



Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- 4 Typering van bacteriën: een onvermijdelijke fase in de epidemiologische opvolging van door voedsel overgedragen besmettelijke ziekten
- 7 De Aziatische fruitvlieg *Drosophila suzukii*: na insleep, vestiging en de eerste schadesymptomen nu ook onderzoek naar beheersingsmogelijkheden
- 12 MALDI-TOF MS als identificatietool voor voedselpathogenen
- 15 Eten van insecten
- 18 "Next Generation Sequencing" ter identificatie van GGOs in levensmiddelen en diervoeder producten
- 21 Atmospheric Pressure Gas Chromatography-Tandem mass spectrometry (APGC-MS/MS) voor de analyse van dioxines en PCB's in levensmiddelen en diervoeders.
- 24 Evolutie van de screeningmethodes voor de opsporing van residuen
- 28 Workshops & Symposia



LabInfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

Redactiegroep

Dirk Courtheyn, Marnix De Gruyter, Conny De Schepper, Alain Dubois, Marc Evrard, Geert Janssens, Alain Laure, Kathleen Martens, Eva Wevers en Marie-Christine Wilem

Auteurs van dit nummer

Bert Matthijs, Pierre Wattiau, Hein Imberechts, Hans Casteels, Johan Witters, Nick Berkvens, Marie Polet, Nadine Botteldoorn, Katelijne Dierick, Marnix De Gruyter, Sander Willems, Marie-Alice Fraiture, Sigrid De Keersmaecker, Nancy Roosens, Gauthier Eppe, Georges Scholl, Jean-François Focant, Edwin De Pauw en Philippe Delahaut

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 K04/120218
Kruidtuinlaan 55
1000 Brussel
Tel.: 02.211.87.33
dirk.courtheyn@favv.be

Beste lezer,

Sinds de vorige uitgave van Labinfo is er heel wat gebeurd. Geert De Poorter verliet ons na een mooie carrière bij het FAVV om bij de FOD Economie nieuwe uitdagingen aan te gaan.

Ikzelf aanvaardde op vraag van onze gedelegeerd bestuurder Herman Diricks om, in afwachting van de definitieve aanduiding van de vervanger van Geert, ad interim de functie van Directeur-generaal Laboratoria op mij te nemen. En ik kreeg amper tijd om me in te werken, of daar was de nieuwe regering met een regeerakkoord en de daaraan verbonden besparingen. Sindsdien is er zeer hard gewerkt aan een besparingsstrategie waarbij we ook in de toekomst als Bestuur Laboratoria over de nodige middelen zullen beschikken om onze missie en kerntaken op een professionele en kwaliteitsvolle manier te kunnen vervullen.

Het resultaat daarvan is dat we niet alleen intern een serieuze inspanning moeten leveren, we vragen die inspanning ook van onze belangrijkste partners: de nationale referentielaboratoria (NRL's) en de verenigingen voor de bestrijding van dierenziekten (DGZ en ARSIA). De gesprekken die in dat verband met deze partners gevoerd worden zijn niet makkelijk, maar verlopen in een sereen, open en constructief klimaat. Ik wil hen via deze weg hiervoor bedanken en hoop dat we er samen in slagen om deze besparingsoefening om te vormen tot een opportuniteit om ons aller werking te verbeteren. Om de toekomst veilig te stellen zullen we ongetwijfeld inventief moeten zijn en nog beter moeten samenwerken, zowel met de NRL's als met de erkende laboratoria.

Dat er ook heel wat nieuwe ontwikkelingen zijn bij de analysetechnieken en te bepalen parameters op het vlak van voedselveiligheid zal u kunnen merken in de artikels van dit nummer van Labinfo.

Ik wens u veel leesgenot met deze dertiende editie van Labinfo.

Bert Matthijs
Directeur-generaal Laboratoria a.i.

Typering van bacteriën : een onvermijdelijke fase in de epidemiologische opvolging van door voedsel overgedragen besmettelijke ziekten

Pierre Wattiau en Hein Imberechts

*Unit "Foodborne and Highly Pathogenic Zoonoses", Operational Direction Bacterial Diseases, CODA-CERVA,
Groeselenberg 99, 1180 Brussels*

De opsporing van pathogene bacteriën op alle niveaus van de voedselketen brengt de uitvoering van verschillende methodologieën in het laboratorium met zich mee. Aan iedere bacterie zijn procedures verbonden die verschillen naargelang de kenmerken van de bacterie, de te analyseren matrix, de te bereiken gevoeligheid van de opsporing en het gewenste karakterisatieniveau van het micro-organisme. Verrijking, kweek en identificatie vormen de eerste fasen van een bacteriologische analyse en leveren kritische resultaten op over de microbiologische kwaliteit van de geanalyseerde matrices. De resultaten van deze fasen hebben echter zeer weinig nut wanneer de oorsprong van een besmetting moet worden getraceerd, klinische gevallen moeten worden vergeleken of een gemeenschappelijke bron van besmetting moet worden vastgesteld. Hiervoor zijn gespecialiseerde technieken noodzakelijk die erop gericht zijn het equivalent van een bacteriële fingerprint te maken. Dit artikel geeft een kort overzicht van de populairste technieken die hiervoor worden gebruikt en van hun toepasbaarheid in verschillende contexten.

De traditionele identificatie van routinematig geïsoleerde bacteriën stopt in het algemeen op het niveau van de soort of subsoort. In bepaalde gevallen kan de identificatie van bacteriesubsoorten verlopen via het onderzoek naar specifieke biochemische kenmerken (biotypes). In andere gevallen zal de aanwezigheid van virulentie- of kolonisatiefactoren (pathotypes) worden onderzocht, zullen de antigenen op het oppervlakte van bacteriën (serotypes) worden geïdentificeerd, zullen specifieke genetische profielen (genotypes) worden opgespoord, zullen de geproduceerde toxines (toxintypes) worden gekenmerkt, zal het resistentieprofiel voor bacteriële referentievirussen (faagtypes) of het electroforetisch profiel van ribosomaal RNA opgedeeld door restrictie-enzymen (ribotypes) worden opgemaakt enz. Al deze "eerstelijns" methoden zijn echter slechts voldoende gevoelig om op toereikende wijze de identiteit of rechtstreekse verwantschap tussen verschillende isolaten vast te leggen. Daarvoor moet er worden gekeken op het niveau van de fijne samenstelling van bacteriën door middel van technieken die geschikt zijn om minieme verschillen in de macromoleculen waaruit ze bestaan, te vinden. De volgende paragrafen beschrijven kort de methoden van subtypering gebaseerd op DNA, waaronder de populairste methoden met hun voordelen en nadelen.

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Met pulsed field elektroforese kan een scherpe print van het bacteriële genoom worden genomen door zeer grote DNA-fragmenten te scheiden. Met deze techniek kunnen de verschillen in genomen, die volgen op deleties (verwijderingen), toevoegingen of herschikkingen die het onderscheid maken tussen bacteriën van een zelfde subsoort, worden gevisualiseerd. De techniek is gevoelig en universeel, maar het werk vereist kostbare en geoeffende arbeidskrachten.

MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis)

Deze techniek heeft als doel de lengte te bepalen van korte herhalende sequenties die zijn onderverdeeld in het genoom van de meeste bacteriën: omdat het aantal herhalingen extreem varieert per stam, kan de identiteit of nabijheid van 2 stammen zo op zeer betrouwbare wijze worden vastgesteld. Hoewel relatief gemakkelijk uit te voeren, is MLVA niet universeel en moet voorafgaand een schema van typering voor iedere subsoort worden opgesteld en gevalideerd. De hypergevoeligheid van bepaalde merkers, die foutief kunnen leiden tot verschillen tussen identieke bacteriën, werd eveneens gemeld.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

De CRISPR patronen, aanwezig bij ongeveer de helft van de bacteriën, bestaan uit groepen herhaalde nucleotidensequenties die worden gescheiden door unieke sequenties waarvan de organisatie en samenstelling variëren van de ene bacterie tot de andere binnen eenzelfde soort. Deze sequenties kunnen tegelijk dienen voor de identificatie van de subsoort en voor de identificatie van groepen individuen binnen deze subsoort. Hoewel gemakkelijk uit te voeren, is deze techniek beperkt in gebruik omdat ze niet van toepassing is op bacteriën met CRISPR patronen in hun genoom.

MLST (Multiple Loci Sequence Typing)

Deze methode bestaat uit het vaststellen van de sequentie van nucleotiden van enkele genen (5 - 10) verspreid in het genoom en die een hulpmiddel zijn voor de codering van hulpeiwitten. De gevoeligheidsgraad is zeer variabel in functie van de bacteriesoort en de uitvoering is relatief langdurig en duur. De methode is zeer nuttig voor taxonomische en fylogenetische studies, maar is van weinig belang voor de tracering van epidemieën.

WGS (Whole Genome Sequencing)

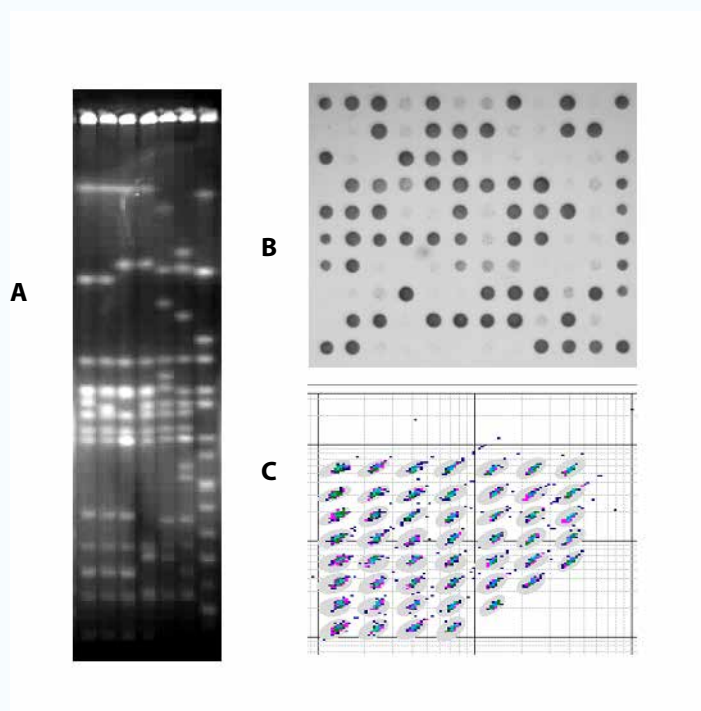
Het betreft hier de vaststelling van de volledige sequentie van het genoom van een bacterie. Meestal is deze sequentie eerst samengesteld uit een groot aantal fragmenten met een lengte die varieert tussen 100 en 250 nucleotiden naargelang de technieken en die een groot aantal keren worden vastgesteld voor eenzelfde genoom. Overlappingsen tussen de fragmenten en/of hun relatieve posities ten opzichte van een referentiesequentie kunnen dienen voor het samenvoegen van het volledige of een gedeelte van het genoom waarvan de sequentie is bepaald. De WGS-technieken, waarvan de populariteit blijft stijgen en de kostprijs blijft dalen, zijn het gevoeligst.



Mits een gepaste computerverwerking kunnen ze met de grootste betrouwbaarheid de graad van verwantschap tussen verschillende bacteriën vaststellen. Hun routinematig gebruik staat desondanks nog niet op de dagorde, hoewel het weinig twijfel lijdt dat ze vroeg of laat de andere technieken zullen verdringen.

SNP typing (Single Nucleotide Polymorphism typing)

De gegevens van sequencing kunnen worden benut om nucleotiden waarvan de identiteit per bacterie binnen een zelfde subsoort verschilt, te identificeren. Wanneer ze worden onderzocht op verschillende plaatsen binnen eenzelfde genoom van een bacterie, kunnen deze polymorfe nucleotiden een genetische handtekening opleveren die voldoende ingewikkeld en uniek is om die te onderscheiden van eender welke andere genetische handtekening. Deze methode heeft als voordeel minder duur te zijn, zonder dat dergelijke geavanceerde instrumenten als die voor WGS noodzakelijk zijn. Microarrays zijn de tools bij uitstek om gelijktijdig veel verschillende polymorfe nucleotiden of een opvallend genetisch profiel te onderzoeken. Er bestaan meerdere formaten van microarrays naargelang ze zijn samengesteld uit minuscule DNA "spots" geprint op het oppervlak van een glazen microscoopplaatje of op microbolletjes bedekt met DNA in suspensie in een vloeistof.



Figuur 1. Typisch profiel van een resultaat van bacterietypering door PFGE (A), via onderzoek van SNPs door middel van een DNA-microarray geprint op een glazen microplaat (B) of via onderzoeken van SNPs door middel van piepschuim bolletjes geselecteerd door flowcytometrie (C).

Pierre.Wattiau@coda-cerva.be

De Aziatische fruitvlieg *Drosophila suzukii*: na insleep, vestiging en de eerste schadesymptomen nu ook onderzoek naar beheersingsmogelijkheden

Hans Casteels, Johan Witters en Nick Berkvens

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Eenheid Plant – Gewasbescherming

Burg. Van Gansberghelaan 96 bus 2, 9820 Merelbeke

Inleiding

Eén van de meest gekende fruitvliegjes in onze contreien is *Drosophila melanogaster* (familie *Drosophilidae*). Dit “klassieke fruitvliegje” is in de zomermaanden veelvuldig terug te vinden op (over)rijp fruit, en op fruit- en groenteresten in onze GFT-containers. Ondanks het feit dat de aanwezigheid van dit vliegje vaak hinderlijk is voor de mens is het niet schadelijk. De larven van deze soort zijn bovendien nuttig en spelen samen met de larven van veel andere *Drosophilidae* een belangrijke rol in ons ecosysteem omdat ze bijdragen tot het afbreken van allerlei organisch materiaal. Wereldwijd zijn er meer dan 3800 fruitvliegsoorten gekend; een vliegje meer of minder kan dan toch geen kwaad?

Ja, toch wel, in het geval van de Aziatische fruitvlieg *Drosophila suzukii*, ook nog suzukivlieg genoemd, kan dit op termijn zware economische gevolgen hebben voor onze fruitteeltsector. Dit fruitvliegje is één van de meest gevreesde plaaginsecten in de Europese klein- en steenfruitteelt; in de Verenigde Staten en Zuid-Europa zijn al opbrengstverliezen tot meer dan 50% genoteerd. In tegenstelling tot onze inheemse gewone fruitvlieg die overrijp of beschadigd fruit aantast, tast deze fruitvlieg ook onrijp fruit aan. Doordat een aantasting in de eerste dagen na de eileg niet opgemerkt wordt, de larven voeden zich immers binnenin de vruchten met het vruchtvlies, is het gevaar groot dat geïnfecteerd fruit in de handel komt, met alle gevolgen van dien voor onze fruittelers, veilingorganisaties en supermarkten.

In chronologische volgorde wordt de problematiek rond de Aziatische fruitvlieg geschetst, van de eerste vondst in een particuliere tuin in Oostende (2011) tot de vaststellingen in de periode 2012–2014 in fruitaanplantingen, al dan niet met (economische) schade, en het aanreiken van oplossingen aan de praktijk via het indienen van een IWT LA-projectaanvraag.

Oorsprong en insleep

D. suzukii is van oorsprong Aziatisch; de vlieg werd voor het eerst ontdekt in Japan in 1916. Rond 1930 waren landen als China en Korea aan de beurt, later werd de vlieg eveneens vastgesteld in Myanmar, Pakistan, Taiwan en Thailand. Dit fruitvliegje begon in 2008, na insleep in Californië, aan een zegetocht in Noord-Amerika. Ondertussen wordt deze exoot al aangetroffen in grote delen van de Verenigde Staten en in Canada. Ongeveer op hetzelfde ogenblik werd de vlieg ook ingesleept in Europa. Tot overmaat van ramp beschikt het vliegje ook nog eens



over een goed aanpassingsvermogen aan de Europese klimaattypes met een snelle geografische verspreiding tot gevolg. Achtereenvolgens werd de vlieg vastgesteld in Italië (2009); Frankrijk, Slovenië en Spanje (2010); Zwitserland, Duitsland en België (2011) en in Portugal, het Verenigd Koninkrijk en Nederland (2012). De toenemende internationale handel in (geïnfecteerd) fruit is verantwoordelijk voor de verspreiding over grote afstanden en ligt wellicht aan de basis van de insleep in België en de andere Europese landen. De verdere verspreiding binnen België is het gevolg van de binnenlandse handel enerzijds, en van de migratie van de volwassen vliegjes anderzijds. Omdat deze schadelijke fruitvlieg al behoorlijk wijdverbreid in Europa voorkomt zijn quarantainemaatregelen niet meer mogelijk.

Levenscyclus

De vermenigvuldiging van deze fruitvliegsoort verloopt heel snel. De ontwikkeling is zoals voor de meeste insecten afhankelijk van de temperatuur; bij goede klimaatsomstandigheden duurt de volledige levenscyclus slechts 1 tot 2 weken (25-30 °C). Deze korte levenscyclus maakt het mogelijk dat de soort meerdere generaties per jaar kan hebben (in Japan zijn er reeds tot 13 per jaar geregistreerd). De mannetjes zijn gekenmerkt door een opvallende zwarte vlek in elke vleugel (foto 1).



Foto 1: mannetje *D. suzukii* (foto ILVO)

Na de paring leggen de wijfjes gemiddeld 350 eitjes met behulp van een typische sterk gechitiniseerde en gekartelde legboor (foto 2) die hen in staat stelt om dwars door de schil van hard en onrijp fruit heen te dringen.



Foto 2: ovipositor wijfje (foto ILVO)

De afgezette eitjes zijn in de meeste gevallen moeilijk te detecteren op het geoogste fruit zodat het voor de teler, veiling of supermarkt praktisch niet mogelijk is om het ogenschijnlijk intacte fruit te controleren. Na 12 tot 72 uur ontluiken de eitjes tot fruitetende larfjes. Er zijn 3 larvale stadia, gevolgd door een popstadium dat zich afspeelt in de vrucht of op het oppervlak hiervan. Na het uitsluipen verlaten de volwassen vliegen de vruchten waarin ze opgroeiden. Door haar grote vruchtbaarheid en korte generatieduur is deze vlieg in staat om zich in korte tijd explosief te vermeerderen. Hoe de overwintering plaats vindt bij ons is nog niet helemaal gekend. Wel is bekend dat deze vliegen nog actief zijn bij lagere temperaturen dan hun Europese soortgenoten zodat ze tot laat in het najaar waarneembaar zijn.

Waardplanten en schade

Nagenoeg elke vrucht met een dunne schil, zowel gecultiveerd als wild, komt als waardplant in aanmerking; maar het zijn vooral bramen, frambozen, aardbeien, blauwe bessen en kersen die enorm geliefd zijn bij deze fruitvliegjes. Naast dit fruit kunnen de larven zich ook ontwikkelen in diverse andere fruitsoorten. Alhoewel in het land van oorsprong de schade beperkt is omwille van de aanwezigheid van natuurlijke vijanden zou de vestiging van deze vlieg in België op korte termijn kunnen leiden tot belangrijke opbrengstverliezen. Dit is toch het geval in gebieden met een vergelijkbaar gematigd klimaat, waar ook bij een klein aantal generaties aanzienlijke schade mogelijk is. De uitgebreide waardplantenreeks, waaronder ook tal van wilde soorten zoals meidoorn, vlier, rozenbottels en wilde bramen, maakt de beheersing van deze vlieg bovendien vrij complex. Zoals andere fruitvliegsoorten is de suzukivlieg ook in staat om te ontwikkelen op overrijp of rottend fruit, ook in onze GFT-containers.

De eerste stap naar opbouw van kennis: monitoring

Na de eerste vaststelling in een particuliere tuin in Oostende (september 2011) werd door het FAVV in 2012 een monitoringsnetwerk opgezet met behulp van aantrekkingsvallen (Droso-trap, Biobest) op verschillende locaties om de aanwezigheid van *D. suzukii* in ons land te bevestigen (foto 3 & 4). Naast fruitpercelen werden ook een aantal fruitveilingen en lokalen met opslag/verpakking opgevolgd. Op laatstgenoemde locaties werden zowel in 2012 als in 2013 geen suzukivliegen vastgesteld. Ook pcfruit, CRA-W en GFW (Groupement des Fraisieristes Wallons) volgden op enkele fruitpercelen het voorkomen van deze vlieg op.





Foto 3: monitoring in braambessen, beschutte teelt (foto FAVV)



Foto 4: monitoring in kersenboomgaard (foto FAVV)

Het entomologisch labo van het Diagnosecentrum voor Planten (ILVO) is verantwoordelijk voor de detectie en identificatie van schadelijke insecten en mijten in alle monsters die door het FAVV in het kader van de plantenbescherming worden genomen. Tijdens de monitoringscampagne werd alle gevangen insectenmateriaal stereomicroscopisch onderzocht op de aanwezigheid van de suzukivliegen. De bevestiging ervan gebeurde eveneens in het entomologisch labo dat tevens erkend is als Nationaal Referentielaboratorium Plantenziekten voor insecten.

In totaal werden 53 locaties bemonsterd in 2012 (kers, aardbei, framboos, blauwe bes en pruim); op 14 hiervan werd *D. suzukii* vastgesteld (26%). De hoogste aantallen in Vlaanderen werden gevonden in kersbomen, maar ook in pruimen, aardbeien, frambozen en blauwe bessen werden volwassen *D. suzukii* aangetroffen. In Wallonië werden de meeste vliegjes gevangen in de frambozenteelt onder bescherming. Opmerkelijk was de vaststelling van de suzukivliegen laat in het seizoen; de eerste vliegen werden op één uitzondering na (januari, Gembloux) pas vastgesteld vanaf half juli en dit tot einde december. In 2013 werd het monitoringsnetwerk uitgebreid naar 108 locaties (waaronder nu ook braam, druif, wilde kers en peer). Op 76 locaties werd de vlieg vastgesteld (70%), en opnieuw vrij laat in het groeiseizoen (begin augustus). Op sommige locaties werd ook minieme, te verwaarlozen schade opgemerkt. De waarnemingen in 2013 toonden aan dat de verspreiding van deze fruitvlieg in omvang toenam, zowel in Vlaanderen als in Wallonië. In de meeste velden werden lage aantallen vliegen aangetroffen, maar in één (verwaarloosde) kersenboomgaard werden enkele honderden exemplaren gevangen tijdens het groeiseizoen. Het waardplantenspectrum waarin de vlieg werd aangetroffen breidde ook nog uit. Het overgrote deel van de vliegen werd aangetroffen in kersenplantages, maar ook in aardbeien, frambozen, bramen, druiven en in diverse andere bessen werd de vlieg gedetecteerd, evenals in wilde kersen. In het late najaar van 2013 bleken ook larven van *D. suzukii* aanwezig te zijn in niet-geplukte peren. Zowel in 2012 als in 2013 werden de eerste

volwassen vliegen pas in de tweede helft juli-augustus gevangen; het hoofdaandeel van de vangsten was pas laat in het najaar (oktober-november). Zelfs bij lage temperaturen werden steeds vliegjes gevangen. De vraag kan gesteld worden in hoeverre de strenge wintercondities in februari 2012/maart 2013 nefast waren voor een snelle(re) populatie-ontwikkeling. De overwintering gebeurt als adult in diapauze in beschutte schuilplaatsen (serres, compost, loodsen, nabije vegetatie) en na de winter is opnieuw een populatieopbouw nodig. De levensduur van de vliegjes is relatief lang (90 tot 160 dagen), en ze zijn al actief bij temperaturen boven de 8°C. De suzuki-fruitvlieg heeft dus een lang voortplantingsseizoen wat uiteraard gunstig is voor een snelle uitbreiding van de populatie. De waarnemingen werden in 2014 verder uitgevoerd door pcfruit en CRA-W op meer dan 90 locaties. Opmerkelijk in 2014 is de vaststelling van vliegjes gedurende de winter en het vroege voorjaar. De zeer milde winter 2013-2014 heeft hier allicht een rol gespeeld. Er waren slechts 3 vorstdagen; de gemiddelde temperatuur was 6,3 °C, waar dit normaal 3,6 °C is. Allicht hierdoor werden ook tijdens de winter en het voorjaar van 2014 suzuki-vliegen in de monitoringsvallen gedetecteerd. In juni 2014 werd schade vastgesteld in kersen, in de loop van juli was er eveneens toenemende schade in bessen, bramen, aardbeien en frambozen. Ook in andere Europese landen is de plaagdruk groter dan in voorgaande jaren.

Bijkomend onderzoek

Wat de vangsten betekenen in de nabije toekomst voor alle klein/zachtfruitteelten (aardbei, bessen, frambozen, druiven, etc.) evenals steenfruit (kersen) is op dit moment moeilijk in te schatten. Schade aan het fruit blijft vooralsnog beperkt, maar neemt wel een uitbreiding. Uiteraard blijft ILVO, Gewasbescherming het verloop van de "vluchten" verder opvolgen. In het kader van hoger geschetste problematiek werd samen met het Proefcentrum Fruitteelt een IWT-projectaanvraag ingediend die ook werd goedgekeurd. In dit project zullen in eerste instantie een aantal sleutelkarakteristieken van deze vlieg grondig bestudeerd worden zoals de fenologie, populatiedynamiek, overwinteringscapaciteit/strategieën, voorkeur voor fruittype, ... Hierbij zal ook de nodige aandacht besteed worden aan de overlevingsmogelijkheden in extremere condities (koude-/warmtetolerantie). Voor de effectieve beheersing van de reeds aanwezige suzukivliegen in fruitbedrijven zal de focus uitgaan naar de optimale uitwerking van de "mass-trapping" en "attract and kill" technieken. Aangezien ook teelthygiëne een cruciaal gegeven is in de beheersing van deze schadelijke fruitvlieg zal een innovatieve oplossing uitgewerkt worden voor de praktische afvoer van fruitafval en de afdoding van potentieel aanwezige levensstadia van deze vlieg. Hierbij wordt gedacht aan het ontwikkelen van een compostcontainer waarin de verschillende stadia van de vlieg efficiënt worden afgedood en waarbij ook reeds de eerste fasen van de compostering kunnen plaats vinden, zodat het geïnfecteerde fruit na een korte periode in de container, verder risicoloos gecomposteerd kan worden.

Conclusie

De resultaten van de monitoring tonen aan dat de suzukivlieg kan overleven in gecultiveerde gewassen/wilde soorten en blijkbaar goed bestand is tegen lagere temperaturen. Ondanks het feit dat een aantal producten een erkenning hebben voor het gebruik tegen deze fruitvlieg (spinosad, dimethoat en lambda-cyhalothrin) is een chemische behandeling omwille van mogelijke residu's bij de oogst, en het voorkomen op wilde soorten, niet eenvoudig. Een snelle uitroeiing kunnen we dus vergeten; deze exoot zal hier blijven en allicht zijn territorium verder uitbreiden, zodat verder onderzoek aangewezen is om praktisch bruikbare beheersstrategieën uit te werken om zo verdere verspreiding en economische schade in de fruitteeltsector te voorkomen.

hans.casteels@ilvo.vlaanderen.be



MALDI-TOF MS als identificatietool voor voedselpathogenen

Marie Polet, Nadine Botteldoorn en Katelijne Dierick

NRL Levensmiddelenmicrobiologie, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel

In de microbiologie waren de bevestiging en de identificatie van bacteriën aanvankelijk vooral gebaseerd op de morfologische kenmerken. Vervolgens werd er gebruik gemaakt van biochemische testen uitgevoerd in proefbuizen, waarna deze werden geminiaturiseerd. Nadien was er de ontwikkeling van de PCR technologie, gevolgd door MALDI-TOF MS (of matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight mass spectrometry). MALDI-TOF MS is een techniek die reeds sinds een twintigtal jaar gebruikt wordt in verschillende toepassingsdomeinen, vooral in de chemische laboratoria voor de detectie van suikers, eiwitten en nucleïnezuren. Meer recent wordt de techniek meer en meer gebruikt voor diergeneeskundige diagnosestelling en op het vlak van milieu, waarbij het nu als een goed identificatiesysteem een steile opmars kent in laboratoria voor microbiologische analyse. Momenteel bestaan er wereldwijd ongeveer 1000 installaties in de klinische en farmaceutische sector en een honderdtal installaties in de levensmiddelensector.

Op het vlak van voedselveiligheid beantwoordt die techniek aan de nodige vereisten voor de bevestiging en de identificatie van voedselpathogenen. MALDI-TOF MS is sneller dan de methodes van de traditionele microbiologie, haalt hetzelfde niveau van discriminatie, is minder duur en vereist minder technische expertise dan de genotypische methodes. Bovendien kan de techniek gebruikt worden in laboratoria die de routine microbiologische levensmiddelenanalyses uitvoeren waarbij de factor tijd een sleutelrol speelt, aangezien die laboratoria voornamelijk samenwerken met de voedingsindustrie. Die techniek kan ook gebruikt worden in het geval van voedseltoxi-infecties.

De MALDI-TOF MS technologie kan micro-organismen identificeren tot op het niveau van de soort. Het principe is gebaseerd op de ioniserende bestraling van de bacteriële eiwitten door een laserstraal en het creëren van karakteristieke pieken (spectrum). Op basis van een databank van spectra zoekt de bijhorende software de overeenkomst met de soort van de bacterie volgens een betrouwbaarheidsindex tussen de twee spectra. MALDI-TOF MS geeft echter geen informatie over het serotype noch over de pathogeniciteit van de soort (bijv. : *Vibrio parahemolyticus*).

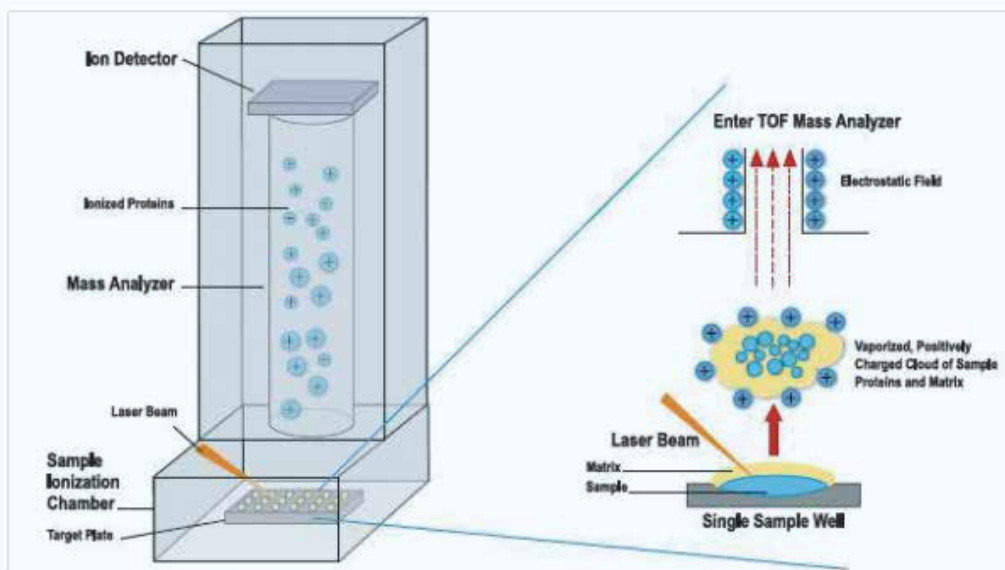
Typisch bestaat een massaspectrometer uit 3 elementen: een ionenbron (MALDI), scheiding van de moleculen (TOF) en een detectiesysteem.

MALDI-MS :

Het analyt wordt eerst gekristalliseerd samen met kleine organische verbindingen (de matrix) om het te beschermen tegen direct contact met de ioniserende bundel en de degradatie ervan te vermijden. De organische verbindingen zullen de straling van de UV-laser opvangen en de energie overbrengen op de eiwitten die positief worden geïoniseerd. De gecreëerde ionen zullen zich losmaken van de eiwitten. De geladen moleculen (+1) worden dan versneld in een elektrisch veld.

TOF:

Nadat ze door het elektrisch veld gegaan zijn, gaan de ionen in een buis die niet onderworpen is aan een elektrisch veld en worden ze gescheiden volgens hun massa-ladingverhouding. De ionen halen verschillende snelheden, aangezien grote moleculen zich trager verplaatsen dan kleine moleculen. Vervolgens zal een Time of Flight (TOF)-analysator de passage van elk ion detecteren en pieken creëren op het spectrum dat nadien vergeleken wordt met een databank. Bepaalde componenten van een spectrum zijn specifiek voor een genus, andere voor een soort of zelfs voor een subsoort. Naargelang de kwaliteit en de zuiverheid van het monster en het aantal referentiespectra in de databank, gebeurt de identificatie van de bacterie in enkele seconden tot enkele minuten.



Figuur 1: Werkingsprincipe van een massaspectrometer van het type MALDI-TOF

Alle types van voedingsmicro-organismen kunnen gezocht worden volgens hetzelfde protocol.

De bereiding van het analysemonster is een cruciale stap in de MALDI-TOF analyses. Immers, om betrouwbare en reproduceerbare identificatieresultaten te bekomen, is het noodzakelijk om voor alle tests over gelijkaardige groeiomstandigheden (incubatietijd en -temperatuur, kweekmilieu) van de bacterie te beschikken. De analyse vertrekt van een zuivere bacteriecultuur. Die kan als dusdanig gebruikt worden of een voorbehandeling ondergaan. De analyses moeten uitgevoerd worden met verse bacterieculturen, aangezien stress omwille van de koude of een gebrek aan voedingsmiddelen de samenstelling van de eiwitten kan wijzigen en dus een impact kan hebben op het analyseresultaat.



De kwaliteit van de databank is ook een kritisch punt in het preciseren van de identificatie van bacteriën. Talrijke studies over de identificatie van bacteriën door de MALDI-TOF werden uitgevoerd op klinische monsters en de specifieke vereisten voor laboratoria voor levensmiddelenmicrobiologie worden over het algemeen niet in rekening genomen. Slechts een aantal studies bestuderen de toepassing van MALDI-TOF MS op levensmiddelenmicrobiologie. Enkele van deze studies brengen aan het licht dat het grote obstakel in de identificatie van voedselisolaten te maken heeft met de databank die regelmatig geüpdatet moet worden met referentiespectra die afkomstig zijn van voedingsstammen.

Tabel 1 : Voordelen en nadelen van de toepassing van MALDI-TOF in de levensmiddelenmicrobiologie

VOORDELEN	NADELEN
Vorbereiding van het universele monster voor bacteriën, gist en schimmels	Hoge kosten voor de aankoop van het toestel
Eenvoudig protocol	Verse culturen voor analyses
Geen afval	Invloed van het groeimilieu op het analyseresultaat
Zeer snel resultaat	De databank moet voldoende groot zijn om op correcte wijze een onderscheid te maken tussen sommige zeer verwante bacteriën, zoals <i>E. coli</i> en <i>Shigella spp.</i>
De databank kan gemakkelijk uitgebreid worden	Geeft geen indicatie over de pathogeniciteit van de soort (bijv.: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>)
	Soorten die problemen stellen bij de identificatie door 16S geven soms dezelfde problemen met die techniek

MALDI-TOF zal geïntegreerd worden op het vlak van identificatietesten in de huidige revisie van de ISO 7218, naast biochemische galerijen, het gebruik van nucleïnezuursondes en agglutinatietesten.

Tot besluit is de MALDI-TOF een veelbelovende toepassing voor de identificatie van bacteriën in laboratoria voor routine levensmiddelenmicrobiologie. Het eenvoudige protocol, de snelheid van de resultaten en de lage analysekosten zijn de voornaamste voordelen van die techniek die goed op zijn plaats is in de voedselveiligheid.

Literatuur:

<http://www.biomerieux.com/fr/spectrometrie-de-masse-maldi-tof>

Pavlovic, M., et al. "Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria." *Open.Microbiol.J.* 7 (2013): 135-41

Marie.Polet@wiv-isp.be

Eten van insecten

Marnix De Gruyter

FLVVG, Braemkasteelstraat 59, 9050 Gentbrugge

Inleiding

Eten van insecten: het zal de meesten onder ons in de Westerse wereld vreemd, zelfs afstotend overkomen. Wij zijn gewoon aan onze al sinds eeuwen gedomesticeerde diersoorten die ons jaar in, jaar uit voorzien van vlees en nog andere nuttige producten zoals wol, leder en melk. Nochtans is dit niet zo abnormaal voor een groot deel van de wereldbevolking. Ruim 2 miljard mensen hebben insecten opgenomen in hun dagelijks dieet, in hoofdzaak in de tropische regio's. Er worden naar schatting wereldwijd zo'n 1900 verschillende soorten insecten gegeten. Deze behoren tot een grote verscheidenheid aan groepen. Ruim 31% van de gegeten insecten hoort bij de *Coleoptera* (kevers), 18% zijn de rupsen van *Lepidoptera* (vlinders) en 14% zijn *Hymenoptera* (vliesvleugelen zoals bijen en wespen). Maar ook sprinkhanen en termieten staan vaak op het menu.

Waarom is dit in de tropen blijven voortbestaan en niet doorgedrongen in de Westerse wereld? Daar zijn een aantal verklaringen voor. In de eerste plaats is er de vervreemding in het Westen van de Natuur. Insecten worden hier meer gezien als een pest die gewassen bedreigen en ziekten overbrengen. In tropische regio's zijn ze echter een onderdeel geworden van de natuurlijke leefomgeving en cultuur (bv. als medicijn). Insecten spelen in onze cultuur een ondergeschikte rol, met uitzondering van een aantal die voor ons nuttige producten leveren, zoals zijderupsen en honingbijen. Bovendien is er tevens een afkeer van het eten van insecten uit esthetisch standpunt of omdat het geassocieerd wordt met primitief gedrag. Vandaar dat er vanuit de agricultuur geen interesse voor was.



Waarom zouden we ze wel eten?

Het eten van insecten biedt nochtans heel wat voordelen ten opzichte van ons traditioneel vee. De wereldbevolking bedraagt momenteel 7 miljard zielen en binnen afzienbare tijd zal ze aangegroeid zijn tot 9 miljard. Ruim een miljard van deze mensen zullen honger lijden. Dit kan ook de politieke stabiliteit van landen ondermijnen. De aangroeiende wereldbevolking zal een zeer grote druk uitoefenen op het milieu. Traditionele veehouderij is zeer verontreinigend. Er is vooral een hoge productie aan broeikasgassen. Na energieproductie is veeteelt hier de grootste van. Het waterverbruik bij veeteelt is aanzienlijk. De productie van 1 kg vlees vereist 3682 liter water.

Bij insecten liggen de zaken anders. Er is veel minder plaats en water voor nodig. Er is een grote voedselomzetting in vergelijking met rundvee: krekels hebben voldoende aan 2 kg voedsel om 1 kg lichaamsgewicht te produceren. Er is hierbij nauwelijks een productie van broeikasgassen. Ook kweken op menselijk afval kan, wat milieuverontreiniging kan helpen indijken (ook al is hier wel een nadeel aan verbonden, namelijk opname van zware metalen). Insecten zijn gemakkelijk te kweken en reproduceren snel. Er zijn eigenlijk geen grote en kostbare installaties voor nodig. In Thailand worden krekels gekweekt in gewone metalen bakken met een laag rijstafval op de bodem. Plastiek flessen zorgen voor drinkwater. Over de bakken wordt een fijnmazig net gespannen om ontsnappen tegen te gaan. De vrouwtjes leggen hun eitjes in schaalpjes gevuld met zand en gebrande rijstpellen. De schaalpjes worden verwijderd en in een andere metalen kuip geplaatst. Elk schaalpje wordt bedekt met rijst om voor een constante broedtemperatuur te zorgen. Men diende de schaalpjes wel te omgeven met water om roofmieren te verhinderen binnen te dringen. Deze productie op een niet industrieel niveau kan voldoende zijn om een dorp van voedsel te voorzien. De geringe kosten voor de installatie houden ook in dat minderbedeelden aan het productieproces kunnen deelnemen.

Bovendien zijn insecten zeer voedzaam. Veel insecten bevatten 60% of meer eiwit dat voor de mens goed verteerbaar is. Het vetgehalte varieert sterk, van 7 tot 77 g/100 g droog gewicht. Het cholesterolgehalte ligt doorgaans wat lager dan in vlees, maar insecten bevatten meer essentiële vetzuren (linolzuur en linoleenzuur). De caloriewaarde van insecten varieert tussen 293 en 762 kcal/g droog gewicht. Bovendien blijken veel insecten zeer rijk te zijn aan essentiële mineralen zoals zink, koper en ijzer, en vitamines zoals thiamine en riboflavine. Insecten kunnen daarom in voedingswaarde vergeleken worden met ander voedsel van dierlijke oorsprong zoals vlees, vis- en schaaldieren. Ze hebben bovendien een veel hoger vezelgehalte.

Potentiële gevaren

Ondanks alle voordelen zijn er toch ook een aantal aandachtspunten. Insecten zijn rijk aan voedingsstoffen wat hen een aantrekkelijke voedingsbodem maakt voor micro-organismen. Zelf hebben ze net als de mens ook een darmflora. Deze kan diverse pathogenen bevatten, ondermeer *Salmonella* en *Campylobacter*. Gebleken is dat deze bacteriën minder dan 72 uur overleven en dus geen ernstig gevaar zouden betekenen. Pathogenen van insecten horen soms tot taxonomisch verschillende groepen als deze van de mens. Ze hebben een levenscyclus die geheel anders is dan deze van menselijke pathogenen en vormen op zich dus geen gevaar.

Het belangrijkste aspect naar micro-organismen toe is dus niet zozeer de darmflora van de insecten zelf, maar het veilig opslaan en bewaren van de producten. Bij onderzoek naar meelwormen bleek dat uit verse insecten *Enterobacteriaceae* en sporenvormende bacteriën geïsoleerd konden worden. Bij koken gedurende 5 minuten bleken eerstgenoemde verdwenen, de sporenvormende organismen echter niet. Het is aangewezen om de insecten koel te bewaren bij een temperatuur van 5 tot 7 °C. Bij deze temperaturen kan bederf tegengegaan

worden van zowel verse als gekookte insecten over een tijdspanne van 2 weken. Door roosteren bleken niet alle *Enterobacteriaceae* gedood te kunnen worden. Waarschijnlijk zijn schimmels eveneens een bron van gevaar. Sommige soorten schimmels produceren mycotoxines in grote hoeveelheden. Frequent insecten eten kan dus op deze manier schadelijk zijn. De verbreiding van schimmels kan tegengegaan worden door koel te bewaren of een droogprocedure.

Het is bekend dat sommige insecten parasieten kunnen bevatten. Sommige parasieten gebruiken insecten als vector. Een belangrijk voorbeeld hiervan is *Trypanosoma*, een parasiet die de ziekte van Chagas veroorzaakt. Bij onderzoek is gebleken dat de parasiet ook op orale manier de mens kon infecteren en er zijn linken gelegd naar het eten van rauwe insecten. Insecten kunnen ook drager zijn van andere gevaarlijke parasieten zoals *Entamoeba histolytica* of *Toxoplasma*. Het is daarom niet ongevaarlijk rauwe insecten te eten.

Een ander gevaar bij het eten van insecten zijn de chemische verontreinigingen. Dit zijn in de eerste plaats pesticiden. Allen leveren een potentieel gevaar op voor de mens, vooral als de insecten in het wild verzameld worden in plaats van gekweekt, waar een betere controle mogelijk is. Algemeen bleken gechloreerde pesticiden niet meer in grote hoeveelheden aanwezig te zijn, maar organofosfor componenten kunnen wel een potentieel gevaar opleveren.

Net als bij paddenstoelen het geval is, kunnen sommige insecten zeer giftige bestanddelen bevatten, terwijl andere er vrij van zijn. De insecten gebruiken deze gifstoffen als afweermiddel. Ze kunnen de stoffen halen uit planten waarop ze leven en deze vervolgens in speciale organen opstapelen. Dergelijke insecten kunnen een potentieel gevaar opleveren. Sommige van de stoffen verliezen echter hun activiteit wanneer men de insecten kookt. Er zijn ook insecten die zelf hun gifstoffen produceren zoals bijen en mieren. Dergelijke stoffen worden in ons spijsverteringskanaal onschadelijk gemaakt. Men is tot de conclusie gekomen dat insecten die leven op voor de mens eetbare planten doorgaans ook wel veilig te consumeren zijn, maar dat andere toch een potentieel gevaar kunnen inhouden. In sommige gevallen kan men de organen die de toxische componenten bevatten, verwijderen. In Oost-Italië bestaat bijvoorbeeld de gewoonte om larven te eten van vlinders van het geslacht *Zygaena*. Deze bevatten echter cyanogene glycosiden die blauwzuur kunnen vrijstellen. De consumenten eten daarom enkel maar de zoete aanhangsels die vrij zijn van de toxische bestanddelen.

Belangrijk is dat sommige insecten ook bestanddelen kunnen bevatten die een invloed hebben op de opname van vitamines (zgn. anti-nutritionele bestanddelen). Eten van de rupsen van *Anaphe venata* bleek de opname van thiamine te belemmeren, zodat na verloop van tijd een deficiëntie kan ontstaan. Vooral in streken waar er een slecht voedselaanbod is, kan dit problemen opleveren.

Tenslotte kunnen insecten ook zware metalen opnemen en opstapelen. Grote hoeveelheden arseen en lood zijn aangetroffen in sommige insecten. Dit kan samenhangen met de levenswijze van het insect. Diegene die bij voorkeur op de bodem leven, nemen mogelijk ook meer toxische metalen op. In het geval de insecten dienen als voedsel voor bv. pluimvee, kan het metaal op deze manier opgenomen worden in de voedselketen.

Deze potentiële gevaren zijn enigszins te nuanceren. Veel kan vermeden worden door de insecten op een hygiënische manier te behandelen zoals nu gebeurt voor vee. Door het kweken van insecten op 'boerderijen' is er een betere controle mogelijk. Parasieten zijn bijvoorbeeld aan een natuurlijke omgeving gebonden voor hun cyclus. Het kweken verlaagt ook de opname van metalen. Men kan de insecten selectief kweken en enkel deze soorten in aanmerking nemen voor kweek waarvan zeker is dat ze geen schadelijke componenten bevatten. Er zal altijd wel een zekere controle nodig zijn, zoals nu ook voor ander voedsel het geval is.

Marnix.DeGruyter@favv.be



“Next Generation Sequencing” ter identificatie van GGOs in levensmiddelen en diervoeder producten

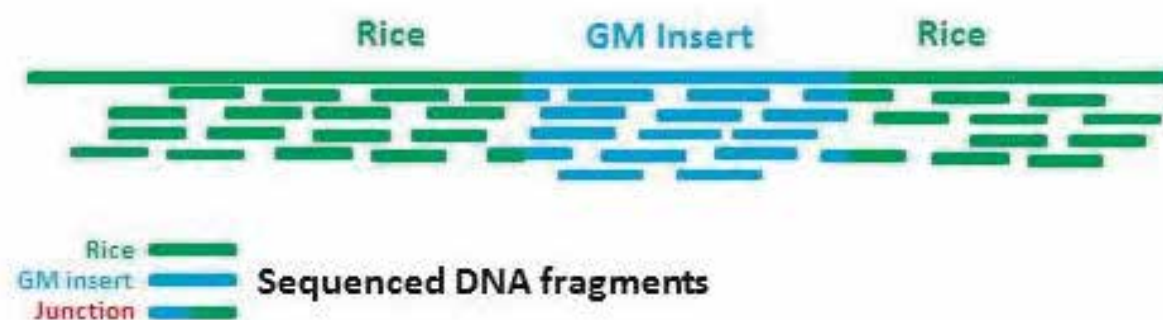
Sander Willems^{1*}, Marie-Alice Fraiture^{1,2*}, Sigrid C. J. De Keersmaecker¹ en Nancy H Roosens¹

¹ Platform Biotechnologie en moleculaire Biologie (PBB), Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), rue J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel, België

² Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO), Eenheid Technologie & Voeding (T&V), Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke, België

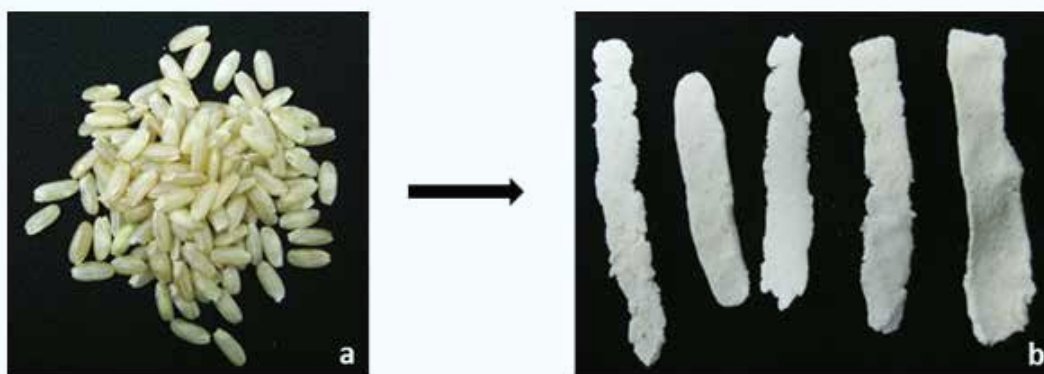
*Gelijkwaardige bijdrage

Het toenemende aantal en de stijgende diversiteit van GGOs (genetisch gewijzigde organismen) aanwezig op de markt maakt het gebruik van de huidige voor GGO analyse “gouden” standaard, de real-time PCR technologie, steeds complexer en tijdrovender om een GGO in levensmiddelen- en diervoederstalen te detecteren. Inderdaad, een verhoogd aantal screening- en/of event-specifieke methoden (respectievelijk gericht op het/de GM (genetisch gewijzigd) element(en) en de insertieplaats van de GM-cassette in het gastheergenoom) moeten door de officiële controle-laboratoria ontwikkeld en gebruikt worden om alle in een land geautoriseerde GGOs te kunnen detecteren. Bovendien impliceert de real-time PCR strategie de voorkennis, althans gedeeltelijk, van de sequentie van de GM-cassette. Het verzamelen van deze sequenties voor niet-geautoriseerde GGOs is een uitdaging en het ontwerpen van elke bijbehorende methode is extreem tijdrovend of zelfs onmogelijk gezien de vele mogelijke GM-elementen te vinden in niet-geautoriseerde GGOs. Dit vormt een groot probleem omdat GGOs niet gedetecteerd kunnen worden als er geen methode gericht op het GM-element in het geteste staal gebruikt werd. Recent werd “Next Generation Sequencing” (NGS), waardoor in parallel massa’s DNA fragmenten gesequeneerd kunnen worden met als resultaat miljoenen sequentie-reads, voorgesteld als een veelbelovende technologie om de uitdaging van GGO detectie in levensmiddelen- en diervoeder-matrices aan te gaan.



Figuur 1: Massa's DNA fragmenten (reads) afkomstig van een GGO, geproduceerd met NGS technologie.

Binnen deze context is het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP) een pioniersstudie gestart, gefinancierd door het UGMMONITOR (SPF conventie RF 11/6242) en EPIGMO (Ylief) project. Deze studie heeft eerst de NGS technologie gebruikt om zijn potentiële toepasbaarheid te beoordelen voor de detectie en identificatie van een GGO (Figuur 1) in verschillende voedselmatrices, namelijk 100% GM rijstkorrels, 10% GM rijstkorrels en 100% GM rijstnoedels (bewerkt voedsel) (Figuur 2). Ten tweede werden de gegevens geanalyseerd door twee verschillende platformen om het potentieel gebruik van NGS door bio-informatica leken te evalueren: een eenvoudig te gebruiken commercieel platform (CLC Genomics Workbench) zonder de nood aan een grondige bio-informatica achtergrond, en een "in-house" platform dat een grotere controle over de workflow en parameters toelaat waarvoor bijgevolg een hoger niveau van deskundigheid in bio-informatica nodig is. Ten derde werd een conceptueel statistisch model ontwikkeld en toegepast om een schatting te maken van het aantal sequentie-reads nodig om verscheidene veelvoorkomende GGOs in concentraties die representatief zijn voor "typische" levensmiddelen- en diervoeder- matrices te kunnen detecteren en identificeren.



Figuur 2: Types rijstmatrices gebruikt in deze studie: rijstgranen (a) en "home-made" rijst noedels geproduceerd van rijstgranen (b).

Onze resultaten toonden aan dat het mogelijk is om NGS te gebruiken om alle soorten stalen gebruikt in deze studie te identificeren en karakteriseren. De analyse vergt enkel de voorafgaande kennis van de sequentie, althans gedeeltelijk, van de GM-cassette en van het gastheergeenoom die als referentie gebruikt worden tijdens het mappen van de gesequeneerde reads. Hierdoor biedt de NGS-strategie een gestandaardiseerde benadering voor eender welke GGO, in tegenstelling tot de specifieke methode die ontworpen, ontwikkeld en gebruikt moet worden voor iedere GGO afzonderlijk bij het gebruik van de real-time PCR methode. Bovendien vormt een bewerkte matrix, zoals rijstnoedels, met gedegraded DNA na DNA-extractie van het staal, geen probleem bij het gebruik van de NGS-technologie (Illumina).

De studie benadrukt ook dat de ontwikkeling van nieuwe gebruikersvriendelijke specifieke visualisatie software nodig is voor een efficiënte analyse en om de gebruiker de nodige kennis te verschaffen, zeker in de huidige context van gebrek aan bio-informatica expertise in de officiële controle-laboratoria.

Het conceptuele statistische model heeft aangetoond dat een groter genoom, zoals dat van tarwe, een groter aantal gesequeneerde reads vereist (i.e. een hogere "coverage" of grotere sequencing-diepte), wat resulteert in een hogere kost per staal, maar tegen een prijs betaalbaar voor een officieel controle-laboratorium als de GGO aanwezig is in een concentratie van 100%. Het detecteren van kleine hoeveelheden GM DNA (1%) in een mengsel van planten-DNA is momenteel echter onmogelijk als men de kosten en complexiteit van de analyse in acht neemt.

De huidige studie geeft preliminaire informatie over een aantal belangrijke sterke en zwakke punten van de NGS-technologie die moeten aangepakt worden vóór een routinematig gebruik van NGS voor GGO-analyse wordt overwogen. Het wordt geconcludeerd dat NGS het potentieel heeft om huidige problemen in de GGO detectie op te lossen. Er zijn echter uitgebreide onderzoeksprojecten en richtlijnen voor de validatie van deze methode noodzakelijk, alvorens implementatie in routine.

Gedetailleerde resultaten van dit onderzoek werden ingediend voor peer-review publicatie.

Dankwoord

Dit onderzoek werd gefinancierd door de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu (conventie RF 11/6242) via het UGMMONITOR project. De auteurs willen ook graag Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, UMR AGAP, Biological Systems department, Montpellier, Frankrijk) bedanken voor het ter beschikking stellen van de rijstkorrels.

nancy.roosens@wiv-isp.be

Atmospheric Pressure Gas Chromatography-Tandem mass spectrometry (APGC-MS/MS) voor de analyse van dioxines en PCB's in levensmiddelen en diervoeders.

Gauthier Eppe, Georges Scholl, Jean-François Focant en Edwin De Pauw
CART Universiteit Luik, Allée de la Chimie 3, B-6c Sart-Tilman, B-4000 Luik, BELGIE*

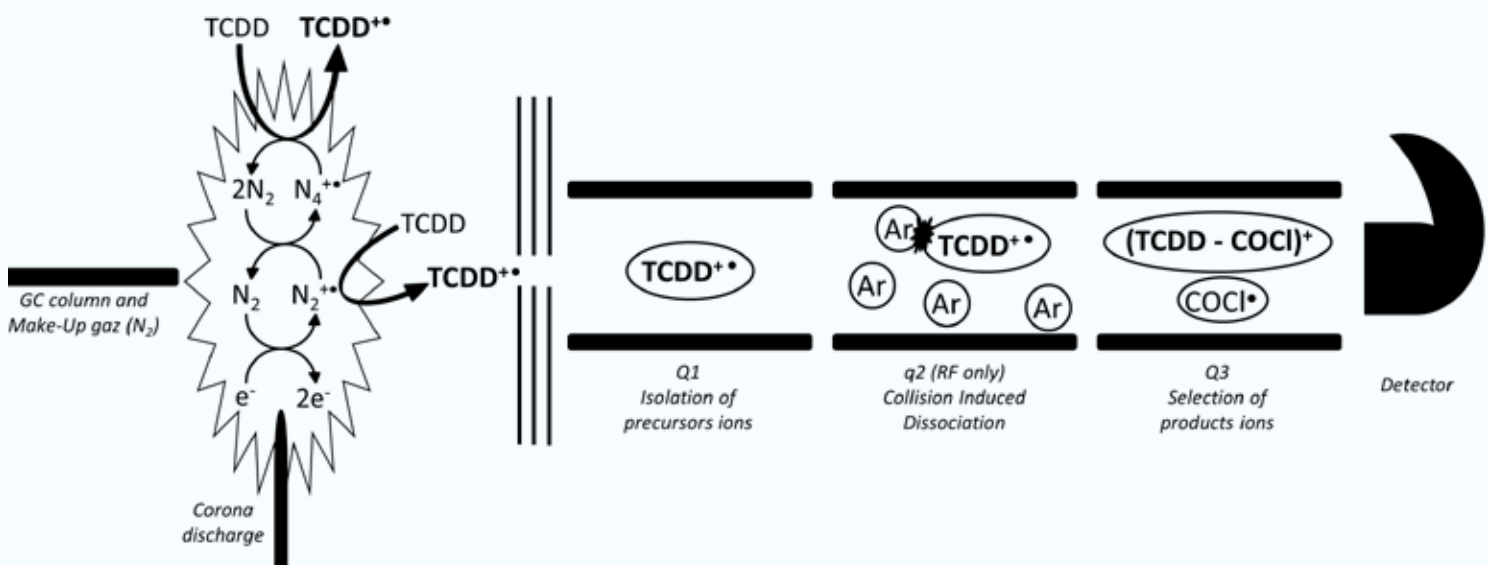
Inleiding

Twee jaar geleden bespraken we in Labinfo het gebruik van GC-MS/MS als een mogelijke nieuwe optie voor bevestiging van PCDD/Fs en de analyse van DL-PCB's (dioxin-like PCB's) in het kader van de officiële controles van levensmiddelen en diervoeders. Later werd deze nieuwe bevestigingsbenadering uitgebreid naar de autocontrole bij professionele operatoren in de levensmiddelen- en diervoedersectoren.

In dit artikel maken we een inventaris op van de verschillende mogelijkheden om dioxineanalyses uit te voeren met andere massaspectrometers dan de zogenaamde hoge resolutiemassaspectrometer sectorinstrumenten (HRMS), waarbij we specifiek focussen op Atmospheric Pressure Gas Chromatography-Tandem mass spectrometry (APGC-MS/MS). Analyse van PCDD/Fs en PCB's door middel van GC-MS/MS is geen nieuw concept. De eerste wetenschappelijke artikelen met betrekking tot de ontwikkeling van deze methode dateren uit de jaren '90 toen hiervoor vooral ion trap massaspectrometers werden gebruikt. De methode kan gemakkelijk sporenniveaus van PCDD/Fs en PCB's detecteren in milieumatrices. Het gebrek aan gevoeligheid om 'sub-part-per-trillion' (ppt) niveaus te bereiken die nodig zijn voor de analyse van levensmiddelen en diervoeders, zorgden ervoor dat de techniek niet meer geschikt was en niet meer gebruikt werd voor toepassingen op het vlak van controle. De nieuwe generatie van benchtop triple quadrupole MS apparaten die verschillende fabrikanten onlangs op de markt brachten heeft echt vooruitgang geboekt inzake detectiegevoeligheid. De eerste studies en validaties die werden uitgevoerd bij levensmiddelen en diervoeders brachten het potentieel van de techniek aan het licht. Dit heeft in 2012 geleid tot een wijziging van de EU-wetgeving, waarbij GC-MS/MS geïntegreerd werd als bevestigingsmethode (252/2012/EG) [1]. Momenteel is het belangrijk om te benadrukken dat alleen de laatste generatie triple quadrupole instrumenten kan voldoen aan de performantiecriteriën van de EU-wetgeving. Dit betekent dus dat het risico groot is dat 'niet-dioxine' laboratoria die niet uitgerust zijn met de laatste generatie triple quadrupole instrumenten niet aan de verleiding zullen kunnen weerstaan om te starten met deze zeer specifieke analyse, waarbij er weinig slaagkansen zijn. Immers, de nieuwe EU-Verordening tot wijziging van 252/2012/EG (589/2014/EG) [2] is eerder gericht op analytische performantie, wat aangeeft dat een bevestigingsmethode alleen gebruikt kan worden wanneer door middel van een volledige validatie is aangetoond dat aan alle kwaliteits- en performantiecriteriën opgelijst in het voormelde EU-document voldaan is. De voorbije twee jaar werden talrijke analytische studies uitgevoerd binnen het netwerk van Europese en Nationale Referentielaboratoria (EU-RL/NRL) om de GC-MS/MS-methode als bevestigingsmethode te beoordelen. De meeste van deze studies gaven aan dat het haalbaar is om te komen tot analytische performanties die op relevante concentratieniveaus vergelijkbaar zijn met die van GC-HRMS. De studies benadrukken echter dat de keuze van de massaspectrometer van essentieel belang blijft.

APGC-M/MS

Bij de verschillende mogelijkheden om sporenniveaus van dioxines en PCB's te analyseren in levensmiddelen en diervoeders, is Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) een zachte chemische ionisatietechniek die talrijke moleculaire en pseudomoleculaire ionen $[M^+]$ produceert door middel van ladingsoverdracht (Figuur 1) of door protonering $[M+H]^+$. Hoewel de eerste ontwikkelingen van APCI-bronnen gebruikt zijn om MS te combineren met vloeistofchromatografie (LC), kan de ionisatie-interface ook verbonden worden met GC. Deze ionisatiemethode zorgt ervoor dat de techniek geschikt is om tegelijkertijd selectieve en intense MS/MS-fragmenten te genereren voor opvolging in de modus Multiple Reaction Monitoring (MRM) en dit voor tal van gerichte analytische applicaties. Dit in tegenstelling tot de traditionele elektronenionisatie (EI) aan hoge energie (70eV), een techniek die over het algemeen lijdt aan sterke fragmentatie en waarbij de selectie van het precursorion altijd een compromis is tussen selectiviteit en gevoeligheid. In sommige gevallen, met minder stabiele moleculen, zou dit de toepassing van een kwantitatieve MS/MS-benadering kunnen bemoeilijken omwille van het gebrek aan specifieke/intense precursor-ionen. Recentelijk hebben ontwikkelingen in APGC-MS/MS geleid tot analytische toepassingen voor polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) [3], pesticiden [4], polybroomdifenylethers (PBDE's) [5] en ook nog PCDD/Fs en PCB's [6]. Kotz et al. hebben bijvoorbeeld aangetoond dat de absolute hoeveelheid van 2,3,7,8-TCDD, geanalyseerd door middel van APGC-MS/MS, die geïnjecteerd wordt op een GC-kolom, lager dan 10 femtogram ($10 \cdot 10^{-15}$ g) kan liggen. Hierbij werden 2 precursorionen geselecteerd, met name 320 and 322 m/z $[M^+]$, wat de twee productionen 257 en 259 m/z $[M-COCl]^+$ opleverde (Figuur 1). Deze methode geeft een gevoeligheid die vergelijkbaar is met de gevoeligheid die bekomen wordt met sectorinstrumenten (HRMS) gebaseerd op de injectie van een standaardkalibratieoplossing. Ter vergelijking met EI-GC-MS/MS, meldden Kotz en zijn medewerkers ook 50 fg 2,3,7,8-TCDD geïnjecteerd op kolom [7]. In een andere studie met EI-GC-MS/MS haalden Fürst en zijn medewerkers hetzelfde performantieniveau. Het laagste kalibratiepunt voor PCDD- en PCDF-congeneren bedroeg 100 fg, geïnjecteerd op kolom, met een uitstekende lineariteit voor 0,1 tot 10 pg op de kolom geïnjecteerde hoeveelheid.[8] L'Homme *et al.* meldden een instrumentele bepaalbaarheidsgrens (iLOQ) van 0,016 pg/ μ L voor 2,3,7,8-TCDD (80 fg op GC-kolom), eveneens met een EI-GC-MS/MS-instrument [9]. Al deze studies toonden aan dat er, voor een beperkt aantal monsters, voldoende gevoeligheid is voor het monitoren van maximale niveaus en actieniveaus voor PCDD/Fs en PCB's in levensmiddelen en diervoeders.



Figuur 1: Analyse van 2,3,7,8-TCDD door middel van APGC-MS/MS

Er werd vastgesteld dat het gebruik van APCI een substantieel voordeel biedt in vergelijking met EI. De analytische performantieniveaus, beperkt tot instrumentele injecties bij APCI, zijn hoogstwaarschijnlijk vergelijkbaar met de performantieniveaus die bekomen worden met EI omdat zowel PCDD/Fs als PCB's aanleiding geven tot intense moleculaire ionen door elektronenionisatie. Dit is niet het geval voor alle verontreinigende stoffen. APCI kan soms sterk de voorkeur genieten, zoals Portolés en medewerkers meldden voor pyrethroïde insecticiden [4], aangezien die pesticiden sterk fragmenteren in EI-modus. Dit pleit tegen de MS/MS-benadering bij de keuze van precursorionen.

In dit artikel hebben we benadrukt dat de gevoeligheid van het detectiesysteem duidelijk een cruciale rol speelt voor dit type van analytische toepassingen. Femtogrammen van PCDD/Fs en van PCB's die geïnjecteerd worden op basis van een kalibratie-oplossing komen niet overeen met de realiteit op het terrein. Routinemetingen uitvoeren van PCDD/Fs en PCB's op reële monsters is de echte uitdaging en dit vereist duidelijk het meest gevoelige detectiesysteem, maar ook de extractie- en opzuiveringsfasen die vooraf gaan aan de injectie spelen allebei een cruciale rol. Die fasen hebben een invloed op de kwaliteit en de betrouwbaarheid van de analytische resultaten. APGC-MS/MS- of EI-GC-MS/MS-technieken hebben hun potentieel aangetoond voor echte monsters van levensmiddelen op het doelniveau, maar lange termijn stabiliteit en performantie onder routineomstandigheden moeten nog beoordeeld worden om met zekerheid te kunnen zeggen dat die nieuwe generatie instrumenten gelijkwaardig zijn aan magnetische sectorinstrumenten op het vlak van de controle op levensmiddelen en diervoeder conform de wetgeving van de EU.

Referenties:

1. Verordening (EG) nr. 252/2012 van de Commissie van 21 maart 2012, tot wijziging van Verordening (EG) nr. 1883/2006 (OJ L 84, 23.3.2012, p. 1–22)
2. Verordening (EG) nr. 589/2014 van de Commissie van 2 juni 2014, tot wijziging van Verordening (EG) nr. 252/2012 (OJ L 164, 3.6.2014, p. 18-40)
3. Domeño, C., et al., (2012). *Journal of Chromatography A*, 1252(0): 146-154.
4. Porteles T, Mol J.G.J.; Sancho J. V., Hernandez F., (2012) *Analytical Chemistry* 84,9802-9810.
5. Geng D, Jogsten IE, Kukucka P, Hagberg J, Roos A, van Bavel B, (2014) *Organohalogen Compd* 76 in press
6. Kotz A, Traag W, Winterhalter H, Malisch R, Dunstan J (2013) *Organohalogen Compd* 75, 678-681
7. Kotz A, Malisch R, Wahl K, Bitomsky N, Adamovic K, Gerteisen I, Leswal S, Schachtele J, Tritschler R, Winterhalter H (2011) *Organohalogen Compd* 73 : 688-691
8. Sandy C, Fürst C, Bernsmann T, Baumesiter D (2011) *Organohalogen Compd* 73: 1370-1371
9. L'Homme B, Scholl G, Eppe G, Focant JF (2014) *Organohalogen compd*, 76 in press

G.Eppe@ulg.ac.be



Evolutie van de screeningmethodes voor de opsporing van residuen

Philippe Delahaut

CER Groupe - Département Santé, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie, Belgique

De doelstelling van een screeningmethode is om de eventuele aanwezigheid van residuen in de productieketen op te sporen. De identificatie van positieve monsters moet snel gebeuren met een minimum aan voorzuiverings- en extractiefases. Het percentage vals-positieve monsters moet laag zijn, terwijl men geen vals-negatieve mag hebben.

De huidige screeningmethodes voor de opsporing van residuen zijn vooral immuno-enzymatische doseringen van het type ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) en systemen van het type teststrip (*dipstick*) voor controles op de productieplaats.

De sleutelementen van deze doseringstypes zijn de antistof of de receptor, het gemerkte of niet-gemerkte antigeen en het opsporingssysteem. Door deze verschillende elementen te verbeteren kunnen nieuwe methodes worden ontwikkeld.

a) Antistoffen

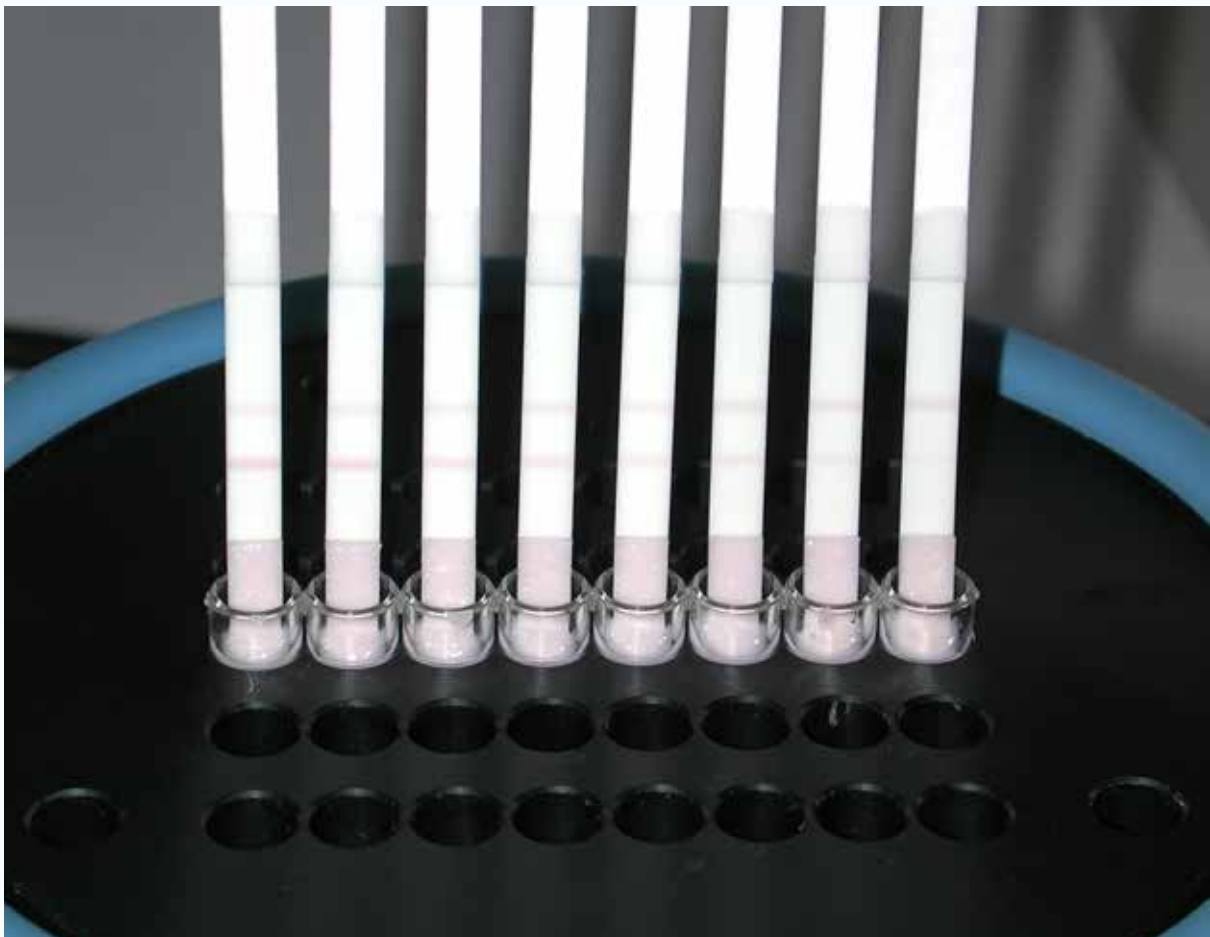
De meeste antistoffen die worden gebruikt voor de *in vitro* diagnostiek zijn polyclonaal of monoclaal. Er bestaan andere alternatieven zoals recombinante antistoffen, nanobodies, aptameren, MIP's (*Molecular Imprinted Polymer*) of receptoren om de *liganden* te produceren die onmisbaar zijn voor de binding met het antigeen. De belangrijkste ontwikkelingen in dit domein bestaan uit het proberen verkrijgen van *liganden* die zich binden aan meerdere moleculen van dezelfde groep om een multiresidu systeem te hebben dat bijzonder interessant is bij de screening. Momenteel laten bepaalde antistoffen toe alle β -agonisten in een enkele dosering te herkennen. Doseringkits die alle quinolonen of alle sulfonamiden in een enkele test kunnen doseren zijn ook beschikbaar.

Receptoren bieden het voordeel dat ze zich binden in functie van een biologische of farmacologische activiteit. Receptoren die zich kunnen vastmaken aan moleculen van groepen β -lactamaten of tetracyclines bestaan reeds. Geplande ontwikkelingen omtrent *binders* zullen vooral beogen om breed spectrum reagentia met een goede affiniteit te produceren.

b) Opsporingswijzen

De opsporing van residuen, zoals antibiotica in levensmiddelen van dierlijke oorsprong, wordt dikwijls verzorgd door het gebruik van screeningstesten zoals microbiologische inhibitietesten, ELISA's of immuno-chromatografische testen (figuur 1). In de loop van het afgelopen decennium werden bepaalde testen verbeterd en nieuwe snelle testen ontwikkeld door het volgen van verschillende tendensen:

- **Snelheid** - Met het oog op tijdswinst werden nieuwe testen ontwikkeld met een maximale testduur van 3 minuten of minder.
- **Multipliciteit** - De meeste snelle testen spoorden gewoonlijk een enkele stof of enkel stoffen op die behoren tot een enkele familie antibiotica (voornamelijk β -lactamaten). Tegenwoordig zijn generieke snelle testen beschikbaar voor de opsporing van 4 families antibiotica of meer.
- **MRL** - De opsporingscapaciteit van snelle testen werd verbeterd in de loop van de voorbije jaren en beter aangepast aan de behoeften van de voedingsmiddelenmarkt.
- **Omgevingstemperatuur** - Sommige producenten van kits richten hun aandacht meer op een test die kan worden gerealiseerd bij omgevingstemperatuur zodat geen enkel verwarmingsapparaat noodzakelijk is.



Figuur 1: illustratie van immuno-chromatografische test

Los van deze koers naar een onmiddellijke multiplextest, aangepast aan de officiële detectiedrempels en waarvoor geen enkele apparatuur benodigd is, beginnen andere, op nieuwe technieken gebaseerde, aanpakken eveneens het licht te zien. Technologieën zoals microfluidica, 'surface plasmon resonance' (SPR), optische biosensoren en biochips zijn reeds beschikbaar of zullen binnenkort beschikbaar zijn voor de analyse van residuen.

Onder deze technologieën kan **flowcytometrie** gelijktijdig meerdere residuen of contaminanten in levensmiddelen opsporen. Hiervoor worden specifieke of generieke "binders" (zoals antistoffen) en haptene vastgemaakt aan het oppervlak van fluorescente micropartikels. Deze partikels kunnen een verschillende grootte en fluorescentie hebben.

Zo kan men in dezelfde bepaling bolletjes van 4 of 5 micron en ook ongeveer 25 verschillende intensiteiten fluorescentie hebben die worden gegenereerd door fluorochromen met variabele afmetingen in ieder bolletje. Aan het oppervlak van ieder bolletje wordt een verschillend haptene vastgemaakt. *Multiplexing* gebeurt door de bolletjes in dezelfde bepaling te vermenigvuldigen.

De belangrijkste uitdaging is de productie van *binders* en de ontwikkeling van een generieke extractiemethode om alle verbindingen met soms zeer verschillende fysico-chemische eigenschappen te extraheren.

Anderzijds is het grote voordeel in vergelijking tot de klassieke ELISA's de *multiplexing*. Technologische ontwikkelingen laten ook vermoeden dat draagbare detectoren met een hoog analysedebiet beschikbaar komen.

In het kader van een EUREKA project leggen wij bij de CER Groupe momenteel de laatste hand aan het op punt stellen van een systeem voor de gelijktijdige opsporing van 10 families van antibiotica in vlees.

In het domein van **biosensoren** doken de voorbije jaren ontzettend veel ontwikkelingen op.

De biosensor is een analytisch systeem waarmee een verandering in concentratie van een molecule aan de oppervlakte van een detector kan worden gemeten. Deze meting gebeurt in realtime zonder beroep te moeten doen op tracers. Deze techniek waarvan de belangrijkste voordelen liggen in de snelheid, reproduceerbaarheid en het ontbreken van interferentie met de matrix, maakt het mogelijk om de interacties tussen een bepaald antigeen en de overeenkomstige antistof te volgen.

Tot besluit kunnen we stellen dat we ons in de komende jaren aan nog snellere en meer betrouwbare methodes voor de opsporing van residuen mogen verwachten. Een belangrijk element om in overweging te nemen is de kost voor de sector.

p.delahaut@cergrupe.be



Workshops & Symposia

De opleidingen voor de erkende laboratoria, georganiseerd door het FAVV in samenwerking met de nationale referentielaboratoria, vindt U terug op de website van het FAVV (www.favv.be > Beroepssectoren > Laboratoria > Seminars & workshops).

Deze tabel wordt regelmatig geactualiseerd, gelieve daarom regelmatig de website te consulteren.

Andere interessante workshops en symposia zijn hieronder opgenomen.

Datum	Onderwerp	Plaats	Meer informatie (website)
13-17.04.2015	IDF/ISO Analytical Week 2015 & Final Optimir scientific and expert meeting	Namur, Belgium	www.idf-iso-analytical-week.org
20-22.04.2014	10th Conference RME2015 Food Feed Water Analysis Innovations and breakthroughs!	The Netherlands	http://www.bastiaanse-communication.com/rme2015/
20-22.04.2015	2015 IAFP European Symposium on Food Safety Calls	Cardiff, Wales	https://www.foodprotection.org/europeansymposium/
25-28.04.2015	25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases	Copenhagen, Denmark	http://www.eccmid.org/
21-22.05.2015	AOAC Europe – NMKL – NordVal International Symposium 2015: "Food Labs in Crystal Ball; Future Challenges in Food Analysis"	Stockholm, Sweden	Jointly organised by AOAC Europe, NMKL and NordVal International. http://www.aoaceurope.com/
June 2015	Global Forum on Genetically Modified Wheat		http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html
7-11.06.2015	6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015 Congress)	Maastricht, Nederland	http://fems-microbiology.kenes.com/
16-19.06.2015	SASKATOON INTERNATIONAL WORKSHOP on VALIDATION and REGULATORY ANALYSIS	Calgary, Alberta, Canada	http://www.saskval.ca/
22-24.06.2015	World Congress and Expo on Applied Microbiology	Frankfurt, Germany	http://www.jmbfs.org/conference/world-congress-and-expo-on-applied-microbiology/
8-12.09.2015	9th International Conference on Predictive Modelling in Foods (ICPMF)	Rio de Janeiro, Brazil	http://icpmf9.com/
15.09.2015	Mass Spectrometry in Food and Feed II	Gent, Belgium	www.voeding.kvcv.be
8-9.10.2015	20th Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	http://www.bsfm.be/
3-6.11.2015	7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA 2015)	Prague, Czech Republic	www.rafa2015.eu





Labinfo