



Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- 4 Detectie van shigatoxinogene E. coli, STEC, in de voeding: methodologie en knelpunten
- 9 High resolution mass spectrometry
- 15 Het nut van whole genome sequencing voor het onderzoeken van voedseluitbraken, Salmonella Enteritidis als een casestudy
- 19 Halal voedingsmiddelen: analysemethoden voor detectie van sporen van varkensvlees in vlees en vleesproducten
- 22 Analyse van voedingsallergenen door middel van LC-MS/MS
- 29 Opkomende en nieuwe gebromeerde vlamvertragers (BFR's) in voedsel: Huidige status van de Europese wetgeving
- 32 Karakterisering van UGM met behulp van DNA walking strategie
- 36 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, Sarah Denayer, Katelijne Dierick, Nadine Botteldoorn, Els Van Pamel, Els Daeseleire, Christof Van Poucke, Véronique Wuyts, Nancy Roosens, Wesley Mattheus, Sophie Bertrand, Kathleen Marchal, Sigrid De Keersmaecker, Rob Margry, Nathalie Gillard, Otto Gaëtan, Philippe Delahaut, Gauthier Eppe, Georges Scholl, Edwin De Pauw, Jean-François Focant, Marie-Alice Fraiture, Herman Philippe en Nina Papazova

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,

Het jaar 2015 loopt stilaan op zijn einde. Binnen het FAVV is het een druk jaar geweest. Het business plan van onze gedelegeerd bestuurder werd goedgekeurd door onze voogdijminister, Minister Willy Borsus. Als gevolg hiervan kon elk bestuur binnen het agentschap aan de slag om een managementplan uit te werken om de strategische objectieven van het business plan te concretiseren. Deze keer was de uitdaging niet te onderschatten, gelet op de zware besparingen die we moeten realiseren.

Ook binnen het bestuur laboratoria hebben we hier samen met het middenkader werk van gemaakt. Het managementplan dat hieruit resulteert zal de komende jaren onze leidraad zijn om onze werking te verbeteren.

Dit managementplan kan eigenlijk opgedeeld worden in een twee grote delen. Het eerste deel betreft de werking van de 5 FAVV-labs, terwijl het tweede deel betrekking heeft op het beheer van de Nationale referentielaboratoria en de externe labs.

In het kader van één van de doelstellingen willen we de samenwerking met de NRL herbekijken, waarbij we een aantal zaken in vraag willen stellen.

Wat verwachten we van een NRL? Wat zijn kritische taken? Wat zijn nice-to-have's? Wat zijn de verwachtingen van de NRL ten aanzien van het FAVV? Op welke manier kunnen we de samenwerking verbeteren? Op welke manier kan het NRL meer toegevoegde waarde bieden? Hoe zit het met de budgetverdeling? Leggen we de juiste prioriteiten? Aan de hand van welke indicatoren kunnen we de werkzaamheden van de NRL beter opvolgen en beoordelen? Zijn er domeinen waarvoor vandaag geen NRL is aangeduid, terwijl dit eigenlijk wel aangewezen is? ...

Kortom, een heleboel vragen. Het antwoord op die vragen zal voor de komende jaren de richting bepalen die we met de NRL zullen volgen.

Dat ook de NRL in 2015 niet stilgezeten hebben, zal duidelijk zijn uit de artikels van dit nummer van Labinfo. Ze werkten onder meer aan nieuwe methoden en technieken om een antwoord te vinden op nieuwe uitdagingen.

Ik wens u veel leesgenot met deze veertiende editie van Labinfo en wens u alvast vredevolle feestdagen en een gelukkig Nieuwjaar.

Bert Matthijs
Directeur-generaal Laboratoria

Detectie van shigatoxinogene *E. coli*, STEC, in de voeding: methodologie en knelpunten

Sarah Denayer, Katelijne Dierick en Nadine Botteldoorn
NRL Levensmiddelenmicrobiologie, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel

Inleiding

E. coli is een doorgaans onschuldige darmbacterie die voorkomt bij mens en dier. Bepaalde types kunnen echter pathogeen zijn bij de mens en darmproblemen veroorzaken. Afhankelijk van hun virulentiefactoren en het ziektebeeld dat ze kunnen veroorzaken worden er binnen de pathogene *E. coli* verschillende groepen onderscheiden. Een belangrijke groep wordt gevormd door de shigatoxine producerende *E. coli*, ook wel STEC genaamd.

Tot deze STEC behoort de groep van de enterohemorragische *E. coli* (EHEC) die bij de mens naast milde diarree ook bloederige diarree kan veroorzaken. In 2-10% van de gevallen kunnen er complicaties optreden zoals het hemolytisch uremisch syndroom (HUS), waarbij nierdialyse soms noodzakelijk is.

De ernst van een infectie veroorzaakt door STEC hangt af van het bezit van virulentiefactoren, zoals de shigatoxinen (gecodeerd door de *stx1* en *stx2* genen), en andere virulentiefactoren die een rol spelen bij adhesie en invasie ter hoogte van de darm zoals bijvoorbeeld het intimine (gecodeerd door *eae*). Naast *E. coli* O157:H7, die reeds is aangetoond in verschillende uitbraken en specifieke biochemische kenmerken bezit (sorbitol -), zijn er ook andere serotypes die bij de mens ernstige ziekte kunnen veroorzaken.

Wat betreft de opsporing van deze pathogeen in levensmiddelen werd in 2012 de methode (ISO/TS 13136:2012) (1) voor de detectie van STEC behorende tot de voor de mens voornaamste serotypes (O157, O111, O26, O103 en O145) gepubliceerd. Kort daarop werd een Europese Richtlijn betreffende STEC in kiemgroenten gepubliceerd (Verordening (EU) 209/2013) (2) evenals een EFSA-opinie (3) waarin een risico-indeling voor STEC wordt gemaakt, dit op basis van virulentiegenen en serotypen.

Detectie van pathogene *E. coli* ISO/TS 13136:2012

De detectie van pathogene *E. coli* volgens ISO/TS 13136:2012 berust op een PCR screening van de belangrijkste virulentiegenen, namelijk *stx* en *eae*, en de genen geassocieerd met de top-5 serotypes. Na het bekomen van een positief PCR resultaat voor een staal, wordt in een volgende stap getracht de kiem te isoleren. Dit laatste kan al dan niet met behulp van serogroepspecifieke ophopingstechnieken zoals immunomagnetische scheiding. De isolatie van de STEC stammen is vereist om de aanwezigheid van de virulentiegenen binnen eenzelfde levende bacterie te bevestigen en aldus een staal als positief te beschouwen voor STEC.

De methode omvat dus volgende stappen:

- A. Ophoping van STEC
- B. Screening: DNA extractie en (real-time) PCR detectie van virulentiegenen en serogroep geassocieerde genen
- C. Isolatie en bevestiging van de kiem uit vermoedelijk positieve stalen voor STEC

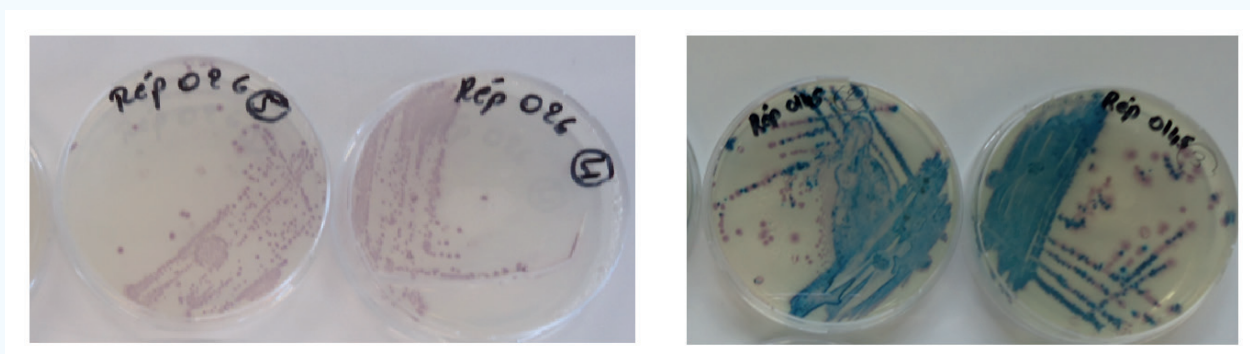
A. Ophoping

De keuze van het ophopingsmedium is afhankelijk van de toestand van de bacteriën en de te analyseren voedingsmatrix. Gebufferd peptonwater (BPW) wordt aangeraden voor stalen waarin gestresseerde bacteriën (bv. in diepgevroren producten) en een lage nevenflora verwacht worden, dit ter resuscitatie van STEC. Voor stalen waarbij een hogere nevenflora wordt verwacht, wordt mTSB medium met novobiocine aangeraden terwijl voor melk- en zuivelproducten mTSB medium met acriflavine gebruikt moet worden. Beide componenten remmen de groei van Gram-positieve bacteriën, dit ten gunste van Gram-negatieve kiemen waaronder STEC. Te hoge concentraties novobiocine werken echter remmend voor STEC, vooral voor de niet-O157 *E. coli* stammen. Anderzijds zou het gebruik van BPW voor deze stalen aanleiding kunnen geven tot een beperkte uitgroei van STEC, dit door competitie met de nevenflora, wat de isolatie in een verdere fase bemoeilijkt. Dit werd bevestigd in een wetenschappelijke studie voor kiemgroenten en rauwe groenten (sla, wortelen), maar was minder van toepassing voor rauwe melk, rundsvlees en swabs van runderkarkassen (IDESTEC RT12/12) (4) (Figuur 1).

Het is dus niet evident voor een laboratorium om een correcte keuze van het ophopingsmedium te maken, deze is sterk afhankelijk van de te analyseren voedingsmatrix.

a Geraspte wortelen (*E. coli* O145)

b Rauwe melk (*E. coli* O26)



Figuur 1 : (a) Aanwezigheid van nevenflora (blauwe kolonies) op CHROMagar STEC na isolatie van STEC (voorbeeld *E. coli* O145) (paarse kolonies) uit geraspte wortelen, maar (b) afwezigheid van nevenflora na isolatie van STEC (voorbeeld *E. coli* O26) uit rauwe melk.

B. Screening: DNA extractie en (real-time) PCR detectie van virulentiegenen en serogroep geassocieerde genen

DNA wordt rechtstreeks vanaf de ophoping bereid met behulp van een geschikte methode voor Gram-negatieve bacteriën.

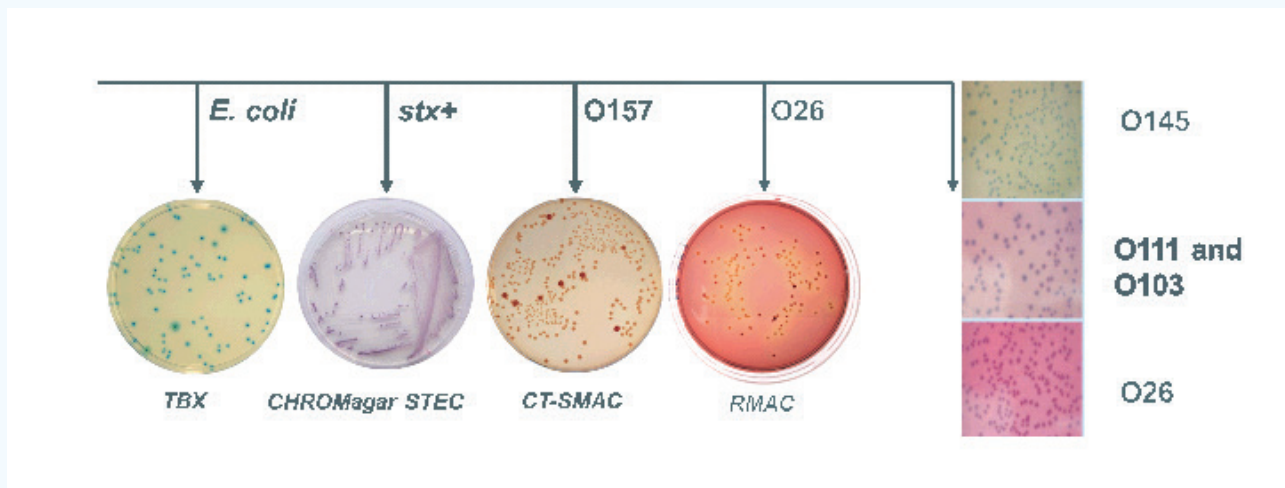
De daaropvolgende screening naar STEC in de ophopingen berust op de detectie van specifieke virulentiegenen, *stx1* -*stx2* en *eae* met (real-time) PCR. Onderzoek naar de serogroep geassocieerde genen geeft informatie over het vermoedelijke seropathotype en kan gebruikt worden om een serogroep specifieke isolatie van STEC uit te voeren (zie punt C.).

Zowel conventionele PCR als de real-time PCR kunnen gebruikt worden voor de screening van de ophopingen. ISO/TS 13136:2012 Annex E beschrijft primer- en probesequenties, maar ook andere primers beschreven in de literatuur of commerciële kits kunnen worden gebruikt mits dezelfde performantie kan worden aangetoond. Deze screeningsstap vormt wellicht geen probleem voor de methode (IDESTEC RT 12/12). (4)



C. Isolatie en bevestiging van de kiem uit vermoedelijk positieve stalen voor STEC

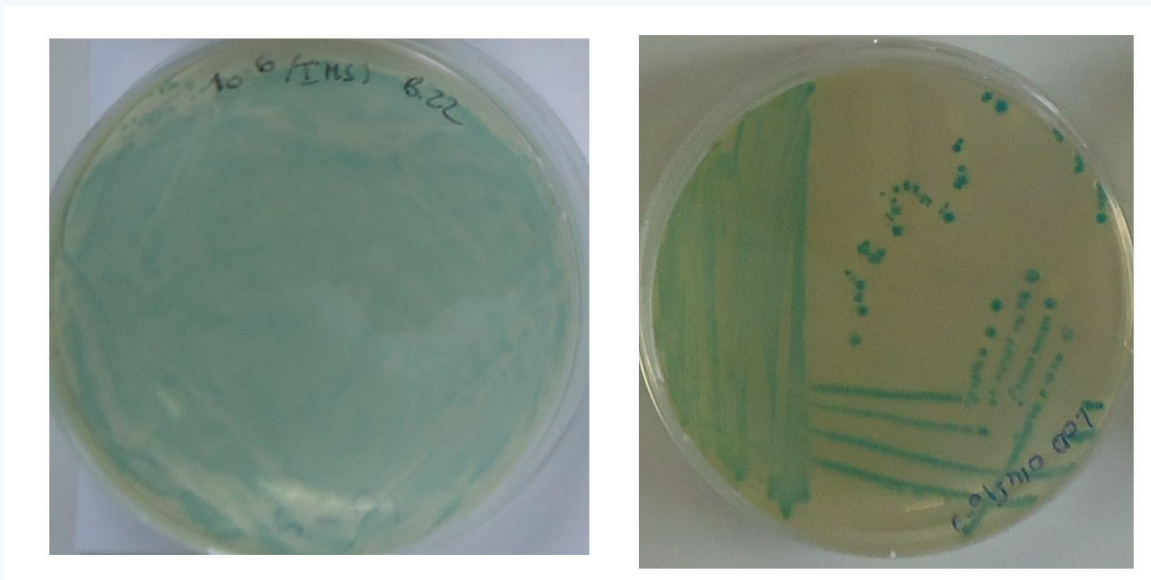
Om de aanwezigheid van de virulentiegenen binnen éénzelfde levende *E. coli* cel te bevestigen, wordt voor *stx*-positieve ophopingen getracht om de STEC stam te isoleren. Hiertoe kan de ophoping worden uitgeplaat op trypton-gal-glucuronide agar medium (TBX), een chromogeen milieu specifiek voor de isolatie van *E. coli*. Dit isolatiemedium laat echter niet toe om een onderscheid te maken tussen commensale *E. coli* en STEC, wat de isolatie bemoeilijkt. Alternatief kan een ander specifiek (chromogeen) isolatiemedium, indien beschikbaar, gebruikt worden om de isolatie van STEC uit de achtergrondbacteriën te vereenvoudigen (vb. CHROMagarTM STEC, ChromIDTM EHEC) (Figuur 2).



Figuur 2: *E. coli* (STEC) isolatie op TBX, ChromagarTMSTECS, CT-SMAC, RMAC en milieu zoals beschreven door Possé et al., 2008. (5)

Ook de resultaten van de screening naar serogroep geassocieerde genen kunnen de keuze van het isolatiemedium vereenvoudigen en oriënteren. Voor stalen die positief zijn in de PCR screening voor serotype O157, kan best de referentiemethode voor *E. coli* O157 (ISO16654 of alternatieve methode) gebruikt worden voor de isolatie. Voor stalen die positief zijn voor serotype O26 bestaat er een commercieel MacConkey agar medium met rhamnose in plaats van lactose (RMAC). Anderzijds kunnen de media zoals beschreven door Possé en medewerkers (2008) (5), die gebaseerd zijn op het verschillend suikergebruik van de top-5 serotypes, eveneens gebruikt worden voor isolatie van de kiem.

De uitplating op een isolatiemedium kan al dan niet voorafgegaan worden door een serogroep-specifieke ophoping door middel van bijvoorbeeld een immunomagnetische scheiding (met magnetische deeltjes die gecoat zijn met O-groep specifieke antilichamen). Echter wordt opgemerkt dat deze facultatieve stap voor een aantal serogroepen niet voldoende specifiek is, waardoor veel nevenflora behouden blijft en de isolatie wordt bemoeilijkt (Figuur 3).



Figuur 3: Isolatie van *E. coli* O145 uit wortelen (a) met IMS of (b) door rechtstreekse uitplating op TBX

Na uitplating op een isolatiemedium worden tot 50 kolonies met de *E. coli* specifieke eigenschappen volgens het gebruikte isolatiemedium verder onderzocht. Door middel van punt-inoculatie worden deze geënt op nutriënt agar (NA) platen en terzelfdertijd in een wateroplossing (pool per 10 kolonies) overgebracht voor de PCR detectie van *stx* en *eae* genen. Wanneer de (real-time) PCR detectie voor de *stx* en/of *eae* genen positief is voor een pool, worden alle individuele kolonies getest om de positieve kolonie te identificeren. Hierbij kan de NA-plaat gebruikt worden om het isolaat te bevestigen. Tot slot wordt het serotype van de positieve kolonie door (real-time) PCR of agglutinatie bepaald.

Conclusie

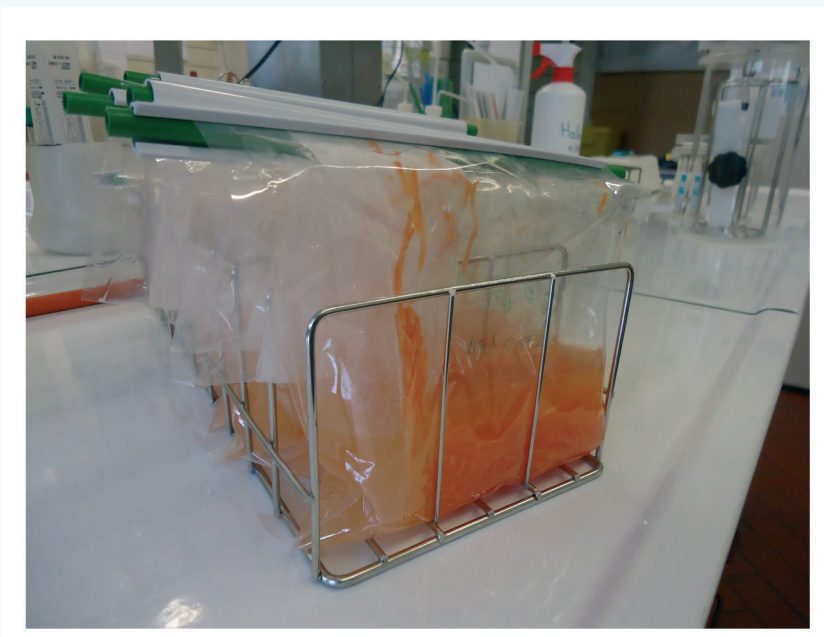
Voorname de isolatie en niet de (real-time) PCR screening van STEC in een ophoping is een knelpunt van de ISO/TS 13136:2012 detectiemethode voor STEC. Wanneer een laboratorium deze methode wil implementeren, dient het rekening te houden met een aantal belangrijke factoren om een optimale detectie-efficiëntie van STEC te kunnen verwezenlijken. Heel belangrijk hierbij is een validatiestudie waarbij een keuze voor zowel het ophopings- als isolatiemedium gemaakt moet worden. Deze keuze is afhankelijk van de aard van de stalen die het laboratorium zal ontvangen voor analyse, aangezien de voedingsmatrix en de aanwezige nevenflora een grote impact hebben op de groei- en isolatiemogelijkheid van STEC. Aangezien de ISO/TS 13136:2012 methode bestaat uit twee grote onderdelen, namelijk de detectie van de pathogeen via (RealTime) PCR en –indien positief voor vooropgestelde criteria- de daaropvolgende isolatie van de kiem, is een modulaire aanpak bij de validatie vereist.



Referenties:

1. ISO/TS 13136 :2012. Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
2. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Journal 2013;11(4):3138. [106 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2013.3138. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
3. Verordening (EU) 209/2013 van de Commissie tot wijziging van de verordening (EG) nr 2073/2005 inzake microbiologische criteria voor kiemgroenten en de bemonsteringsvoorschriften voor pluimveekarkassen en vers pluimveevlees. (2013) Publicatieblad van de Europese Unie L68/19
4. Doorgedreven identificatie van voor de mens pathogene shiga-toxine producerende *Escherichia coli* (STEC) in België. (IDESTEC RT 12/12)
5. Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L. (2008). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. FEMS Microbiol Lett. 282(1):124-31

Sarah.Denayer@wiv-isp.be



High resolution mass spectrometry

Els Van Pamel, Els Daeseleire en Christof Van Poucke

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek / Institute for Agricultural and Fisheries Research

Eenheid Technologie en Voeding - Voedselveiligheid / Technology and Food Science Unit - Food Safety

Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle

Introductie hoge resolutie massaspectrometers (HRMS)

Analytische technieken die kwalitatieve (wat?) en/of kwantitatieve (hoeveel?) informatie kunnen verschaffen over de samenstelling van biologische monsters, zijn van cruciaal belang in tal van sectoren zoals onder andere de levensmiddelenindustrie. Het succes van dergelijke technieken wordt onder meer bepaald door parameters zoals gevoeligheid, selectiviteit, robuustheid, nauwkeurigheid, precisie, snelheid en kostprijs per analyse. Chromatografisch-massaspectrometrisch gebaseerde technieken zoals gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS) en vloeistofchromatografie-massaspectrometrie ("liquid chromatography-mass spectrometry", LC-MS) spelen hierin een belangrijke rol. In wat volgt, zal voornamelijk de nadruk gelegd worden op de evolutie binnen MS naar hoge resolutie massaspectrometers ("high resolution mass spectrometers", HRMS). De laatste jaren is er binnen de analytische wereld een verschuiving waar te nemen van lage resolutie massaspectrometers (zoals single en tandem/triple quadrupolen) naar hoge resolutie toestellen die gekenmerkt worden door een groot onderscheidend vermogen (i.e. hoge resolutie; mogelijkheid van de detector om twee ionen met slechts een klein verschil in massa (massa/lading) van elkaar te kunnen onderscheiden), massa-accuraatheid en dynamisch bereik. Magneetsector, Time-of-Flight (TOF), Fourier transformatie ion cyclotron resonantie (FTICR) en Fourier transformatie Orbitrap massaspectrometers zijn verschillende types van commercieel beschikbare "high resolution" toestellen. Voor een meer gedetailleerde beschrijving van elk van deze types massaspectrometers wordt verwezen naar Labinfo Nr. 12 (juli 2014, "Mycotoxine screening" door Bart Huybrechts). Het overzichtsartikel van Xian et al. (2012) behandelt deze massaspectrometertypes en hun recente ontwikkelingen eveneens meer in detail. Naast deze basistypes zijn ook hybride toestellen op de markt, zoals bijvoorbeeld quadrupool-TOF (QTOF) en linear trap quadrupool (LTQ)-orbitrap configuraties. In dergelijke hybride toestellen worden meerdere massaspectrometertypes aan elkaar gekoppeld. Dit vergroot de analysemogelijkheden aanzienlijk gezien ze meer diverse massaspectrometrische informatie verschaffen. Zo laten deze hybride type massaspectrometers bijvoorbeeld toe om niet alleen de accurate massa van het doelanaliet (precursorion of moederion) te bekomen, maar kan (binnen eenzelfde analyse) dit precursorion gefragmenteerd worden en kan ook van deze fragmentionen (of dochterionen) de accurate massa bepaald worden (MS/MS of zelfs MSⁿ). In het artikel van Liang et al. (2011) is een overzicht terug te vinden van de basistypes en hybride types van dergelijke hoge resolutie toestellen voor wat betreft hun prestatievermogen of prestatie. Hierbij worden onder andere de massa-accuraatheid, de resolutie, de detectiegevoeligheid, de snelheid van dataopname, de mogelijkheid tot MS/MS en multistage MS (MSⁿ) analyse onderling vergeleken.



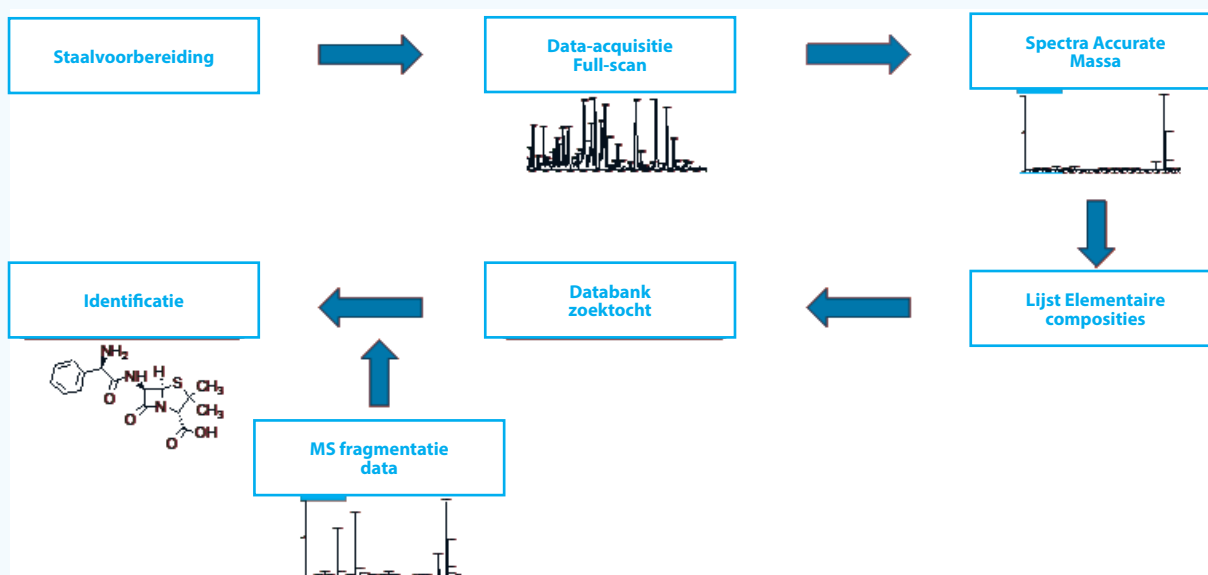
Kenmerken HRMS

Hoewel de naam laat vermoeden dat hoge resolutie of het vermogen om nauw bij elkaar gelegen spectrale pieken (overeenstemmend met verschillende massa/lading verhouding) zo goed mogelijk van elkaar te onderscheiden het hoofdkenmerk is van dergelijke toestellen, is massa-accuraatheid of het vermogen om de massa van componenten zo nauwkeurig mogelijk te kunnen bepalen, minstens even belangrijk. De performantie van HRMS toestellen wordt uitgedrukt in termen van “resolving power” en ligt –afhankelijk van het type hoge resolutietoestel– in de grootteorde $>10\,000 - 100\,000$ of zelfs nog hoger bij de ultra-hoge resolutietoestellen. Dit is aanzienlijk hoger vergeleken met waarden van $1\,000 - 2\,000$ van quadrupool toestellen. Voor wat massa-accuraatheid betreft, wordt deze meestal uitgedrukt in parts per million (ppm) en configuratie-afhankelijk ligt deze in het bereik van $<1 - 5$ ppm. Een voldoende massa-accuraatheid draagt bij tot een vermindering van het aantal mogelijke elementaire composities (structuurformules) voor een molecuule binnen een bepaalde massatolerantie, wat de interpretatie van de data vereenvoudigt (Holčapek et al. 2010) en toelaat om bijvoorbeeld nieuwe en/of ongekende componenten te identificeren.

“Targeted or untargeted”?

Een belangrijk voordeel van hoge resolutie massaspectrometers is de mogelijkheid om zowel gericht (“targeted”) als ongericht (“untargeted”) te werken. Targeted werken houdt in dat gericht geanalyseerd wordt op de aan-/afwezigheid van gekende componenten (beperkende lijst) in een monster en dat de concentratie ervan kan bepaald worden aan de hand van de kalibratiecurve met de beschikbare standaard ervan, al dan niet in de matrix. Hoewel tandem massaspectrometrie (MS/MS) hiertoe vaak de meest gebruikte methode is (wegens de hoge gevoeligheid en selectiviteit op een kosteneffectieve wijze), hebben ook hoge resolutie massaspectrometers in dit domein hun verdienste. Kenmerkend voor HRMS is echter eerder de “untargeted approach”. Hierbij kan tijdens (een deel van) de analyse van een monster continu gekeken worden over een breed massabereik, waardoor een totaalprofiel bekomen wordt (d.w.z. “full scan” analyse). Een dergelijke aanpak vereist dus geen voorkennis (of *a priori* kennis) over de component(en) van interesse (vb. interesse in een bepaalde klasse van stoffen). Het laat dus toe om binnen een componentklasse (vb. steroïden) een vrijwel onbeperkt aantal verschillende componenten op te sporen, maar ook om dit voor meerdere verschillende componentklassen samen in één analytische run uit te voeren (vb. steroïden en coccidiostatica).

Indien men de identiteit van “onbekende” moleculen tracht te achterhalen, zullen bij een algemene “untargeted” approach de bekomen massaspectra of piekenpatronen softwarematig geanalyseerd worden (zie Figuur 1). Hierbij komt een lijst van mogelijk elementaire composities of structuurformules uit de bus. Vervolgens kan een databankzoektocht gestart worden om tot een gereduceerde lijst van mogelijke identificaties (“hits”) of in het beste geval zelfs een mogelijke identificatie te komen. Databanken zoals PubChem, Chemspider, KEGG, ... kunnen hierbij aangewend worden. Het is dan aan de analist zelf om uit de lijst van mogelijke componentvoorstellen de meest waarschijnlijke kandidaat te achterhalen op basis van extra informatie. Deze extra informatie kan schuil gaan in fragmentatiedata (MS/MS of MSⁿ). Immers, zoals reeds hoger vermeld kunnen bij hybride toestellen naast full scan data ook MSⁿ data gegenereerd worden. Concreet betekent dit dat naast informatie over moedermoleculen ook massaspectrometrische gegevens van de fragmentionen (dochterionen) van deze precursoren (moederionen) kunnen bekomen worden. Dit vergroot het identificatievermogen of de kans op het terugvinden van de juiste component aanzienlijk. Daarnaast kunnen de chemische eigenschappen zoals de polariteit van de voorgestelde structuren een indicatie geven over hoe waarschijnlijk een kandidaat is op basis van zijn elutiegedrag (d.w.z. de tijd die nodig is om de chromatografische kolom te doorlopen). De “Seven Golden Rules” zoals beschreven door Kind and Fiehn (2007) kunnen hierbij ook van pas komen.



Figuur 1: Overzicht van de workflow bij "untargeted" analyse voor de identificatie van onbekende stoffen

Bij de "untargeted" benadering kan het ook zijn dat men in eerste instantie niet onmiddellijk geïnteresseerd is in het achterhalen van de identiteit van verschillende componenten op zich, maar dat men de profielen (of piekenpatronen) bekomen tijdens "full scan" analyses wil vergelijken tussen verschillende groepen van monsters. Zo kan het bijvoorbeeld zijn dat onderzoekers de invloed van bepaalde omstandigheden/condities of behandelingen op de samenstelling van hun biologisch materiaal willen bestuderen (vb. veranderingen in bepaalde componentklassen) of dat men bijvoorbeeld wil nagaan of de authenticiteit van voedingsproducten gerespecteerd werd (vb. vervalsing van olijfolie). Bij dergelijke onderzoeksvragen zullen de gegenereerde profielen met softwarepakketten statistisch geanalyseerd worden. Multivariatie klassificatiemethodes zoals "Principal Component Analysis" (PCA) en "Partial Least Squares Analysis" (PLS) of clusteranalyse kunnen hiertoe aangewend worden. Zonder al te diep in te gaan op de theoretische aspecten van dergelijke metabolomics benaderingen, kan gesteld worden dat deze technieken bijdragen tot het achterhalen van die merkers/componenten die bijdragen tot de meeste variatie tussen datasets (behandelingen/condities). Met andere woorden, welke componenten veranderen (vb. verdwijnen of veranderen in hoeveelheid) bij welke omstandigheid. Deze merkers kunnen dan mogelijk via databankzoektochten geïdentificeerd worden. Men dient zich er echter van te vergewissen dat –hoewel de hoge massa-accuraatheid van HRMS toestellen bij de "untargeted approach" onmiskenbaar en onmisbaar is– het een uitdagend proces blijft om "onbekenden" eenduidig te identificeren. En hoewel fragmentatie-informatie bekomen tijdens HRMS uiterst nuttig is, zal voor de structuuropheldering van totaal ongekende componenten steeds teruggegrepen dienen te worden naar "Nuclear Magnetic Resonance" (NMR).



Injecteer nu, analyseer later?

Een bijkomend aspect dat bijdraagt tot de voordelen van HRMS is het feit dat, omwille van “untargeted/full scan” analyse, retrospectieve data-analyse tot de mogelijkheden behoort. Hierbij kan eerder opgenomen data op een later tijdstip softwarematig opnieuw geanalyseerd worden (*a posteriori*), waarbij nagegaan kan worden of ten tijde van de data-opname reeds (toen nog ongekende) componenten al dan niet aanwezig waren in het monster. Het principe van “injecteer nu, analyseer later” dus, wat binnen bijvoorbeeld de dopingwereld en veterinaire residuwereld uiterst interessant kan zijn.

“Ion mobility”, een derde dimensie ...

In het domein van HRMS komt vandaag de dag het aspect van scheiding op basis van ionenmobiliteit (“ion mobility separation”, IMS) steeds vaker onder de aandacht. Het overzichtartikel van Kanu *et al.* (2008) biedt een samenvatting van de verschillende types, alsook de voordelen van IMS en beschrijft de koppeling van IMS met MS voor TOF, quadrapool, ion trap en FTICR massaspectrometers. De koppeling tussen IMS en MS zorgt ervoor dat enerzijds gasfase ionen gescheiden kunnen worden op basis van hun grootte/lading verhouding en hun interacties met een buffergas, en anderzijds op basis van hun massa/lading verhouding gescheiden worden in de MS. IMS geeft aanleiding tot een extra dimensie, vertaald in drifttijd wat op zijn beurt kan omgerekend worden naar de “collision cross section” (CCS) van de molecule, zeg maar de 3D dimensie op basis van de molecuulgrootte. Men spreekt dan ook van een multi-dimensionale scheiding die de mogelijkheid biedt om isomeren, isobaren en conformeren van elkaar te scheiden, alsook om chemische ruis (“chemical noise”) te reduceren. IMS-MS is bijgevolg een krachtige analytische techniek die toelaat om zelfs zeer op elkaar gelijkende componenten in complexe stalen te scheiden en reduceert het gevaar op vals negatieve en vals positieve resultaten. Deze techniek heeft zijn toepassingen in verschillende domeinen zoals proteomics, glycomics en metabolomics (Kanu *et al.* 2008).

“-OMICS”

De brede toepassingsmogelijkheden van hoge resolutie massaspectrometers, gaande van componentidentificatie en structuuropheldering tot analyse van doelwitcomponenten alsook de immense diversiteit aan biologische componenten die samen (d.w.z. multi-analyt) geanalyseerd kunnen worden (geneesmiddelen, metabolieten, organische componenten, proteïnen (en modificaties), peptiden, lipiden, glycoconjugaten en andere biologische componenten) hebben bijgedragen tot hun succes in de “-OMICS” wereld (proteomics, metabolomics, lipidomics, ...). Voorbeelden van HRMS-toepassingen binnen het domein van voedselveiligheid zijn terug te vinden in Volume 28 van Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry of High Resolution Mass Spectrometry to Food Safety. In onderstaande wordt de evolutie naar HRMS binnen de wereld van veterinaire residuanalyses kort besproken.

HRMS binnen de veterinaire residuwereld

Reeds enkele decennia lang is er vanuit het standpunt van voedselveiligheid een Europese wetgeving van kracht voor chemische componenten die vallen onder de noemer veterinaire geneesmiddelen. Hiertoe behoren bijvoorbeeld de antimicrobiële geneesmiddelen zoals antibiotica en geneesmiddelen met groeibevorderende eigenschappen, zoals bijvoorbeeld steroïden en β -agonisten. Er is bijgevolg jaren geïnvesteerd in de ontwikkeling en validatie van analysemethodes die toelaten om residuen en/of metabolieten van dergelijke geneesmiddelen in verschillende types van voeder-/voedselmatrices en biologische matrices op te sporen. Naast traditionele snelle screeningsmethoden om verdachte en negatieve (d.w.z. conforme) monsters van elkaar te onderscheiden, ligt de nadruk vandaag de dag op massaspectrometrie als bevestigingsmethode voor een onbetwistbare identificatie en/of kwantificatie (met andere woorden: hoeveel van welk (metaboliet)residu is aanwezig in een monster). Voor de "targeted" analyse van verschillende veterinaire geneesmiddelenresiduen in één enkele analyse (d.w.z. multiresidu methodes) zijn lage resolutie tandem/triple quadrupolen (QqQ) nog steeds de vaakst gebruikte massaspectrometers. Echter, de hoge resolutie en massa-accuraatheid, de "non a priori" aanpak, het retrospectieve aspect en de mogelijkheid tot MS^n maken dat er recentelijk een tendens waar te nemen is naar een stijgend gebruik van de hoge resolutiemassaspectrometers en dit zowel binnen de "targeted" als "untargeted" benadering voor vaak complexe monsters (voor zover het hogere prijskaartje de introductie in routinelaboratoria toelaat). HRMS laat toe dat ook geanalyseerd kan worden op stoffen die voorheen niet inbegrepen waren in de "targeted" methodes of op zoek te gaan naar nieuwe biomerkers (Le Bizec *et al.* 2009). Maar hoe kan men nu nagaan hoe goed een methode werkt voor het opsporen van diergeneesmiddelenresiduen of metabolieten ervan? De technische richtlijnen voor de performantiekarakteristieken, limieten en criteria waaraan dergelijke methodes moeten voldoen, worden beschreven in Beschikking 2002/657/EG. In deze Beschikking wordt voor massaspectrometrische bevestigingsmethoden tevens het concept van identificatiepunten (IPs) en ionverhoudingen geïntroduceerd. Dit om een onbetwistbare identificatie te garanderen (en dus de kans op foutieve resultaten zo laag mogelijk te houden). Zo is voor stoffen van groep A (verboden stoffen en substanties met anabole effecten) een minimum van 4 IPs vereist, daar waar voor deze van groep B (veterinaire geneesmiddelen en contaminanten) een minimumscore van 3 IPs wordt vooropgesteld. Onder de rubriek "prestatiecriteria en andere voorschriften voor massaspectrometrische detectie" staat beschreven hoeveel IPs per ion worden toegekend voor methodes gebruik makend van HRMS (al dan niet met HRMSⁿ). Tevens staat voor HRMS beschreven dat de resolutie normaliter groter dan 10 000 moet zijn voor het hele massabereik (bij een dalwaarde van 10%).

Echter, met de recente evolutie op vlak van technologie (en dan zeker voor wat HRMS betreft) dient de geschiktheid van de huidige richtlijnen in bovenvermelde Beschikking opnieuw onder de loep genomen te worden. Aspecten zoals onder andere resolutie en massa-accuraatheid, het gebrek aan meetbare ruis, de extra dimensie van IMS en andere dienen hierbij beschouwd te worden. De vraag dringt zich dan ook op of de performantiecriteria voor analysemethodes in de Beschikking 2002/657/EG dienen herzien te worden in het kader van de meest recente ontwikkelingen op vlak van technologie. Het is in dit kader dat het RIKILT Wageningen UR momenteel een project coördineert dat gericht is op het voorstellen van aangepaste performantiecriteria. Een validatiestudie is gaande die de verschillende technieken en verschillende laboratoria wereldwijd insluit om wetenschappelijk onderbouwde data te vergaren om de geschiktheid van de vooropgestelde performantiecriteria te toetsen.



Een grote stap vooruit, maar het einde is nog niet in zicht

Tot slot kan gesteld worden dat, hoezeer de meest recente massaspectrometers op de markt bijdragen tot een immens hoogwaardig analysepotentieel, en hoezeer het "dilute-and-shoot" principe theoretisch toegepast kan worden, in de praktijk blijkt dat correcte monstername, monstervoorbereiding/-opzuivering en degelijke chromatografische scheiding noodzakelijk blijven om de uitkomst van analyses ten goede te komen. Het zijn dus niet enkel nieuwe ontwikkelingen binnen de wereld van HRMS die van belang zijn, maar tevens op vlak van chromatografie (UHPLC, tweedimensionele LC), software voor data-analyse, ... Bovendien is het voordeel bij HRMS vaak evenzeer een nadeel, met name omwille van het feit dat het genereren van een massa aan data ook een complexe en vaak tijdrovende data-analyse met zich meebrengt. Met andere woorden: je ziet bijna alles, maar wat zie je precies? Ook het prijskaartje is nog een belemmerende factor om deze techniek zomaar te introduceren in routinelaboratoria.

Over het gebruik van HRMS binnen de residuenwereld is het laatste woord dan ook nog niet gezegd. Over zaken zoals bijvoorbeeld methodenvalidatie en identificatiecriteria voor HRMS zijn nog diepgaande discussies en studies vereist.

Referenties:

- 1 Beschikking van de Commissie van 12 augustus 2002 ter uitvoering van Richtlijn 96/23/EG van de Raad wat de prestaties van analysemethoden en de interpretatie van resultaten betreft (2002/657/EG).
- 2 Holčapek M., Jirsko R., Lsa M. (2010) Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *J. Chrom. A*, 1217, 3908-3921.
- 3 Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., and Hill H.H. (2008) Ion mobility-mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 43, 1-22.
- 4 Kind T., and Fiehn O. (2007) Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8, 105-124.
- 5 Le Bizec B., Pinel G., and Antignac J.-P. (2009) Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 1216, 8016-8034.
- 6 Liang Y., Wang G., Xie L., and Sheng L. (2011) Recent development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Emerging Technologies for Metabolite Identification. *Curr. Drug Metab.*, 12, 329-344.
- 7 Xian F., Hendrickson C.L., and Marshall A.G. (2012) High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 84, 708-719.

els.vanpamel@ilvo.vlaanderen.be

Het nut van whole genome sequencing voor het onderzoeken van voedseluitbraken, *Salmonella* Enteritidis als een casestudy

Véronique Wuyts^{1,2,3}, Sarah Denayer⁴, Nancy H.C. Roosens¹, Wesley Mattheus⁵, Sophie Bertrand⁵, Kathleen Marchal^{3,6}, Katelijne Dierick⁴, Sigrid C.J. De Keersmaecker¹

¹Platform Biotechnologie en Moleculaire Biologie, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), Brussel, België

²Departement Microbiële en Moleculaire Systemen, Centrum voor Microbiële en Plantengenetica, KU Leuven, Leuven, België

³Departement Plantenbiotechnologie en Bioinformatica, Universiteit Gent, Gent, België

⁴NRL VoedselToxi-Infecties (NRL-VTI) en NRL *Salmonella* in voeding, Dienst Voedselpathogenen, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), Brussel, België

⁵NRC voor *Salmonella* en *Shigella* (NRCSS), Dienst Bacteriële Ziekten, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), Brussel, België

⁶Departement Informatie Technologie, Universiteit Gent, IMinds, Gent, België

Klassieke voedseluitbraak-onderzoeken bestaan uit het verzamelen van monsters van humane gevallen, vaak fecesstalen, een ondervraging van deze patiënten via een standaardvragenlijst om een gemeenschappelijke voedselbron te identificeren en het bemonsteren van het verdachte voedsel. De verzamelde epidemiologische informatie en voedsel- en/of humane monsters worden naar het Nationaal Referentie Laboratorium Voedsel-Toxi-infecties (NRL-VTI) gestuurd voor de detectie, isolatie en identificatie van de via het voedsel overgedragen ziekteverwekkers, om zo de bron van de uitbraak te bepalen en vervolgens de uitbraak zo snel mogelijk te kunnen beheersen. In het algemeen maakt de verdere karakterisering, of “fingerprinting”, van de pathogeen het mogelijk om een sterk verband tussen het isolaat van de bevestigde patiënten en dat vanuit het verdachte voedsel te leggen of om andere humane gevallen die hetzelfde gecontamineerde voedsel geconsumeerd hebben, te identificeren. Dit laatste is belangrijk voor uitbraken met grote geografische spreiding van ziektegevallen. Deze karakterisering bestaat meestal uit (sub)typeren, vaak door middel van verschillende technieken, en antimicrobiële gevoeligheidstesten.

De klassieke karakteriseringsmethoden resulteren echter niet altijd in een volledig fingerprinting- profiel van een uitbraakstam, zoals duidelijk werd geïllustreerd door de Duitse *Escherichia coli*-uitbraak in 2011. Traditionele “*multi-locus sequence typing*” (MLST) gebaseerd op 7 huishoudgenen toonde een nauwe relatie tussen de 2011 uitbraakstam en een historische Duitse *E. coli* stam gekoppeld aan het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS). “*Whole genome sequencing*” (WGS) bracht echter aan het licht dat de uitbraakstam en de historische pathogene *E. coli*-stam verschilden in chromosomale gen- en plasmide-inhoud, waardoor een duidelijk verschil in virulentie-potentieel onthuld werd [1]. Dit toonde aan dat WGS belangrijke informatie voor de behandeling of voor specifieke eisen aan een detectiemethode van nieuw opkomende ziekteverwekkers kan opleveren.

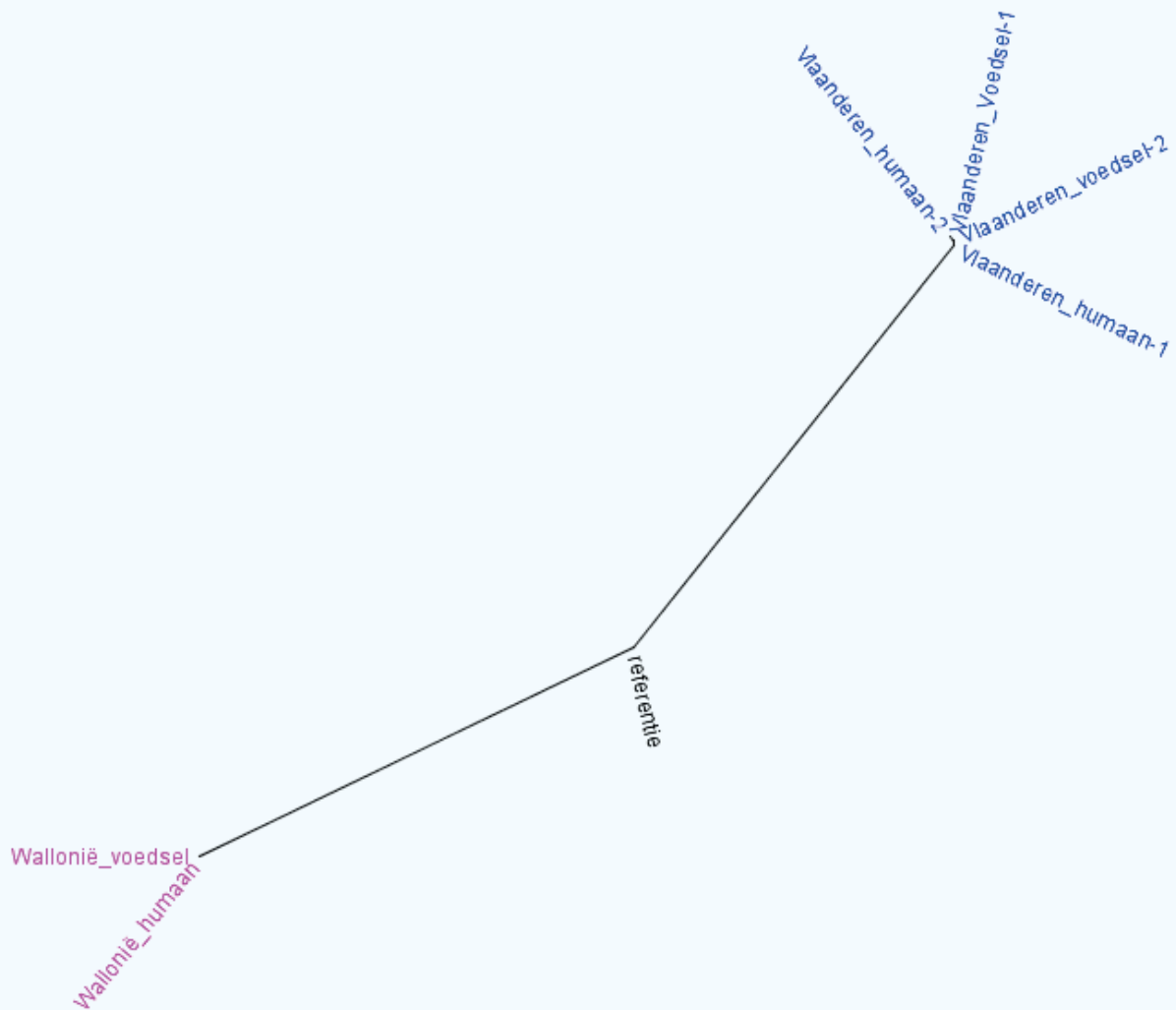
Aangezien WGS vooruitgeschoven wordt als de universele (sub)typeringsmethode met ultieme resolutie, wordt deze technologie verondersteld zeer geschikt te zijn voor uitbraakonderzoek. Voor het bepalen van volledige genomesequenties van bacteriële pathogenen kunnen verschillende “*next generation sequencing*” (NGS) plat-



forms worden gebruikt om de sequencing data te genereren. Momenteel is echter de analyse van de WGS data, bestaande uit miljoenen korte sequencing "reads", een meer urgente kwestie. Hiervoor zijn substantiële computerkracht en bio-informatici nodig, middelen die normaal gesproken niet worden teruggevonden in een doorsnee NRL. Vergelijkbaar met de traditionele karakteriseringsmethoden, kunnen pathogenen met WGS gekarakteriseerd worden op basis van hun gen-inhoud, bijvoorbeeld door het vinden van antimicrobiële resistentie- of virulentiegenen. Vervolgens kunnen deze pathogenen verder getypeerd worden om de relatie tussen verschillende isolaten te identificeren. Hiervoor bestaan twee WGS workflows. Eén workflow start met de *de novo* assemblage van de bekomen sequencing reads, waarna een sequentie-type wordt toegewezen door een allel-gebaseerde analyse, ook wel "whole genome MLST" genoemd. Voor dit soort analyse moeten typeringschema's en internationale databanken worden opgericht waarmee de allelen van een uitbraakisolaat kunnen vergeleken worden, en dit voor elk pathogeen species. Whole genome MLST schema's en databanken zijn echter tot dusver niet beschikbaar voor de meeste pathogenen. Daarom is een andere workflow, waarbij "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) geïdentificeerd worden na het mappen van de "reads" op een referentiegenoom, momenteel de meest gebruikte. Voor elk van de twee workflows zijn goed opgeleide bio-informatici nodig voor de ontwikkeling van gebruiksvriendelijke pipelines voor WGS analyse.

Op dit moment worden retrospectieve WGS analyses uitgevoerd om een schatting te maken van de genetische diversiteit binnen bepaalde uitbraken en tussen uitbraakisolaten en circulerende achtergrondstammen. Dit kan helpen bij de interpretatie van gegevens van toekomstige uitbraken. In deze context onderzocht het NRL-VTI (Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP)) in april en mei 2014 twee geografisch gescheiden uitbraken van *Salmonella*, één in Vlaanderen en één in Wallonië. Aangezien er voor beide uitbraken zowel voedsel- als humane isolaten beschikbaar waren, werden deze uitbraken genomen als een casestudy voor retrospectief uitbraakonderzoek door WGS, en dit in samenwerking met het Platform Biotechnologie en Moleculaire Biologie (WIV-ISP).

De klassieke karakteriseringsmethoden voor *Salmonella*, namelijk serotypering, faagtypering en "multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis" (MLVA), hebben aangetoond dat de uitbraken werden veroorzaakt door *Salmonella Enteritidis* met eenzelfde faagtype en hetzelfde MLVA profiel, met uitzondering van één humaan isolaat dat een variant faagtype had. Op basis van deze resultaten en de epidemiologische onderzoeken, kon de Vlaamse uitbraak gekoppeld worden aan chocolademousse bereid met rauwe, niet-commerciële eieren en ook de Waalse uitbraak kon gelinkt worden aan rauwe, niet-commerciële eieren, die werden geconsumeerd via tiramisu. De uitbraken konden echter slechts onderscheiden worden op basis van hun afzonderlijke locaties. WGS werd uitgevoerd door NGS analyse op zes voedsel- en humane isolaten. Voor de WGS data-analyse werden software en tools gebruikt die compatibel zijn met Windows 7, en dit met het zicht op de latere toepasbaarheid en haalbaarheid binnen een niet-bioinformatica-expert omgeving. De WGS reads werden voor SNP detectie geupload naar de CSI Phylogeny server [2] van het Center for Genomic Epidemiology. Dit resulteerde in ongeveer 52 SNPs verschil tussen de twee uitbraken en 0-2 SNPs verschil binnen elk van de uitbraken. De fylogenetische boom getoond in figuur 1 maakt duidelijk onderscheid tussen de isolaten van de verschillende uitbraken, terwijl de link tussen het humane en voedsel-isolaat binnen elke uitbraak onderling duidelijk aangetoond wordt. Bijkomende typering werd gedaan door het uploaden van de *de novo* samengestelde contigs (geconstrueerd met eenvoudig te gebruiken, commerciële NGS data analyse software, i.e. CLC Genomics Workbench) naar MLST server [3], ResFinder [4] en PlasmidFinder [5]. MLST server, gebaseerd op het klassieke MLST schema van 7 huishoudgenen, kende aan alle 6 de isolaten een zelfde sequentie-type toe. Met ResFinder konden geen resistentiegenen gevonden worden, met uitzondering van een bla_{TEM} gen gevonden in het humane isolaat met het variante faagtype. Voor dit isolaat werd ook een tweede plasmide met PlasmidFinder gevonden, terwijl voor alle andere isolaten slechts één plasmide gedetecteerd kon worden. Antimicrobiële gevoeligheidstesten met behulp van minimale remmende concentraties bevestigde fenotypisch de ResFinder resultaten. Visuele analyse met BRIG [6] toonde aan dat het bla_{TEM} gen op het extra plasmide gelegen is.



Figuur 1. Fylogenetische boom van de uitbraakisolaten gemaakt met Figtree [7]. De referentie is *S. Enteritidis* P125109 (zwart). Isolaten van de Vlaamse uitbraak staan in blauw, die van de Waalse uitbraak in paars.

Deze casestudy toont aan dat een meer gedetailleerde fingerprinting van uitbraakisolaten mogelijk is met WGS: de *S. Enteritidis* isolaten van elke uitbraak konden onderscheiden worden op basis van SNP analyse, wat niet mogelijk was met de klassieke faagtypering en MLVA. Deze studie toont ook aan dat WGS analyses op basis van gen-inhoud de karakterisering van de uitbraakisolaten verder kunnen verfijnen. Hoewel de NGS-technologie in sommige gevallen nog steeds duur zou kunnen zijn, met de verdere daling van de NGS prijzen, zouden de huidige afzonderlijke typeringsassays, elk aanzienlijk bijdragend aan de totale kost van een uitbraakonderzoek, in de toekomst vervangen kunnen worden door deze éne, universeel toepasbare assay. Verder benadrukt dit werk dat WGS analyse niet strikt voor bio-informatici voorbehouden is. Daarom bewijst deze studie duidelijk het potentieel van het gebruik van WGS in het NRL-VTI voor toekomstige uitbraakonderzoeken. Deze uitbraakonderzoeken zullen zelfs nog meer een voordeel kunnen halen uit een toekomstige routine WGS analyse van elk isolaat dat naar het NRL-VTI of specifieke NRC gestuurd wordt om zo beter de uitbraakstammen van circulerende achtergrondisolaten te kunnen discrimineren.

Gedetailleerde resultaten van deze studie zijn ingediend voor peer-review publicatie.



Dankwoord

Wij zouden graag het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) en de Vlaamse en Franstalige Gemeenschappen voor de geweldige samenwerking bedanken. Deze studie werd ondersteund door subsidie P4044.0103 (SalMolType) van het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP - RP / PJ). Het NRL-FBO is mede gefinancierd door het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de voedselketen en de Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Het NRCSS wordt gedeeltelijk gefinancierd door de FOD Sociale Zekerheid door een fonds binnen de ziekteverzekering.

Referenties:

1. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS ONE* 6: e22751
2. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O (2014) Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE* 9: e104984
3. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O (2012) Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 1355-1361
4. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV (2012) Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644
5. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H (2014) *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3895-3903
6. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12: 402
7. Rambaut, Andrew (2014) FigTree. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed: 15-4-2015

sigrid.dekeersmaecker@wiv-isp.be; sarah.denayer@wiv-isp.be en katelijne.dierick@wiv-isp.be

Halal voedingsmiddelen: analysemethoden voor detectie van sporen van varkensvlees in vlees en vleesproducten

Rob Margry

Voorzitter AOAC Lowlands Sectie

Bij de voedingsmiddelen productie en handel worden integriteit, authenticiteit en "eerlijkheid in de handel" steeds belangrijkere aandachtspunten. De paardenvlees affaire is daar een goed voorbeeld van. De vraag daarbij is of de samenstelling van het product overeen stemt met de tekst op het etiket. Deze vraag wordt niet gestuurd vanuit voedselveiligheid, maar vanuit de wens van de consument, die zijn/haar wens veelal baseert op traditionele, religieuze of emotionele gronden. Zo wordt de vraag naar vers halal vlees en vleesproducten, vrij van sporen van varkensvlees, de laatste jaren steeds groter. In Europa leven 16 miljoen Moslims, in Turkije 72 miljoen en wereldwijd 1,5 miljard.

De consument vraagt om transparantie. Evenals bij *fair trade* en biologische producten is er daarbij behoefte aan een keurmerk. De bestaande halal keurmerken zijn echter niet uniform.

In de Koran worden veel meer diersoorten en dierlijke producten als haram beschouwd (niet toegelaten voor consumptie), maar in de halal praktijk blijkt het bij analyseverzoeken tot nu toe uitsluitend om detectie van varkensmateriaal te gaan.

In de praktijk wordt voor varkensvlees een nultolerantie gehanteerd. Het zal duidelijk zijn dat bij gebruik van de verschillende analysemethoden, met elk hun eigen prestatiekenmerken, de analyse uitslagen vaak met elkaar in tegenspraak zullen zijn. De methoden zijn gebaseerd op verschillende principes (bijvoorbeeld gebaseerd op DNA- of eiwit-detectie). Daardoor zijn er verschillen in detectiegrens en in het percentage fout negatieve en fout positieve uitslagen. Met name bij heel lage verontreiniging van vlees met varkensvlees zal ook bij een herhaling van de analyse door hetzelfde laboratorium een tegengestelde uitslag verkregen kunnen worden.

Producenten, die hun producten willen laten controleren, hebben vaak ten onrechte de indruk dat laboratoria, die geaccrediteerd zijn volgens ISO 17025, allemaal dezelfde analyse uitslag zullen laten zien.



Er is dus duidelijk behoefte aan een referentiemethode waar de andere methoden aan getoetst kunnen worden. Anderhalf jaar geleden is binnen het Comité Européen de Normalisation (CEN) een werkgroep (CEN/TC 425) opgericht, die de standaard voor een management systeem voor de productie van *Halal Food* gaat formuleren. Het productieproces is daarbij gebaseerd op HACCP principes. Naast *traceability*, zal ook *conformity assessment* opgenomen worden, inclusief verificatie met behulp van analyses. Daarbij wordt dan niet alleen het eindproduct gecontroleerd, maar moet ook verontreiniging van de productielijn gecontroleerd kunnen worden, bijvoorbeeld door middel van swabs.

In 2006 is er een Europees referentielaboratorium opgericht om methoden te ontwikkelen voor de detectie en diersoortidentificatie van dierlijk materiaal in diervoeders: het EURL-AP (CRA-W, Gembloux). Omdat het eten van voor humane consumptie goedgekeurd vlees van landbouwhuisdieren niet als een gezondheidsrisico wordt gezien, is er geen officieel EURL voor diersoortspecificatie in voedingsmiddelen. EURL-AP heeft overigens in 2013 wel van DG Santé de opdracht gekregen om een aanbeveling te doen voor de detectie van paardenvlees in vlees en vleesproducten.

Gangbare analysemethoden

K. Nakyinsige *et al* (2012) geven een overzicht van analysemethoden die geschikt zouden zijn om varkensweefsel in vlees(producten) aan te tonen. Naast PCR (DNA detectie), immunochemische en chromatografische methoden (eiwitdetectie), worden ook LC-MS/MS, biosensor methoden, FTIR (vet analyse) en Differential Scanning Calorimetry (DSC) daarbij genoemd. In de praktijk worden vooral PCR en immunochemie routinematig toegepast. De andere technieken zijn in ontwikkeling, waarbij het niet te verwachten is dat deze binnen enkele jaren gevalideerd zullen zijn voor toepassing bij halal monitoring.

Ondertussen zijn er veel analysemethoden voor species identificatie verkrijgbaar op de markt. Volgens de leveranciers zijn sommige kits alleen bruikbaar voor vers vlees. Andere zouden ook voor de analyse van bewerkte (verhitte) vleesproducten ingezet kunnen worden. In het kader van de nultolerantie is het opvallend dat de verschillende leveranciers voor hun producten verschillende detectiegrenzen hanteren. Deze blijken te variëren van 5% tot 0,0001%. De vraag hierbij is welk type referentiemateriaal gebruikt is om deze grens vast te stellen. Door bijvoorbeeld vers rundvlees te *spiken* met varkensvlees, kan een kalibratielijn opgesteld worden, waarbij een (semi-)kwantitatieve uitslag op gewichtsbasis gegeven kan worden. Na bewerking (met name verhitte) van vlees is echter niet meer duidelijk in welke mate DNA of eiwit nog intact aanwezig is. Beide moleculen kunnen zodanig gedatureerd zijn, dat een onbekende fractie niet meer gedetecteerd zal worden. Na bewerking zijn de toegepaste methoden dus uitsluitend kwalitatief bruikbaar: er kan dan uitsluitend gerapporteerd worden als "aantoonbaar" of "niet aantoonbaar". Ook in die situatie kan er dan voor gekozen worden om de uitslag te baseren op vers vlees, maar dan ontstaat er in feite een onderschatting van het werkelijke gehalte.

PCR methoden

Tegenwoordig worden bij halal controle bij voorkeur real-time PCR methoden gekozen voor het routine onderzoek van vers vlees of bewerkte vleesproducten. Soms wordt nog Restriction Fragment length polymorphism PCR, met elektroforese scheiding van de vermenigvuldigde DNA fragmenten, gebruikt. Die benadering is echter omslachtig en is gevoeliger voor fout-positieve uitslagen. De verschillende real-time PCR methoden maken meestal gebruik van verschillende targets (DNA fragmenten), waarbij een voor die target passende set primers

en een probe worden gebruikt. Dit resulteert in verschillende prestatiekenmerken, met name in het percentage fout positieve en fout negatieve uitslagen, maar ook in verschillende detectiegrenzen. Uiteraard is ook de wijze van voorbereiding (malen, homogeniseren en extraheren) van het monster daarbij belangrijk. De detectiegrens van een real-time PCR methode is niet alleen afhankelijk van het gebruikte type apparatuur, maar ook van het individuele apparaat. EURL-AP (zie Planchon *et al*, 2010) heeft een protocol ontwikkeld om met behulp van plasmide calibrants voor elk apparaat een beslisgrens voor het onderscheid "aangetoond" en "niet aangetoond" vast te stellen. Op deze manier zullen de verschillen tussen uitslagen aanzienlijk kleiner worden.

K. Nakyinsige *et al* (2012) noemen in hun overzicht onder andere de real-time PCR methode, die ontwikkeld is door Fumière *et al* (2006). Het voordeel van deze methode is dat een kort (68 baseparen lang) amplicon gebruikt wordt. Amplicons korter dan 100 baseparen zijn minder gevoelig voor (hitte) denaturatie van DNA. Van deze methode is onlangs een nieuwe verbeterde variant ontwikkeld, die op dit moment via een inter-laboratorium validatie studie getest wordt. Deze methode zou ook geschikt zijn voor de analyse van vlees. NutriControl heeft oriënterende experimenten gedaan met vlees, die dat bevestigen.

Immunochemische methoden

Zowel Enzyme Linked Immuno Sorbant Assays (ELISA) als lateral flow assays (dip sticks) worden gebruikt. Deze methoden zijn in het algemeen minder gevoelig dan real-time PCR methoden en detecteren varkenseiwit. Een veel gebruikt doeleiwit is het hittestabiele skeletspier eiwit Troponine I. Een nadeel van eiwitdetectie is dat het doeleiwit niet in alle weefsels voorkomt. DNA is daarentegen aanwezig in elke cel die een kern bevat. NutriControl is bezig om de bruikbaarheid van een aantal ELISA methoden te vergelijken.

Standaardisering van analysemethoden

Omdat het niet te verwachten is dat er een tolerantiegrens afgesproken zal worden voor varkenscomponenten in vlees, is er dus grote behoefte aan een genormaliseerde (standaard) analysemethode, waaraan laboratoria hun eigen methode kunnen toetsen. Daarnaast is het ook belangrijk dat laboratoria deelnemen aan ringonderzoeken. Mogelijk zijn er meer geschikte methoden, maar de nieuwe door EURL-AP ontwikkelde methode zou een goede kandidaat kunnen zijn.

Literatuur:

- Nakyinsige K., Che Man Y.B. and Sazili A.Q. (2012): Halal authenticity issues in meat and meat products; Meat Science 91, 207 – 214
- Fumière O., Dubois M., Baeten V., von Holst C. and Berben G.(2006): Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds; Anal. Bioanal. Chem. 385, 1045 – 1054
- Planchon V., Oger R., Marien A., Berben G. and Fumière O.; AGROSTAT, February 23 -26 2010, Benevento, Italy

Rob.margry@nutricontrol.nl

Analyse van voedingsallergenen door middel van LC-MS/MS

Gillard Nathalie, Otto Gaëtan en Philippe Delahaut

CER Groep - Departement Gezondheid, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie

Inleiding

Voedingsallergenen vormen een groeiend probleem waaraan consumenten met een allergie, producenten uit de agroalimentaire sector en regelgevende Agentschappen het hoofd moeten bieden. Meer en meer consumenten krijgen de diagnose aan een allergie te lijden (2 tot 3% bij volwassenen en tot 8% bij kinderen) en enkel de volledige eliminatie van het allergeen in de voeding kan allergische reacties voorkomen.

De aanwezigheid van niet-geïdentificeerde en niet-aangegeven allergenen in levensmiddelen kan soms leiden tot anafylactische reacties. Bij de Europese verordening 1169/2011 is de etikettering van 14 allergenen als ingrediënt verplicht geworden (granen die gluten bevatten, schaaldieren, eieren, vis, pinda's, soja, melk, noten, selder, mosterd, sesamzaad, sulfiet, weekdieren, lupine en alle afgeleide producten van deze voedingsstoffen) bij voorverpakte producten.

Voor het merendeel van de agrovoedingsbedrijven en vooral voor de kleine bedrijven, is het economisch gezien onmogelijk om productielijnen enkel en alleen voor één type producten voor te behouden, en dus zijn kruiscontaminaties mogelijk. Deze toevallige aanwezigheid van allergenen is niet door de wetgeving gedekt en veel bedrijven geven momenteel eerder de voorkeur aan voorzorgsetikettering (door het gebruik van waarschuwingsszinnen 'kan sporen van... bevatten' of 'is geproduceerd in een fabriek waar ook allergeen ingrediënt X en allergeen ingrediënt Y worden verwerkt') dan aan het instellen van een programma voor risicobeheer van kruiscontaminaties in hun productieketen.

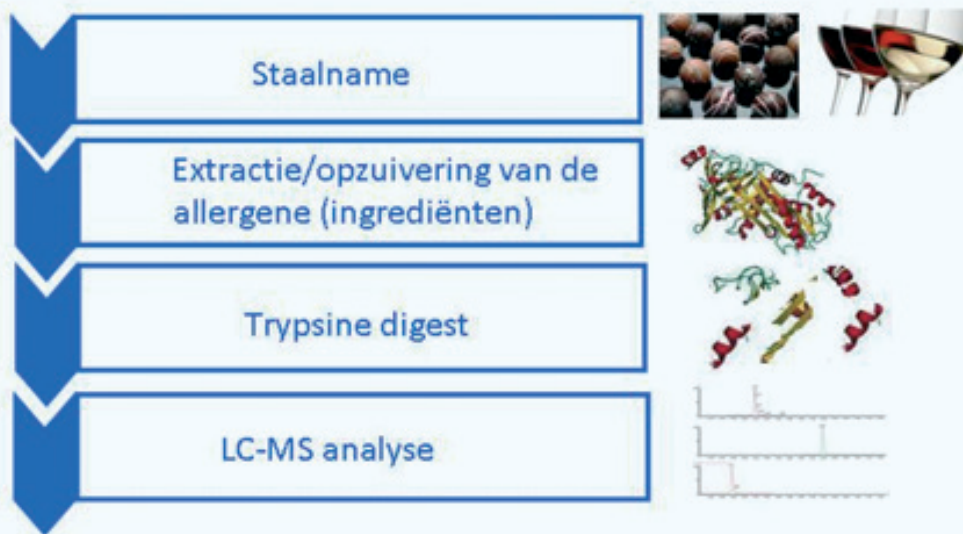
Om de eventuele aanwezigheid van allergenen in hun producten te beoordelen en bijgevolg correct op het etiket te kunnen vermelden, heeft de agrovoedingsindustrie betrouwbare en specifieke analytische instrumenten nodig.

Momenteel worden allergenen in levensmiddelen in hoofdzaak opgespoord door ELISA en PCR (of RealTime PCR) methodes. Echter, beide methodes hebben beperkingen. Immers, de PCR-analyses kunnen enkel de aanwezigheid van het specifiek DNA van allergieverwekkende ingrediënten opsporen. De immunologische methodes vertonen een grote variabiliteit bij de kwantificering, te wijten aan de aanwezigheid van interferenties van de matrix en aan de specificiteiten van de verschillende antilichamen in de commerciële ELISA-kits. De resultaten van deze analyses worden sterk beïnvloed door de verwerking van de levensmiddelen en vals-negatieve resultaten kunnen op die manier worden gegenereerd.

Vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie (LC-MS/MS) blijkt een uitgelezen techniek te zijn om routinematig allergenen te identificeren, te bevestigen en te kwantificeren. Immers, deze techniek is zeer specifiek (zij kan de aanwezigheid van een verbinding identificeren en bevestigen op basis van haar retentietijd en haar fragmentatieprofiel), is robuust en gevoelig. De techniek heeft ook als voordeel verschillende allergenen te kunnen doseren in de loop van één enkele analyse, in tegenstelling tot de ELISA-tests. Dit vermindert de analysekosten en is dus economisch gezien interessant. Bovendien maken haar specificiteit en robuustheid het mogelijk om de interferenties die aan de matrix te wijten zijn, te verlagen.

Principe van de analyse van allergenen door massaspectrometrie

Het basisprincipe van de analyse van allergenen door massaspectrometrie wordt beschreven in figuur 1.



Figuur 1. Principe van de analyse van voedingsallergenen door vloeistofchromatografie gekoppeld aan tandemmassaspectrometrie

De aangewende aanpak om analyses uit te voeren op allergenen biedt bepaalde bijzonderheden in vergelijking met deze voor analyses op niet-proteïneachtige residuen en contaminanten (residuen van geneesmiddelen, toxines,...). Deze bijzonderheden hebben betrekking op de grootte van de allergenen en ook op hun structuur. De gebruikte strategie wordt hierna in detail beschreven.

1. Pre-instrumentele fase: enzymatische digestie van allergenen

Na extractie/zuivering wordt het extract aan een enzymatische vertering onderworpen voordat het door middel van MS/MS geanalyseerd wordt. Immers, allergenen zijn proteïnen waarvan de moleculaire massa varieert van enkele tientallen kDa (lysozyme, caseïne) tot meer dan 150 kDa (ovomucine). Waar de analyse van deze volledige proteïnen mogelijk is met behulp van « Time of Flight » (ToF) massaspectrometrie, zijn de proteïnen te groot om een analyse uit te voeren door middel van triple quadrupole spectrometers waarvan het massabereik zelden 2000 Da overschrijdt. De enzymatische digestie maakt het mogelijk peptiden te genereren waarvan de grootte compatibel is voor hun verdere analyse met LC-MS/MS. Onder de enzymen die in de handel beschikbaar zijn, is trypsine het uitgelezen enzym: het is zeer specifiek (het knipt na de aminozuren lysine en arginine); het genereert peptiden die tussen 7 en 20 aminozuren bevatten en dus compatibel zijn met de LC-MS/MS analyse; en het is relatief goedkoop in vergelijking met andere endoproteasen. Voor sommige proteïnen, zoals gliadinen, is trypsine geen uitgelezen enzym, aangezien hun primaire sequentie te weinig lysine en arginine bevat (zie Figuur 2). In dat geval verkiest men voor de digestie een ander enzym, een combinatie van enzymen (trypsine/chemotrypsine) of een chemische digestie.



sp|P18573|GDA9_WHEAT Alpha/beta-gliadin, *Triticum aestivum*
 MKTFLILALLAIVATTAR**RI**AV**R**VPV**P**QLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQ**F**PGQQ**Q**PFPPQQ**P**YP**Q**P**Q**PFPSQQ**P**YL**Q**L
 Q**P**FP**Q**P**Q**L**P**YP**Q**P**Q**L**P**YP**Q**P**Q**L**P**YP**Q**P**Q**FR**P**Q**Q**YP**Q**S**Q**P**Q**YS**Q**P**Q**Q**P**IS**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**K**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**L
 Q**Q**IL**Q**Q**Q**L**I**PC**R**D**V**L**Q**Q**H**SI**A**Y**G**SS**Q**VL**Q**Q**S**T**Y**Q**L**V**Q**L**C**C**Q**L**W**Q**I**EQ**S**R**C**Q**A**I**H**N**V**H**A**I**L**H**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**Q**
 Q**Q**PL**S**Q**V**S**F**Q**Q**P**Q**Q**Q**Y**P**S**G**Q**S**F**Q**PS**Q**Q**N**P**Q**A**Q**GS**V**Q**P**Q**L**P**Q**FE**I**R**N**L**A**LE**T**L**P**A**M**C**N**V**I**P**P**Y**C**T**I**A**P**V**G**I**F**G**T**N

Figuur 2. Sequentie van tarwegliadine. De plaatsen waar de proteïne door trypsine geknipt wordt staan in het rood.

2. Ontwikkeling van een instrumentele methode voor dosering van allergenen door LC-MS/MS

Na enzymatische vertering worden de monsters met behulp van LC-MS/MS geanalyseerd. Een grote uitdaging in de analyse van voedingsallergenen door middel van massaspectrometrie is het identificeren van proteïnen en/of peptiden die specifiek zijn voor het doelallergeen, die robuust zijn, met andere woorden ook te detecteren in verwerkte levensmiddelen, en die toelaten een goede gevoeligheid te bekomen.

Verschillende proteïnen kunnen geselecteerd worden voor een allergeen ingrediënt. Selectiecriteria zijn de beschikbaarheid van zijn sequentie in de databanken, de hoeveelheid van het proteïne in het allergeen ingrediënt en de verteerbaarheid van het gekozen enzym. In Tabel 1 worden de specifieke proteïnen van pinda's weergegeven. In het geval van pinda's vertegenwoordigen de proteïnen *Ara h1* en *Ara h2* respectievelijk 20% en 10% van de totale proteïnen en lijken dus goede doelproteïnen voor de MS analyse te zijn.

Het is eveneens belangrijk te benadrukken dat een doelproteïne voor massaspectrometrie niet noodzakelijk allergeenopwekkend hoeft te zijn, het is hier de bedoeling de aanwezigheid van een allergeen ingrediënt te bewijzen en niet om de allergeniciteit van het geteste levensmiddel aan te tonen.

Tabel 1. In pinda's aanwezige proteïnen

Proteïne	Familie	Moleculaire massa (kDa)
Ara h1	vicillinen	64,5
Ara h2	conglutinen	17,5
Ara h3	glycininen	14
Ara h4	glycininen	35,9
Ara h5	profilinen	14
Ara h6	conglutinen	14,5
Ara h7	conglutinen	15,8

Voor elke geselecteerde proteïne zullen tal van peptiden na enzymatische vertering gegenereerd worden. In figuur 3 is het voorbeeld van de proteïnen *Ara h1*, *Ara h2* en *Ara h3-4* van pinda's terug te vinden; trypsine knipt na de residuen arginine en lysine, wat het mogelijk maakt de vele peptiden te onderscheiden die na vertering door trypsine gegenereerd worden.

sp|P43238|ALL12_ARAHY Allergen Ara h 1, clone P41B OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1
 MRGRVSPMLLLLGLVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACESRCKLEYDP
 RCVYDPRGHTGTTNQRSPGERTRGRQPGDYDDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPRE
 DWRRPSHQQRKIRPEGREGEQEWGTPGSHVREETSRRNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQ
 RSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNNRKSFNLDEGHALRIPSGFISY
 ILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVLLEENAGG
 EQEERGGRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDITNPINLREGEPDLSNNFGK
 LFEVKPKDKKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREE
 EEDEDEEEEGSNREVERRYTARLKEGDVFIMPAHPVAINASSELHLLGFGINAENNRIFLAGDKDNVIDQI
 EKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQKESHFVSARPPQSQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN

tr|Q8LKN1|Q8LKN1_ARAHY Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis hypogaea PE=3 SV=1
 MGKLLALSVCFCFLVLGASSISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGYYIETWNPNNQEFECAGVAL
 SRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQGGRYGFLIFPGCPSTYEPAQQGRRHQSQRPPRRFQQDQSQQ
 QQDSHQKVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFNLAGNHEQEFL
 RYQQQSRRRSLPSPYSPQTQPKQEDREFSPRGQHGRRRERAGQEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVD
 DRQILQNLRGENESDEQGAIVTVRGGLRILSPDRKRRQQYERPDEEEYDEDEYEEERQQDRRRGR
 GSRGSGNGIETICTASFKNIGRRNSPDIYNPQAGSLKTANELQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPH
 YNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDNSGDRVFDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSPSIA
 NLAGENSFIDNLPEEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPSEQSLRAVA

sp|Q6PSU2|CONG7_ARAHY Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=2
 MAKLTILVALALFLLAAHASARQQWELQGDRRCCQSLELANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYGRDPYSPSQ
 DPYSPSQDPDRRDPYSPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRCCMCEALQQIMENQSDRLQGRQ
 QEQQFKRELRLNPQQCGLRAPQRCDLEVESGGDRDY

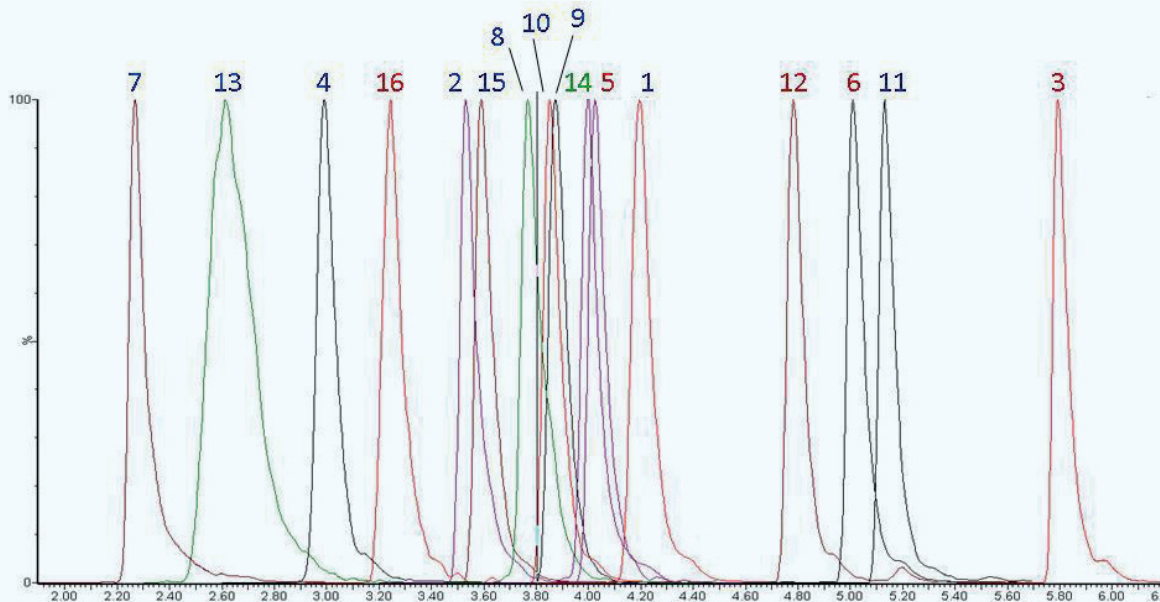
Figuur 3. Aminozuursequenties van de proteïnen Ara h1, Ara h2 en Ara h 3-4 van pinda's. De plaatsen waar de proteïne door trypsine geknipt wordt staan in het rood (lysine K en arginine R). De peptiden die voor de LC-MS/MS methode geselecteerd zijn, zijn in blauw onderstreept.

Er moet opnieuw een selectie worden uitgevoerd, gebaseerd op de lengte van de peptiden (de analyse met chromatografie zal optimaal zijn voor peptiden met 7 tot 20 aminozuren; de specificiteit zelf van een peptide kan betrouwbaar geverifieerd worden voor peptiden met minstens 8 aminozuren), op hun specificiteit voor het doelallergeen (de specificiteit wordt geverifieerd door de sequentie van het peptide in een UNIPROT databank te zoeken, waarbij wordt nagegaan of deze peptidesequentie niet in andere proteïnen kan worden gedetecteerd) en op hun robuustheid bij de verwerking van de levensmiddelen. Wat de robuustheid bij de verwerking van de levensmiddelen betreft, worden bepaalde proteïnen gevormd en/of bepaalde aminozuren van die proteïnen gewijzigd (glycosylering, Maillard reactie,...). Dit is geen probleem als de doelpeptiden in MS/MS zelf nog steeds intact zijn na verwerking en het extractie/zuiveringsprotocol het mogelijk maakt deze te recupereren.



De eerste twee selectiecriteria van peptiden kunnen gemakkelijk worden toegepast bij de ontwikkeling van de LC-MS/MS methode. Wanneer geen informatie beschikbaar is over de robuustheid van peptiden bij de verwerking van levensmiddelen, wordt aanbevolen om een maximum aan peptiden in de ontwikkelde methode in te brengen en later een selectie uit te voeren.

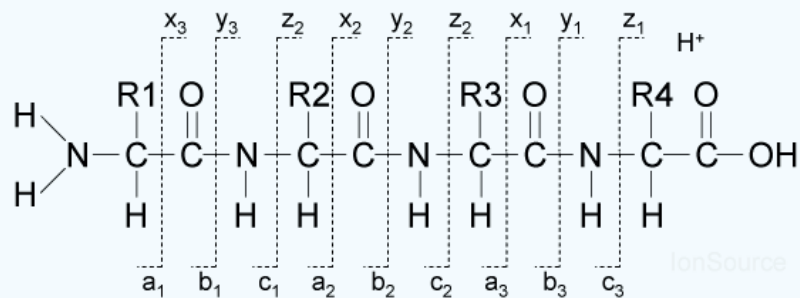
In figuur 4 is een chromatogram terug te vinden van de analyse van een monster van pinda's. De peptiden die in deze methode weerhouden worden, zijn peptiden die voldoen aan de criteria inzake lengte en specificiteit en een goede gevoeligheid hebben bij analyse van een monster van pinda's.



Figuur 4. Chromatogram met weergave van de gezochte peptiden voor het allergeen "pinda". Peptiden afkomstig van de proteïnen Arah1 (blauw), Arah2 (groen) en Arah3-4 (rood) zijn weergegeven met de volgende code: (1) NNPFYFPSR, (2) DQSSYLQGFGR, (3) SPDIYNPQAGSLK, (4) IPSGFISYILNR, (5) SQSENFYVAFK, (6) WLGLSAEYGNLYR, (7) VLEENAGGEQEER, (8) GSEEEGDITNPINLR, (9) IVQIEAKPNTLVLPK, (10) GTGNLELVAVR, (11) NTLEAAFNAEFNEIR, (12) PFYSNAPQEIFIQQGR, (13) EGEPDLSNDFGK, (14) DPYSPSQDPYSPSQDPDR, (15) DLAFPGSGEQVEK en (16) SLPYSPYSPQTQPK

De routineanalyse van peptiden gebeurt in MRM-modus; deze analyse biedt echter enkele bijzonderheden in vergelijking met de analyse van residuen van geneesmiddelen.

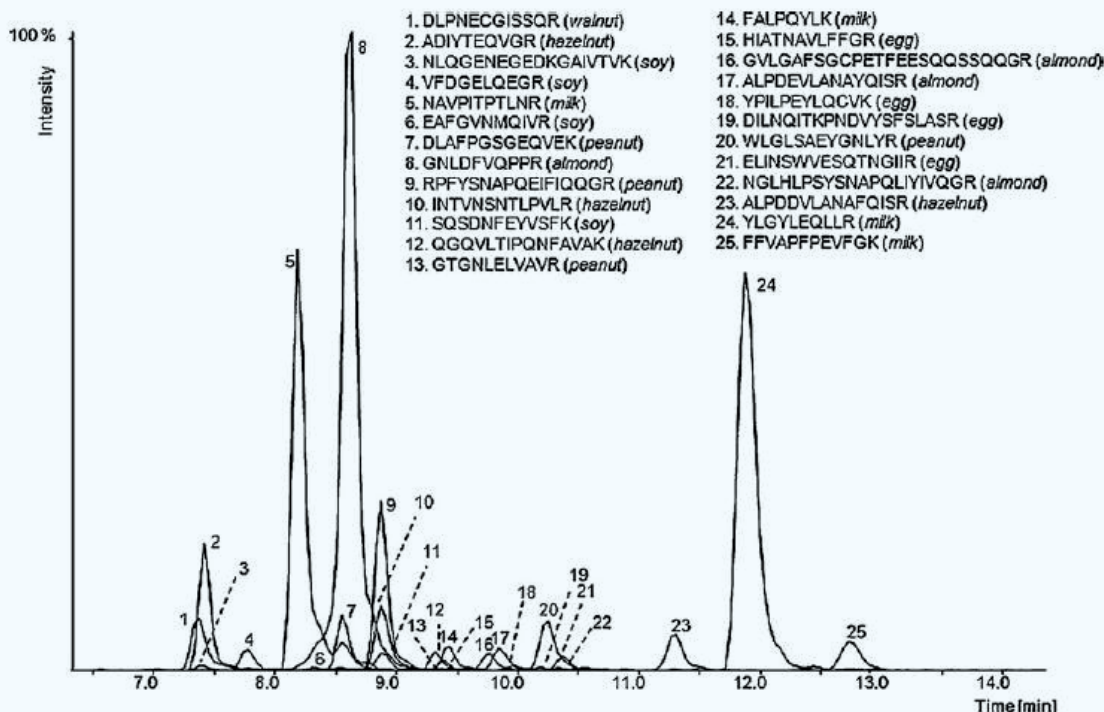
Immers, de "parent"-peptiden zullen heel vaak aanwezig zijn met een verschillende lading (1+, 2+ en 3+), net zoals de dochterionen. Met betrekking tot het type van dochterionen die bij de MS/MS analyse van peptiden vastgesteld wordt, is het mogelijk de fragmentatie van peptiden en het soort geproduceerde ionen te begrijpen aan de hand van de Biemann nomenclatuur weergegeven in Figuur 5. Indien er in theorie voor elke peptide een veelvoud van peptidefragmenten kan worden gedetecteerd, blijkt in de praktijk dat de ionen a, b en y het meest frequent vastgesteld worden bij lage collision-energie.



Figuur 5. Fragmentatie van peptiden volgens de Biemann nomenclatuur.

Voor meer specificiteit van de MS-methode kunnen de selectiecriteria ook worden toegepast op de MRM-transities, zoals bijvoorbeeld richten op de transities waarvoor de ratio m/z van het "parent" ion kleiner is dan dat van het dochterion (dit is mogelijk door bvb. te richten op peptide 2+ als "parent" ion en een fragment 1+ als dochterion) en de dochterionen die overeenkomen met kleine fragmenten vermijden (een fragment met 2-3 aminozuren heeft meer kans van een ander peptide afkomstig te zijn dan een fragment met 6-7 aminozuren).

Na de toepassing van alle eerder beschreven selectiecriteria is het uiteindelijk mogelijk tot een LC-MS/MS-methode te komen die in staat is verschillende allergenen te detecteren en te identificeren. Figuur 6 geeft het chromatogram weer dat verkregen wordt na analyse van een broodmonster met behulp van een LC-MS/MS-methode waarbij het mogelijk is 7 allergenen tegelijk te detecteren (Heick *et al.*, 2011)



Figuur 6. Gevolgde MRM-transities om 7 allergenen te detecteren (noten, hazelnoten, soja, melk, pinda, amandelen en eieren) bij 1000 ppm in een broodmonster (Heick *et al.*, 2011).



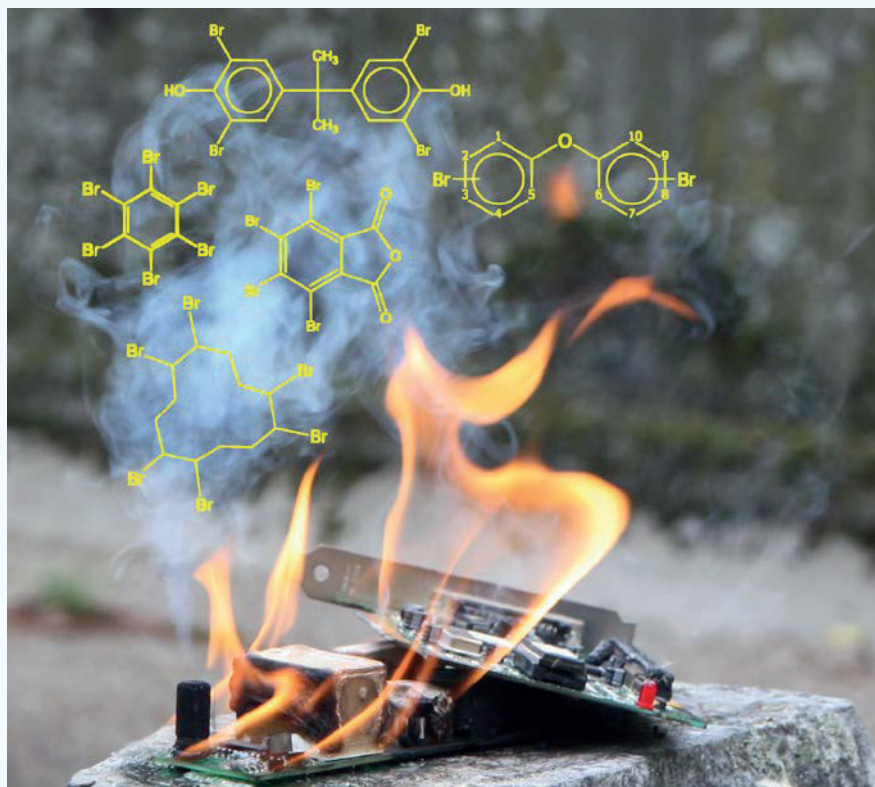
Referenties:

- Heick J, Fischer M., Popping B. (2011) First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218, p. 938–943
- Biemann K. (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environmental Mass Spectrometry*. (1-12), p.99-111

n.gillard@cergroupe.be

Opkomende en nieuwe gebromeerde vlamvertragers (BFR's) in voedsel: Huidige status van de Europese wetgeving

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



Reeds gekende BFR's

Gebromeerde vlamvertragers (BFR's) zijn antropogene chemische stoffen die gebruikt worden om de vuurbestendigheid van materialen te vergroten. Deze gebromeerde organische verbindingen werden voor het eerst op industriële schaal geproduceerd in het begin van de jaren '70 en het huidige gecumuleerde productievolume ervan ligt hoger dan 400.000 ton/jaar [1]. BFR's worden voornamelijk gebruikt in de elektronische industrie, voornamelijk in de elektronische onderdelen van printplaten, connectoren en kabels of componenten zoals plastic covers (bijvoorbeeld televisie, computers), maar ze worden ook gebruikt in tapijten, bekleding, inrichtingsartikelen en verf.



BFR's worden verwerkt, ofwel als additief (gemengd met polymeren), zoals polybroomdifenylethers (PBDE's), polybroombifenyls (PBB's) en hexabroomcyclododecanen (HBCDD's) ofwel als reactieve ingrediënten (covalente binding met een polymeer), zoals tetrabroombisfenol A (TBBPA). PBB's, PBDE's, HBCDD's, TBBPA's en hun afgeleiden worden het vaakst gebruikt. Deze gebromeerde vlamvertragers kunnen uitlogen of verdampen uit de producten waarin ze zijn verwerkt. Er werd ontdekt dat ze alomtegenwoordig zijn in afgelegen gebieden in zowel abiotische als biotische monsters, wat het bewijs levert dat deze stoffen persistent zijn in het milieu, met inbegrip van transport over lange afstand in het milieu, bioaccumulatie in land- en zeevoedsel en menselijke biota. In 2009 werden HexaBB's, BDE-congeneren 47, 99, 153, 154, 175 en 183 onder het Verdrag van Stockholm geclassificeerd als nieuwe Persistente Organische Verontreinigende stoffen (POP's); in 2013 werden HBCDD's ook toegevoegd aan de nieuwe lijst van POP's. Dit heeft geleid tot een verbod op de productie en het gebruik van bepaalde formuleringen van deze BFR's.

Om de behoefte aan (al dan niet) regulerende maatregelen te beoordelen, vroeg de Europese Commissie aan de Europese Voedselautoriteit (EFSA) om een wetenschappelijk advies voor te bereiden inzake de risico's voor de menselijke gezondheid met betrekking tot de aanwezigheid van BFR's in voedsel. Het Wetenschappelijk Panel voor contaminanten in de voedselketen nam tussen 2010 en 2012 verschillende wetenschappelijke adviezen aan met betrekking tot de verschillende klassen van gebromeerde vlamvertragers [2,3,4,5,6]. De EFSA kwam tot de conclusie dat de belangrijkste BFR's (BDE-congeneren 28, 47, 100, 153, 154, 183 en 209; BB-congener 153; HBCDD α -, β - en γ -isomeren; TBBP-A) zorgvuldig gemonitord moeten worden op basis van de analytische haalbaarheid om hun voorkomen in voedsel en diervoeder te meten in geaccrediteerde laboratoria. De Europese Commissie heeft een aanbeveling (2014/118/EU) aangenomen die aangeeft dat de lidstaten in 2014 en 2015 de aanwezigheid van gebromeerde vlamvertragers moeten monitoren in een grote verscheidenheid aan levensmiddelen die de consumptiegewoonten weerspiegelen. Analytische methoden moeten een bepaalbaarheids grens (LOQ) bereiken van 0,01 ng/g vers gewicht of lager voor PBDE's en HBCDD's, terwijl 0,1 ng/g vers gewicht of lager aanvaard wordt als bepaalbaarheids grens voor TBBP-A en afgeleiden ervan.

Opkomende en nieuwe BFR's

Naast deze 'gekende' BFR's, werden een reeks minder gekende en bestudeerde BFR's geclassificeerd als 'opkomende' en 'nieuwe' BFR's [8]. Volgens het EFSA-verslag over deze nieuwe klassen van BFR's en ook op basis van de wetenschappelijke publicatie van Bergman en medewerkers, worden [9] opkomende BFR's gedefinieerd als '*chemicals which are applied as flame retardants that have been identified as anthropogenic chemicals in any environmental compartment, in wildlife, in food or in humans*'. Nieuwe BFR worden gedefinieerd als '*chemicals applied as flame retardants, and with confirmed presence in materials and/or goods in concentrations above 0,1% but not identified in environmental samples, wildlife, food or humans*'. Deze twee groepen van gebromeerde vlamvertragers omvatten respectievelijk 17 en 10 individuele componenten. De volledige lijst is beschikbaar in het EFSA-verslag [8]. Het is vrij moeilijk om accuraat de productie van deze nieuwe gebromeerde vlamvertragers in te schatten. Het verslag van Harju en medewerkers schat het totaal productievolume op ongeveer 180.000 ton/jaar [10]. Met betrekking tot de analytische methodes, wees het EFSA-verslag op het gebrek aan specifieke analytische methoden voor veel van deze BFR's. Wat de lijst betreft, werd in de Aanbeveling van de Commissie 2014/118/EU echter gevraagd om analyses uit te voeren op tris(2,3-dibroompropyl)fosfaat (TDBPP); N,N'- ethyleenbis (tetrabroomftaalimide (EBTEBPI); hexabroomcyclodecaan (HBCYD); bis(2-ethylhexyl) tetrabroomftalaat (BEH-TEBP); 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabroombenzoaat (EH-TBB) en dibroomneopentylglycol (DBNPG) in vis en andere visserijproducten, vlees en vleesproducten, dierlijke en plantaardige vetten en oliën, melk en zuivelproducten, eieren en eiproducten en voeding voor zuigelingen en peuters [7.] Een bepaalbaarheids grens van 1 ng/g vers gewicht of lager is aanbevolen voor deze BFR's. Er dient te worden opgemerkt dat de analytische uitdagingen om nauwkeurige methodes te ontwikkelen in dit geval veel moeilijker is in vergelijking met de methodes die enkele jaren geleden werden ontwikkeld voor reeds gekende gebromeerde vlamvertragers zoals PBDE's. Een veelheid aan analytische metho-

des zijn nodig voor monsterextractie, voorzuivering en instrumentele analyse [11]. Bovendien zijn nog maar een beperkt aantal standaarden beschikbaar voor opkomende en nieuwe gebromeerde vlamvertragers, waaronder enkele ¹³C-gemerkte standaarden voor isotoop dilutie kwantificering met technieken gebaseerd op vloeistofchromatografie- of gaschromatografie-massaspectrometrie. Er dient nog een groot aantal standaarden en referentiematerialen te worden ontwikkeld.

Wetenschappelijke verslagen, adviezen en publicaties toonden aan dat er een aantal onderzoeksleemtes zijn met betrekking tot analytische aspecten, milieuproblemen, gehalten van BFR's in voeding, fysico-chemische eigenschappen, toxicologische gevaren en menselijke blootstelling aan deze opkomende en nieuwe BFR's. Er moeten studies en onderzoeksprojecten worden uitgevoerd om bijkomende experimentele data te verzamelen. In deze context brengt een recente publicatie mogelijke bedenkingen naar voren met betrekking tot de aanwezigheid van Dechloranen (Dechloraan Plus, Dechloraan 602, Dechloraan 603, Dechloraan 604 en Chlordaan Plus) in monsters van menselijk serum afkomstig van West-Europa [12]. Ondanks het feit dat deze gechlorideerde en gemengde chloor-broom FR's nooit geproduceerd werden in Europa, werden ze gemeten aan hogere niveaus dan de meest voorkomende PBDE's. Dechloranen werden verder nog gevonden in Belgische levensmiddelen aan een gehalte in pg/g vet dat overeenkomt met een geschatte dagelijkse inname van meer dan 100 pg [13]. Aangezien er weinig geweten is over de toxiciteit van dechloranen, wijzen deze verslagen nog niet op de nood aan regelmatige levensmiddelen-diervoeder controle, maar ze brengen wel dechloranen naar voren als één van de mogelijk volgende doelwitten.

Referenties:

- (1) Eljarrat E, Barcelo, Brominated Flame Retardants, New York : Springer 2011
- (2) Scientific Opinion on Polybrominated Biphenyls (PBBs) in Food. *EFSA Journal* 2010; 8(10):1789. [151 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1789.
- (3) Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. *EFSA Journal* 2011; 9(5):2156. [274 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2156.
- (4) Scientific Opinion on Hexabromocyclododecanes (HBCDDs) in Food. *EFSA Journal* 2011; 9(7):2296. [118 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2296.
- (5) Scientific Opinion on Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its derivatives in food. *EFSA Journal* 2011; 9(12):2477. [61 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2477.
- (6) Scientific Opinion on Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food: Brominated Phenols and their Derivatives. *EFSA Journal* 2012; 10(4):2634. [42 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2634.
- (7) Commission Recommendation 2014/118/EU of 3 March 2014, Official Journal of the European Union
- (8) Scientific Opinion on Emerging and Novel Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food. *EFSA Journal* 2012; 10(10):2908. [125pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2908.
- (9) Bergman A, Ryden A, Law R. J., de Boer J., Covaci A., Alae M., Birnbaum L., Petreas M., Rose M., Sakai S., Van den Eede N., van der Veen I., *Environment International* 49 (2012) 57-82
- (10) Harju M, Heimstad ES, Herzke D, Sandanger T, Posner S, Wania F. Report 2462. Oslo, Norway: Norwegian Pollution Control Authority; 2009. 113.
- (11) Covaci A., Harrad S., Abdallah M.A., Ali N., Law R.J., Herzke D., de Wit C. A., *Environment International*, 37 (2011), 532-556.
- (12) Brasseur C., Pirard C., Scholl G., De Pauw E., Viel J-F., Shen L., Reiner E.J., Focant J-F., *Environment International*, 65 (2014), 33-40.
- (13) L'Homme B., Calaprice C., Calvano C., Zambonin C., Leardi R., Focant J-F., *Chemosphere*, 139 (2015), 525-533.

G.Eppe@ulg.ac.be



Karakterisering van UGM met behulp van DNA walking strategie

Fraiture Marie-Alice^{1,2,3}, Herman Philippe¹, Papazova Nina¹ en Roosens Nancy¹

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

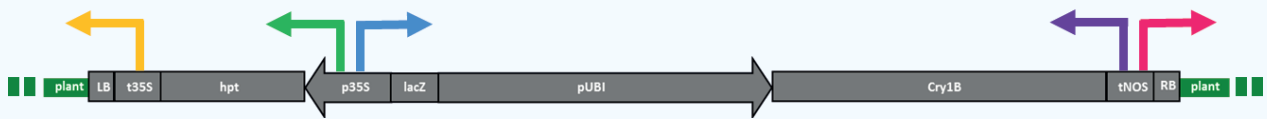
² Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO), Eenheid Technologie & Voeding (T&V), Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke, Belgium

³ University of Gent, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Ottergemsesteenweg 460, 9000 Ghent, Belgium

Om de productiviteit in de landbouw te verhogen werden biotechnische strategieën ontwikkeld die de productie toelaten van genetisch gemodificeerde (GG) gewassen. Aangezien rijst een van de meest overheersende gewassen is in de voedselketen, zijn in het kader van het project UGMONITOR (conventie RF 11/6242) meer dan 1000 peer-reviewde publicaties verzameld, van de periode van 1991 tot 2015, met als doel een overzicht te maken van alle transgene rijst lijnen ontwikkeld tot R&D fase (IRRI, Scopus). De meeste van deze studies werden uitgevoerd in Azië (77,8%), vooral in China (47,4%) en Japan (20,9%). Hoewel deze GG rijst lijnen hoofdzakelijk in laboratoria getest werden (70,6%), ondergingen 23,8% daarvan ook veldproeven. Met betrekking tot de genetische informatie werd een grote variatie van kenmerken met hun overeenkomstige genen waargenomen (bv resistentie tegen insecten, herbicidetolerantie, biotische stress-weerstand, abiotische stress-weerstand, verbeterde graanopbrengst, gezonder nutritionele samenstelling). De familie van pCambia vector werd geïdentificeerd als veel gebruikte familie onder de transformatievectoren (544 GM rijst (34,6%) in 359 peer-reviewde publicaties) (Cambia, Canberra, Australië). Overigens zijn 30% van de transgene planten gerapporteerd als getransformeerd met vectoren van deze familie (Komori *et al.*, 2007). Bovendien bezitten meer dan 70% van de GG- rijst lijnen p35S en / of tNOS elementen in hun transgene cassette.

Op basis van dit overzicht en de beschikbare informatie in verschillende databases (Biosafety Cleaning-Huis; databank CERA's; GMDD; GMO Compass), werden de belangrijkste transgene elementen - p35S, tNOS en t35S_pCAMBIA geselecteerd. p35S en tNOS zijn aanwezig in zowel de EU geautoriseerde genetisch gewijzigde organismen (GGO's) als in GGO's die niet-geautoriseerd zijn in de EU. Het t35S element uit de pCambia vector familie is niet aanwezig in EU geautoriseerde GGO's, maar kan wel gevonden worden in ongeveer 30% van de niet-geautoriseerde GG-gewassen. Op deze elementen werd gemikt om een innovatieve en geïntegreerde strategie te ontwikkelen, gebaseerd op DNA walking, met het oog op het detecteren van de aanwezigheid van een breed spectrum GGO's in de voedsel- en voederketen.

In deze strategie wordt de aanwezigheid van GGO's eerst beoordeeld door het uitvoeren van qPCR screening op de geselecteerde transgene elementen (p35S, tNOS en t35S_pCAMBIA). Bij een positief signaal kan de vermoedelijke aanwezigheid van een GGO vervolgens bevestigd worden door de DNA fragmenten die de transgene flankerende gebieden en/of onnatuurlijke combinaties van elementen bevatten, verkregen via de DNA walking strategie, gebruikmakend van dezelfde primers als voor de screening (Fraiture *et al.*, 2014, 2015a en 2015b) (Figuur 1).



Figuur 1: DNA walking toegepast op genetisch gewijzigde Bt rijst (100%).

Voor elke DNA walking methode werd een schematische voorstelling van de mogelijke startpositie en richting aangebracht op de transgene cassette van de Bt rijst, in het geel (t35S pCAMBIA), in groen (p35S-R), in blauw (p35S-F), in paars (tNOS-R) en in roze (tNOS-F). LB (linker 'border' gebied); t35S (CaMV 35S terminator); hpt (hygromycine fosfotransferase gen); p35S (CaMV 35S promotor); lacZ (LacZ-alfa-fragment); Pubi (maïs ubiquitine promotor); Cry1b (synthetisch Cry1b gen); tNOS (Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase terminator); RB (rechter 'border' gebied); plant (plantgeenoom) (Aangepast schema van Breitler et al., 2004).

Deze DNA walking methoden werden in eerste instantie ontwikkeld op zuiver materiaal (100% Bt rijstkorrels). Vervolgens werd de prestatie van de methoden succesvol geëvalueerd in termen van gevoeligheid (gaande van 100% tot 0,005% van het target), evenals op toepasbaarheid op een reeks van voedselmatrices (rijst meel, rijst noedels, rijst en maïs mengsels, maïs korrels en maïs poeder) die veel voorkomen in GGO routine analyse (Fraiture et al., 2014, 2015a en 2015b). De voorgestelde DNA walking strategie is dus een cruciaal moleculair hulpmiddel, dat snel resultaten oplevert (drie werkdagen) en dat gemakkelijk uitvoerbaar is door controle laboratoria teneinde de aanwezigheid van genetisch gemodificeerde organismen in een bepaalde matrix aan te tonen. Deze strategie wordt nu geïmplementeerd in de GGO analyse van levensmiddelen en diervoeders door het Belgische NRL-GGO (PBB, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid).

Dankwoord

Het onderzoek dat tot deze resultaten leidde, werd gesubsidieerd door de Belgische Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu via het contract UGMMONITOR (conventie RF 11/6242). De auteurs willen ook graag Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, UMR AGAP, Biological Systems department, Montpellier, Frankrijk) bedanken voor het ter beschikking stellen van de rijstkorrels.



Referenties

1. Biosafety Cleaning House. URL <<http://bch.cbd.int/database/organisms/>>.
2. Breitler, J. C., Vassal, J. M., del Mar Catala, M., Meynard, D., Marfa, V., Melé, E., Royer, M., Murillo, I., San Segundo, B., Guiderdoni, E. & Messeguer, J. (2004). Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 2, 417-430.
3. Cambia, Canberra, Australia. URL <http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3724.html>.
4. Center for Environmental Risk Assessment (CERA).
URL <http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database>.
5. ENGL ad hoc working group on “unauthorised GMOs” (2011). Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials.
URL <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/2011-12-12%20ENGL%20UGM%20WG%20Publication.pdf>>.
6. Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., Roosens, N. H. (2014). An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised GMOs. *Food Chemistry*, 147:60-69.
7. Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Roosens, N. H. (2015a). Validation of a sensitive DNA walking strategy to characterize unauthorised GMOs using model food matrices mimicking common rice products. *Food Chemistry*, 173:1259-1265.
8. Fraiture, M. A., Herman, P., Lefèvre, L., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., Roosens, N. H. (2015b). High coverage and integrated DNA walking system to characterize GMOs in food/feed matrices. (submitted).
9. GMDD. URL<<http://gmdd.shgmo.org/index/search>>
10. GMO Compass. URL <<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>>.
11. IRRI. <<http://www.irri.org/our-work/research>>
12. Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J. & Komari, T. (2007). Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors. *Plant Physiology*, 145, 1155-1160.
13. Scopus (transgenic rice). URL <<http://www.scopus.com/home.url>>.

MarieAlice.Fraiture@wiv-isp.be en Nancy.Roosens@wiv-isp.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)
27-29.01.2016	HTC-14 14th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology	Ghent, Belgium	http://www.ldorganisation.com/v2/produits.php?langue=english&cle_menus=1238916061
29.02.2016 - 01.03.2016	14th International Fresenius Conference Food Safety and Dietary Risk Assessment	Cologne, Germany	http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=539
11-13.04.2016	IDF International Symposium on Cheese Science and Technology & the IDF Symposium on Concentration and Drying Technologies of Dairy Products	Dublin, Ireland	http://www.idfingredientsandcheese2016.com/
9-10.05.2016	Eurachem International Workshop on "Method Validation – Current practices and future challenges"	Ghent, Belgium	http://www.belab-eurachem2016.com/
11.05.2016	5th International Symposium Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and Perspectives	Ghent, Belgium	www.mytox.be
17.05.2016	68th International Symposium on Crop Protection	Ghent, Belgium	http://www.ugent.be/bw/crop-protection/en/iscp
23-25.05.2016	Euroresidue conference (ER VIII) Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food	Egmond aan Zee, the Netherlands	http://www.euroresidue.nl/
30.05.2016 – 3.06.2016	IDF Analytical Week 2016	Copenhagen, Denmark	http://www.copenhagen2016.dk/
6-9.06.2016	WMFmeetsIUPAC Joint meeting of the 9th conference of The World Mycotoxin Forum and the XIVth IUPAC International Symposium on Mycotoxins	Winnipeg, Canada	http://www.wmfmeetsiupac.org/2016/

20-21.06.2016	18th International Fresenius AGRO Conference Behaviour of Pesticides in Air, Soil and Water	Mainz, Germany	http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=529
7-9.09.2016	IDF Mastitis Conference 2016	Cité des Congrès, Nantes, France	http://www.idfmastitis2016.com/en/
18-21.09.2016	130th AOAC Annual Meeting & Exposition	Dallas, Texas, USA	http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC/Mtgs/16AM/AOAC_Member/MtgsCF/16AMCF/16AMCFSSM.aspx?hkey=93d482bb-598c-4b59-84f0-a01e96f7f07d
26-28.09.2016	4th International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals		http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html
10-12.10.2016	5th Beneficial Microbes Conference Beneficial impact of pre- and probiotics on human and animal health		http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html
16-21.10.2016	IDF World Dairy Summit	Rotterdam, The Netherlands	http://www.idfwds2016.com/
7-9.11.2016	The RME Conference Series – 11th conference Food Feed Water Analysis: innovations and breakthroughs!	The Netherlands	http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html





Labinfo