



Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- 4 De Xylella fastidiosa kronieken
- 16 Ionenmobiliteitsspectrometrie (IMS): ondersteuning bij de analyses op bestrijdingsmiddelen door screening
- 19 Organisatie en resultaten van ringtesten voor multi-mycotoxine analysemethodes
- 26 Gelijktijdige detectie van 10 antibioticafamilies in vlees door middel van doorstroomcytometrie
- 29 "Whole genome sequencing" om de officiële laboratoria te helpen met de ontwikkeling van een methode voor detectie van EU-niet-geautoriseerde genetisch gewijzigde B. subtilis overproducerende riboflavine
- 32 Workshops & Symposia



LabInfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

Redactiegroep

Dirk Courtheyn, Alain Dubois, Marc Evrard, Geert Janssens en Marie-Christine Wilem

Auteurs van dit nummer

Bert Matthijs, Johan Van Vaerenbergh, Laure Joly, Séverine Gosciny, Vincent Hanot, Philippe Szternfeld, Edwin De Pauw, Gauthier Eppe, Philippe Debongnie, Emmanuel K. Tangni, Bart Huybrechts, Alfons Callebaut, Anne-Catherine Huet, Sigrid De Keersmaecker, Nina Papazova en Nancy Roosens

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,

We zijn intussen weeral een dik half jaar na het verschijnen van de vorige uitgave van Labinfo. Sindsdien is er binnen het management van DG Laboratoria één en ander veranderd.

Yasmine Ghafir werd op 1 januari aangeduid als directeur externe laboratoria, nadat Dirk Courtheyn de overgangperiode na het pensioen van Walter Smedts met veel professionalisme had verzekerd. Yasmine werkte reeds 10 jaar op de stafdienst van de Gedelegeerd Bestuurder van het FAVV. Zij verzekerde er o.a. het opvolgen van de objectieven van het businessplan, de eindredactie van het activiteitenverslag en de opvolging van DG Laboratoria. Voordien heeft zij 10 jaar gewerkt in het Labo voor Levensmiddelenmicrobiologie aan de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit te Luik (bij Professor Georges Daube), als verantwoordelijke van het nationaal referentielaboratorium voor microbiologie voor het FAVV.

Sacha Diaine verliet begin januari het voedselagentschap na een loopbaan van 16 jaar om een nieuwe uitdaging aan te gaan in de bedrijfswereld, waardoor de functie directeur FAVV-laboratoria open kwam te staan.

Mandy Lekens werd op 1 april aangeduid als directeur FAVV-laboratoria, na deze functie enkele maanden ad interim uitgevoerd te hebben. Mandy werkte reeds 15 jaar in het laboratorium van Tervuren, waarvan 9 jaar als laboratoriummanager. Voordien was zij in hetzelfde laboratorium werkzaam als afdelingshoofd van de afdelingen Contaminanten en Toevoegingsmiddelen.

De dagelijkse leiding van het laboratorium van Tervuren wordt sinds het vertrek van Mandy Lekens ad interim waargenomen door Mieke Vanbrabant, afdelingshoofd van de afdeling Toevoegingsmiddelen.

We zijn ervan overtuigd dat Yasmine, Mandy en Mieke hun nieuwe taken met succes zullen opnemen.

Dit nummer van Labinfo gaat in op een aantal nieuwe technieken op het vlak van de voedselveiligheid, evenals op nieuwe bedreigingen. Een opmerkelijk artikel handelt over de bacterie *Xylella*, die een ware nachtmerrie vormt voor de geteisterde en bedreigde gebieden. Er is verder een artikel over de organisatie en resultaten van unieke ringtesten voor multi-mycotoxine analysemethodes aan de hand van "natuurlijk" gecontamineerd materiaal welke jaarlijks ingericht worden door het CODA. Dit artikel werd geschreven door de erg gewaardeerde en gepassioneerde onderzoeker Philippe Debongnie, die op 26 juli 2016 onverwacht overleden is. Onze gedachten gaan uit naar zijn familie en medewerkers.

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

Bert Matthijs
Directeur-generaal Laboratoria

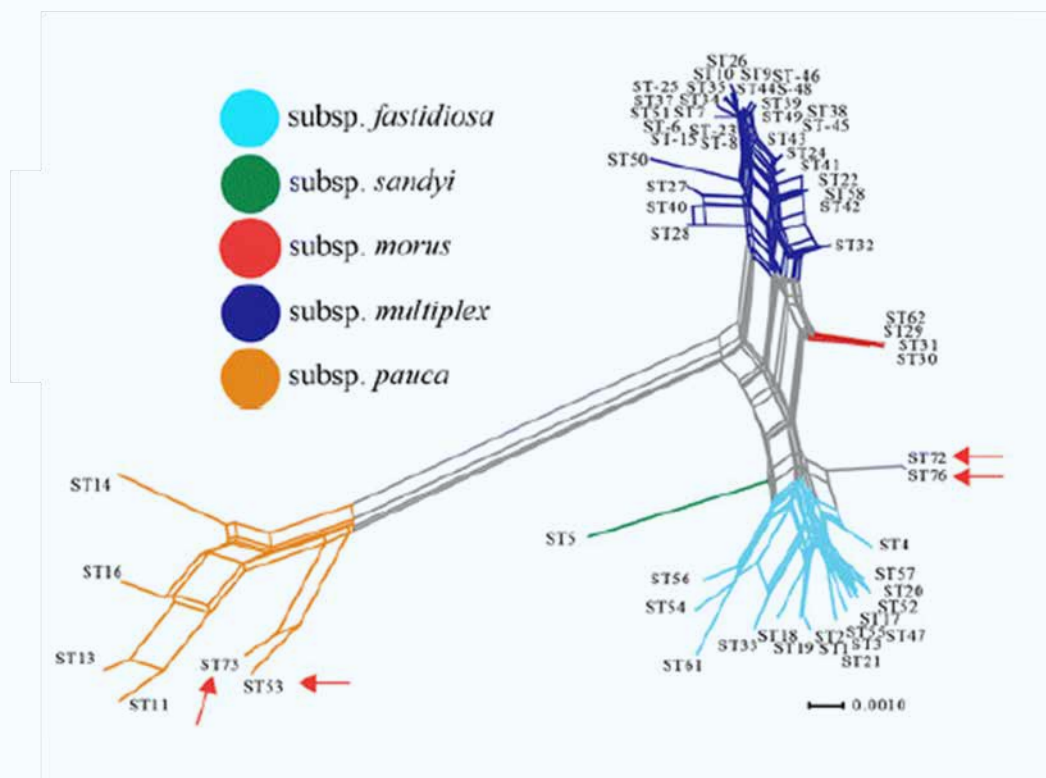
De *Xylella fastidiosa* kronieken

Johan Van Vaerenbergh

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Plant – Gewasbescherming,
Diagnosecentrum voor Planten, Burg. Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke

De toestand in een notedop

In oktober 2013 werd de fytosanitaire wereld in de Europese Unie opgeschrikt door de formele bekendmaking dat de bacterie *Xylella fastidiosa* was vastgesteld in zieke olijfbomen in het zuiden van Italië. In de regio Apulië op het schiereiland Salento gingen eeuwenoude olijfbomen al een tijdje ten onder aan de 'Complesso del Disseccamento rapido dell'Olivo'. De aanvankelijke diagnose van houtschimmels en schade door larven van de gestippelde houtvlinder (*Zuzera pyrina*) was niet overtuigend als oorzaak van de aantasting want er waren ook veel verdroegende olijfbomen zonder schade door deze organismen. De primaire oorzaak werd aangetoond door de detectie en identificatie van *Xylella* en dat zette meteen ook maatregelen om de opgang van de bacterie te verhinderen, in het bijzonder de vernietiging van geïnfecteerde olijfbomen. Ondertussen staat de teller van zieke olijfbomen op meer dan een miljoen, processies en zegeningen van olijfgaarden ten spijt. Ook in de oudste en meest legendarische olijfbom in de regio, de 'Gigante di Alliste' van zowat 1500 jaar oud, heeft *Xylella* toegeslagen.



Figuur 1. Fylogenetisch netwerk van sequentietypes (ST) van *Xylella fastidiosa* door MLST van 7 bacteriële genen (Scally et al., 2005). De subspecies *fastidiosa*, *multiplex* en *pauca* zijn sterk heterogeen (vertakte opbouw) door genetische recombinatie (Loconsole et al., 2016).

ST53 = *X.f.subsp. pauca*, CODiRO stam uit olijfbom in Apulië, Italië (2013).

ST73 = *X.f.subsp. pauca*, uit *Coffea arabica* uit Costa Rica (interceptie in Italië, 2015)

ST72 en ST76 = stammen uit *Coffea arabica* uit Costa Rica (interceptie in Italië, 2015) met genetische kenmerken van zowel *X.f.subsp. fastidiosa* als *X.f. subsp. sandyi*

ST16 = *X.f.subsp. pauca*, uit *Coffea arabica* in Brazilië en ook vastgesteld in olijfbomen in Brazilië.

In het surveyonderzoek is ondertussen de *Xylella* bacterie ook aangetroffen in 22 andere mediterrane bomen en struiken, ondermeer in oleander, amandelboom, bezemstruik (*Spartium junceum*), vleugeltjesbloem (*Polygala myrtifolia*), *Acacia saligna*, *Westringia fruticosa*, *Rhamnus alaternus*, *Myrtus communis*... Genetische analyse door MLST (Multi Locus Sequence Typing) heeft inmiddels aangetoond dat het in al deze planten om één en dezelfde *Xylellastam* gaat (CoDiRO stam, sequentietype (ST) 53 in figuur 1). Het onderzoek geeft ook aan dat één enkele introductie, vermoedelijk tussen 2008 en 2010, aansprakelijk is voor de schade in de olijfteelt en in het mediterrane landschap, (Saponari *et al.*, 2013; Saponari *et al.*, 2014; Martelli *et al.*, 2016; Loconsole *et al.*, 2016).

Xylella fastidiosa is vooral schadelijk in de druiventeelt en de wijnbouw in de V.S. en in de citrusteelt in Zuid-Amerika, voornamelijk in Brazilië. In de V.S. vertoont de bacterie zich ook in sierplanten en bomen in het stedelijk landschap. In Centraal- en Zuid-Amerika wordt ze vaak in koffieplanten aangetroffen (Rodriguez *et al.*, 2001; Montero-Astúa *et al.*, 2008). In Azië is de bacterie aangetoond op Taiwan; eerst in Nashi perelaar (Leu & Su, 1993) - maar het is nu duidelijk dat dit wellicht een andere *Xylellasoort* is die provisorio benoemd is als *Xylella taiwanensis* (Chen *et al.*, 2014). Later werd *Xylella fastidiosa* er in druivelaar vastgesteld (Su *et al.*, 2013). In Iran werd *Xylella fastidiosa* in druivelaar en amandelboom bevestigd (Amanifar *et al.*, 2014) maar de *Xylella* isolaten werden niet volledig getypeerd noch in een cultuurcollectie gedeponeerd. De meldingen uit Turkije (Güldür *et al.*, 2005) en Libanon (Temsah *et al.*, 2015) zijn niet onderbouwd door isolatie van de bacterie en blijven daarom twijfelachtig. De *Xylellakronieken* in de EU beginnen eigenlijk in 2012 wanneer de bacterie wordt vastgesteld in Frankrijk in koffieplanten uit Mexico (*Coffea canephora*) en Ecuador (*Coffea arabica*) die door Nestlé R&D in Tours voor in-vitro vermeerdering werden aangehouden in een bioveiligheidskas (Legendre *et al.*, 2014; Jacques *et al.*, 2016). In 2014 werd de bacterie opnieuw gedetecteerd in koffieplanten, ditmaal uit Costa Rica, die in Nederland waren ingevoerd (Bergsma *et al.*, 2014). Op het ogenblik van deze vaststelling waren de koffieplanten al verder over de EU verdeeld en naderhand kwam hierover *Xylellamelding* uit Frankrijk, Italië, Oostenrijk, Duitsland en het Verenigd Koninkrijk. De gebeurtenissen hebben de Europese Commissie ertoe aangezet spoedmaatregelen te nemen die het binnenbrengen en de verspreiding van deze bacterie moeten verhinderen (Besluit 2015/789). Elke lidstaat is verplicht een survey uit te voeren op het grondgebied, vooral in plantensoorten die bijzonder vatbaar zijn voor de bacterie. In juli 2015 werd daardoor *Xylella fastidiosa* vastgesteld op Corsica en in oktober 2015 op het Franse vasteland langs de Côte d'Azur (Nice, Antibes, Toulon). Telkens werden de vaststellingen vooral gedaan in vleugeltjesbloem, *Polygala myrtifolia* (EPPO, 2015).

In de plant wordt *Xylella fastidiosa* uitsluitend in de watervoerende kanalen aangetroffen. De symptomen zijn een gevolg van een verstoorde bevoorrading van water naar de bladeren en komen over als droogteschade. Bladeren vertonen herfstverkleuring met verdroging van de bladrand, dikwijls met een gele begrenzing (*leaf scorch* of *leaf scald*, samengestelde figuur 2A/B/C/D), gevolgd door verdroging van volledige bladeren en van takken, groeivertraging en uiteindelijk verdroging van de hele plant. Het schadebeeld is minder of meer uitgesproken naargelang de plantensoort, de *Xylella* variant en de omgevingscondities.

Het zijn dus vooral houtige planten waarin *Xylella fastidiosa* huishoudt. En erg selectief is de bacterie niet. Ze werd al vastgesteld in meer dan 300 plantensoorten uit meer dan 60 botanische families. In veel plantensoorten is het infectieproces echter onvoorspelbaar en het duurt dikwijls maanden vooraleer de aanwezigheid van de bacterie zichtbaar wordt. De meerderheid van de plantensoorten waarin *Xylella* wordt gedetecteerd vertonen weinig of zelfs geen symptomen maar ze zijn wel drager van de bacterie en een reservoir voor overdracht naar andere, mogelijks meer vatbare plantensoorten. Blijkbaar is *Xylella* vooral schadelijk in plantensoorten waarmee ze nooit in contact is geweest. Flagrant voorbeeld is de ravage in Europese druivelaar (*Vitis vinifera*) in Californië in tegenstelling tot veel Amerikaanse druivelaars (ondermeer *Vitis rotundifolia*) die drager van de bacterie zijn zonder symptomen. De introductie van *Xylella* in het mediterrane bassin heeft intussen al 41 nieuwe plantensoorten voortgebracht die door de bacterie worden ziek gemaakt, waaronder lavendel, *Pelargonium* en *Cistus* (zonneroos).





Figuur 2A.
X.f. subsp. multiplex in *Polygala myrtifolia*.
 Credit: Bruno Legendre, SPV-Anses, Angers, Frankrijk



Figuur 2B.
X.f. subsp. multiplex in olm.
 Credit: Brian Olson, Oklahoma State University @ Bugwood.org



Figuur 2C.
X.f. subsp. fastidiosa in druivelaar (Pierce's disease).
 Credit: PD/GWSS Board, California Department of Food and Agriculture



Figuur 2D.
X.f. subsp. pauca in olijfboom
 Credit: <http://www.centumcellae.it>

Xylella fastidiosa bestaat in verschillende varianten en die hebben min of meer hun eigen verspreidingsgebied en hun voorkeur voor plantensoorten. Er worden gebruikelijk 5 varianten (subspecies) onderscheiden :

- *X. f.* subsp. *fastidiosa*: vooral in druivelaar (bv de oorspronkelijke variant die de ziekte van Pierce veroorzaakt) en amandelboom.
- *X. f.* subsp. *multiplex*: de variant met de grootse diversiteit van planten waaronder amandelboom en andere *Prunus* soorten, alsook sierplanten en loofbomen in het stedelijk landschap zoals eik, plataan, esdoorn en olm. Deze variant is vastgesteld op Corsica en langs de Azurenkust in Frankrijk.
- *X. f.* subsp. *pauca*, in citrusbomen, in het bijzonder in sinaasappel, en in de koffieplant. Deze variant werd in Zuid-Italië vastgesteld in olijfboom en mediterrane struiken.
- *X. f.* subsp. *sandyi*, tot nog toe enkel in oleander in de V.S.
- *X. f.* subsp. *morus*, tot nog toe enkel in moerbeï (*Morus alba*) in de V.S.

Een mogelijks zesde variant, *X.f.* subsp. *tashke* werd vastgesteld in *Chitalpa tashkentensis* in New-Mexico, V.S.

De *Xylella* oervorm gaan wellicht duizenden jaren terug op het Amerikaanse continent. Er wordt vermoed dat die vorm goedaardig in planten uit de natuurlijke vegetatie leefde. De *multiplex* variant zou dan geëvolueerd zijn in het gematigd klimaat van Noord-Amerika, de *fastidiosa* variant in Centraal-Amerika en de *pauca* variant in Zuid-Amerika. De *fastidiosa* variant die de ziekte van Pierce in druivelaar veroorzaakt zou rond 1880 uit Mexico in Californië zijn ingesleept (Nunney *et al.*, 2010). Het contact met de Europese druivelaar had noodlottige gevolgen. Tegen 1890 was 16.000 ha wijndruiven vernietigd in het Los Angeles bassin. Andersom werd de *multiplex* variant uit Noord-Amerika geïntroduceerd in Zuid-Amerika. Door contact met de inheemse *pauca* variant zijn recombinante stammen ontstaan die gemakkelijker citrus en koffie konden infecteren (Nunney *et al.*, 2012).

Zowel voor Zuid-Italië als voor Corsica en Frankrijk wordt insleep uit het Amerikaanse continent vermoed. De ST53 stam uit Zuid-Italië is nauw verwant met ST73 uit koffieplant in Costa Rica (Loconsole *et al.*, 2016, in figuur 1). De *pauca* variant is ook al aangetroffen in olijfbomen in Brazilië (Coletta-Filho *et al.*, 2016) en Argentinië (Haelterman *et al.*, 2015). Het valt op dat de genetische profielen van de *pauca* stam uit de Braziliaanse olijfbomen (ST16) en van de *pauca* stam COF0238 uit *Coffea arabica* in Brazilië identiek zijn wat er op wijst dat beide plantensoorten door dezelfde *Xylella* zijn geïnfecteerd. De *multiplex* stammen van Corsica en van de Franse mediterrane kust zijn dan weer nauw verwant met stammen uit amandel en pruim in de V.S.

Alhoewel *Xylella fastidiosa* reeds werd opgenomen in de eerste editie van de Europese wetgeving over plantengezondheid (Richtlijn 77/93 van 21 December 1976, nu Richtlijn 2000/29 en KB van 10/08/2005), zijn jarenlang 'waardplanten van *Xylella*' uit het Amerikaanse continent in de EU ingevoerd zonder controle op de latente aanwezigheid. Dit voedt het vermoeden dat *Xylella* al veel eerder voet aan de grond heeft gezet in Europa. Maar zolang ze geen opvallende schade veroorzaakt in plantenkwekerijen of in commerciële culturen blijft ze onder de radar. Vooral door de invoer uit gebieden waar *Xylella* aanwezig is kunnen geïnfecteerde planten zonder symptomen overal in de EU terecht komen. En dus ook op plaatsen, zoals in Zuid-Italië, waar de samenhang tussen bacterie, plant en omgeving optimaal bleek te zijn. Tot nog toe is er geen aanwijzing dat de aanwezigheid van *Xylella* in olijfboom en in het stedelijk en natuurlijk landschap in Zuid-Italië een bedreiging is voor druivelaar en citrus. Genetische recombinatie in *Xylella fastidiosa* blijkt een krachtige driver te zijn voor de opkomst van nieuwe varianten, in het bijzonder in gebieden waar de bacterie nieuw werd geïntroduceerd. Het is niet denkbeeldig dat de stammen die nu in Europa aanwezig zijn elkaar treffen en nieuwe varianten doen ontstaan die wel geschikt zijn voor druivelaar of citrusbomen.



Biologie van *Xylella* en fitness in de plant.

Het mag duidelijk zijn dat *Xylella* niet wordt overgedragen door simpelweg een plant aan te raken. De bacterie bevindt zich immers uitsluitend in de watervoerende kanalen van de plant. De natuurlijke verspreiding gebeurt door cicaden, insecten die het xyleem aanprikken met hun steeksnuut om zich te voeden (Redak *et al.*, 2004). Ze behoren tot de orde van de halfvleugeligen (*Hemiptera*). De overdragers of vectoren van *Xylella* zijn de kleinere cicaden die tegenwoordig als *Auchenorrhyncha* worden benoemd. Ze zijn bij de bevolking het best gekend door de schuimnesten op plantenstengels waarin de larven zich ontwikkelen. De belangrijkste *Xylella* vectoren zijn de dwergcicaden of bladspringers (sharpshooter leafhoppers, orde *Cicadellidae*) en de schuimcicaden of schuimbeestjes (froghoppers of spittlebugs, orde *Cercopidae*).

De belangrijkste vector van *Xylella* in Apulië is de schuimcicade *Philaenus spumarius* (figuur 3A/B). Die wordt in heel Europa, dus ook in België, courant waargenomen. In de V.S. is ze ook aanwezig maar daar speelt die cicade nauwelijks mee in de *Xylella* biologie. De overwintering van het insect gebeurt doorgaans als eitje zodat het volwassen insect telkens weer besmet moet geraken. Echter, in zachte winters kan wellicht ook het volwassen insect overleven en daarin dus ook *Xylella*, zoals in mediterrane streken waar de *Xylella* vector in de natuurlijke begroeiing verblijft.

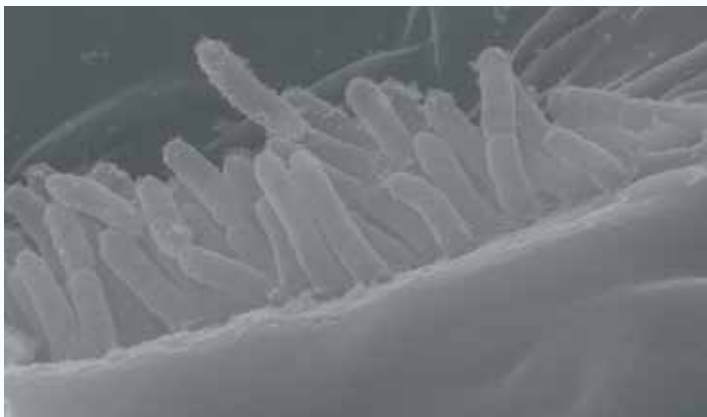


Figuur 3A.
De schuimcicade *Philaenus spumarius*,
vector van *Xylella fastidiosa* in Apulië
Credit: Kai Rösler, 2009 @

Figuur 3B.
Larve (nymf) van de schuimcicade
Philaenus spumarius.
Credit: J. Skaftason @ <http://ftp.funet.fi>



Het xyleemvocht is vrij arm aan voedingsstoffen en bijgevolg wordt telkens een grote hoeveelheid xyleemvocht opgenomen tijdens een voedingscyclus. Er kunnen dus ook veel *Xylella* cellen worden ingenomen. Het verblijf van *Xylella* in de insectvector is goed gedocumenteerd voor de vectoren op het Amerikaanse continent. Na opname hecht de bacterie zich aan de wand van de keel en het bovenste deel van de slokdarm en installeert zich daarna in een biofilm van rechtopstaande cellen (Purcell *et al.*, 1979 - figuur 3C). Blijkbaar moeten de opgenomen *Xylella* cellen al biofilm-geconditioneerd zijn in de plant om zich zo in het insect te vestigen (Hill & Purcell, 1997). Als de cicade zwervende *Xylella* cellen uit het xyleemvocht opneemt dan zal de bacterie zich nauwelijks of niet installeren. In de biofilm kan de bacterie ook vermeerderen (Newman *et al.*, 2004). Er is geen incubatieperiode nodig in de vector. Vrijwel onmiddellijk na opname is het insect besmettelijk. De larvestadia (nymfen) kunnen ook *Xylella* opnemen en verspreiden maar ze verliezen de bacterie bij elke vervelling. Het volwassen insect is zijn hele bestaan besmettelijk. Het valt nog te bezien hoe de bacterie zich gedraagt in de Europese vector(en). Cicaden zijn polyfaag maar ze hebben toch een voorkeur voor plantensoorten. Ook de overdracht is niet voor elke plantensoort even doelmatig. Ze vliegen over korte afstand, zo'n 100 meter, maar kunnen over langere afstand passief worden meegevoerd, bvb met de wind of als vreemdsoortige lifter (alien hitch-hiker) in voertuigen.

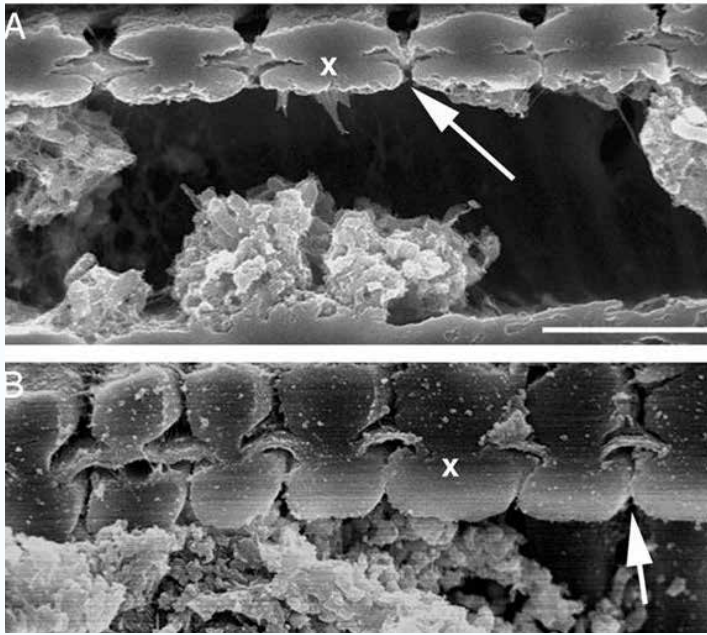


Figuur 3C. *Xylella fastidiosa* geïnstalleerd als rechtopstaande cellen in een biofilm in de keel van *Graphocephala atropunctata* (Killiny *et al.*, 2009).

Er zijn plantensoorten die na infectie een duidelijk ziektebeeld tonen maar in (veel) andere is de bacterie latent of sluimerend aanwezig. Dat heeft te maken met hoe *Xylella* in de plant leeft. Ze zwerft het liefst als vrije bacterie (dat wordt planktonisch genoemd, als plankton in de oceaan) doorheen de waterleidingen van de plant. Als *Xylella* zich hecht aan de wand van een waterkanaal dan ontstaan kleine ophopingen of microkolonies die aangroeien tot aggregaten die de vrije waterstroom belemmeren (figuur 4). Een chemische verbinding stuurt de communicatie tussen *Xylella* cellen die een biofilm vormen. De bacterie komt door de ophoping echter zelf in de problemen want ze geraakt afgesneden van water en voeding. Het wordt een kwestie van leven of dood. De bacterie produceert enzymen die openingen maken in de scheidingswand tussen twee xyleemkanalen waardoor ze kan ontsnappen naar een buurkanaal met betere leefomstandigheden. In verstopte waterleidingen worden vooral dode *Xylella* cellen vastgesteld.

De omslag van zwervende cel naar aggregaat en dus de overgang van latente aanwezigheid naar ziekte wordt door verschillende factoren gestuurd. Veel van deze triggers zijn onderzocht in druivelaar maar niet in andere plantensoorten. Ondermeer de pH en de chemische samenstelling van het xyleemvocht bepalen of *Xylella* planktonisch of in aggregaten zal aanwezig zijn (Zintsun, 2006 ; Andersen *et al.*, 2007). *Xylella* heeft als ziekmaker nog andere troeven, zoals enzymen die de wand van het xyleemkanaal irriteren waardoor de plant callose afzet op de wanden om ze te verstevigen (Nascimento *et al.*, 2016). Ophoping van callose zal de xyleemkanalen ook vernauwen zoals cholesterol dat doet in aders. In het XYLERIS project (financiering door FOD Volksgezondheid, Leefmilieu en Veiligheid van de Voedselketen) onderzoekt ILVO de impact van onze weersomstandigheden op de proliferatie van *Xylella* in verschillende plantensoorten. Specifieke bodemcondities zoals arm/rijk aan nutriënten en vochtig/droog worden geanalyseerd als mogelijke ontstekingsmechanismen voor de pathogene fase van *Xylella* in de plant.





Figuur 4.
Xylella fastidiosa aggregaten in een xyleemleiding van druivelaar.
 De pijl wijst op een membraanholte (membrane pit) waarlangs de bacterie bij overbevolking kan ontsnappen naar een buurleiding (Newman et al., 2004).

De aanwezigheid van *Xylella* in de plant wisselt sterk naargelang het seizoen en de omgevingscondities want die beïnvloeden immers de hoeveelheid xyleemvocht en de chemische samenstelling ervan. De hoogste concentraties van *Xylella* worden vastgesteld tijdens de zomermaanden. Koude trekt blijkbaar grenzen aan de bedrijvigheid van de bacterie. Voor de overleving moeten de winters mild zijn waardoor de planten niet echt in rust gaan. Meer noordelijk gelegen gebieden lijken dus de destructieve gevolgen van *Xylella* te ontlopen. De meest noordelijke vaststellingen van *Xylella* werden gedaan op ongeveer 50° N.B. in loofbomen in het stedelijk landschap. In het najaar blijkt de bacterie uit de kruin weg te trekken en zoekt ze de stam en de wortels op tijdens de winter om zich dan in de lente opnieuw naar takken en twijgen te verplaatsen. De ecogeografische hotspots voor ontwikkeling en vestiging van *Xylella fastidiosa* in Europa zijn ingekleurd in het kaartje na verwerking van 19 ecologische factoren (Bosso et al., 2016).



De hotspots voor *Xylella fastidiosa* in Europa. De noordelijke begrenzing loopt van Portugal en centraal Spanje over Madrid en de Balearen naar Corsica en de Tyrreense kust ten zuiden van Rome, het zuiden van Italië, de kustgebieden van Montenegro en Albanië, het zuiden van Griekenland boven Delphi en Athene en het noorden van Turkije. Er zijn ook enkele hotspots aan de Azurenkust. Noord-Afrika en het Nabije Oosten zijn helemaal geschikt voor de bacterie. Er zijn geen hotspots in België.

Inspectie door FAVV en diagnose door ILVO

De opsporing van *Xylella fastidiosa* is uitermate belangrijk voor de bescherming van cultuurteelten, kwekerijen, openbaar groen en stedelijk landschap. Het FAVV doet surveyonderzoek bij invoer, in kwekerijen, in tuincentra, in openbaar groen en in het stedelijk en natuurlijk landschap. De meest efficiënte weg voor de verspreiding van de bacterie over lange afstand is handel en transport van besmette planten. Sinds 19 mei 2015 komen 160 plantensoorten uit 27 botanische families de EU niet meer zomaar binnen. Een voorwaarde voor invoer is ondermeer dat het exporterende land moet aantonen dat *Xylella fastidiosa* niet op het grondgebied aanwezig is.

Xylella fastidiosa heeft de status van bijzonder schadelijk organisme in de fytosanitaire regelgeving van de EU. De bacterie kan in meerdere plantensoorten of plantaardige producten aanwezig zijn en gevaar opleveren voor de hele EU. Een vaststelling in België kan grote economische gevolgen hebben voor plantentelers en -handelaren. In dat geval verplicht het uitvoeringsbesluit 2015/789 (18 mei 2015) van de Commissie ondermeer dat de lidstaat een gebied afbakt dat bestaat uit een besmette zone met daar omheen een bufferzone en dat er maatregelen worden uitgevoerd voor de eradicatie van de bacterie, i.h.b. door alle planten waarin *Xylella* kan huishouden te verwijderen in een straal van 100 meter om de besmetting, ongeacht hun sanitaire conditie. Om de besmette zone wordt een bufferzone van 10 km ingesteld waarin intensief naar *Xylella* infectie wordt gespeurd. Het afgebakend gebied kan maar worden opgeheven als *Xylella* gedurende vijf opeenvolgende jaren niet wordt vastgesteld. Er is intussen geen verkeer van waardplanten binnen en vanuit de bufferzone toegestaan. Het is mogelijk om van deze schikkingen af te wijken voor een geïsoleerde infectie van *Xylella* die recent werd ingesleept en die eenvoudig kan worden geruimd en er bewezen zijn dat de bacterie is binnengebracht met de planten waarop het is aangetroffen. Tevens moet worden aangetoond dat er geen besmette vectoren aanwezig zijn.

Ook is vanaf 2016 een plantenpaspoort verplicht voor alle plantensoorten die in de EU besmet zijn bevonden. Deze verplichting geldt voor alle verkeer binnen de EU en binnen België tussen professionele bedrijven en derden, ondermeer potplanten, struiken, bomen, perk- en kuisplanten bestemd voor de eindconsument, de veiling, tuincentra, bouwmarkten, hoveniers, natuur- en terreinbeheerders en groenvoorziening van gemeentes. De maatregelen zijn niet van toepassing op zaden en eindproducten zoals vruchten en snijbloemen. Een aantal landen buiten de EU hebben ook hun invoereisen aanzienlijk verscherpt voor Europese planten en plantmateriaal. In vitro planten bvb kunnen niet naar Australië zonder dubbele toetsing.

Het uitvoeringsbesluit 2015/789, aangepast door uitvoeringsbesluit 2015/2417, verplicht elke lidstaat ook tot een survey op het grondgebied. Die is in eerste instantie een visuele inspectie van specifieke plantensoorten maar impliceert ook bemonstering en analyse. Elke lidstaat moet bovendien een draaiboek samenstellen in geval van vaststelling en de bevolking, reizigers en professionelen in handel en transport bewust maken over het risico van de bacterie. Elke persoon die de aanwezigheid van *Xylella* in een plant vermoedt moet de fytosanitaire overheid informeren en hierover alle nuttige informatie bezorgen. Dit heeft reeds vruchten afgeworpen in Saksen, Duitsland waar mediterrane planten van private personen overwinterden in een serre van een kleine plantenkwekerij. *Xylella* werd aangetroffen in een oleander met verdrogings symptomen.

Het is duidelijk dat er voor de uitvoering van de nogal wat analyzewerk nodig is. Omdat *Xylella* zich gemakkelijk in de waterkanalen verplaatst kan de bacterie zowat overal in de plant worden aangetroffen. Ze wordt standaard opgespoord in de steeltjes en in de hoofdnerf van bladeren (figuur 5A/B/C). Er worden maximaal 25 blaadjes in één analyse verwerkt. Het is soms wenselijk om van een partij planten meerdere monsters te analyseren, bvb omdat het gekend is dat de bacterie er zich eerder latent in ophoudt, zoals in koffieplanten.

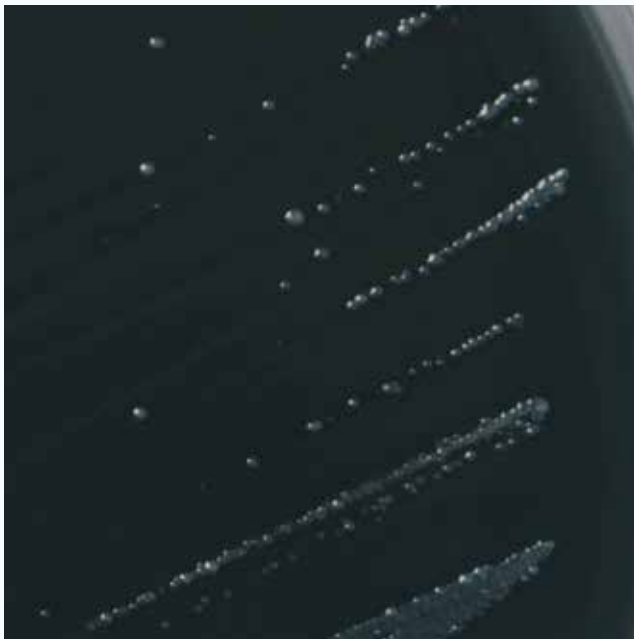
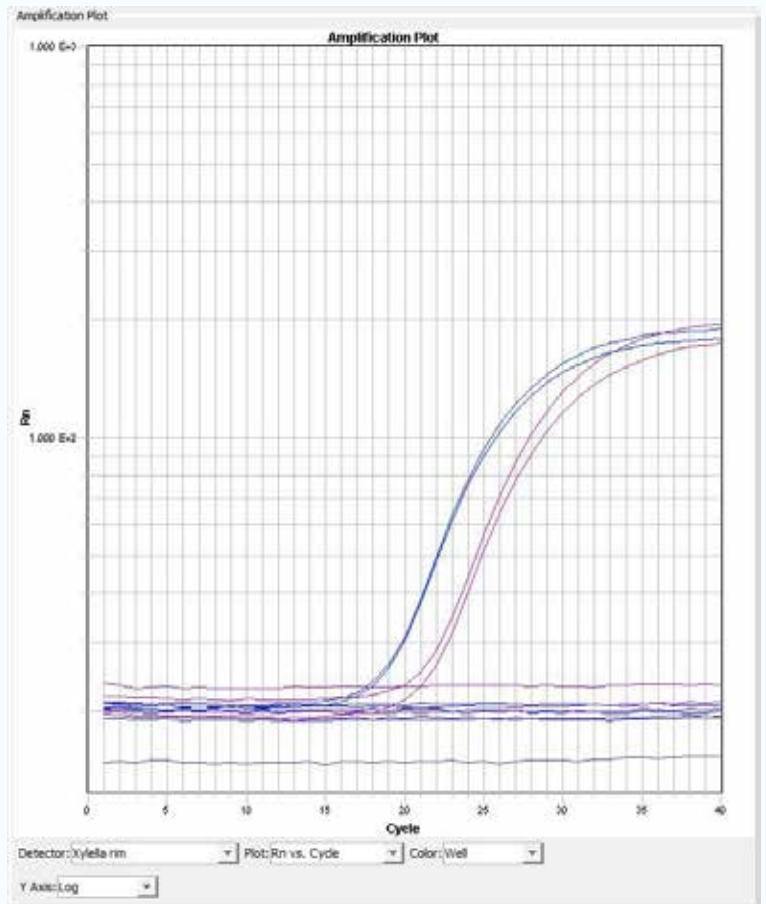


Xylella is bijzonder moeilijk uit te kweken op voedingsmedia. Daarom wordt de bacterie in eerste instantie moleculair opgespoord. Die analyse wordt uitgevoerd door TaqMan® real-time PCR (Harper *et al.*, 2010) op het *rimM* gen dat bijdraagt in de translatie van het 16S rRNA. Deze test detecteert alle varianten van *Xylella fastidiosa*. Een negatief analyseresultaat wordt gerapporteerd als afwezigheid van *X.fastidiosa*. Het onderzoek is afgewerkt. Een positief analyseresultaat wordt gemeld als vermoedelijke aanwezigheid van *X.fastidiosa*. Het onderzoek wordt voortgezet met andere moleculaire testen, ondermeer de *gyrB* barcode (Rodrigues *et al.*, 2003) en de bepaling van de subspecies (ondermeer Hernandez-Martinez *et al.*, 2006). Een positief resultaat in deze analyses bevestigt de aanwezigheid van *Xylella fastidiosa*. Het onderzoek wordt dan verder gezet met uitkweek op BCYA (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) met L-cysteïne en ijzerpyrofosfaat (Janse *et al.*, 2012), een medium dat oorspronkelijk voor de uitkweek van *Legionella* werd ontwikkeld. Het duurt doorgaans 10 tot 15 dagen om *Xylella* kolonies van ongeveer 1 mm te verkrijgen maar er zijn ook stammen waarbij de uitkweek 4 weken duurt. Uiteindelijk worden kolonies in reïncultuur geënt en moleculair getypeerd (ST analyse). Het onderzoek wordt afgesloten met het aantonen van de pathogeniteit. De cultuur wordt geënt in de plantensoort waaruit de bacterie werd geïsoleerd, in *Polygala myrtifolia* (toetsplant die snel ziekte toont), in *Catharanthus roseus* (Monteiro *et al.*, 2001) en in *Nicotiana tabacum* SR1 (Francis *et al.*, 2008).



Figuur 5A. Monster van *Polygala myrtifolia* voor diagnose van *Xylella fastidiosa*.

Figuur 5B. *rimM* TaqMan PCR met duplobepaling van + controles



Figuur 5C. Kolonies van *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* op BCYA na 14 dagen bij 28°C.

Honderd jaar na de eerste wetenschappelijke verwijzing van een bacteriële oorzaak van verdroging van druivelaar in Californië (Pierce, 1892) werd de bacterie benoemd als *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). *Xylella* verwijst naar de specifieke niche van de bacterie in de plant, het xyleem. De soortnaam *fastidiosa* wijst op de moeilijke uitkweek van een bacterie met een ongebruikelijke stofwisseling.

Het is de aard van de bacterie om in schijnbare verstandhouding met de plant te leven. Deze entente vervaagt als het evenwicht in de watervoerende kanalen wordt verstoord. Maar even goed pakt *Xylella fastidiosa* nieuwe plantensoorten drastisch aan nadat ze accidenteel in een nieuw gebied werd geïntroduceerd. Als er over *Xylella* iets kan worden voorspeld dan is het wel dat de bacterie onvoorspelbaar is.



Geciteerd onderzoek:

- Amanifar et al., 2014. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 318–327.
- Andersen et al., 2007. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology Letters* 274: 210–217.
- Bergsma et al., 2014. *Xylella fastidiosa* in *Coffea arabica* ornamental plants imported from Costa Rica and Honduras in the Netherlands. *Journal of Plant Pathology* 97: 395.
- Bosso et al., 2016. Shedding light on the effects of climate change on the potential distribution of *Xylella fastidiosa* in the Mediterranean basin. *Biological Invasions* DOI 10.1007/s10530-016-1118-1.
- Chen et al., 2014. Analyses of *Xylella* whole genome sequences and proposal of *Xylella taiwanensis* sp. nov. CDFA Pierce's Disease Control Program Research Symposium. p.92.
- Coletta-Filho et al., 2016. First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Phytopathologia Mediterranea* 55:
- EPPO Reporting Service 2015, n° 8. First report of *Xylella fastidiosa* in France, on the island of Corsica. Report 2015/144.
- EPPO Reporting Service 2015, n° 10. *Xylella fastidiosa* detected in Alpes-Maritimes, mainland France. Report 2015/180.
- Francis et al., 2008. Improved bioassay of *Xylella fastidiosa* using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. *Plant Disease* 92: 14-20.
- Güldür et al., 2005. First report of almond leaf scorch in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 87: 246.
- Haelterman et al., 2015. First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 97: 393.
- Harper et al., 2010. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100: 1282-1288.
- Jacques et al., 2016. New coffee plant-infecting *Xylella fastidiosa* variants derived via homologous recombination. *Applied and Environmental Microbiology* 82:1556–1568.
- Hernandez-Martinez et al., 2006. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds and oleander using a multiprimer assay. *Plant Disease* 90: 1382-1388.
- Hill & Purcell, 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87: 1197-1201.
- Janse et al., 2012. Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of *cost873* for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology* 94: 147-154.
- Killiny & Almeida, 2009. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 521-528.
- Legendre et al., 2014. Identification and characterisation of *Xylella fastidiosa* isolated from coffee plants in France. *Journal of Plant Pathology* 96: 100.
- Leu & Su, 1993. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch in Taiwan. *Plant Disease* 77: 642-646.
- Loconsole et al., 2016. Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity. *European Journal of Plant Pathology* : DOI 10.1007/s10658-016-0894-x
- Martelli et al., 2016. The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. *European Journal of Plant Pathology* 144: 235-243.
- Monteiro et al., 2001. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease* 85: 246-251.
- Montero-Astúa et al., 2008. Isolation and molecular characterization of *Xylella fastidiosa* from coffee plants in Costa Rica. *Journal of Microbiology* 46: 482-490.

- Nascimento et al., 2016. The type II secreted lipase/esterase LesA is a key virulence factor required for *Xylella fastidiosa* pathogenesis in grapevines. *Sci. Rep.* 6, 18598; doi: 10.1038/srep18598
- Newman et al., 2004. Cell–cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *PNAS* 101: 1737-1742.
- Nunney et al., 2010. Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: novel insight into the origins of Pierce's disease of grapevine in the U.S. *PLoS One* 55:e15488.
- Nunney et al., 2012. Detecting genetic introgression: high levels of intersubspecific recombination found in *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 78:4702-4714.
- Pierce, 1892. The California vine disease. A preliminary report of investigations. US Department of Agriculture. Division of Vegetable Pathology. Bulletin No.2.
- Purcell et al., 1979. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science* 206: 839-841.
- Redak et al., 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49: 243–270.
- Rodriguez et al., 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Disease* 85:1027.
- Rodrigues et al., 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4249-4255.
- Saponari et al., 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95: 668–668.
- Saponari et al., 2014. New hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO in Apulia. *Journal of Plant Pathology* 96: 603–611.
- Scally et al., 2005. Multilocus Sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8491–8499.
- Su et al., 2013. Pierce's disease of grapevines in Taiwan: isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology* 161: 389-396.
- Temsah et al., 2015. First report of *Xylella fastidiosa* associated with oleander leaf scorch in Lebanon. *Journal of Crop Protection* 4: 131-137.
- Wells et al., 1987. *Xylella fastidiosa* gen.nov., sp.nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 136–143.
- Zintzun, 2006. <http://nature.berkeley.edu/classes/es196/projects/2006final/zintzun%20.pdf>

johan.vanvaerenbergh@ilvo.vlaanderen.be



Ionenmobiliteitsspectrometrie (IMS): ondersteuning bij de analyses op bestrijdingsmiddelen door screening

Laure Joly¹, Séverine Goscinny¹, Vincent Hanot¹, Philippe Szternfeld¹, Edwin De Pauw² en Gauthier Eppe²

¹WIV, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel

²CART Universiteit Luik, Allée de la Chimie 3, B-6c Sart-Tilman, B-4000 Luik, België

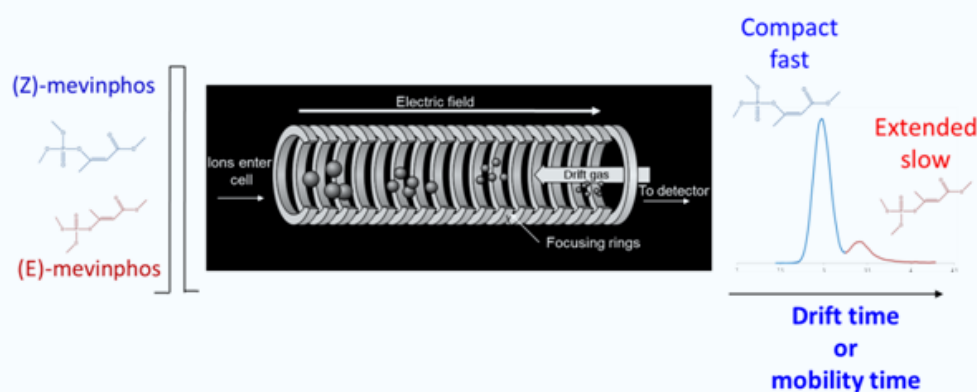
Inleiding

Gedurende vele jaren bezaten enkel de laboratoria voor chemie en fysica die hun eigen instrumenten bouwden een toestel dat ionenmobiliteitsspectrometrie aan massaspectrometrie koppelt (IMS-MS). Het is slechts sedert een tiental jaar dat IMS-MS-instrumenten zijn opgedoken in de handel, waardoor een groter aantal laboratoria dit instrument kon aankopen.

Scheiding van 2 isomeren door IMS

Een ionenmobiliteitskamer is een cel die een neutraal gas bij een gecontroleerde druk (~3 mbar) bevat, dat wordt onderworpen aan een elektrisch veld. De ionenmobiliteit is de tegenhanger in gasvormige toestand van de elektroforese: de ionen worden tegelijkertijd versneld in het elektrische veld en afgeremd door de talrijke botsingen met het buffergas.

In een ionenmobiliteitscel zal een ion met compacte samenstelling sneller bij de detector komen dan een ion met een omvangrijkere samenstelling.



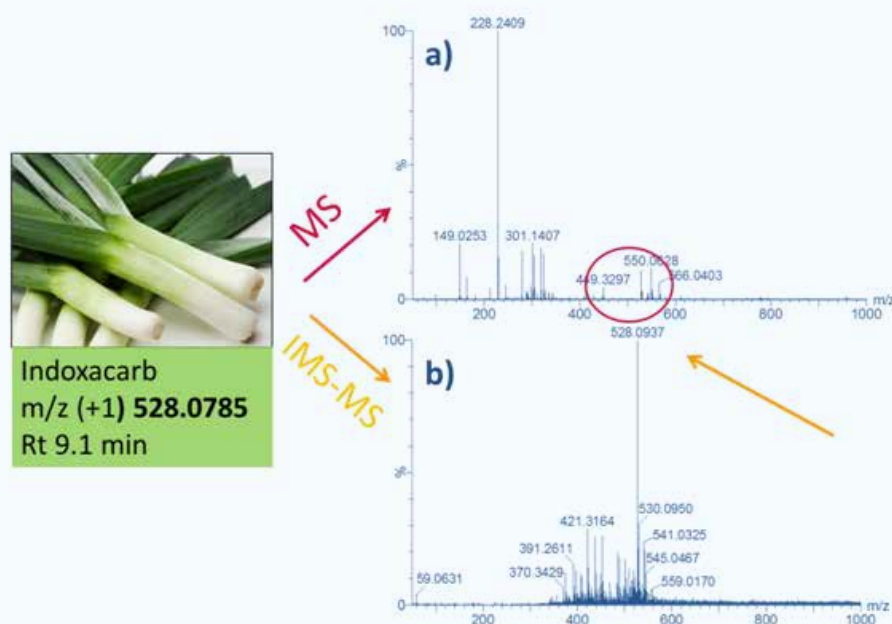
Figuur 1: In een ionenmobiliteitscel zijn er 2 tegengestelde krachten: het elektrische veld versnelt de ionen en het buffergas remt ze af door de wrijvingskracht. Aangezien Z-mevinfos compacter is dan E-mevinfos, zal die de ionenmobiliteitscel sneller doorkruisen en als eerste bij de detector komen.

Verschillende parameters zullen de scheiding van de moleculen beïnvloeden: het soort buffergas (koolstofdioxide, stikstof, helium), de druk in de mobiliteitscel, het soort elektrisch veld (lineair of golvend) en de kracht van het elektrisch veld. Een adequate regeling van die parameters zal het mogelijk maken om de scheiding van verschillende driedimensionale vormen, zelfs van moleculen met dezelfde massa (isomeren), te optimaliseren. Figuur 1 toont dat de Z- en E-isomeren van mevinfos worden gescheiden dankzij de ionenmobiliteitscel. Het Z-isomeer van mevinfos is het meest compact, de mobiliteitstijd ervan is kleiner dan die van het E-isomeer van mevinfos, dat een samenstelling heeft die uitgestrekter is in de ruimte.

Clean up van de “full scan” massaspectra met behulp van IMS

In de meeste routinematige screeningmethodes worden tegelijkertijd meerdere honderden bestrijdingsmiddelen geanalyseerd. Parallel daaraan worden de zuiveringsstappen tot een minimum beperkt om het verlies van bestanddelen te vermijden. De full scan spectra die daaruit voortvloeien, zijn complex. De aanwezigheid van talrijke matrixpieken kan de identificatie van geanalyseerde bestanddelen met een lage gevoeligheid of een lage concentratie verhinderen. Zo is bijvoorbeeld de piek van indoxacarb met een massa van 528,08 bijna niet zichtbaar in het MS-spectrum (figuur 2a).

Het IMS-MS-spectrum in figuur 2b toont hoe de ionenmobiliteit de massaspectra ontlast en de interpretaties vergemakkelijkt. De quasi onbestaande piek van indoxacarb met massa 528,08 van het MS-spectrum (figuur 2a) wordt de meest intense piek van het IMS-MS-spectrum (figuur 2b). IMS-MS verhoogt het betrouwbaarheidsniveau van de verstrekte resultaten.



Figuur 2: Voorbeeld van het clean-up-effect van de ionenmobiliteit voor indoxacarb bij peren: massaspectra van het type full scan verkregen door de gegevens te filteren volgens de retentietijd van indoxacarb (a) en door de gegevens te filteren volgens de retentietijd EN de mobiliteitstijd van indoxacarb (b)



De ionenmobiliteit als een bijkomend identificatiepunt

De conventionele screeningsmethodes identificeren de bestrijdingsmiddelen aan de hand van twee identificatiepunten: hun retentietijd en hun massa. De scheiding volgens ionenmobiliteit voegt een bijkomende scheidingsdimensie toe aan de massa en de retentietijd. De mobiliteitstijd kan worden beschouwd als een bijkomend identificatiepunt. Dit maakt het mogelijk om de vals positieve en/of vals negatieve gevallen te doen dalen.

De betrouwbaarheid van deze nieuwe parameter is aangetoond, de mobiliteitstijden vertonen een goede reproduceerbaarheid, zijn onafhankelijk van de concentraties en de geanalyseerde matrix. De ionenmobiliteitstijd is een bijkomende fysieke parameter om te helpen bij de identificatie en om de betrouwbaarheid van de verstrekte resultaten te verhogen.

Besluit

Dit artikel geeft een overzicht van het gebruik dat kan worden gemaakt van de ionenmobiliteit voor de analyse van bestrijdingsmiddelen door screening. Deze performante technologie kan in de toekomst worden toegepast op de analyses door multiresiduscreening van bestrijdingsmiddelen in levensmiddelen.

Aanvullende lectuur:

- V. Gabelica, *Intérêt de la spectrométrie de mobilité ionique pour l'étude de la conformation et des assemblages non-covalents de biomolécules*, *Spectra Analyse*, nr. 251, september-oktober 2006
- S. Goscinny, L. Joly, E. De Pauw, V. Hanot, G. Eppe, *Travelling-wave ion mobility time-of-flight mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables*, *Journal of Chromatography A*, 1405 (2015) 85-93

laure.joly@wiv-isp.be

Organisatie en resultaten van ringtesten voor multi-mycotoxine analysemethoden

Philippe Debongnie, Emmanuel K. Tangni, Bart Huybrechts en Alfons Callebaut

Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie (CODA-CERVA)

Operationele Directie Chemische Veiligheid van de Voedselketen,

Dienst Toxines en Natuurlijke Bestanddelen

Nationaal Referentielaboratorium voor Mycotoxines

Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, België

Inleiding

Binnen het thema gezondheid en voedselveiligheid zijn betrouwbare chemisch-analytische resultaten essentieel. Niet alleen voor het onderzoek, maar vooral voor de implementatie van de wetgeving, voor het verzekeren van de kwaliteit en de veiligheid van voeding en voeders, om betrouwbare databanken op te bouwen (monitoring voor risk assessment) en tenslotte om wereldwijd handelstransacties mogelijk te maken.

Ieder analytisch "erkend" laboratorium valideert zijn analytische methodes en moet de betrouwbaarheid van zijn resultaten kunnen aantonen. Een duidelijk bewijs, dat gevraagd wordt om een accreditatie te bekomen, is een succesvolle deelname aan ringtesten (PT's). Een PT is een oefening waarbij een aantal laboratoria één of meerdere stalen krijgt met een onbekende concentratie van de analyt in kwestie. Na analyse rapporteert het laboratorium het resultaat aan de organisator. De PT-organisator verzamelt de resultaten en berekent voor ieder resultaat een "z-score", dat een maat is voor het verschil tussen het bekomen resultaat en de "echte" of "werkelijke" concentratie.

Het laboratorium moet ook in staat zijn een realistische schatting te maken van de meetonzekerheid van de resultaten. Daarom berekenen sommige PT-organisatoren (o.a. de Europese Referentie Laboratoria, EU-RL's) ook de "ζ-score", een maat voor de betrouwbaarheid van het "totaal resultaat" van het lab, rekening houdend met de schatting van de "uitgebreide meetonzekerheid, $MU_{(k=2)}$ ", d.w.z. het 95% betrouwbaarheidsinterval rond het resultaat. Veronderstel dat de werkelijke concentratie $99 \mu\text{g}/\text{kg}$ is, dan is " $120 \pm 24 \mu\text{g}/\text{kg}$ " correct en het lab zal een bevredigende ζ-score krijgen, terwijl " $115 \pm 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ " eerder misleidend is en een slechte ζ-score oplevert, ondanks het feit dat het resultaat 'an sich' dicht bij de werkelijke waarde ligt.

Voor ieder domein van de voedselveiligheid in de Europese Unie (bv. mycotoxines, spoorelementen, pesticiden, ...) hebben de Nationale Referentie Laboratoria (NRL's) de taak om PT's te organiseren, waaraan de erkende laboratoria verplicht moeten deelnemen. Het EU-RL controleert op zijn beurt de NRL's door de organisatie (met verplichte deelname) van een EU-PT.

De dienst Toxines en Natuurlijke Bestanddelen van CODA-CERVA is het Belgisch NRL voor mycotoxines en organiseert als dusdanig een jaarlijkse PT voor de (door het FAVV) erkende laboratoria (OCL, Official Control Laboratory). Deze dienst combineerde zijn expertise in de ontwikkeling van multi-mycotoxine LC-MS/MS analysemethoden en zijn expertise in de ontwikkeling van referentiemateriaal (in samenwerking met de Mycothèque van de Universiteit catholique de Louvain, UCL) om "natuurlijk" gecontamineerd materiaal aan te maken dat kan gebruikt worden in PT's. Op die manier kan CODA-CERVA PT's aanbieden die zeer nuttig zijn voor het toenemend aantal laboratoria



die LC-MS/MS multi-mycotoxine methodes gebruiken. Sinds 2012 nemen 20 tot 40 laboratoria (van over heel de wereld) deel aan deze multi-PT's, naast de ongeveer 10 erkende laboratoria (OCL's).

Alle berekeningen en criteria die gebruikt worden voor de PT-resultaten zijn gebaseerd op het "International harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories" (Pure Appl. Chem., Vol. 78, No. 1, pp. 145–196, 2006) van IUPAC.

In dit artikel leggen we uit hoe onze PT's georganiseerd worden en hoe de resultaten verwerkt worden. We beschrijven ook welke informatie in de antwoorden beschikbaar is en welke algemene trends we zien in de analytische performantie van de labs.

PT materiaal

Graankorrels worden geïncubeerd met geselecteerde schimmelstammen (superproducers) aan de UCL Mycothèque. Na incubatie wordt alles gesteriliseerd, gemalen en gehomogeniseerd. Deze zwaar gecontamineerde partijen worden dan gemengd en verdund tot de gewenste concentratie aan mycotoxines in een blanco graanmeel ('background material'). Het finale materiaal wordt verpakt in hoeveelheden van 55 gram. Dit materiaal kan zowel de mycotoxines bevatten waarvoor de EU maximale toegelaten waarden (MAL's) of richtwaarden heeft bepaald, als mycotoxines waarvoor geen wetgeving bestaat (vb. acetylDON, nivalenol, enniatines ...).

Naast granen maken we ook referentiemateriaal voor voedingssupplementen, cacao, enz.

Toegewezen waarde

De "conventionele werkelijke concentratie" of "toegewezen waarde" (V_{ass}) is het robuust gemiddelde van de "referentie set" van de resultaten ingestuurd door de deelnemers, d.w.z. de verzameling van resultaten die overblijft na uitsluiting van de "outliers". De "standaard meetonzekerheid" van deze waarde (u_{vass}) is de robuuste standaard afwijking van deze referentieset van resultaten, gedeeld door de vierkantswortel van het aantal. Het 95% betrouwbaarheidsinterval of de "uitgebreide meetonzekerheid" is gelijk aan de standaard meetonzekerheid u_{vass} vermenigvuldigd met een "dekkingsfactor" $k=2$.

Z-scores

De z-score wordt voor ieder resultaat (X_{lab}) berekend door zijn afwijking met V_{ass} te nemen en te delen door de "target standaard afwijking voor ringtesten" (σ_p):

$$Z = (X_{lab} - V_{ass}) / \sigma_p$$

De z-scores worden als volgt geëvalueerd :

- "voldoende" indien het resultaat ligt tussen -2 en +2;
- "twijfelachtig" indien tussen -3 and -2 of tussen +2 and +3;
- "onvoldoende" indien lager dan -3 of hoger dan +3.

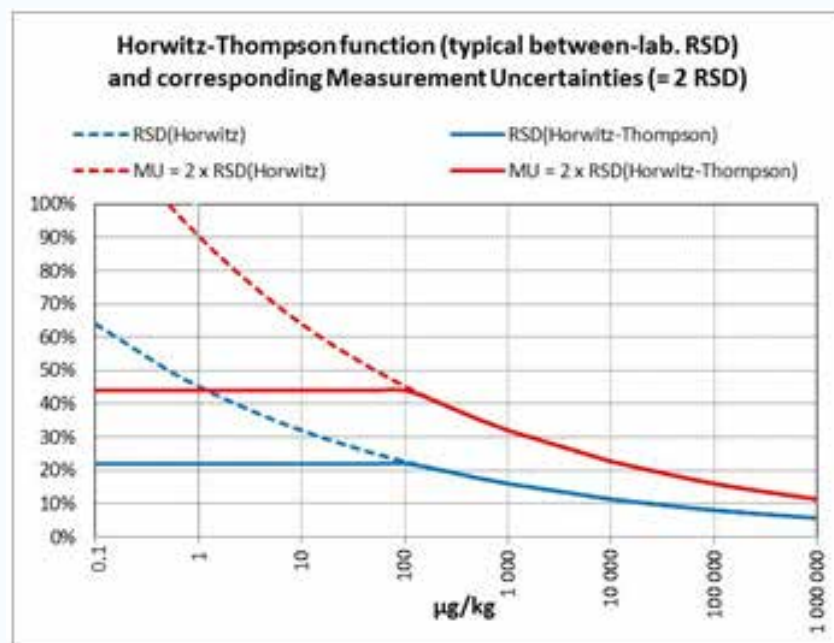
Onder de hypothese van een "normale" of "Gaussiaanse" verdeling zouden de percentages van "twijfelachtige" en "onvoldoende resultaten" respectievelijk ongeveer 5% en 0.25% moeten zijn. Met andere woorden, het gemiddeld-scorende laboratorium mag ongeveer 5% "twijfelachtige" z-scores verwachten en slechts 0.25% "onvoldoende" z-scores behalen. Een onvoldoende z-score leidt tot een onderzoek naar de oorzaken, gevolgd door eventuele correctieve acties.

Target standaard afwijking (σ_p)

De waarden van de z-scores zijn sterk afhankelijk van de target standaard afwijking σ_p . De σ_p wordt vaak berekend vanuit V_{ass} , met de hulp van de empirische Horwitz-Thompson vergelijking (fig. 1). Horwitz gebruikte de data van een zeer groot aantal ringtesten en vond dat de meest bepalende factor voor de "tussen laboratoria standaardafwijkingen" de concentratie van het analyt was. Hij stelde een empirische functie op voor de waargenomen data:

$$RSD_{(\%)} = 2^{(1-0,5\log c_{(g/g)})}$$

Thompson wijzigde deze functie later door een RSD van 22% voor lage concentraties ($\leq 120 \mu\text{g}/\text{kg}$) vast te leggen). De reden hiervoor is dat indien de RSD veel groter zou zijn dan 22%, het 95% betrouwbaarheidsinterval rond het resultaat ($\pm \text{MU} = \pm 2 \text{RSD}$) zó groot zou worden, dat het van geen enkel nut zou zijn. Daarom worden in de praktijk extra inspanningen, investeringen en kosten gemaakt om het betrouwbaarheidsinterval binnen bepaalde grenzen te houden.



Figuur 1: Horwitz-Thompson functie

Zeta-score (ζ)

Vele klanten en zelfs de analytici van het laboratorium hebben problemen om een $\pm 44\%$ betrouwbaarheidsinterval bij lage concentraties te aanvaarden als "normaal". Als gevolg hiervan hebben de labs de tendens om hun meetonzekerheid te onderschatten, vooral omdat ze vrezen voor hun reputatie bij de klant.

Dit is één van de redenen om een "z-score" te berekenen. De "z-score" gebruikt de afwijking van de "toegewezen waarde" samen met de standaard meetonzekerheid ($u_{\text{lab}} = MU_{\text{lab}} / 2$) opgegeven door het lab (gecombineerd met de standaard meetonzekerheid van de toegewezen waarde zelf) in plaats van σ te gebruiken:

$$\zeta = (X_{\text{lab}} - V_{\text{ass}}) / \sqrt{(u_{\text{lab}}^2 + u_{\text{Vass}}^2)}$$

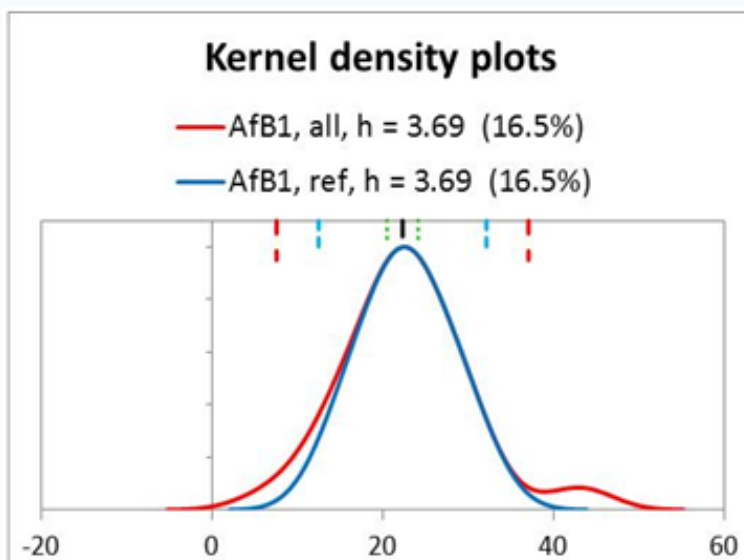
De ζ -scores worden beoordeeld als "voldoende", "twijfelachtig" of "onvoldoende" gebruik makend van dezelfde criteria als deze van de z-scores.

Voorbeeld: aflatoxine B1 in de PT van 2014

Er werd aan de deelnemers gevraagd om de resultaten van de analyses van 2 substalen te rapporteren. Er werden in totaal 47 resultaten (sets van 2) ontvangen, waarvan 46 correct (in duplo) werden gerapporteerd. Twee van de sets waren "right-censored", d.w.z. boven de normale rapportagelimiten van de deelnemers.

De mediaan van alle resultaten, MED_{tot} , was $22,32 \mu\text{g}/\text{kg}$, lichtjes boven het maximaal toegelaten gehalte voor voeders ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$, Richtlijn 2003/100/EG). Vijf resultaten werden verwijderd als outlier (buiten de $\pm 50\%$ range rond MED_{tot}). De mediaan van de overblijvende 40 resultaten (= "reference set") was $22,34 \mu\text{g}/\text{kg}$.

"Kernel density plots" (fig. 2) werden gebruikt om visueel de verdeling van de "non-censored" resultaten te bekijken, zowel vóór als na verwijdering van de outliers (respectievelijk rode en blauwe lijn).

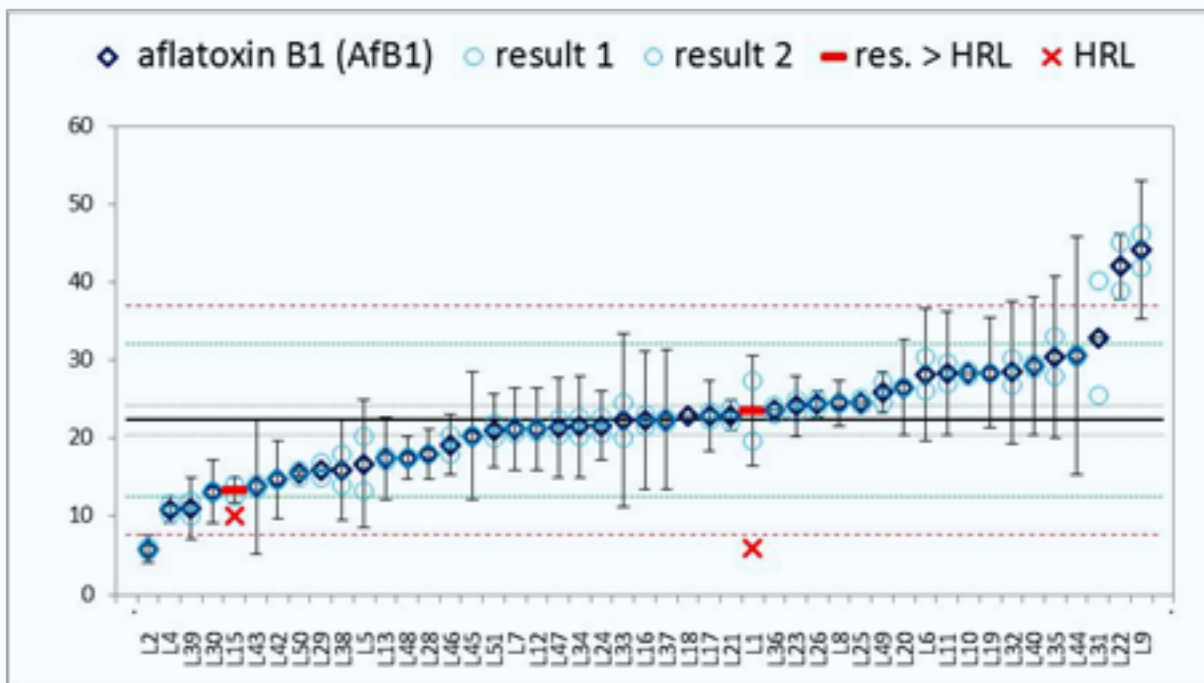


Figuur 2: Kernel density plots vóór en na verwijdering van de outliers (respectievelijk rode en blauwe lijn)

De robuuste standaardafwijking σ_{rob} (mediaan van de absolute waarden van de afwijkingen in de referentieset) was 5,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (25,8%). De verhouding van deze standaardafwijking tot de verwachte waarde uit de Horwitz-Thompson vergelijking ("HorRat" = σ_{rob} / σ_p) was 1,17, dus beneden het maximum (1,2) aanbevolen door IUPAC.

Aan alle criteria werd dus voldaan om MED_{ref} de status te geven van "toegewezen waarde". Daarna werden de z- en ζ -scores toegewezen aan de resultaten van de labs.

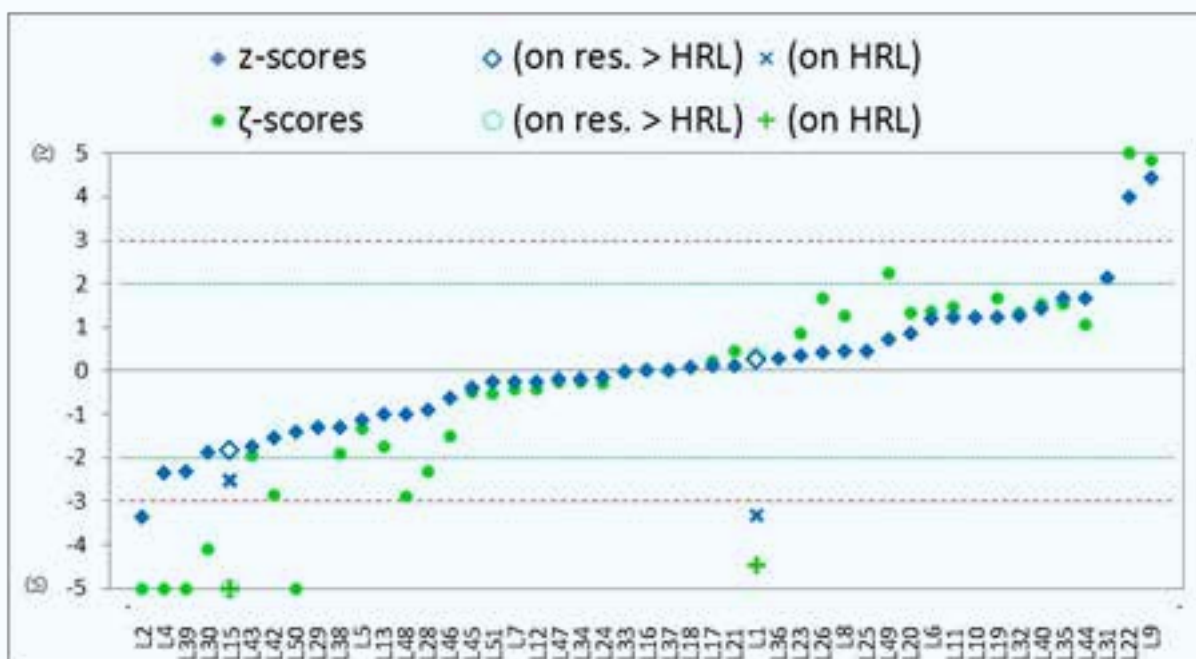
Figuur 3 stelt de resultaten voor in $\mu\text{g}/\text{kg}$, in oplopende concentratie, met de typische sigmoïdale vorm. De horizontale lijnen stellen V_{ass} voor, met volgende intervallen: $\pm u_{V_{ass}} \pm 2 \sigma_p$ and $\pm 3 \sigma_p$. De 39 resultaten binnen de 2 groene lijnen krijgen de vermelding "voldoende", 3 resultaten tussen de groene en de rode lijnen zijn "twijfelachtig" en 3 resultaten buiten de rode lijnen zijn "onvoldoende". Twee "right-censored" resultaten werden ook in deze plot opgenomen. Er werd aan de deelnemers gevraagd om voor hun resultaten die buiten de rapportagelimiten lagen, toch hun gemeten waarden (korte rode lijn) te rapporteren, samen met hun rapportagelimiten (x). In ons geval zouden de gerapporteerde waarden de z-score "voldoende" behaald hebben (-1.8 and 0.2).



Figuur 3: Resultaten van de laboratoria voor aflatoxine B1

Figuur 4 stelt de corresponderende z-scores and ζ -scores voor. Voor de z-scores komen de veranderingen t.o.v. van figuur 3 overeen met een verandering in de y-as. Maar de ζ -scores geven een ander beeld: de meeste zijn hoger (in absolute waarde) dan de corresponderende z-scores, en 7 zijn onvoldoende. Dit is algemeen voorkomend in ringtesten en is het gevolg van een wijdverspreide tendens van laboratoria om hun meetonzekerheid te onderschatten.



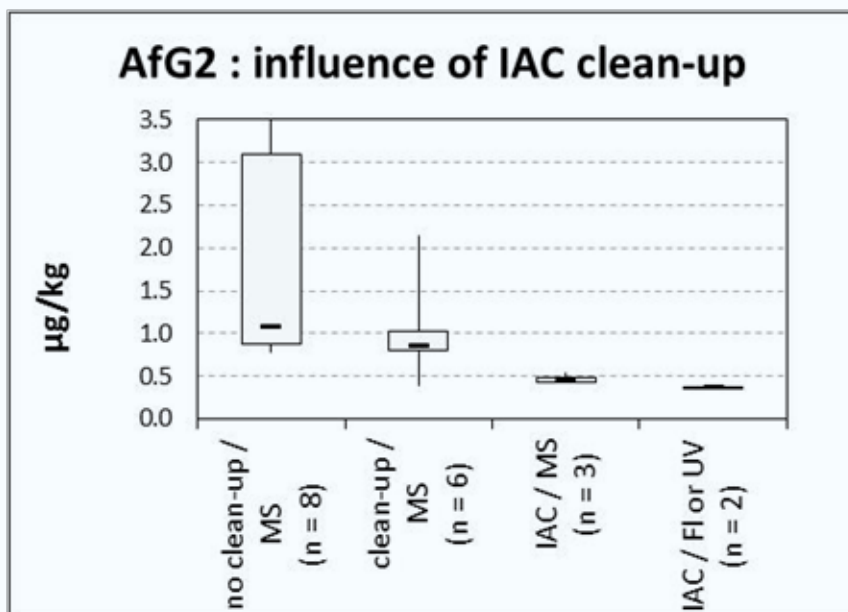


Figuur 4: De z-scores and ζ -scores van de laboratoria

Methode- of instrument-gerelateerde trends

Aan de deelnemers wordt ook gevraagd om enkele details van hun analytische methodes, inclusief van de gebruikte apparatuur, te rapporteren. Wij proberen dan naar mogelijke invloeden van de methode of analytische instrumentatie op de verdeling van de resultaten te kijken.

Als voorbeeld kunnen we in de PT van 2014 een verschil vaststellen in de resultaten voor aflatoxine G2. De AFG2 concentratie was zeer laag ($< 2 \mu\text{g}/\text{kg}$) en beneden de rapportagelimiets van vele deelnemers. In fig. 5 stellen de "box-and-whiskers" symbolen de percentielen 0-25-50-75-100 voor van de verdeling van de "non-censored" resultaten, voor 4 groepen van analytische methodes. De 5 resultaten bekomen met een zuivering van het extract op een immuno-affiniteits (IAC)-kolom waren lager dan de 14 resultaten bekomen zonder zuivering van het extract of met een ander type van zuivering.

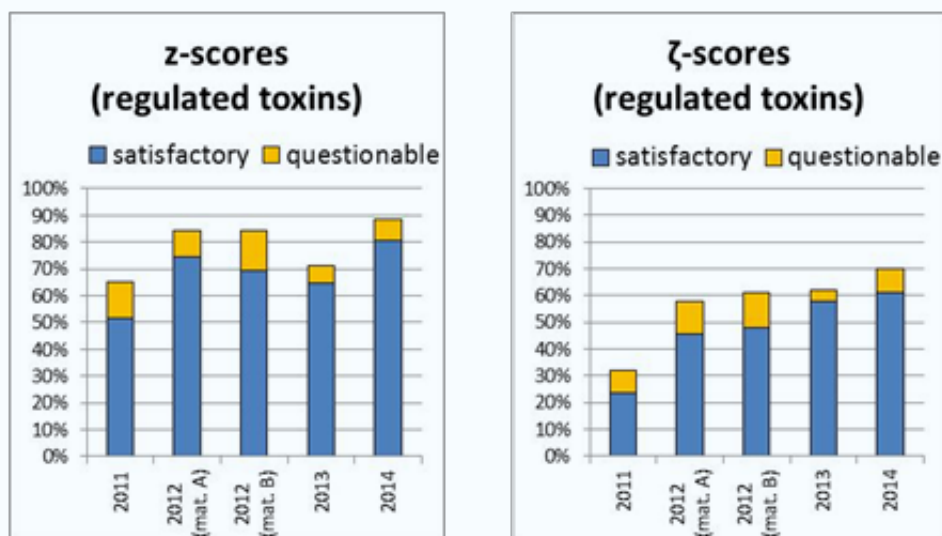


Figuur 5: Grafische voorstelling in "box-and-whiskers" van de resultaten bekomen voor 4 groepen van analytische methodes

Algemene trends

De percentages van "voldoende" z-scores en ζ -scores over de jaren heen bereiken niet de 95% die verwacht worden op basis van de Gaussiaanse verdeling (fig. 6 en 7). Voor de z-scores is dit vooral te wijten aan de aanwezigheid van "outliers" (alleen de referentie dataset heeft ongeveer een Gaussiaanse verdeling). Voor de ζ -scores komt daar nog bij dat een aantal deelnemers hun meetonzekerheid onderschatten.

Nochtans verbetert het plaatje over de jaren: de percentages van "voldoende" z- and ζ -scores hebben de neiging om toe te nemen, vooral als gevolg van een daling in het aantal "outliers" en een toename van meer realistische schattingen van de meetonzekerheid.



Figuur 6 en 7: De percentages van "voldoende" z-scores en ζ -scores over de jaren heen

Bart.Huybrechts@coda-cerva.be



Gelijktijdige detectie van 10 antibioticafamilies in vlees door middel van doorstroomcytometrie

Anne-Catherine Huet

CER Groupe – Département Santé, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie, België

Inleiding

Overmatig diergeneeskundig gebruik van antibiotica kan leiden tot de aanwezigheid van residuen in levensmiddelen, wat een risico inhoudt voor de consument. Sommige antibiotica kunnen allergische of giftige reacties veroorzaken. Bovendien heeft dit buitensporige gebruik van antibiotica geleid tot een toename van de resistentie van de bacteriën, alsook tot het opkomen van nieuwe stammen. De Europese Unie heeft voor meerdere antibiotica maximumwaarden voor residuen (MRL) vastgelegd om het gebruik ervan te reguleren (Verordening (EU) nr. 37/2010 van de Commissie). Een doordacht gebruik van antibiotica in de dierlijke productie wordt aangemoedigd.

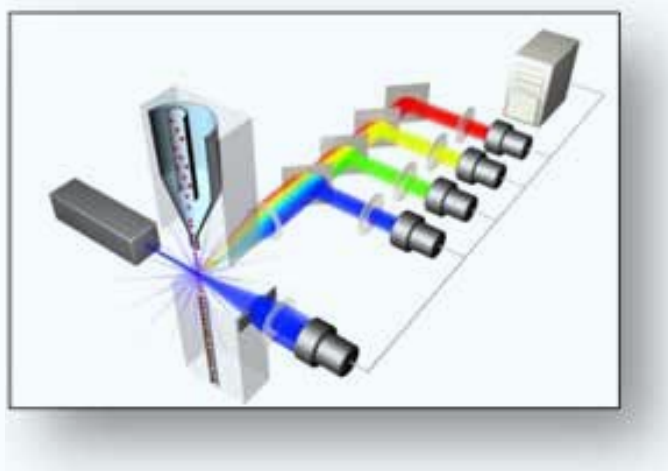
Verschillende screeningmethoden werden op punt gesteld, voornamelijk om de eventuele aanwezigheid van residuen van antibiotica in levensmiddelen te detecteren. De meest bekende screeningmethoden zijn: microbiologische inhibitietesten, ELISA's en immunochromatografische testen. Het merendeel van deze sneltesten detecteren ofwel enkel substanties die tot één enkele antibioticafamilie behoren, ofwel een beperkt aantal substanties van meerdere families. Voor de identificatie van de familie(s) die aanwezig is (zijn) in de matrix is het over het algemeen nodig om gelijktijdig meerdere testen per monster uit te voeren.

In het kader van een project in samenwerking met Unisensor SA hebben wij een screeningmethode ontwikkeld die gelijktijdig een groot aantal antibiotica in vlees kan detecteren en daarbij een onderscheid kan maken tussen de aanwezige families. Onze voorkeur ging uit naar doorstroomcytometrie gebaseerd op een immunoassay.

Detectiemethode en de performantie ervan

Drie elementen zijn essentieel voor de ontwikkelde methode:

- i) fluorescerende microdeeltjes die individueel kunnen worden onderscheiden op basis van de specifieke combinatie van grootte en intensiteit van de fluorescentie. Deze microsferen vormen de vaste basis voor het uitvoeren van competitieve testen met een antibioticum of een hiervan afgeleide stof die aan het oppervlak ervan wordt vastgehecht. Dit maakt het mogelijk om iedere familie te identificeren.
- ii) van specifieke of generieke biomoleculen zoals antilichamen, receptoren,... die gericht zijn tegen de antibiotica en de fluorescerende microsferen. Bij aanwezigheid van antibiotica in het monster zal er competitie zijn tussen deze residuen in suspensie en de antibiotica (of hun afgeleiden) die vastgehecht zijn op de microdeeltjes om binding met de liganden aan te gaan.
- iii) fluorescerende reporters die de dosering mogelijk maken.

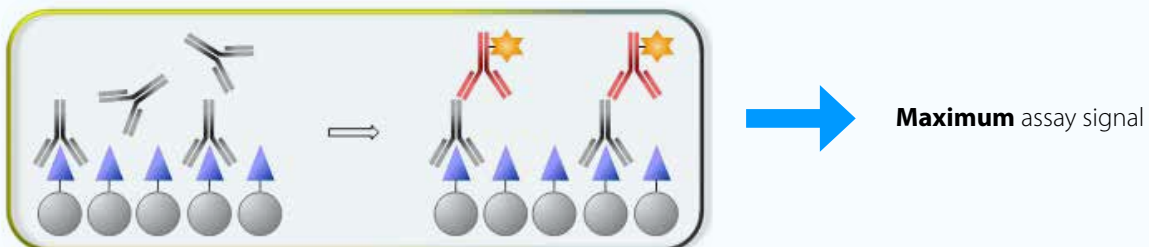


Figuur 1: het principe van doorstroomcytometrie bestaat uit een laser die de fluorescerende reporters activeert die vastgehecht zijn aan de oppervlakte van de microsferen en uit de detectoren die de uitgezonden fluorescentie opvangen.

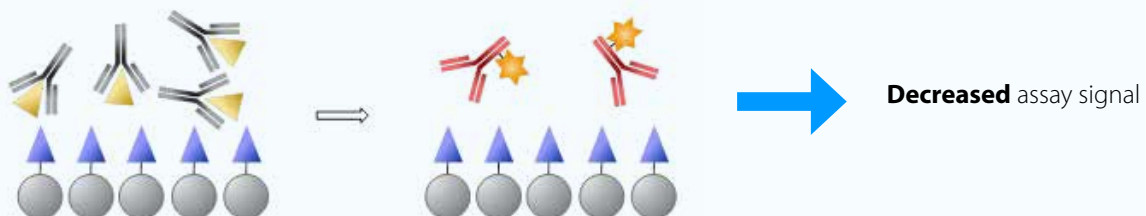
Aangezien het gaat om een assay van het competitieve type, wordt de aanwezigheid van het (de) doelresidue(n) aangetoond door een vermindering van het signaal voor de overeenkomstige microsferen ten opzichte van de intensiteit van de fluorescentie van een blanco monster.



A) **Afwezigheid** van antibiotica in het staal



B) **Aanwezigheid** van antibiotica in het staal



Figuur 2: het principe van het immunoassay gebruikt in deze methode

We zijn ook de uitdaging aangegaan om eenzelfde eenvoudige extractiemethode op punt te stellen die kan gebruikt worden voor de 10 antibioticafamilies, en waarbij de vastgelegde MRL's gerespecteerd kunnen worden. Gezien de physico-chemische eigenschappen van de verschillende antibiotica zeer uiteenlopend kunnen zijn, was dit geen eenvoudige opgave.



Besluit

De groep CER en Unisensor SA hebben een snelle methode ontwikkeld om in vlees 10 antibioticafamilies gelijktijdig te detecteren aan de hand van doorstroomcytometrie. Deze methode omvat meer dan 80 individuele substanties die behoren tot volgende verschillende families: tetracyclines, β -lactam antibiotica, sulfonamiden, fenicolen, (fluoro)quinolonen, macroliden, aminoglycosiden, polymyxines, pleuromutilines en lincosamiden. Momenteel wordt een commerciële toepassing van de BEADYPLEX-kit™ ontwikkeld door Unisensor SA. Deze ontwikkeling gebeurt op vraag van de agroalimentaire industrie die op zoek is naar steeds meer veeleisende methodes wat betreft analysesnelheid, kost, meetprecisie, selectiviteit van de geanalyseerde moleculen, automatisering voor een grote reeks van monsters en vooral wat de diversiteit betreft van de residu's die gelijktijdig kunnen worden opgespoord in één enkel monster.

Tabel 1 : samenvatting van de informatie m.b.t. BEADYPLEX™ die wordt gebruikt in varkensvlees

Antibiotic family	Representative antibiotic	MR(P)L (ng/g)	Screening target concentration (ng/g)	Number of detected antibiotics
Aminoglycoside	Streptomycin	500	250	8
	Gentamicin	50	50	
Polymyxin	Colistin	150	150	2
Lincosamide	Lincomycin	100	25	2
Tetracycline	Oxytetracycline	100	50	9
Sulfonamide	Sulfadimidine	100	100	18
Macrolide	Spiramycin	250	250	5
	Tildipirosin	1200	1200	
Phenicol	Thiamphenicol	50	100	3
β -Lactam	Cefquinome	50	50	18
(Fluoro)quinolone	Marbofloxacin	150	20	15
Pleuromutilin	Valnemulin	50	50	2

Voor meer informatie:

infolnr@cergrupe.be - celia.suarez@unisensor.be

“Whole genome sequencing” om de officiële laboratoria te helpen met de ontwikkeling van een methode voor detectie van EU-niet-geautoriseerde genetisch gewijzigde *B. subtilis* overproducerende riboflavine

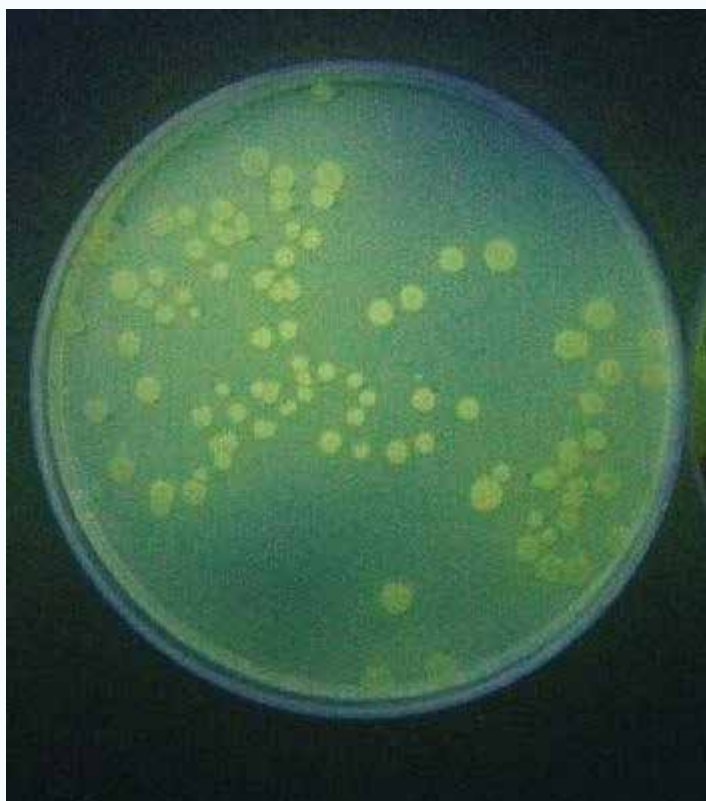
Sigrid De Keersmaecker, Nina Papazova en Nancy Roosens

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

In september 2014 werd de aanwezigheid van de genetisch gewijzigde (GG) *Bacillus subtilis* - een vitamine B2 (riboflavine) overproducerende bacterie in een voedertoevoegingsmiddel uit China geïmporteerd op de EU markt - gemeld via de RASFF (RASFF 2014.1249). Deze RASFF melding bewijst dat contaminatie met een genetisch gewijzigde microorganisme (GGM) kan voorkomen in de EU-voedselketen. Bovendien was er geen detectie methode voor deze GGM beschikbaar en nog geen strategie ontwikkeld om dergelijke contaminatie te detecteren door de officiële laboratoria.

Daarom heeft WIV-ISP de technologie “whole genome sequencing” gebruikt (Illumina HiSeq2500 platform, 350-fold coverage) op de geïsoleerde GGM (figuur 1) om de sequentie informatie te genereren die nodig is om een specifieke detectie methode te ontwikkelen.





Figuur 1. Geïsoleerde GG-*Bacillus subtilis*, overproducerende vit. B2, die gebruikt werd voor "whole genome sequencing" (RASFF 2014.1249).

Kortom, de sequencing "reads" werden *de novo* geassembleerd tot grotere fragmenten ("scaffolds"), gebruik makend van de optie "de novo assembly" van de CLC workbench version 7.5.1. (CLC Bio). De gegenereerde data werden geanalyseerd door middel van een BLAST analyse om de sequenties die riboflavine operon bevatten terug te vinden.

Deze fragmenten werden verder gebruikt om een nieuwe TaqMan qPCR methode te ontwikkelen (Vit. B2 – UGM). De methode detecteert de overgangsequentie tussen de *B. subtilis* riboflavine operon en de transformatievector gebruikt om deze GG-bacterië te construeren. De methode werd ontwikkeld volgens de EU-vereisten voor performantie van qPCR methoden voor specificiteit, sensitiviteit, PCR efficiëntie en herhaalbaarheid. De Vit. B2-UGM qPCR methode kan de *B. subtilis* bacterie detecteren in gDNA geëxtraheerd uit additieven zonder voorafgaande bacteriële cultuur.

De ontwikkelde qPCR methode werd ter beschikking gesteld aan de officiële laboratoria als een essentiële tool om deze niet-geautoriseerde GG bacterie snel en specifiek te kunnen detecteren in voeding en diervoeder additieven.

Deze studie toont aan dat de “whole genome sequencing” data toegang kunnen geven tot cruciale sequentie-informatie die nodig is voor ontwikkeling van specifieke qPCR methoden om onbekende en niet-geautoriseerde GGO's in levensmiddelen en diervoeders te kunnen detecteren.

GMM worden massaal gebruikt om voedings- en diervoederadditieven te produceren. Volgens de EU-wetgeving (EC 1333/2008; 1331/2008) moeten alle additieven vrij zijn van zowel GGM (levend of niet) als van nieuwe geïntroduceerde genen. Tegenwoordig, wordt geen systematische controle uitgevoerd op de EU-markt. De vraag wordt gesteld of het nodig is om een meer systematische monitoring op te zetten voor de aanwezigheid van GGM op de EU-markt, alsook het ontwikkelen van geschikte detectie strategieën.

Deze tekst is gebaseerd op twee wetenschappelijke artikels gepubliceerd door het WIV:

- *Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SCJ, Wuyts V, Gau C, Pirovano W, Costessi A, Philipp P, Roosens NH. Genome sequence of EU-unauthorized genetically modified Bacillus subtilis strain 2014-3557 overproducing riboflavin, isolated from a vitamin B2 80% feed additive- 531. Genome Announcements (2015); 3(2): e00214-15 DOI: 10.1128/genomeA.00214-15*
- *Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SCJ, Delvoye M, Gau C, Philipp P, Roosens NH. Use of Next Generation Sequencing data to develop a qPCR method for specific detection of EU-unauthorized genetically modified Bacillus subtilis overproducing riboflavin. BCM biotechnol (2015); / DOI: DOI: 10.1186/s12896-015-0216-y*

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 > Professionelen > 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)
28.08-01.09.2016	The 32nd Symposium of the European Society of Nematologists	Braga, Portugal	http://esn2016braga.om
28.08-02.09.2016	The 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants – Dioxin 2016	Firenze, Italy	http://www.dioxin2016firenze.org/
7-9.09.2016	IDF Mastitis Conference 2016	Cité des Congrès, Nantes, France	http://www.idfmastitis2016.com/en/
9.09.2016	kant-en-klaargerechten: lekker en gezond?	Leuven, Brussels	Organised by the Flemish Chemical Society – Food section http://www.kvcv.be/index.php/nl/secties/sectie-voeding
12.09.2016	INSECTA® 2016 International Symposium on Insects as Feed, Food and Non-Food	Magdeburg, Germany	www.insecta-conference.com
15-16.09.2016	21st Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	Organized by the Belgian Society for Food Microbiology vzw/aslb (BSFM) www.bsfm.be
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/16AM_M.aspx?hkey=93d482bb-598c-4b59-84f0-a01e96f7f07d
22.09.2016	Food Safety Analysis Seminar	Brussels, Belgium	Analyze.nl@thermofisher.com
26-28.09.2016	4th International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals	The Hague, The Netherlands	http://www.bastiaanse-communication.com/RUA16/#xl_xr_page_index
5-7.10.2016	dPCR EXPERIENCE WORKSHOP Practical workshop on different dPCR platforms	Ljubljana, Slovenia	http://biosistemika.com/products/nib-workshop/
06-07.10.2016	European One Health Eco Health Workshop	Brussels, BELSPO, Belgium	http://www.biodiversity.be/health/58

07.10.2016	Joint Meeting BWDS & DSWH : “ Wildlife Crossing Borders”	Antwerpen, ITG, Belgium	http://bwds.be/symposium/index.html
10-12.10.2016	5th Beneficial Microbes Conference Beneficial impact of pre- and probiotics on human and animal health	Amsterdam, The Netherlands	http://www.bastiaanse-communication.com/BMC2016/ http://beneficialmicrobes2016.org/index.php
13.10.2016	Vitaminen in voeding, diervoeding en supplementen	Breda, The Netherlands	http://www.aoaclowlands.nl/inschrijvingen.html
16-21.10.2016	IDF World Dairy Summit	Rotterdam, The Netherlands	http://www.idfwds2016.com/
18-19.10.2016	International Symposium LABS in a CRYSTAL BALL NEW TRENDS FOR MULTI-COMPONENTS ANALYSIS AOAC Europe Section, ACE Analytical Community Europe	Barcelona, Spain	http://www.aoaceurope.com/2016/Barcelona2016v3.pdf
19-20.10.2016	Feed2016: 5th International Feed Conference: Present and future challenges	Geel, Belgium	http://www.feed2016.eu/
27-28.10.2016	5th International “Fresenius Feed Conference” Feed Additives – Animal Nutrition – Medicated Feed	Maritim Konferenzhotel Darmstadt/ Germany	https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/5th-international-fresenius-feed-conference-feed-additives-animal-nutrition-medicated-feed/
7-9.11.2016	The RME Conference Series – 11th conference Food Feed Water Analysis: Human Animal Diagnostics	Amsterdam, The Netherlands	http://www.rapidmethods.eu/
16-18.11.2016	“6th International Symposium on Food Packaging: Scientific Developments supporting Safety and Innovation (ILSI)	Barcelona, Spain	http://www.ilsio.org/Europe/Pages/Packaging-Materials-Symposium-2016-General-Information.aspx
28-29.11.2016	World Congress on Microbiology 2016	Valencia, Spain	http://microbiology.omicsgroup.com/europe/
1-2.12.2016	One Health Symposium Focus on Genomics of Pathogenic Escherichia coli	Utrecht, The Netherlands	http://www.iss.it/vtec/?lang=2&id=242&tipo=20
25-26.01.2017	SEAFOOD SAFETY NEW FINDINGS & INNOVATION CHALLENGES	Brussels, Belgium	www.ecsafeseafoodconference.com
09-13.07.2017	FEMS 7th Congress of European Microbiologists	Valencia, Spain	http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/landing/Pages/default.aspx





Labinfo