegde z-score :

Z-score :  $(x-X)/s$

met: x = door deelnemend lab meegedeeld resultaat;

X = het robuust gemiddelde berekend volgens de A-algoritme uit norm ISO 13528;

s = de standaardafwijking berekend op basis van de resultaten meegedeeld door de deelnemers.

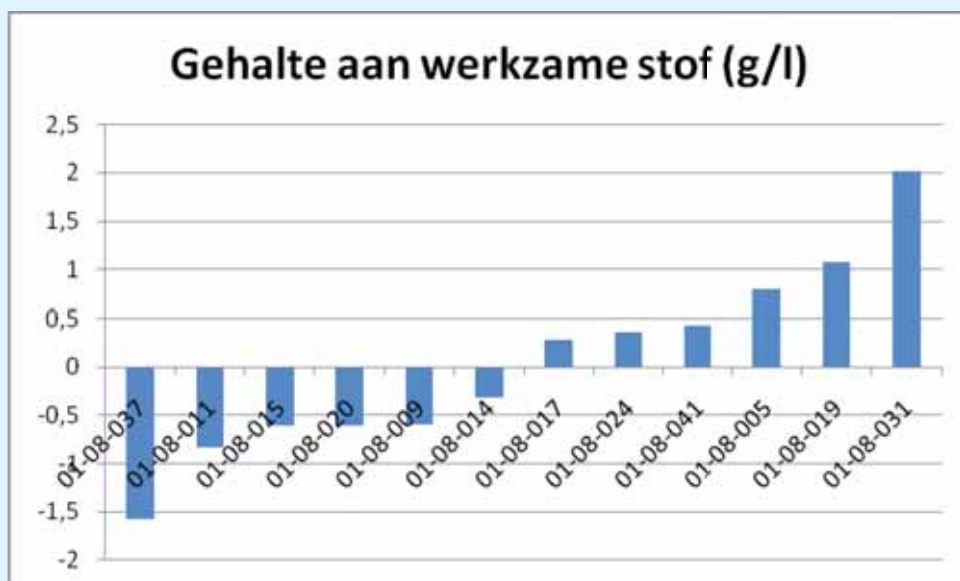
Tabel: Overzicht ontvangen resultaten en statistieken

Parameter	Aantal meegeedeelde resultaten	Minimum	Mediaan	Gemiddelde	Robuust gemiddelde (volgens A-algoritme ISO 13528)	Maximum	Standaard-afwijking	Robuuste standaard-afwijking (volgens A-algoritme ISO 13528)
w.s.* (g/kg)	12 (0)**	335,2	342,5	342,1	341,9	353,4	5,7	6
w.s. (g/l)	12 (0)	397,4	409,6	410	409,7	425,5	7,7	7,8
Dichtheid	13 (1)	1,1413	1,2044	1,1993	1,204	1,2061	0,017	0,0015
pH formulering	13 (1)	8,1	8,37	8,4	8,378	8,9	0,2	0,156
pH verdunning aan 1%	13 (2)	6,6	7,8	7,8	7,8	9,1	0,55	0,26
Schuim	13 (0)	0	-	-	-	-	-	-

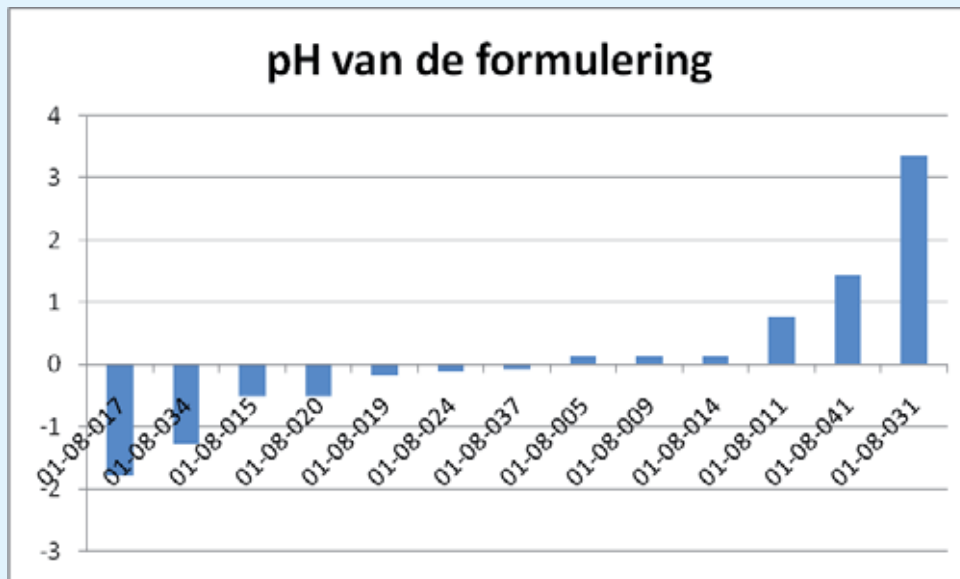
\* = gehalte aan werkzame stof

()\*\* = aantal resultaten dat een Z-score > 3 geeft voor de test

Grafiek 1: Distributie van de Z-scores voor het bepalen van het gehalte aan werkzame stof (g/l)



Grafiek 2: Distributie van de Z-scores voor het bepalen van de pH van de onverdunde formulering



Deze eerste interlaboratoriumproef over de fysisch-chemische eigenschappen van een formulering van een bestrijdingsmiddel bleek in diverse opzichten interessant te zijn. In de eerste plaats waren de reacties op de test van de deelnemende laboratoria zeer positief. Een van de deelnemers kon ze voor norm ISO 17025 inroepen ten aanzien van zijn auditors. Daarnaast kon hiermee worden aangetoond dat een test, waarvan men zou kunnen denken dat ze eenvoudig is, zoals het meten van de pH, toch problemen kan opleveren. Daarmee wordt noodzaak van dergelijke tests bevestigd.

De BU wil in de toekomst de proef uitbreiden door het aantal deelnemers en het aantal ingezonden monsters te verhogen. De tweede doelstelling bestaat erin de ISO 17043 certificering te verkrijgen voor de organisatie van deze proeven.

Franck Defeijt en Alain Dubois, LFSAGx  
franck.defeijt@afsca.be  
alain.dubois@afsca.be

# Microbiologie

## Microbiologische levensmiddelencriteria en wetgeving

Microbiologische gevaren in levensmiddelen zijn een belangrijke oorzaak van door voedsel overgedragen ziekten bij de mens en kunnen opgedeeld worden in twee grote groepen, met name voedselinfecties en voedselvergiftigingen. Een voedselinfectie wordt veroorzaakt door de opname van pathogene micro-organismen zoals *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157. Een voedselvergiftiging daarentegen treedt op tengevolge van opname van in het product aanwezige toxines, die geproduceerd werden door in het levensmiddel aanwezige bacteriën (*Staphylococci*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*) of schimmels (*Aspergillus flavus*, *Fusarium* spp.).

Ter bescherming van de gezondheid van de mens zijn op wereld-, Europees en nationaal vlak microbiologische criteria vastgelegd. In de jaren '60 van de vorige eeuw werd door de FAO en de WHO de Codex Alimentarius opgericht. Deze ontwikkelt op wereldvlak zowel algemene als productspecifieke normen voor voedselveiligheid, etikettering en productsamenstelling. Hoewel deze Codexnormen wettelijk niet bindend zijn, vormen ze toch de basis van de Europese, nationale of regionale wetgevingen in verband met de voedselveiligheid. In 2000 legde de Europese overheid haar beleidsprioriteiten in verband met de voedselveiligheid vast in het Witboek Voedselveiligheid ter bescherming van de gezondheid van de consument. De belangrijkste punten waren de oprichting van een Europese Voedselautoriteit, de verbetering van de wetgeving rond de verschillende aspecten van de voedingsproducten en de officiële controles. Voor het eerst werden alle aspecten van de voedselveiligheid in acht genomen: van de riek tot de vork. In dat kader publiceerde de Europese Unie in 2002 de "General Food Law" in de EG-verordening 178/2002. Deze wetgeving bevat de basisprincipes van de Europese voedselwetgeving en is opgesteld ter bescherming van de gezondheid van de mens en dier, voor de realisatie van vrij verkeer van levensmiddelen en diervoeders in de Europese Gemeenschap. Andere Europese wetgevingen rond hygiëne, contaminanten en controles zijn gebaseerd op deze verordening. In het kader van de levensmiddelenhygiëne werden in 2006 de volgende verordeningen van kracht:

- Verordening EG 852/2004 inzake levensmiddelenhygiëne en daarop aansluitend de verordening EG 2073/2005 inzake microbiologische criteria;
- Verordening EG 853/2004 inzake hygiënevoorschriften voor levensmiddelen van dierlijke oorsprong;
- Verordening EG 854/2004 inzake officiële controles van voor menselijke consumptie bestemde producten van dierlijke oorsprong;
- Verordening EG 882/2004 inzake officiële controles van levensmiddelen.



Zoals reeds vermeld zijn de microbiologische criteria opgenomen in de verordening EG 2073/2005. In 2007 werd deze verordening herzien, nieuwe criteria werden toegevoegd en deze wijzigingen zijn opgenomen in de verordening EG 1441/2007.

Een microbiologisch criterium is een criterium ter bepaling van de aanvaardbaarheid van een product, een partij levensmiddelen of een proces dat berust op de aan- of afwezigheid van micro-organismen of het aantal daarvan, en/of de hoeveelheid toxines/metaboliëten (gevormd door een micro-organisme) per eenheid van massa, volume of oppervlakte dan wel de partij. Een criterium is altijd opgebouwd als volgt: beschrijving van het levensmiddel, het micro-organisme of toxines, stadium waarvoor het criterium geldt (verwerking, distributie, opslag, in de handel gebracht), de analysemethode en de waarden  $n$ ,  $m$ ,  $M$  en  $c$ , waarbij

- $n$ : het aantal monsters genomen per lot
- $m$ : gewenste bovengrens van de monsters
- $M$ : maximale bovengrens voor de  $n$  monsters
- $c$ : het maximaal aantal van de  $n$  monsters waarvan de waarde van de onderzochte parameter tussen  $m$  en  $M$  ligt.

Het beschrijft ook de te gebruiken analysemethode voor de opsporing van het micro-organisme en de te nemen maatregelen wanneer het criterium is overschreden.

*Vb. voor Listeria monocytogenes in kant-en-klare levensmiddelen die in de handel zijn gebracht geldt het volgende criterium:  $n=5$ ,  $c=0$ ,  $m=M=100$  cfu/g, analysemethode ISO 11290-2*

Bij het opstellen van de criteria werd een duidelijke strategie gebruikt: alle criteria moeten relevant zijn voor de bescherming van de volksgezondheid, ze moeten een praktisch nut hebben, gebaseerd zijn op risicobeoordeling of op internationaal erkende principes.

Bij ieder criterium is een analysemethode opgenomen, gebruikt voor de kwantitatieve of kwalitatieve bepaling van het betreffende micro-organisme. Door het Bestuur van de Laboratoria van het FAVV werd een lijst van erkende microbiologische methoden gepubliceerd, waarin de methoden opgenomen zijn die conform de EG-verordening mogen gebruikt worden voor het uitvoeren van analyses in het kader van het controleprogramma en de autocontrole.





Er zijn 2 categorieën van microbiologische criteria met name:

- voedselveiligheidscriteria: deze bepalen of een in de handel gebracht levensmiddel of product aanvaardbaar is of niet: vb. voor *Listeria monocytogenes* in kant-en-klare gerechten, *Salmonella* spp. in een aantal kant-en-klare gerechten en rauw verwerkt vlees, *Staphylococcus enterotoxines* in een aantal zuivelproducten zoals kaas of melkpoeder, *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* in babyvoeding;
- proceshygiëncriteria: deze geven aan of een productieproces aanvaardbaar verloopt of niet vb. voor *Salmonella* spp. op karkassen, *Enterobacteriaceae* op karkassen en in gedroogde babyvoeding; meer gebruikt als indicatororganisme, coagulase-positieve *Staphylococci* in bepaalde melkproducten.

Deze criteria zijn bindend voor iedere lidstaat van de EG. Indien er geen criteria voorhanden zijn, moet de lidstaat zelf actie ondernemen om de veiligheid van het product te kunnen garanderen. In dat kader werden op advies van het wetenschappelijk comité actielimieten opgesteld door het FAVV.

Het is aan de operator om aan de hand van deze criteria aan te tonen dat hij een veilig product op de markt brengt en dat eraan voldaan wordt gedurende de hele houdbaarheid. Ook moet hij bewijzen dat hij zijn productieproces volledig onder controle heeft via een HACCP-systeem, dat gevalideerd en geverifieerd wordt aan de hand van deze criteria. Daarnaast is het de verantwoordelijkheid van de bevoegde autoriteit om aan de hand van officiële controles na te gaan of deze criteria gerespecteerd worden door de operatoren.

Deze criteria zijn niet absoluut en zijn steeds onderhevig aan veranderingen tengevolge van de vooruitgang in de wetenschap, technologie en methodiek, nieuw opduikende pathogenen en nieuwe bevindingen in risicobeoordelingen. Zij worden voortdurend geëvalueerd en herbekeken om de veiligheid van ons voedsel te kunnen garanderen.



Orye Kristien (FLVVM, Melle)  
kristien.orye@favv.be



## Toepassing van PCR technieken in het microbiologisch voedingsmiddelen-laboratorium

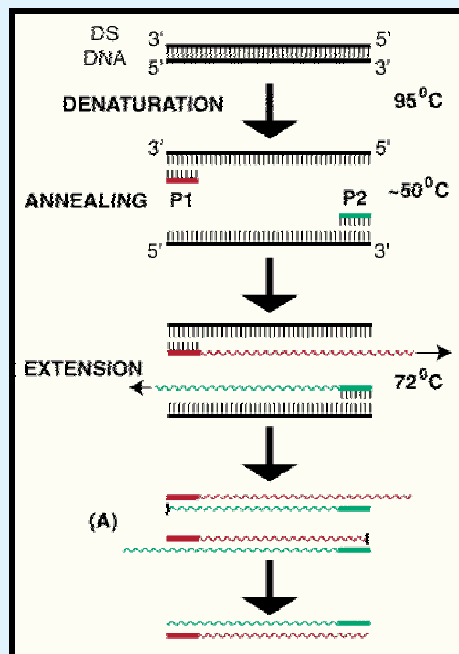
De verschillende stappen om tot de isolatie en identificatie van de kiem te komen in levensmiddelen is gebaseerd op biochemische kenmerken. Bij de isolatie van pathogene bacteriën zijn algemeen volgende stappen te onderscheiden: homogenisatie van de voeding, vooraanrijking, selectieve aanrijking, uitplating op een selectieve bodem en tenslotte uitzuivering en bevestiging van de kiem. Deze klassieke methoden zijn vaak arbeidsintensief, langdurig (5-14 dagen) en hebben als nadeel dat soms atypische kiemen over het hoofd worden gezien. Hoewel deze klassieke technieken onmisbaar zijn in het microbiologisch voedingsmiddelen-laboratorium, zal het gebruik van moleculaire technieken zoals de Polymerase Chain Reaction (PCR) deze tekortkomingen kunnen tegemoet komen.

### 1) PCR

PCR voor de identificatie van kiemen is gebaseerd op amplificatie van specifieke regio's binnen het genoom van micro-organismen. De componenten die nodig zijn voor het uitvoeren van een PCR zijn:

1. primers (een forward en reversed, 20bp oligonucleotiden) die complementair zijn aan een bepaald fragment van het DNA van het micro-organisme en resulteren in de amplificatie van het ingesloten DNA-fragment;
2. doelwit DNA (genomisch DNA van de kiem);
3. dNTPs (dATP, dTTP, dCTP en dGTP) de bouwstenen voor DNA;
4. Taq DNA polymerase (enzyme) ;
5. MgCl<sub>2</sub> voor de werking en specificiteit van het enzyme en
6. buffer voor het bekomen van de ideale zoutconcentratie en pH tijdens de reactie.

Een PCR is een cyclische reactie waarbij na denaturatie van het DNA bij 95°C in een eerste stap, de primers kunnen binden (T ~ 50-60°C) tijdens de annealingstap. Vervolgens zal een verlenging van de primers plaatsvinden in een laatste elongatiestap bij 72°C. Door het cyclisch herhalen (25-35 cycli) van deze 3 stappen is er een exponentiële toename van het gewenste DNA-fragment.



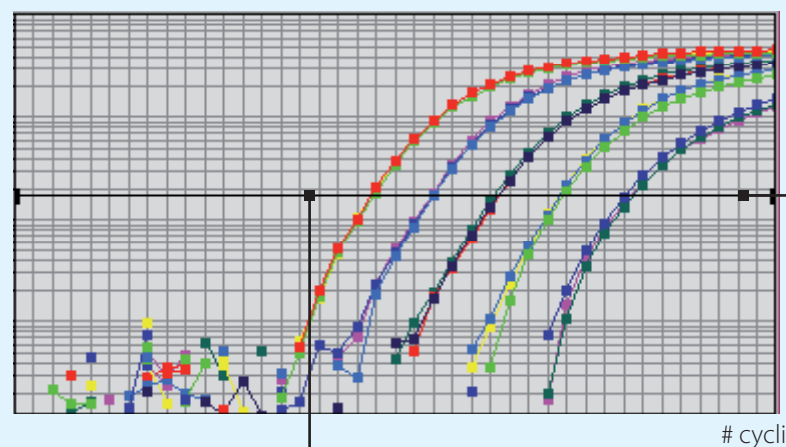
Visualisatie van de gevormde PCR-producten gebeurt op agarose-gels, waarbij DNA zichtbaar wordt in UV na incubatie van de gels in een buffer met etidiumbromide. In dit geval is alleen de fragmentlengte van een PCR-product een discriminerende factor.

## 2) Real-time PCR (RT-PCR/qPCR)

Een variatie op deze basis PCR-methode is de 'Real-time PCR', waarbij de exponentiële toename van een fragment in functie van het aantal doorlopen cycli kan gevolgd worden.



**Rn**  
= gemeten  
reporter  
signaal

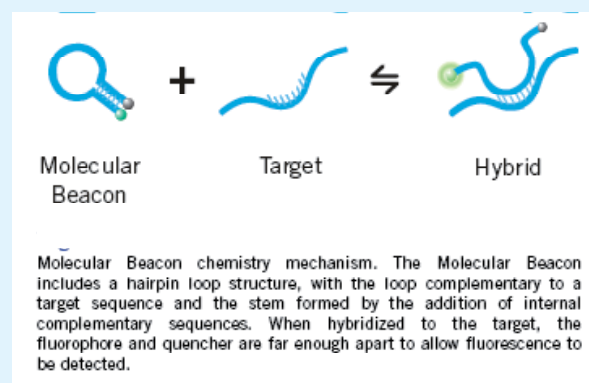
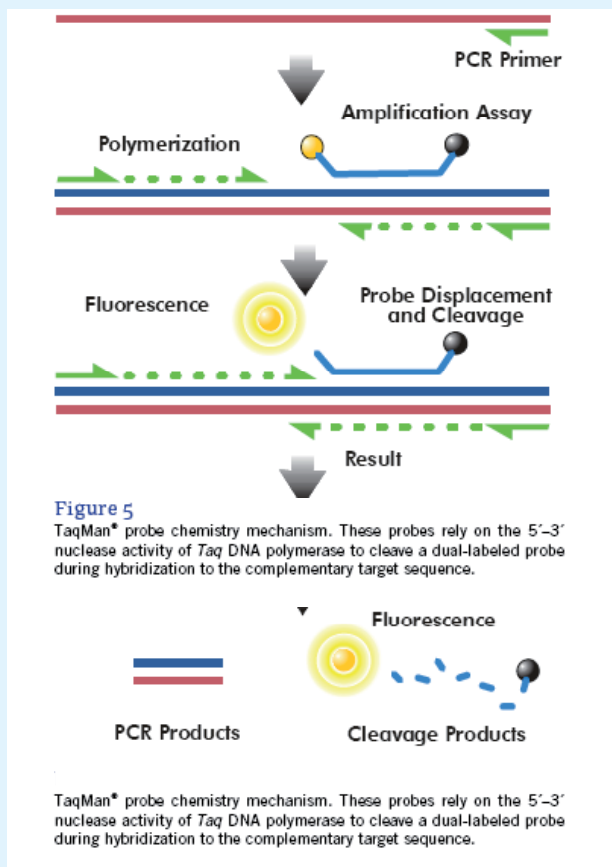


Basislijn =  
controlestaal  
zonder DNA

Ct = cyclus waarbij staal de basislijn kruist

Dit is mogelijk door de aanwezigheid van een fluorescent gelabelde probe in het PCR-mengsel. Deze probes binden op een specifieke sekventie van het doelwit-DNA, gelegen tussen de forward en reverse primer. Er bestaan verscheidene types van probes maar de meeste gebruikte zijn de TaqMan probe (Applied Biosystems) en de Molecular beacon (BioRad). Het principe van de TaqMan probe en Molecular beacon zijn gebaseerd op de aanwezigheid van een zogenaamde 'reporter' en zijn 'quencher' aan beide uiteinden van de probe. Wanneer beide componenten in elkaars nabijheid zijn, dus bij een intacte probe, zal bij bestraling met een lichtbron de energie van de reporter doorgegeven worden aan de quencher zodat er geen fluorescentie wordt waargenomen. In het geval van de TaqMan probe wordt de probe tijdens de elongatiestap van de PCR verknipt door de 5' nuclease activiteit van het Taq polymerase waardoor de afstand tussen de reporter en de quencher vergroot. Bestraling van de reporter zal in dit geval wel tot fluorescentie leiden met detectie van een signaal als gevolg. Hetzelfde geldt voor de Molecular Beacon waar bij binding op doelwit DNA fluorescentie wordt waargenomen.





### 3) Toepassingen

De PCR techniek (PCR en RT-PCR) kan op verschillende niveaus in de detectie van pathogene kiemen worden ingezet. Een eerste niveau is direct in het voedingsmiddel. Belangrijk is hierbij dat de kiem in voldoende hoge aantallen aanwezig is en dat er een efficiënt extractieprotocol voorhanden is. Het voordeel kan zijn dat we een snel antwoord hebben of de pathogeen aanwezig is en er kan ook een semi-kwantitatief resultaat bekomen worden. Anderzijds heeft deze techniek op dit niveau ook een aantal nadelen, waaronder de amplificatie van dode cellen die aanwezig zijn in de voedingsmatrix. Men dient er ook rekening mee te houden dat de matrix ook componenten kan bevatten die de PCR reactie kunnen inhiberen.

Een tweede niveau waar de PCR techniek kan gebruikt worden is na de eerste niet-selectieve aanrijking. Belangrijk is hierbij de sensitiviteit van de PCR reactie voor de te detecteren pathogeen maar ook de specificiteit. De meeste commerciële kits op de markt vinden hun toepassing op dit niveau. Naast de detectie van een specifieke pathogeen maken deze kits gebruik van een interne controle, dewelke het amplificatie proces volgt en zo aantoont of er geen inhibitie in de stalen optreedt door de matrix of door de nevenflora die aanwezig is. Om deze kits routinematig in het labo te gaan gebruiken is een uitgebreide validatie nodig in verschillende voedingsmatrices.

Een derde niveau waar de PCR techniek kan toegepast worden is bij de identificatie en bevestiging van de geïsoleerde bacterie. De PCR gaat een gen detecteren dat een specifiek kenmerk is van de bacterie. Door hier gebruik te maken van PCR kan een volledige set aan biochemische bevestigingen vermeden worden en kunnen ook atypische stammen gemakkelijk worden geïdentificeerd.

Nadine Botteldoorn en Sarah Denayer (WIV, Brussel)  
Nadine.Botteldoorn@iph.fgov.be

## Vergelijkende studie van de bacteriologische kwaliteit en houdbaarheid van vacuümverpakt Argentijns en Belgisch Wit-Blauw rundvlees

Er heerst ongerustheid bij de Belgische landbouwers over Argentijns rundvlees dat op de Belgische markt aangeboden wordt, omdat het Argentijnse rundvlees een veel lange houdbaarheid zou hebben dan het Belgische Wit-Blauw rundvlees. De NRL Levensmiddelenmicrobiologie werd gevraagd om de bacteriologische kwaliteit van beide vleessoorten te vergelijken. Daarnaast werd nagegaan of mogelijks de vooropgestelde lange houdbaarheid van het Argentijnse rundvlees werd bewerkstelligd door specifieke behandelingen van het vlees.

Argentijns rundvlees wordt vacuümverpakt ingevoerd, versneden in grote deelstukken van 4 tot 5 kg. De houdbaarheid vermeld op de verpakking kan oplopen tot 6 maanden. Voor detailverkoop in België worden de grote stukken in porties versneden en opnieuw vacuümverpakt met een nieuwe houdbaarheidstermijn van 14 dagen. Ook Belgische Wit-Blauw rundvlees wordt na slachting en directe ontbening vacuümverpakt voor minstens 2 weken om zo de rijping te laten verlopen, en plaats te besparen in de koelruimtes.

Drie verschillende soorten vleesstalen werden onderzocht, namelijk (i) vacuümverpakt (niet-versneden) Argentijns rugstuk met een houdbaarheid van 6 maanden, (ii) in België versneden en opnieuw vacuümverpakt Argentijns rundvlees met nieuwe houdbaarheid van 2 weken, en (iii) Belgische Wit-Blauw vacuüm verpakte biefstukken met houdbaarheid van 2 weken. Algemene bacteriologische kwaliteit werd nagegaan door kwantitatieve bepaling van totaal aëroob kiemgetal bij 30°C, E. coli, Enterobacteriaceae, melkzuurbacteriën en Brochotrix thermosphacta. De stalen werden geanalyseerd bij ontvangst en op einde van de houdbaarheid vermeld op de verpakking. Gedurende de houdbaarheid van het Belgische rundvlees onder vacuüm wordt een toename van de totale microbiële flora waargenomen, met vooral een duidelijke stijging van de melkzuurbacteriën (zie Tabel 1). Bij de eerste analyse van beide types Argentijns rundvlees, toen al twee maanden geslacht, waren alle onderzochte bacteriologische parameters al in dezelfde grootteorden als voor het Belgische rundvlees op einde houdbaarheid (zie Tabel 1). Met andere woorden, het Argentijnse rundvlees had bij de eerste analyse de bacteriologische kwaliteit van het Belgische vlees op einde houdbaarheid. Bij einde houdbaarheid heeft het Argentijnse vlees gemiddeld een slechtere bacteriologische kwaliteit dan het Belgische vlees. Er is eveneens een duidelijk verschil tussen enerzijds niet-versneden en anderzijds in België versneden en opnieuw verpakt Argentijns rundvlees met een nieuwe houdbaarheid van 14 dagen. Op einde houdbaarheid bevat eerstgenoemde beduidend hogere aantallen Enterobacteriaceae en vertoont eveneens duidelijke organoleptische afwijkingen (duidelijke rottingsgeur) en verschillen in textuur.

Tabel 1. Gemiddelde waarden voor onderzochte bacteriologische parameters uitgedrukt in KVE/g. De resultaten voor de kwantitatieve bepaling voor Brochotrix thermosphacta waren steeds onder de detectielimiet (< 100 KVE/g) en werden niet vermeld.

Staal	Analyse	Totaal aëroob kiemgetal	E. coli	Enterobacteriaceae	Melkzuurbacteriën
Belgisch vlees (versneden)	eerste analyse	1,31E+04	<10	5,00E+01	2,38E+03
	einde houdbaarheid	1,45E+07	<10	3,71E+03	1,10E+07
Argentijns vlees (versneden)	eerste analyse	1,10E+07	<10	9,77E+02	1,06E+07
	einde houdbaarheid	9,55E+07	<10	8,00E+03	7,80E+07
Argentijns vlees (niet versneden)	eerste analyse	4,51E+07	6,50E+01	2,73E+03	5,27E+07
	einde houdbaarheid	1,62E+08	<10	5,35E+05	1,24E+08



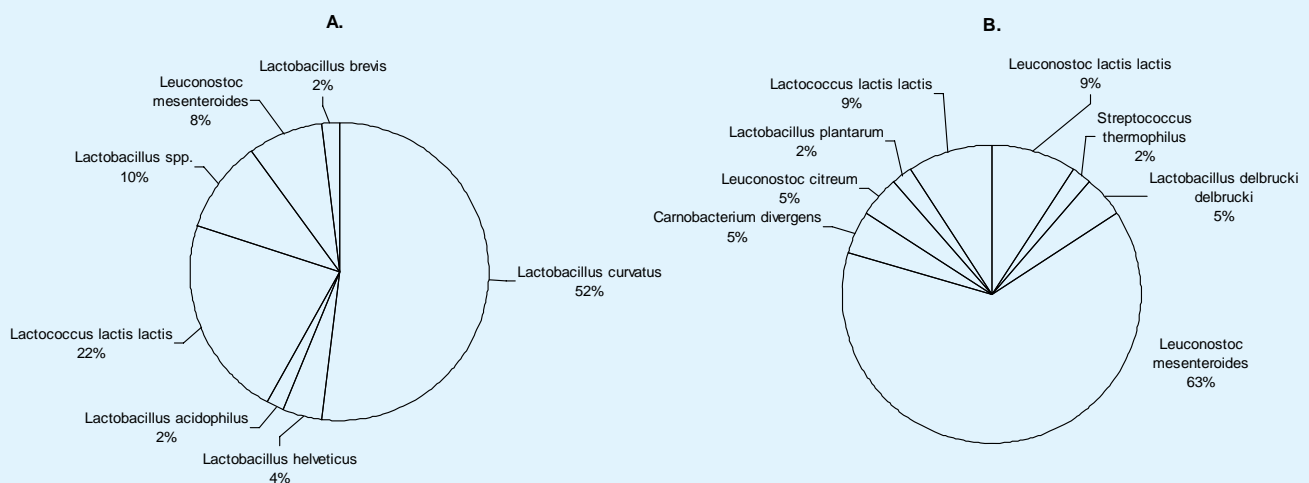
Naast de bacteriologische kwaliteit van beide rundvleessoorten werd eveneens nagegaan of irradiatie verantwoordelijk kon zijn voor de veronderstelde lange houdbaarheid van Argentijns rundvlees door het verlagen van de bacteriële contaminatie. Hiervoor werd een alkylcyclobutanone bepaling uitgevoerd door de firma Eurofins (Duitsland) op een monster uit elk geanalyseerd lot. Irradiatie kon echter worden uitgesloten, omdat de karakteristieke merker 2-dDCB (Milesi et al., 2008) niet werd teruggevonden. Dit werd eveneens bevestigd door de aantallen van en de variatie aan microbiële flora teruggevonden op het Argentijnse rundvlees (zie Tabel 1).

Een andere mogelijkheid om bewaartijd van vlees te verlengen is de additie van bioprotectieve melkzuurbacteriën, meer bepaald door hun productie van antimicrobiële metabolieten zoals organische zuren of bacteriocines (d.i. kleine antimicrobiële peptiden) (Castellano et al., 2008). Na de negatieve resultaten voor irradiatie werden volgende indicatieve waarnemingen voor de toevoeging van bioprotectieve culturen (Milesi et al., 2008) nagegaan. (i) Aanwezigheid van hoge aantallen melkzuurbacteriën ( $>10^5$  KVE/g) en hoge aantallen Enterobacteriaceae ( $>10^5$  KVE/g) in vergelijking met Europees vlees. Het Argentijnse rundvlees bevatte inderdaad meer melkzuurbacteriën en Enterobacteriaceae dan Belgisch rundvlees, zowel bij de eerste analyse als op einde houdbaarheid (zie Tabel 1), maar was dan ook al veel langer geslacht.

(ii) De detectie en identificatie van specifieke soorten melkzuurbacteriën gekend voor hun gebruik als bioprotectants in voeding, meer specifiek vlees. Hiertoe werden ad random melkzuurbacteriën geïsoleerd en geïdentificeerd uit zoals Argentijns als Belgisch rundvlees; laatstgenoemde werd ingesloten ter vergelijking. In totaal werden 50 isolaten uit Argentijns vlees en 44 isolaten uit Belgisch vlees bevestigd als melkzuurbacteriën via Gramkleuring en catalasetest - melkzuurbacteriën zijn Gram-positief en catalase-negatief - en biochemisch geïdentificeerd met API 50 CHL (incubatie 48h T = 30°C). Beide soorten rundvlees vertoonden een duidelijke dominantie van één soort melkzuurbacteriën, met daarnaast een ongeveer gelijkmatige spreiding van de isolaten over de andere aanwezige soorten (zie Figuur 1). De dominante soorten zijn wel verschillend, namelijk *Lactobacillus curvatus* in Argentijns rundvlees en *Leuconostoc mesenteroides* in Belgisch rundvlees, maar zijn allebei, zoals vele andere melkzuurbacteriën, gekende producenten van bacteriocines.

Het beperkte, en gezien de proefopzet (nl. de 'leeftijd' van de verschillende soorten vlees) normaal geachte, verschil in diversiteit aan melkzuurbacteriën en Enterobacteriaceae, en het voorkomen en de dominantie van gekende bioprotectieve species op beide vleessoorten maakt het onmogelijk om vast te stellen of een doelbewuste additie van een bioprotectieve melkzuurbacterie aan het Argentijnse rundvlees heeft plaatsgevonden.

Figuur 1. Overzicht van de diversiteit van melkzuurbacteriën geïsoleerd uit A. Argentijns rundvlees, en B. Belgisch rundvlees. Identificatie gebaseerd op biochemische API 50CH testen.



Een vergelijking van de bacteriologische kwaliteit van Argentijns en Belgisch rundvlees toont aan dat de veronderstelde verschillen in bewaartijd mogelijks minder groot zijn dan initieel verwacht. De maximaal mogelijke houdbaarheid van Belgisch vlees is niet gekend door de hoge turn-over in de winkels, maar een houdbaarheid van twee maanden is waarschijnlijk haalbaar. Daarnaast verantwoorden de resultaten van deze studie het in vraag stellen van de vooropgestelde bewaartijd (circa zes maanden) van het Argentijnse rundvlees, voornamelijk door de hoge Enterobacteriaceae aantallen, de duidelijk waargenomen organoleptische afwijkingen op het einde van de vooropgestelde bewaartijd en de afwezigheid van aanwijzingen van het gebruik van irradiatie of additie van bioprotectieve culturen. Mogelijks is de ongerustheid van de Belgische landbouwers eerder een probleem van perceptie, want het Argentijnse rundvlees bedraagt slechts 0.4% van het marktaandeel (cfr. gegevens Carrefour), is duurder dan Belgisch rundvlees (27 Euro/kg in vergelijking met 20 Euro/kg), en heeft een verschillende smaak en textuur.

### **Referenties**

- Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483-499.
- Milesi S, Soncin S, Chiesa LM, Cantoni C (2008). A study on the shelf life of frozen vacuum packaged Argentine meat. *Engineering 4 Food*, nov 2008, 19-23.

Kim Heylen, Nadine Botteldoorn en Katelijne Dirick (WIV, Brussel)  
kim.heylen@iph.fgov.be

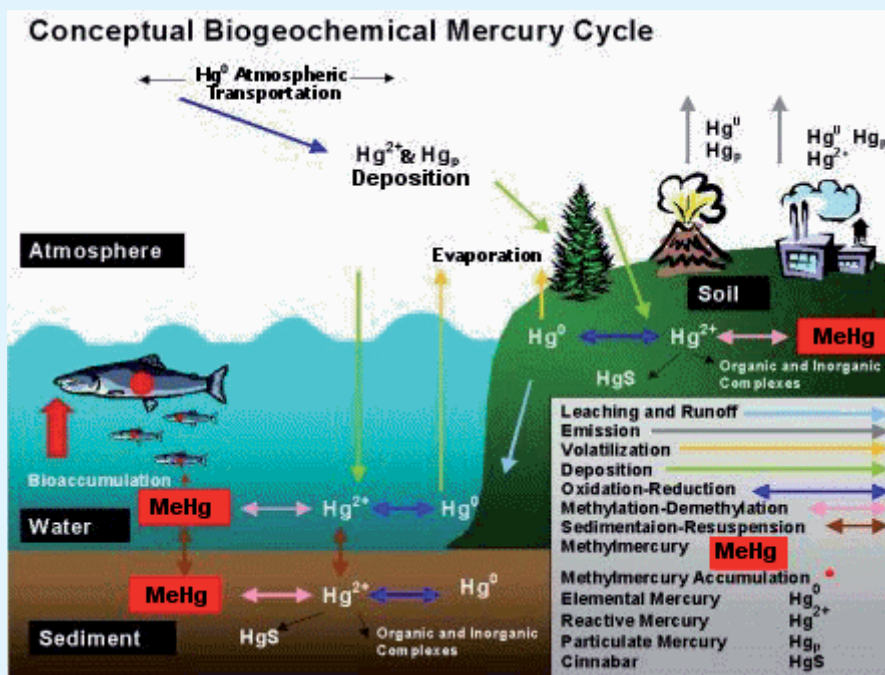


# Zware metalen

## Methylkwik

Kwik is een wijd verspreid en persistent element in het milieu. Het is van nature aanwezig in de vorm mercuri-sulfide ( $\text{HgS}$ ) of rode cinnaber. Daarnaast zijn menselijke activiteiten verantwoordelijk voor vrijstelling van kwik in de atmosfeer, de bodem en het water. Eens vrijgesteld in de omgeving ondergaat kwik een serie van complexe chemische en fysische transformaties (Figuur 1).

Figuur 1. De natuurlijke bio-geo-chemische cyclus van kwik: ontgassing van bodem en oppervlaktewater; transport in de atmosfeer; afzetting van kwik op land en in oppervlaktewater; opname van het kwik door bodempartikels



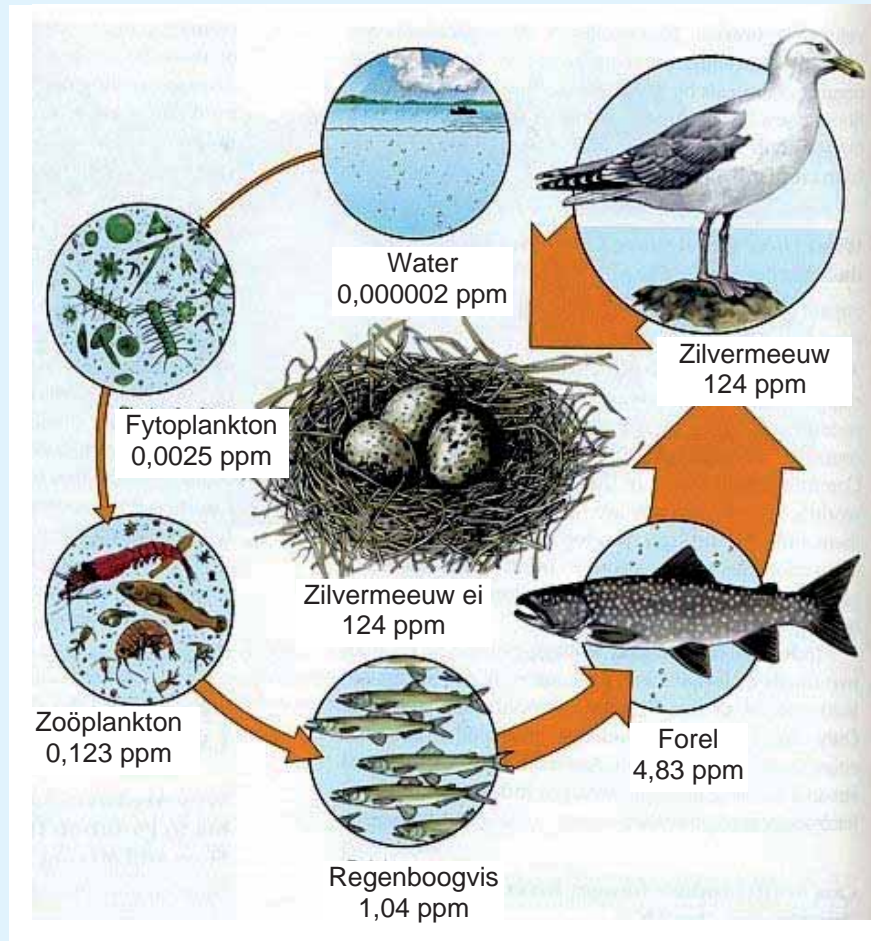
Kwik komt voor als elementair kwik en in diverse anorganische en organische verbindingen en complexen. De anorganische vormen van kwik zijn minder toxisch dan de organische, maar de anorganische vormen kunnen in water worden omgezet naar organische vormen door bacteriën. Van de organische vormen is methylkwik de meest giftige. Een waaier aan toxische effecten is gelinkt aan blootstelling aan methylkwik. Het belangrijkste effect van langdurige blootstelling aan hoge concentratie methylkwik is neurotoxiciteit. Andere effecten zijn psychologische problemen, verminderd gehoor, gezichtsverlies, ataxie, problemen met motoriek.

Consumptie van zeedieren blijkt voor mensen de belangrijkste blootstellingwijze aan methylkwik. Kwik accumuleert in de voedselketen waardoor de hoogste concentraties aan kwik worden gevonden in dieren hoger op de voedselketen en in oudere dieren (Figuur 2). De gemiddelde concentratie aan kwik in vis in Europa wordt geschat op 62 tot 97  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Afhankelijk van de soort is het aandeel methylkwik 70 tot 100 % van het totaal kwikgehalte in vis.





Figuur 2. Bioaccumulatie voor kwik



Gezien de toxiciteit van kwik, zijn door internationale organisaties normen vastgesteld voor kwik in vis en aquacultuurproducten. De normen gelden voor totaal kwik en zijn vastgesteld op 0,5 en 1 mg/kg. Voor methylkwik zijn er nog geen normen vastgelegd in levensmiddelen. Het aantal laboratoria met ervaring met de bepaling van methylkwik is beperkt. Toch is er al vele jaren onderzoek gedaan naar de bepaling van methylkwik. De oudste methoden zijn gebaseerd op Gas Chromatografie (GC) analyse van methylkwikchloride ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ). Nieuwere methoden met Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) maar ook modernere GC methoden hebben de analyse van methylkwik aanzienlijk verbeterd. De laatste jaren worden CRM geproduceerd met gewaarborgde gehalten aan methylkwik en er kan worden deelgenomen aan ringtesten voor methylkwik in vis.

De speciatiemethoden voor bepaling van methylkwik zijn opgebouwd uit 5 typische stappen:

1. Chemische digestie van de matrix en extractie van methylkwik in zijn originele vorm.
2. Omzetting van methylkwik via een derivatisatie.
3. Extractie van het analyt in een vloeibare fase, via cryogeen vangen of met Solid Phase Micro Extraction (SPME).
4. Scheiding van methylkwik van de matrix en van de andere kwikvormen.
5. Detectie en bepaling van de concentratie aan methylkwik.



Voor de digestie van kwikspecies zijn de meest voorkomende procedures de zure digestie, de alkalische digestie, de waterige destillatie, superkritische vloeistofextractie en extractie met microgolfbestraaling.

Grignard reagentia, natriumtetra-ethylboraat, natriumtetra-fenylboraat en natriumtetra-propylboraat zijn efficiënte derivatisatie reagentia.

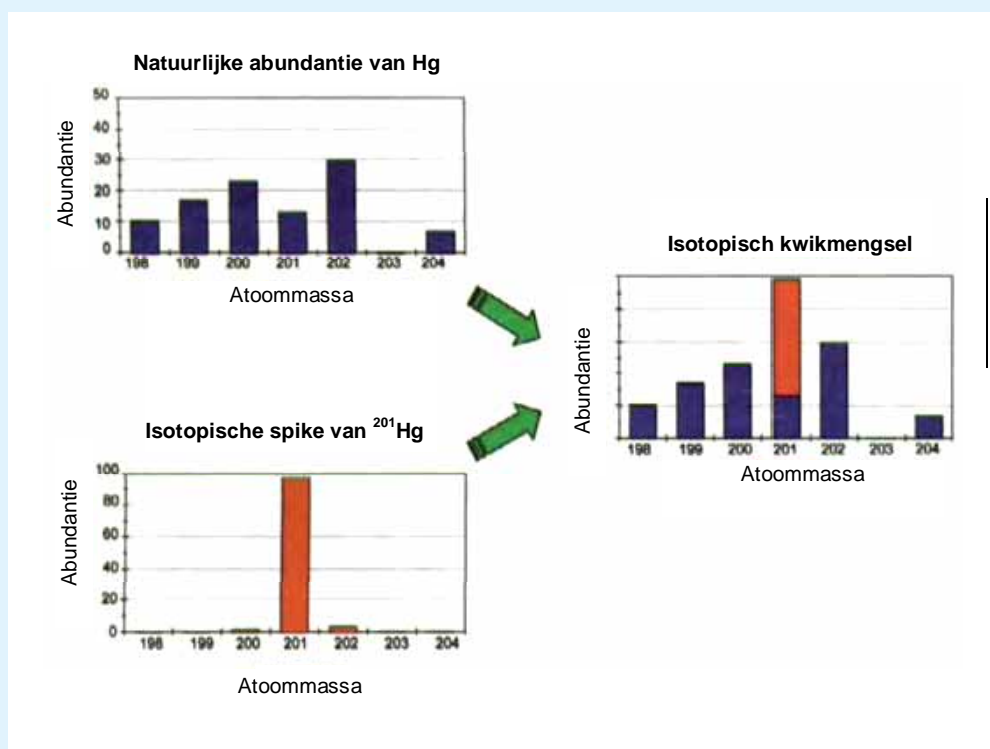
Qua scheidingstechnieken zijn GC en LC veel gebruikt, daarnaast is capillaire electroforese ook een mogelijke techniek.

Snellere methoden gebruiken SPME voor een HPLC-scheiding of combineren de digestie en derivatisatie in een microgolfmethode.

Een waaier aan detectietechnieken zijn geschikt voor methylkwikdetectie na een chromatografische scheiding: AFS, AAS, ICP-MS, ICP-OES, MIP-AES, FAPES.

De koppeling van GC met ICP-MS is de meest populaire combinatie voor kwikspeciatie door de hoge resolutie van GC en de hoge gevoeligheid, groot dynamisch bereik en multi-element capaciteit van ICP-MS. Bovendien kan met ICP-MS de meest accurate en precieze kalibratietechniek worden toegepast: de isotoopverduunningmassa-spectrometrie. Deze techniek is gevoeliger dan externe kalibratie en zelfs standaardadditie, omdat er gerekend wordt met verhoudingen en niet met absolute intensiteiten. Species-specifieke isotoopverduinning massa spectrometrie (Species Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry, SS-IDMS of kortweg IDMS) is een recente ontwikkeling die gebaseerd is op het vergelijken van de isotoop verhoudingen. Het principe van de techniek is dat aan het staal een standaardmateriaal wordt toegevoegd met gekende en stabiele isotoopverhoudingen van het gezochte element (Figuur 3).

Figuur 3. Isotoop verduinning van kwik met een isotoop verrijkt aan  $^{201}\text{Hg}$



Transformatie van species kunnen gedetecteerd worden door vergelijken van de gemeten isotoopverhoudingen met de natuurlijke isotoopverhoudingen. De techniek is dan ook enkel toepasbaar voor bepaling van elementen die meer dan één isotoop hebben. Kwik heeft meerdere isotopen, nl.  $^{196}\text{Hg}$ ,  $^{198}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$  en  $^{204}\text{Hg}$ .

SS-IDMS kan ook simultaan op verschillende elementen worden toegepast, zo bvb. kunnen tin-, kwik- en lood-species samen bepaald worden. Deze kalibratietechniek is veel preciezer en accurater dan externe kalibratie en zelfs standaardadditie, net doordat er gerekend wordt met verhoudingen i.p.v. met absolute intensiteiten voor de bepaling van de concentratie.

Een voordeel van deze aanpak is dat verlies van methylkwik gedurende de verschillende stappen van de bepalingsmethode het eindresultaat niet beïnvloedt, m.a.w. met deze techniek kan gecorrigeerd worden voor de ongewenste omzettingen (methylatie en demethylatie) van kwikspecies en zelfs voor drift van de meetapparatuur.

IDMS is een krachtige techniek om met een kleine gecombineerde meetonzekerheid resultaten te bekomen die SI traceerbaar zijn. Het Comité Consultatif pour la Quantité de Matière (CCQM) erkent IDMS zelfs als een potentieel primaire methode voor bepaling van methylkwik, wat betekent dat de methode over de hoogste metrologische kwaliteiten beschikt, dat de uitvoering ervan volledig beschreven en begrepen is en waarvoor de meetonzekerheid in SI eenheden kan uitgedrukt worden.

Besluit: Speciatiemethoden zijn complexe methoden. Dankzij IDMS is het momenteel mogelijk om methylkwik juist en vrij precies te kwantificeren en dit tot op een niveau van enkele ppb's.

Inge Van Hauteghem (FLVVG, Gentbrugge)  
Inge.vanhauteghem@favv.be



# Trichinen

## Feedback CRL – Workshops -Symposia

### Verslag 4th Workshop of National Reference Laboratories for Parasites

Deze vierde workshop werd georganiseerd door het Community Reference Laboratory (CRL) te Rome, en vond plaats op 28 en 29 mei 2009.

Naast vertegenwoordigers van de verschillende National Reference Laboratories (NRL's) van de lidstaten, en ook van deze van buiten de EU (Kroatië, Noorwegen, Servië en Zwitserland), waren er ook uitgenodigde experts, een vertegenwoordiging van de Europese Commissie en het Agentschap voor de Europese Voedselveiligheid (EFSA) aanwezig.

Mevr. B. Janackova (DG SANCO, EU) benadrukte dat een belangrijke doelstelling van deze jaarlijkse workshop het creëren van een efficiënt netwerk tussen de NRL's en het CRL is. De afgelopen 'pepsine-crisis', en de samenwerking tussen verschillende NRL's bij het terugvinden van onverwachte parasieten in voedsel heeft aangetoond dat dit reeds het geval is. Zij rapporteerde ook over de 'Working Group on Trichinella-matters' welke doorging op 21 april 2009. Sommige lidstaten testen niet volledig in overeenstemming met VO 2075/2005, maar doen hun best om zo goed mogelijk te voldoen; andere lidstaten doen aan 'risico-gebaseerde testing' zonder een officiële goedkeuring van de andere lidstaten. Hierover bestaat nog veel discussie. Enkel Denemarken heeft het officiële 'Trichinella-verwaarloosbaar risico'-statuut, geen enkele lidstaat heeft erkende Trichinella-vrije bedrijven. Derde landen moeten aan dezelfde eisen voldoen om in te voeren in de EU. Over de nakende verplichting om alle Trichinella- testen enkel uit te voeren in geaccrediteerde laboratoria werd gesteld dat de transitieperiode afloopt eind 2009. Er kan enkel gedebateerd worden over een eventuele verlenging van deze transitieperiode voor een periode van 4 jaar, gezien accreditatie noodzakelijk werd geacht door alle lidstaten en dit zo door het Europese Parlement werd gestemd. Indien deze eventuele verlenging er zou komen, zou dit ook enkel kunnen voor deze laboratoria die reeds gestart zijn met de accreditatieprocedure. De 'Working Group on Trichinella-matters' vergadert hierover in de nabije toekomst, en maakt, indien een akkoord hierover kan bereikt worden, een werkvoorstel voor het Europese Parlement. De publicatie van het officiële besluit door de Europese Commissie wordt verwacht eind 2009.

De verschillende lidstaten stelden hun NRL zeer kort voor, en gaven ook meer informatie over de notificatie van bepaalde pathogenen in hun land. Deze presentaties kunnen integraal bekeken worden op de website van het CRLP: <http://www.iss.it/crlp>.

Enkel opmerkelijke zaken: de meeste lidstaten organiseren sinds kort ringtesten voor het terugvinden van Trichinella-larven, met wisselend resultaat. In Denemarken organiseert men 2 maal per jaar een opleiding welke 3 dagen in beslag neemt. Er was ook een geval van Trichinella pseudospiralis in een nerts. Zij testen nog steeds ongeveer 99% van alle geslachte varkens gezien hun belangrijke export naar derde landen. Letland rapporteerde reeds 5 humane Trichinella-besmettingen in 2009. Deze werden allemaal veroorzaakt door de consumptie van everzwijnenvlees. Voorheen waren er ook humane besmettingen veroorzaakt door varkensvlees. Lithouwen rapporteerde 41 humane Trichinella –besmettingen in 2008, zij vonden ook 10 positieve varkens en 61 besmette everzwijnen. In Polen vond men in 2008 69 geïnfecteerde varkens, en 524 besmette everzwijnen. Zij rapporteerden ook 270 humane Trichinella- besmettingen in 2007 en 32 in 2008. Het aantal routinelaboratoria voor Trichinella-testen is daar gereduceerd van meer dan duizend naar een achthonderdtal en ringtesten worden georganiseerd. Om dit praktisch haalbaar te houden werd een speciale web-toepassing ontworpen zodat deelnemende laboratoria hun resultaten zelf kunnen ingeven. Vier medewerkers van het Poolse NRL zijn acht maanden lang fulltime bezig geweest met enkel het aanmaken van deze ringteststalen. In Roemenië vond men in 2008 1005 geïnfecteerde varkens, 27 everzwijnen en 22 beren, maar geen positieve paarden. Ook 268 humane besmettingen werden daar vastgesteld.



Slovenië rapporteerde een 1 positief everzwijn. Het Verenigd Koninkrijk vond een positieve vos in april 2009, afkomstig uit Noord Ierland. Deze werd geconfirmeerd als *Trichinella spiralis*. Zij valideren momenteel ook *Trichinella*-ELISA-testkits. In de ringtesten gebruiken zij gefixeerde larven in digestievloeistof, en sturen deze rond ter evaluatie van de tweede sedimentatiestap en de aflezing.

Servië rapporteert dat 0.06% van de varkens besmet zijn met *Trichinella*, en dat zij een tweehonderdtal humane besmettingen van *Trichinella* diagnosticeren per jaar.

Duitsland rapporteerde in 2008 1 humane besmetting, deze was niet van Duitse oorsprong. Ook een Duits privé-varkensbedrijf werd positief gevonden: 3 varkens hadden een besmetting van 1.2 tot 299 larven per gram. Waarschijnlijke oorzaak is het voederen van afval. Bij de everzwijnen werden er 13 isolaten gevonden (12 *T. spiralis* en 1 *T. pseudospiralis*), bij de vossen 3 isolaten (alle *T. britovi*), en bij de wasbeerhonden (hun populatie is aan het stijgen in Duitsland) 2 isolaten (beide *Trichinella spiralis*).

Daarnaast waren er ook interessante presentaties over *Toxoplasma gondii* in mensen, dieren en voedsel in Europa, en de ontwikkeling van nieuwe diagnostische testen voor deze parasiet. Andere sprekers zetten ook de parasieten *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Diphyllobothrium* spp. en *Opisthorchis felinus* in de kijker.

De resultaten van het EFSA-project "Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of *Echinococcus*, *Trichinella*, *Cysticercus* and *Sarcocystis* in animals and foodstuffs in the European Union" werden voor gesteld door de projectcoördinator, en een uiteenzetting over parasieten in geïmporteerde kikkerbilen werd gegeven.

Aan deze laatste twee projecten werd door het NRTL-België meegewerkt.

Wat betreft *Trichinella* werd er ook nog speciale aandacht besteed aan het mogelijk aanwenden van serologie voor de opsporing van besmetting, en het standardisatieproces van deze test.

De interlaboratoriumtesten, georganiseerd door het CRL in april 2009 voor de NRL's, ter evaluatie van het opsporen van *Trichinella* larven in varkensvlees en deze voor het aantonen van Anisakidae larven in vis filets, werden besproken.

Naar aanleiding van de 'pepsine-crisis' werd er gepeild naar de huidige situatie in de verschillende lidstaten, en naar mogelijke oorzaken en oplossingen gezocht.

Leen Claes, Instituut voor Tropische Geneeskunde Antwerpen (ITG)  
lclaes@itg.be



# Genetisch gemodificeerde organismen

## Ontwikkelingen

### Co-Extra: Europees project over co-existentie en traceerbaarheid van GGO en niet-GGO productieketens

D. Breyer<sup>1</sup>, N. Roosens<sup>1</sup>, G. Berben<sup>2</sup>, I. Taverniers<sup>3</sup>, M. Van den Bulcke<sup>1</sup> en M. Sneyers<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV), Afdeling Bioveiligheid en Biotechnologie, J. Wytsmanstraat 14, 1050 Bruxelles; <sup>2</sup> Centre wallon de recherches agronomiques (CRA-W), Département Qualité des productions agricoles, Chaussée de Namur, 24, 5030 Gembloux; <sup>3</sup> Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO), Eenheid Technologie & Voeding, Burg. Van Gansberghelaan 115 bus 1, 9820 Merelbeke

Co-Extra is een Europees project dat in april 2005 van start ging en in september 2009 wordt beëindigd. Er werken meer dan 200 wetenschappers aan mee die verbonden zijn aan 51 multidisciplinaire onderzoeksteams en een aantal privé-bedrijven uit 18 landen (Europa, Brazilië, Argentinië en Rusland). Het project beschikt over een totaal budget van 22 miljoen euro, waarvan 13 miljoen wordt betaald door de Europese Commissie via een financieringsregeling voor het 6de Europese kaderprogramma voor onderzoek.

De belangrijkste doelstelling van Co-Extra bestaat erin de tools te verstrekken die nodig zijn voor de implementatie van co-existentie en traceerbaarheid met als doel de co-existentie van productieketens met GGO-producten, met gangbare producten of met producten uit de biologische landbouw te garanderen. Dit geïntegreerde project vormt een aanvulling op twee andere Europese projecten: SIGMEA dat vooral betrekking heeft op de co-existentie op het niveau van de landbouwproductie en Transcontainer dat zich toespitst op "biocontainment".

#### **Betrokkenheid van de partners van het NRL-GGO bij Co-Extra**

Het Co-Extra consortium werd ondergebracht in 8 workpackages (WP), plus een WP voor het algemeen beheer van het project.

De partners van het NRL-GGO (WIV, CRA-W, ILVO) werden betrokken bij 3 werkpakketten: WP4 (ontwikkeling van benaderingsmethoden voor analyse en monsternamen), WP5 (ontwikkeling en integratie van tools voor analytische traceerbaarheid) en WP6 (technische uitdagingen voor het opsporen van GGO's). Het WIV werkte ook mee aan de ontwikkeling en het beheer van de website van het project (WP8).

#### **Belangrijkste resultaten van het project**

De eindresultaten van het project werden onlangs voorgesteld op een internationale conferentie (Parijs, juni 2009). Co-Extra leidde in het bijzonder tot vooruitgang op de volgende gebieden:

- Traceerbaarheid: bemonsteringsstrategieën, nieuwe methoden voor het opsporen, identificeren en kwantificeren van GGO-ingrediënten, opsporing van niet-toegestane GGO's;
- Kosten/baten van co-existentie;
- Aansprakelijkheid en schadeloosstelling verbonden met co-existentie;
- Ontwikkeling van een instrument als hulp bij de besluitvorming;
- Analyse van de standpunten van de verschillende bij co-existentie betrokken actoren.

Wat de partners van het NRL-GGO's betreft, kunnen de belangrijkste verkregen resultaten als volgt worden samengevat :

WIV: ontwikkeling van een semi-kwantitatieve benadering voor het opsporen van GGO's van soja, maïs en koolzaad met real-time SYBRGREEN PCR (gepatenteerde technologie) ; demonstratie van de prestaties van dual target plasmiden als kalibreermiddel voor de kwantificering van GGO's ; evaluatie van opslagvoorwaarden van bij PCR gebruikt materiaal : ontwikkeling van een algemene benadering om het inhibitieniveau bij PCR te meten.

CRA-W : er werd nabij-infraroodspectrometrie gebruikt om conventionele soja te onderscheiden van soja met het transgene event GTS40-3-2. Bij koolzaad was een monster van 800 mg voldoende voor een kwantitatief resultaat met een bevredigende meetonzekerheid bij aanwezigheid van 0,1% GGO. De in de praktijk toegepaste methoden bij de monstervoorbereiding konden door middel van een vragenlijst worden opgelijst. Er werd een rapport opgesteld over de opsporing van botanische onzuiverheden met de gevolgen voor de etikettering van de grondstoffen met transgene verontreinigingen waarbij ook werd gewezen op de huidige technische beperkingen.

De bijdrage van het ILVO – via wetenschappelijke publicaties of de ontwikkeling van nieuwe methoden – had vooral betrekking op : de evaluatie van de sequentiestabiliteit en de overeenstemming van deze sequenties bij proeven op soorten die als referentie gebruikt worden ; evaluatie van referentie- en kalibreermateriaal voor GGO's ; "gene stacks", de betreffende terminologie en detectiemethoden ; multiplex detectie van soorten, bemonstering, opsporen van "stacks" en van onbekende GGO's.

Meer informatie is beschikbaar :

- op de website van het Co-Extra project: <http://www.coextra.eu>
- bij het Nationaal referentielaboratorium voor GGO's (NRL-GMO) - email: [NRL-GMO@sbb.ihe.be](mailto:NRL-GMO@sbb.ihe.be)



# Dioxinen en DL-PCB

## Ontwikkelingen

### Nieuwe gecombineerde technieken bij dioxineanalyse

#### **Context**

In de dioxineanalyse verloopt de zoektocht naar de heilige graal via de ontwikkeling van betrouwbare procedures die snel en tegen een redelijke prijs congeneerspecifieke resultaten opleveren. Een dergelijke procedure moet uiteraard voldoen aan de QA/QC-voorschriften die zijn opgelegd in de (analyse-)richtlijnen van Eurachem en van de EU of andere maar ook aan de ISO17025 normen en/of aan de GLP-procedures. Elke stap van die procedures, met name extractie, opzuivering, fractionatie, chromatografische scheiding en fysico-chemische (of biologische) meting moet zo optimaal mogelijk worden gemaakt bij maximale capaciteit.

Los van de gebruikte meetmethode (fysisch-chemisch of biologisch) moet de gevoeligheid zich op ppq-niveau (part per quadrillion, 10<sup>-15</sup>) situeren. Dat komt overeen met een extreem geval van analyse op ultraspoor en houdt een echte uitdaging in voor de analytische scheikunde. T. Colborn illustreert in zijn boek « Our Stolen Future » het concept ppt (part per trillion, 10<sup>-12</sup>) door het te vergelijken met een druppel gin in een trein van met tonic gevulde tankwagens. Die trein zou meer dan 9 km lang moeten zijn. Met ppq komt een trein van meer dan 90 km overeen...

Omdat de doelanalyten in feite ultraspooren zijn moet men kunnen vertrekken van een grote hoeveelheid monster en moet men een groot aantal matrixgerelateerde interferenties uitschakelen voordat men zelfs nog maar kan denken aan de eigenlijke meting.

#### **Vorbereiding monster**

Hoe complexer het monster, hoe complexer de methode die moet worden toegepast. De extractie van doelanalyten uit de matrix en de eliminatie van ongewenste interferenties gebeuren bij middel van een methode met meerdere stappen die veel tijd en geld kosten. Hoewel Soxhlet en vloeistof-vloeistofextractie nog worden gebruikt voor respectievelijk vaste en vloeibare matrices, bestaan ook andere recentere en meer specifieke methoden. De belangrijkste daarvan zijn extractie met superkritische vloeistof, (SFE), extractie bij middel van microgolven (MAE), extractie door vloeistof onder druk (PLE), en vastefase-extractie (SPE).

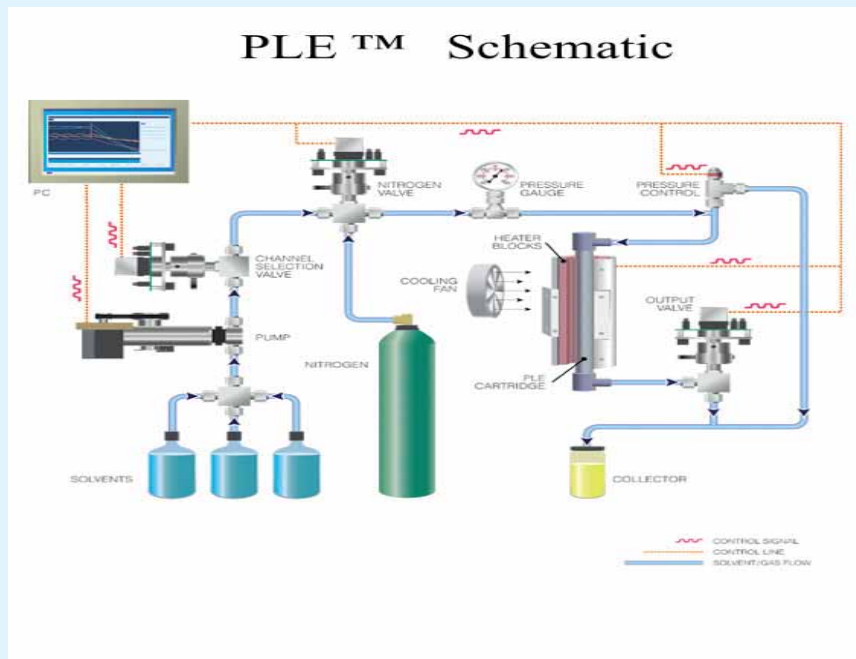
Los van de gebruikte extractiemethode moeten de extracten heel grondig worden gezuiverd en ervoor zorgen dat dioxinen, furanen en planaire PCB's worden gescheiden van de niet-planaire soorten om de gaschromatografische analyse vlotter te doen verlopen.

Een efficiënte strategie voor geïntegreerde extractie, zuivering en fragmentatie steunt op het gebruik van een geautomatiseerd online systeem. Een van de mogelijke benaderingen is een combinatie van het SPE- of PLE-extractiesysteem met een zuivering op meerdere LC-kolommen. Figuur 1 geeft het schema van een dergelijk systeem

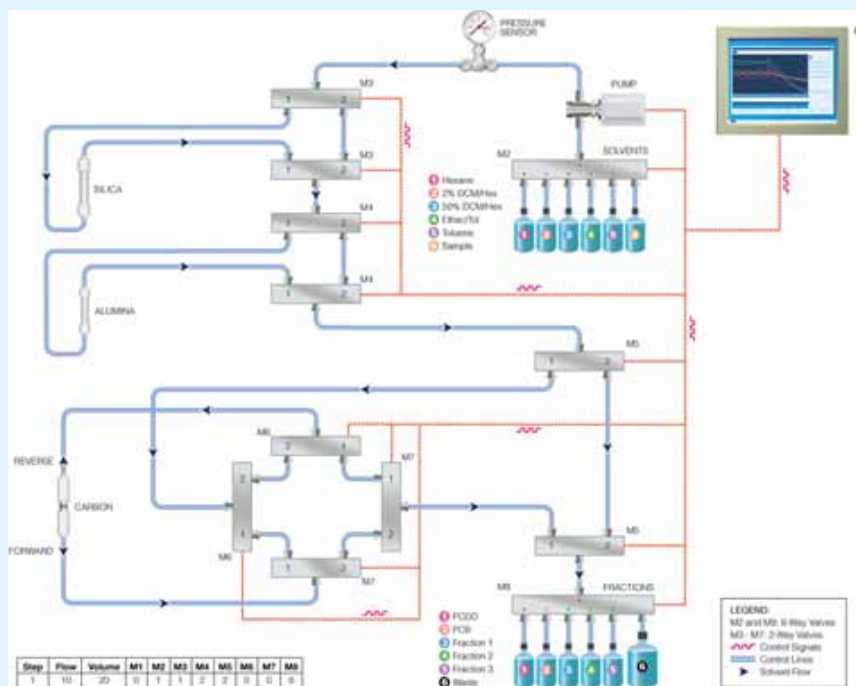


voor PLE-extractie weer. Figuur 2 geeft de opzuivering en fractionatie weer van het systeem dat gekoppeld is aan het PLE-systeem. Het monster wordt in een extractiecel gebracht en de temperatuur en de druk worden verhoogd met het oog op de extractie. Het verkregen extract wordt meteen over de verschillende zuiveringskolommen gestuurd die al naargelang van de solvent ook fragmentatie mogelijk maken. De verschillende fragmenten die daarbij worden verkregen, worden vervolgens geconcentreerd en in het GC-MS-systeem geïnjecteerd.

Figuur 1 : Schema van het geautomatiseerde extractiesysteem (type PLE).



Figuur 2 : Schema van het online geautomatiseerde opzuiverings- en fractionatiesysteem



## Meten

In de jaren zeventig deden Baughman en Meselson metingen op ppt-niveau met gebruik van hogeresolutie-massaspectrometrie. Van daaruit en met de komst van de capillaire chromatografie, het beschikbaar komen van isotoop-standaarden en de verbetering van de toestellen voor massaspectrometrie ontstond de methode die bekend staat als GC-IDHRMS (ID=isotope dilution) voor het bepalen van dioxinen. Die methode biedt de gevoeligheid die nodig is om dioxineanalyses uit te voeren omdat er een instrumentele detectiegrens van een tiental femtogram mee kan worden bereikt. Die gevoeligheid gaat bovendien samen met een zeer goede specificiteit, dankzij de massaresolutiekracht van dit toestel (High Resolution Mass spectrometry). Thans is die techniek de gouden standaard en is hij verplicht gesteld door de Europese en de Amerikaanse regelgeving voor doelgerichte dioxineanalyse en moleculaire analyse.

Als men denkt in termen van analytische dimensionaliteit kan de GC-HRMS worden verdeeld in drie dimensies: 1) gaschromatografie om de verbindingen te scheiden, die in hoofdzaak steunt op de fysisch-chemische eigenschappen, 2) massaspectrometrie voor het scheiden in massa's en 3) hoge resolutie voor identificatie van de moleculen gesteund op de juiste massa. Om het even welke andere opstelling zou dus ten minste hetzelfde aantal dimensies moeten hebben om als een waardevol alternatief te kunnen worden beschouwd.

Indien men de methode wil vereenvoudigen, zou het vervangen van de zeer complexe HRMS door een meer toegankelijk MS-apparaat het meest relevant zijn. Wanneer wij kiezen voor lageresolutiemassaspectrometrie moet de ontbrekende dimensie echter worden gecompenseerd om de dimensionaliteit van de GC-HRMS referentiemethode in acht te nemen en altijd een specifieke en exacte kwantificering in isotoopverdunding uit te voeren. In dergelijk geval zijn er verschillende opties mogelijk.

### **Gaschromatografie in combinatie met lageresolutiemassaspectrometrie met iontrap in in tandem modus (GC-Q1STIDMS/MS)**

De ontbrekende dimensie is vervangen door het volgen van de dochterionen die worden gevormd na de fragmentatie van de uitgangsionen (precursorionen). Dit biedt de vereiste specificiteit. De keuze van de tandemtechniek wordt gemotiveerd door een aanzienlijke toename van gevoeligheid, die nodig is om de vereiste gevoeligheidsdrempel van de iontrap te garanderen. De mogelijkheid om te kiezen voor een groot-volume injectie (PTV) laat de instrumentele detectiegrens dalen tot ppt-niveau.

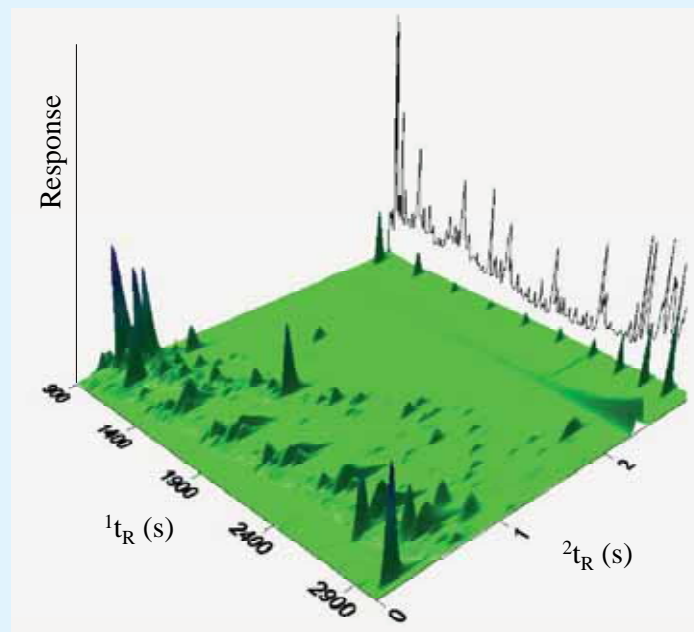
### **Tweedimensionale gaschromatografie in combinatie met time-of-flight lageresolutiemassaspectrometrie (GCxGC-TOFMS)**

In plaats van een dimensie aan de MS toe te voegen kan eveneens een chromatografische dimensie worden toegevoegd. Bij GCxGC komt het monster achtereenvolgens in contact met twee verschillende chromatografische fasen (twee dimensies) die met elkaar verbonden zijn door een modulator. Het belangrijkste voordeel van die techniek ligt in de aanzienlijke stijging van het aantal afzonderlijke pieken terwijl de analysetijd niet wordt verlengd. Het kunnen beschikken over twee verschillende orthogonale retentietijden vergemakkelijkt ook de identificatie van de verbindingen (Figuur 3). Het is dus mogelijk om in één enkele injectie meerdere types analyten te scheiden. Vanwege de geringe breedte van de pieken (50-200 ms) vereist deze techniek echter een detector met een hoge meetsnelheid. De TOFMS is de uitgelezen detector omdat die niet door de meetsnelheid is beperkt.

Het groot nadeel van die techniek is de gebrekkige gevoeligheid als gevolg van de structuur van de bron. Vergelijkende studies hebben echter aangetoond dat het gebruik van technieken op basis van groot-volume injecties de LOD's makkelijk zouden kunnen aanpassen voor dioxineanalysen in levensmiddelen.

Een groot voordeel van GCxGC-TOFMS is de uitvoerige registratie van de massa's van het gevolgde gamma. Hierdoor kunnen alle moleculen in het monster worden opgespoord zonder dat het verkrijgen van de gegevens van de targetverbindingen in gevaar wordt gebracht. De analist beschikt dus over een volledig overzicht van de inhoud van het monster die de aanwezigheid van andere contaminanten kan aantonen. De combinatie van GCxGC-TOF is een goede keuze om complexe analyseproblemen op te lossen.

Figuur 3 : Chromatogram GCxGC-TOFMS voor een monster van menselijk serum. De dioxines en PCB's bevinden zich in het midden van de grafiek.

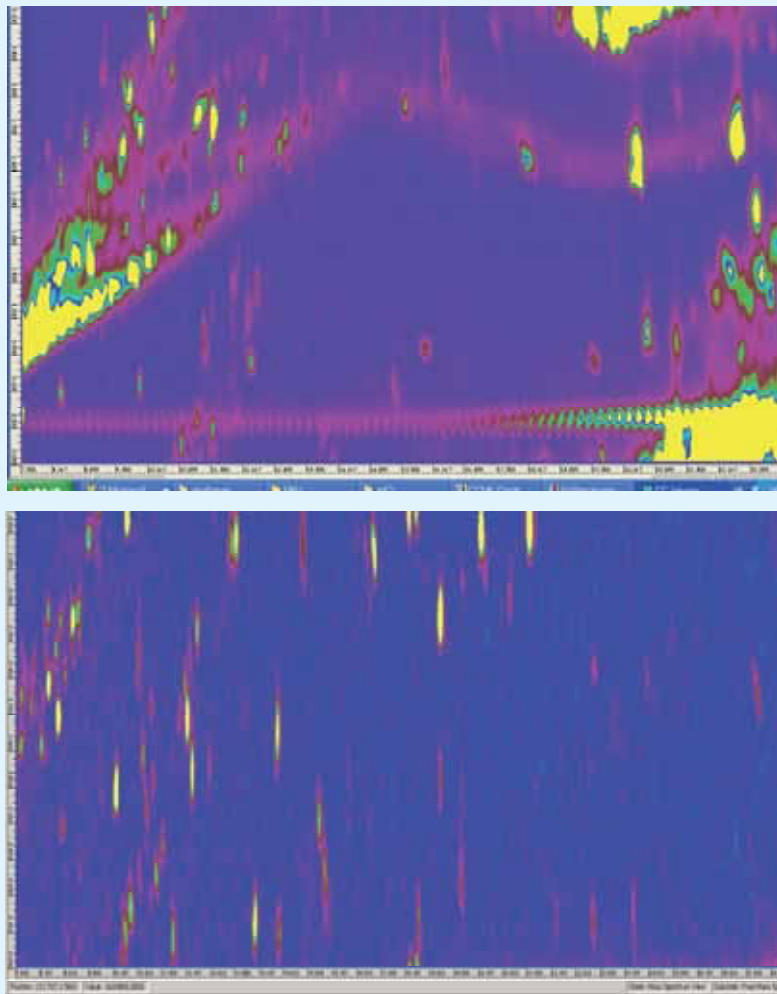


### **Tweedimensionale gaschromatografie in combinatie met quadropool lageresolutiemassaspectometrie (GCxGC-qMS)**

De quadripool is een scanmassaspectrometer (beperkte scansnelheden) zoals de hoge resolutie spectrometer en is dus geen uitgelezen detector voor GC x GC. Een combinatie van die twee technieken zou echter een andere ionisering mogelijk maken : negatieve chemische ionisatie (NCI). Die verloopt vlotter en geeft minder fragmenten vanuit het moederion. Daardoor wordt de intensiteit van het signaal van het moedereion versterkt en krijgt men een hogere gevoeligheid (Figuur 4). Vroeger gaf die ionisatiemethode een gebrekkige herhaalbaarheid en werd daardoor weinig gebruikt in de dioxineanalyse. Sinds kort is de stabiliteit van dit systeem verbeterd en zou men er eventueel een alternatief voor ionisatie door elektronenimpact (EI) van kunnen maken. Het grootste probleem blijft de ontwikkeling van procedures voor een betrouwbare kwantificering op basis van massaspectra die arm zijn aan fragmenten en waarvan de meest intense signalen vooral gebaseerd zijn op halogeenatomen in plaats van gemerkte ouderionen.



Figuur 4 : Chromatogrammen GCxGC-qFMS voor een kwaliteitscontrolemonster van rundvet. Het chromatogram bovenaan is verkegen in EI modus. Het chromatogram onderaan in NCI modus.



## Bespreking

GC-HRMS is een analysetechniek die reeds lang ingang gevonden heeft voor het analyseren van organische sporen. Alle kennis die de voorbije twintig jaar werd opgedaan, de efficiëntie en het intensieve gebruik van de techniek voor de dosering van dioxinen maken dit tot de referentiemethode.

Als gevolg van de evoluties van de laatste jaren op het vlak van massa-analysatoren, bestaan er alternatieve methoden voor HRMS. Combinaties van chromatografische technieken met deze nieuwe massa-analysatoren bieden mogelijkheden die bij de ontwikkeling van de HRMS-methoden nog ondenkbaar waren. De lijst in dit overzicht bevat niet alle mogelijkheden, enkel de meest toepasselijke alternatieven worden vermeld. Ander recent onderzoek, gebaseerd op triple quadrupole (TSQ) LRMS in tandem modus illustreert eveneens de verhoogde prestaties van dit instrument voor dioxineanalyse.

Al deze alternatieven tonen aan dat het mogelijk is om analytische prestaties te verkrijgen die aan de strenge Europese normen voldoen zonder gebruik te maken van hogeresolutiemassaspectrometrie. Het is nog even afwachten vooraleer deze moderne analysatoren op de markt worden gebracht, maar het is onvermijdelijk dat zij in de toekomst de "oude" iontrapapparatuur zullen vervangen. Deze nieuwe fysisch-chemische methoden moeten worden gezien als alternatieve technieken voor HRMS en niet als opsporingsmethoden, zoals dit het geval was voor de biologische methoden.

Een van de grootste uitdagingen van analytische chemici die actief zijn in het gebied van de spoorverontreinigingen bestaat in een tendens die de jongste jaren steeds algemener voorkomt en die erin bestaat dat het aantal verbindingen dat in de bewakingsplannen wordt vermeld, toeneemt en dat zowel voor plannen over het milieu, controle op de voedselketen of biologisch toezicht bij mensen. De beperkingen van SIM-scanning (sectorinstrumenten en iontrap massa spectrometers) worden in dit bijzondere geval duidelijk omdat maar weinig ionen tegelijk kunnen worden onderzocht. Biologische tests kunnen antwoord geven op deze problemen doordat zij de toxiciteit van een monster globaal meten in TEQ. Deze globale toxiciteit die belangrijk is voor de volksgezondheid, laat een vlotte vergelijking met specifieke normen voor de in levensmiddelen toegelaten maximumgehalten aan PCB's en dioxines echter niet toe. Met deze biologische strategie kunnen monsters worden gesorteerd en kan de fysisch-chemische analyse op de meest relevante monsters worden afgestemd.

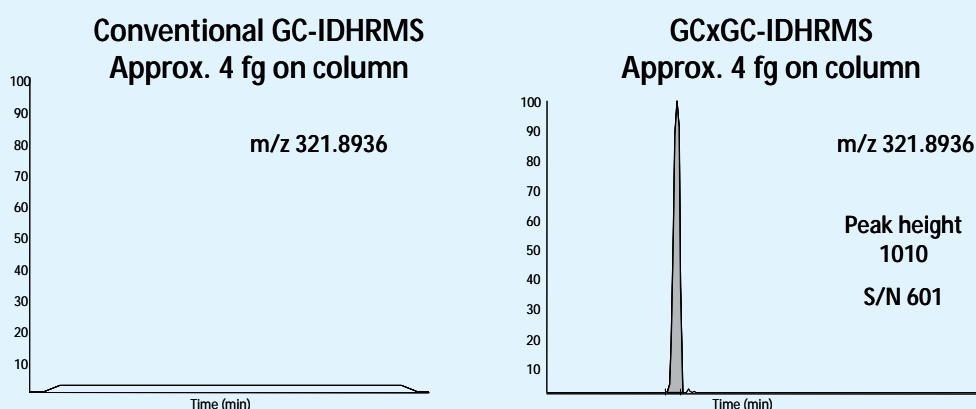
Om aan deze problemen tegemoet te komen is GCxGC-TOFMS waarschijnlijk de nieuwe techniek die niet alleen de mogelijkheid biedt om targetverbindingen te identificeren en kwantificeren, maar ook om ze te onderzoeken en om niet-targetverbindingen op te sporen. Met GCxGC kunnen elutieprofielen worden geïdentificeerd, kenmerkende profielen die samenhangen met bijzondere matrices of bronnen van verontreiniging.

Op die manier kunnen cartografieën worden opgemaakt. Dank zij het gebruik van een TOFMS als detector zijn alle spectrumgegevens beschikbaar zolang de analyse duurt en kunnen de gegevens achteraf worden verwerkt. De prijs die hiervoor moet worden betaald is dat zeer grote bestanden moeten worden beheerd om de ruwe gegevens te kunnen exploiteren.

Het tweede grote probleem waarmee de analist wordt geconfronteerd is het steeds afnemende verontreinigingsniveau dat sinds enkele jaren voor deze verbindingen wordt vastgesteld. De ruis voor dioxinen in levensmiddelen en menselijk serum is zo sterk gedaald dat meten erg moeilijk wordt. Grotere monsters gebruiken om dit probleem op te lossen is zeker niet aan te raden aangezien de complexiteit van de betrokken matrices. De inspanningen moeten gericht zijn op de verbetering van de gevoeligheid van de methoden.

De hogeresolutiemassaspectrometrie heeft nog mooie jaren voor zich aangezien onlangs met de combinatie van GCxGC en HRMS de extreme gevoeligheid van deze methode werd aangetoond. Injectie bij een  $\mu\text{g}$  ( $\mu\text{g}$  = atogram, 10-18 g) van 2, 3, 7, 8 TCDD van een monster van menselijk serum heeft geleid tot signalen met hoge S/N verhoudingen (Figuur 5).

Figuur 5 : Chromatogram GC-HRMS (links) en GCxGC-HRMS (rechts) voor een monster van menselijk serum (12C-2,3,7,8-TCDD).



Deze combinatie houdt ook enkele beperkingen in zoals de beperking van het aantal ionen dat kan worden gevolgd en de fluctuaties in de berekeningen van de isotoopverhoudingen. Deze beperkingen zijn gekoppeld aan het zeer beperkt aantal moleculen die effectief in de massa-analysator binnenkomen. Toch is het evident dat het gelijktijdig gebruik van GCxGC-HRMS met een meer exhaustieve methode zou leiden tot een afname van het aantal analyten waarvoor geen signaal wordt vastgesteld.

De algemene tendens die in de analytische sporenchemie naar voren komt bestaat erin om meer algemene en veranderlijke analysemethoden te ontwikkelen. Er wordt gewerkt aan de geïntegreerde en geautomatiseerde benadering van de verschillende stappen in de voorbereiding van het monster en de analyse door GC-MS. De verbetering van onze huidige procedures is mogelijk en is al opgestart om de uitgevoerde analyses zodoende een zo hoog mogelijke rendabiliteit te verschaffen.

Jean-François Focant

(CART, Centre d'Analyse des Résidus en traces, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Université de Liège, Allée de la Chimie 3, B-6c Sart-Tilman, B-4000 Liège)

JF.Focant@ulg.ac.be

# Melk en Melkproducten

## Feedback CRL – Workshops - Symposia

### Verslag van de deelname aan de 12de Workshop van het EU Community Reference Laboratory for Milk and Milkproducts (CRL MMP)

Als Nationaal Referentie Laboratorium (NRL) consortium Melk en Melkproducten namen het ILVO-T&V en het CRA-DQPA op 28 en 29 mei 2009 deel aan de tweejaarlijkse door het Europees Referentie Laboratorium (CRL) Melk en Melkproducten georganiseerde algemene workshop.

Deze CRL werking is ondergebracht in het Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité Alimentaire et sur les Procédés Agroalimentaires – LERQAP te Maison (FR) Alfort en wordt gecoördineerd door Dhr. Bertrand Lombard. Op de CRL workshop waren de NRLs van 26 verschillende EU landen vertegenwoordigd. Voor het NRL België waren Véronique Ninane (CRA-DQPA) en Koen De Reu (ILVO-T&V) aanwezig.

Na de inleiding werd een overzicht gegeven over de kerntaken van een CRL en een NRL. De CRL en NRL taken staan opgenomen in de EU Verordening 882/2004, respectievelijk onder artikel 32 en 33. Een NRL moet o.a. intens samenwerken met het CRL, de informatie van het CRL doorgeven op nationaal niveau, de referentieactiviteiten op nationaal niveau uitvoeren of coördineren, deelnemen aan vergelijkend onderzoek en wetenschappelijk rapporteren aan de bevoegde overheid. Het CRL moet op zijn beurt de EU inlichten over het eventueel niet grondig meewerken van het NRL of het bekomen van slechte resultaten tijdens een rondzendonderzoek.

Vervolgens kwam de noodzaak van accreditatie voor officiële controle ter sprake. Overeenkomstig de Verordening 882/2004 moet de officiële controle gebeuren onder accreditatie (bv. ISO 17025 of ISO 17011) (art. 12). De Verordening 2076/2005 (art. 1 en 18) stelt dat deze eis voor officiële controlelaboratoria en dus ook voor CRL en NRL laboratoria moet ingaan vanaf 31 december 2009. Voor de CRL en NRL laboratoria geldt dit voor de referentiemethoden (o.a. opgenomen in de Verordening 2073/2005 en 1664/2006) waarvoor zij bevoegd zijn. De referentiemethoden in het kader van de scope van de NRLs Melk en Melkproducten, staan opgenomen in de 1664/2006 Verordening en betreffen totaal kiemgetal, somatisch celgetal en alkalisch fosfatase. Hierop volgde een discussie over de mogelijkheid om de referentiemethode voor somatisch celgetal (EN ISO 13366-1) te accrediteren, gezien de vele problemen met deze methode en de beperkte toepassing ervan in de praktijk. De diverse aanwezigen op de workshop waren het erover eens dat de referentiemethode voor het somatisch celgetal de komende jaren hét aandachtspunt voor het CRL en de NRLs moest worden.

Vervolgens werden de resultaten van het ringonderzoek totaal kiemgetal georganiseerd in 2007 besproken. Het ringonderzoek toonde aan dat het NRL netwerk in staat is deze analyse op een degelijke manier uit te voeren.

Vanaf 2009 zal het CRL de stalen voor dit ringonderzoek zelf aanmaken en voorziet het om deze reden een voorafgaande studie over de bewaring van de stalen. Aan rauwe melk zullen drie types bewaarmiddel (natriumazide, boorzuur en een boorzuurmengsel met glycerol) toegevoegd worden en zal de stabiliteit gedurende bewaring opgevolgd worden. Aangezien DG SANCO aan het CRL gevraagd heeft om de kwaliteit (totaal kiemgetal) van colostrum melk (eerste melk, rijk aan antistoffen) in de praktijk te onderzoeken werd de wijze van uitvoering van dit onderzoek toegelicht en besproken. Er zal o.a. ook nagegaan worden wat de invloed van diepvriezen op dergelijke monsters is. Indien diepvriezen mogelijk is kunnen monsters van andere landen in de studie opgenomen worden. Bedoeling is een algemeen idee te krijgen van de bacteriologische kwaliteit van colostrum melk. Vervolgens werden door het CRL de preliminaire resultaten besproken over de validatie van het Bactocount (Bentley) toestel, dat een alternatief kan zijn voor het Bactoscan routine toestel voor het bepalen van het totaal kiemgetal van rauwe melk. Het principe van het Bactocount toestel is vergelijkbaar met dat van de Bactoscan, nl. gebaseerd op een kleuring van het DNA van de bacteriën en flowcytometrie. De tussentijdse resultaten wijzen op een te



hoge residuele standaardafwijking tussen de resultaten bekomen met het toestel en de referentieresultaten. De checklist voor de controle bezoeken aan de laboratoria die Bactoscan toestellen gebruiken werd vervolgens toegelicht. Deze checklist werd opgesteld door het CRL in zeer nauwe samenwerking met het ILVO-T&V (Koen De Reu). Ervaring van verschillende NRL laboratoria (o.a. U.K.) heeft reeds aangetoond dat de checklist nuttig is. Het CRL moedigt de verschillende NRLs aan om deze checklist intens te gebruiken.

Vervolgens werd het resultaat van een questionnaire omtrent de praktijksituatie voor de bepaling van het totaal kiemgetal in het kader van de uitbetaling van rauwe melk toegelicht. Deze questionnaire gaf aan dat de melkveebedrijven in de EU gemiddeld 49 koeien hebben. Het merendeel van deze melk wordt dagelijks of tweedagelijks geleverd aan de zuivelindustrie. In 8 van de 21 landen die geantwoord hebben worden de stalen volledig automatisch genomen. In 9 gevallen kan de staalname zowel automatisch als manueel gebeuren. In de overige 4 landen gebeurt alles manueel. In 11 landen wordt bewaarmiddel aan de melk toegevoegd terwijl in de overige landen de analyse op rauwe melk gebeurt na gekoelde bewaring. De meeste landen maken eveneens gebruik van één enkele conversietabel voor alle Bactoscan toestellen opgesteld in hun land.

Het volgende onderwerp op de agenda betrof de bepaling van het somatisch celgetal. In een eerste presentatie van Mevr. Alexandra Cauquil (CRL) werden de resultaten bekomen tijdens het ringonderzoek van 2008 besproken. De bepaling werd uitgevoerd met de referentiemethode EN ISO 13366-1. Zowel het ILVO-T&V als het CRA-DQPA namen hieraan deel. Globaal genomen waren de bekomen resultaten van de diverse NRLs beter dan in 2002. Daaropvolgend werden zowel een questionnaire over referentiemateriaal voor deze parameter als het ontwerpen van een referentiesysteem uitvoerig besproken.

De tweede dag stond voornamelijk in het teken van de bepaling van de alkalische fosfatase (ALP) activiteit in melk. In een eerste presentatie werd het ringonderzoek georganiseerd in 2007 toegelicht. Opvallend was dat de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van het NRL netwerk opvallend beter was dan de streefwaarden opgenomen in de ISO 118116-1 methode. Het is de bedoeling dat de bekomen prestatiekenmerken opgenomen worden in een aanvulling op deze ISO norm. Het ILVO-T&V nam deel aan het ringonderzoek en bekam goede resultaten. In voorbereiding op het ringonderzoek voor 2009 zal het CRL voorafgaand een homogeniteit en stabiliteitstudie uitvoeren. De bewaring zal gebeuren bij 4°C (3 weken) en -20°C (1 jaar). Daarnaast zal de stabiliteit en homogeniteit na verzenden gecontroleerd worden.

Vervolgens gaven Mevr. Louisa Pellegrino (NRL-IT) en Mevr. Marina Nicolas (CRL) een overzicht van de bekomen resultaten aan ALP in verschillende types gepasteuriseerde kazen. Op basis van hun resultaten is er het idee om voorlopig de limiet van 6 mU/g kaas voor te stellen als wettelijke limiet aan DG SANCO. Er wordt echter nogmaals benadrukt dat ook resultaten van andere lidstaten welkom zijn. De ALP activiteit van gepasteuriseerde geitenmelk werd eveneens in 8 NRL landen bestudeerd. Zes landen gaven aan dat de fosfatase activiteit lager ligt dan 350 mU/l, de norm voor koemelk. In twee landen, Roemenië en Cyprus, worden echter hogere waarden bekomen. Er wordt aan de aanwezige lidstaten gevraagd om eventueel beschikbaar bijkomend onderzoek te bezorgen. Wat kameel-, ezel- en paardenmelk betreft werd door diverse onderzoeksgroepen, waaronder het ILVO-T&V, aangetoond dat ALP geen geschikte parameter is voor het controleren van een goede pasteurisatie of besmetting met rauwe melk.

Vervolgens lichtte Mevr. Marina Nicolas de resultaten toe van een vergelijkend onderzoek tussen de alternatieve fotometrisch methode (Enzymatic photo-activated system – EPAS) NovaLum en de referentiemethode Fluorophos. De alternatieve methode vertoont een positieve bias t.o.v. de referentiemethode. Gezien de lineaire correlatie is het misschien mogelijk om te werken met een conversiefactor om de resultaten van de alternatieve methode af te stellen op deze van de referentiemethode. De afwijking kan verklaard worden door het feit dat de twee methoden gebaseerd zijn op een verschillend principe en een verschillend substraat.

In een volgende voordracht kwam de reactivatie van ALP ter sprake. Het ALP zit als dimeer gebonden op vetglobulen. Magnesium speelt een belangrijke rol bij de vorming van dit dimeer. Bij een pasteurisatie gaat het dimeer over tot een monomeer en zit magnesium niet meer gebonden. In vetrijke producten is het echter mogelijk



dat na pasteurisatie het vrijgesteld magnesium toch opnieuw gaat binden met het monomeer en opnieuw een dimeer gevormd wordt waardoor het ALP opnieuw geactiveerd wordt. Deze reactivatie is afhankelijk van de temperatuur.

Tot slot werd de workshop afgesloten met het vastleggen van alle CRL en NRL activiteiten gepland voor de periode 2010-2011.

Koen De Reu  
Koen.Dereu@ilvo.vlaanderen.be

## **Normatieve en wettelijke ontwikkelingen**

Nieuwe IDF- FIL (International Dairy Federation – Fédération International de Laiterie) normen in 2008 - 2009 (van 20 november 2008 tot 12 mei 2009):

### ***Normen:***

ISO 3356|IDF 063:2009 - Milk – Determination of alkaline phosphatase

ISO 22935-1|IDF 099-1:2009 – Milk and milk products – Sensory analysis – Part 1: General guidance for the recruitment, selection, training and monitoring of assessors

ISO 22935-2|IDF 099-2:2009 – Milk and milk products – Sensory analysis – Part 2: Recommended methods for sensory evaluation

ISO 22935-3|IDF 099-3:2009 – Milk and milk products – Sensory analysis – Part 3: Guidance on a method for evaluation of compliance

ISO 5764|IDF 108:2009 – Milk – Determination of freezing point

ISO 23065|IDF 211:2009 – Milk fat from enriched dairy products – Determination of omega-3 and omega-6 fatty acid content by gas-liquid chromatography

### ***Andere nuttige IDF publicaties:***

IDF Bulletin nr 433/2009 'A revolution in food safety management – E-form'

IDF Bulletin nr 434/2009 'International collaborative study on the gas-liquid chromatographic method for the determination of milk fat purity in milk and milk products'

IDF Bulletin nr 435/2009 'Standardization of a chemiluminescent method to detect alkaline phosphatase in liquid dairy products'

Koen De Reu  
Koen.Dereu@ilvo.vlaanderen.be



## Workshops & Symposia

Datum	Onderwerp	Plaats	Meer informatie (website)
21/11/2009	Leven in de brouwerij!	Leuven	KVCV
11-13/11/2009	New Challenges in Food Preservation: Processing – Safety - Sustainability	Budapest	EFFoST <a href="http://www.fffost-conference.elsevier.com">www.fffost-conference.elsevier.com</a>
23-24/11/2009	New Trends in Food Analysis From LC-MS Technologies to UPLC	Paris, Espace Saint Martin, France	AOAC Europe, ASFILAB
24/11/2009	Symposium Chemische Veiligheid van de Voedselketen – Recente Wetenschappelijke Ontwikkelingen	Tervuren	FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu <a href="https://portal.health.fgov.be">https://portal.health.fgov.be</a>
7-8/12/2009	Novel Food	Mainz, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com">www.akademie-fresenius.com</a>
26-27/01/2010	International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP)	Brugge	<a href="http://www.ordibo.be">www.ordibo.be</a>
27-29/01/2010	Eleventh International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-11)	Brugge	<a href="http://www.ordibo.be">www.ordibo.be</a>
22-26/03/2010	10th ASM Conference on Candida and Candidiasis	Miami, USA	
25/03/2010	Antibiotica en Alternatieven (AOAC Lowlands Symposium)	Breda, Nederland	<a href="http://aoaclowlands.nl/symposia.html">http://aoaclowlands.nl/symposia.html</a>
5-8/05/2010	ISOPOL XVII - International Symposium On Problems Of Listeriosis	Porto, Portugal	
1-4/06/2010	6th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis	Gent	Ugent, Faculty of Pharmaceutical Sciences <a href="http://www.vdra.ugent.be">http://www.vdra.ugent.be</a>
06/2010	2nd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens	Toronto, Canada	
21-26/08/2011	DIOXIN2011, 31st Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 21-26 August 2011, Brussels, Belgium.	Brussels, Belgium	JF.Focant@ulg.ac.be





# Labinfo