



# Labinfo

Informatieblad voor de erkende laboratoria voedselveiligheid

- 4 Analyse van spoorelementen, waar ligt de grens?
- 12 Impact van de klimaatverandering op mariene toxines
- 16 Detectie van voedselallergenen: state of the art en perspectieven voor de voedingscontrole
- 24 Analyse van pijnboompitten die PNS (pine nut syndrom) veroorzaken
- 32 Opsporen van STEC-uitscheidende runderen aan de hand van Droplet Digital PCR: Een detectie met duizenden druppels
- 37 Het gebruik van real time PCR kwantificatie voor de telling van thermofiele *Campylobacter* species op pluimveekarkassen
- 41 *Salmonella*-infecties : Identificatietechnieken voor een succesvol uitbraakonderzoek
- 48 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, Karlien Cheyngs, Nadia Waegeneers, Heidi Demaegdt, Ann Ruttens, Nathalie Gillard, Anne-Catherine Huet, Mélanie Planque, Marjolein Vandekerckhove, Isabel Taverniers, Jeroen Vancutsem, Koen Doms, Hans Rediers, Bavo Verhaegen, Els Van Coillie, Koen De Reu, David Triest, Alexandra Duarte, Katelijne Dierick, Nadine Botteldoorn, Sophie Bertrand, Wesley Mattheus, Pieter-Jan Ceysens, Mathieu Gand, Raymond Vanhoof, Sarah Denayer, Nancy Roosens en Sigrid De Keersmaecker

### 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,

De nationale referentielaboratoria (NRL) zijn één van de steunpilaren voor de goede werking van het laboratoriumnetwerk waarop het FAVV beroep doet. Om de dienstverlening van de NRL zo optimaal mogelijk af te stemmen op de behoeften van de diverse belanghebbenden, werden deze door het Bestuur Laboratoria in de loop van 2016 bevestigd omtrent de mogelijke herdefiniëring van het takenpakket van de NRL.

In het kader van deze enquête werden verschillende directies binnen de FAVV-administratie (DG Controlebeleid, DG Controle en de diensten van de Gedelegeerd Bestuurder) geïnterviewd, terwijl ook verscheidene laboratoria werden bevestigd (de 5 FAVV laboratoria, en een steekproef van erkende laboratoria, NRL en EU referentielaboratoria).

De enquête was niet alleen zeer leerrijk, ze was ook een uitstekende communicatiegelegenheid met alle betrokkenen. We ondervonden dat de verschillende belanghebbenden soms onvoldoende weten wat de NRL en het Bestuur Laboratoria nu al allemaal doen, zodat hierover een betere communicatie zal worden verzorgd in de stuur- en communicatiegroepen.

De verschillende belanghebbenden bleken onderscheiden verwachtingspatronen te hebben: DG Controlebeleid is bijvoorbeeld vooral geïnteresseerd in snelle informatie over de vooruitgang van de analytische mogelijkheden en over de eerste detectie van gevaren in de voedselketen; DG Controle heeft vooral nood aan snelle en betrouwbare analyses, evenals aan praktische opleidingen in verband met monsternamen en interpretatie van resultaten; de laboratoria verwachten dan weer voornamelijk informatie en technische ondersteuning bij het implementeren van methoden.

Over het algemeen is er een grote tevredenheid over de werking van de NRL. Naast wat nu al voorzien is en uitgevoerd wordt binnen de overeenkomsten tussen het FAVV en de NRL, kwamen in de enquête heel wat nuttige ideeën naar boven. Er is op dit vlak nog veel te doen, maar veel van wat gevraagd wordt, proberen we nu al te realiseren in de nieuwe overeenkomsten, en zal verder ook aan bod komen op de stuurgroepen en communicatiegroepen. De resultaten van de enquête zullen nog langere tijd als leidraad dienen bij de werking van het Bestuur Laboratoria in verband met de NRL en de laboratoria in het algemeen.

Ongeveer gelijktijdig met de publicatie van dit nummer van Labinfo worden ook de nieuwe NRL Chemie bekend gemaakt. Een van de vernieuwingen met aandacht voor nanotechnologie zal u niet ontgaan.

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

Bert Matthijs  
Directeur-generaal Laboratoria

# Analyse van spoorelementen, waar ligt de grens?

Karliën Cheyns, Nadia Waegeneers, Heidi Demaegdt en Ann Ruttens

Operational Direction Chemical Safety of the Food Chain  
 Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA-CERVA)  
 Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, Belgium

## Essentiële kenmerken en toxiciteit van spoorelementen

Er bestaan verschillende definities van “spoorelementen”. In dit artikel worden spoorelementen beschouwd als minerale elementen die voorkomen in levende weefsels, voedingsmiddelen en diëten in relatief lage concentraties of als “sporen”. Ze zijn gekend als de 78 elementen (Figuur 1) van het periodiek systeem, die overblijven nadat de zes hoofdgroepselementen (C, Ca, H, N, O en P) en de zes secundaire elementen (Cl, K, Mg, Na, S en Si) van het menselijk lichaam worden uitgesloten, alsook de zes edelgassen (Ar, He, Kr, Ne, Rn en Xe). Het gehalte aan spoorelementen in levende weefsels varieert tussen 0,01 en 100 mg kg<sup>-1</sup>.

1 H																	2 He										
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne										
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar										
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr										
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe										
55 Cs	56 Ba	57-70 *	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn									
87 Fr	88 Ra	89-102 **	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	114 Uuq														
* Lanthanide series																											
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb
** Actinide series																											
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No

Figuur 1 : Het periodiek systeem der elementen gecategoriseerd volgens 6 hoofdgroepselementen (rood), 6 secundaire elementen (oranje), 6 edelgassen (groen) en 78 spoorelementen

Voor verschillende van deze spoorelementen is bewezen dat ze noodzakelijk zijn voor de mens (vb. Co, Cr, Cu, Zn, Fe, I, Mo en Se), terwijl dit voor andere momenteel niet geweten is. Sommige van deze elementen zouden eveneens essentieel kunnen zijn (vb. B, Mn, Ni, Sn en V), maar andere worden beschouwd als mogelijk toxisch (vb. As, Al, Cd, F, Hg en Pb). Een element als "toxisch" bestempelen is moeilijk aangezien het de dosis is die het gif uitmaakt: een stof kan het schadelijke effect dat gelinkt is aan zijn toxische eigenschappen, slechts genereren indien het een gevoelig orgaan in het lichaam bereikt in een voldoende hoge concentratie (een voldoende hoge dosis) [1]. Analoog worden ook essentiële elementen toxisch bij hoge concentraties.

De kennis betreffende de toxiciteit van verschillende spoorelementen kwam al in de oudheid tot stand [2]. Hoewel de Romeinen de toxiciteit van lood (Pb) kenden, waren ze zo verzot op het diverse gebruik ervan dat ze de gevaren van lood minimaliseerden. Het gerucht gaat dat loodvergiftiging de ondergang van het Romeinse Rijk in de hand werkte. De acute toxiciteit van arseen (As) was goed gekend in de middeleeuwen, aangezien het vaak aangewend werd als een moordtechniek. Doordat de symptomen gelijkaardig zijn aan deze van cholera, wat in die tijd normaal was, bleef een vergiftiging met arseen vaak onopgemerkt.

In de laatste decennia na Wereldoorlog II, werd het milieu en de daarmee verbonden volksgezondheid een zaak van openbaar belang. Verschillende incidenten hebben heel wat aandacht gevestigd op de toxiciteit van bepaalde spoorelementen.

- In 1947 werd een ongewone en pijnlijke ziekte van reumatische aard opgetekend bij 44 patiënten uit een dorp aan de rand van de Jintsu Rivier in Japan. In de daaropvolgende jaren, werd de ziekte bekend als de "itai-itai"-ziekte (wat zoveel betekend als 'auw-auw' ziekte) in overeenstemming met het gegil van de patiënten als gevolg van de pijnlijke vergroeiingen van het skelet. De ziekte werd veroorzaakt door het hoge gehalte aan cadmium (Cd) in het gebied als gevolg van de intensieve mijnbouw in het nabijgelegen gebergte.
- Van 1932 tot 1968 werd methyلكwik in industrieel afvalwater, afkomstig van een chemische fabriek, geloosd in de Minamata baai, Japan. Langzamerhand kregen patiënten uit dit gebied te maken met verzwakte spieren, verlies van het zicht, hersenbeschadiging en uiteindelijk verlamming, waarbij ze in vele gevallen in coma vielen met de dood tot gevolg. De ziekte was gekend als de ziekte van Minamata en na grondig onderzoek werd in 1959 ontdekt dat de symptomen veroorzaakt werden door de consumptie van vis en ander voedsel dat met methyلكwik besmet was.

De wetenschap volgde de publieke ongerustheid en de essentiële kenmerken en toxiciteit van spoorelementen werden populaire onderzoeksthema's. Terzelfdertijd verhoogde de noodzaak aan middelen om deze elementen te analyseren. Thans staan vier spoorelementen (As, Cd, Pb, Hg) in de WHO-lijst van de 10 voornaamste chemische producten die leiden tot gezondheidsproblemen. Gezien drank en voeding veelvoorkomende wegen zijn waardoor de mens blootgesteld wordt aan toxische en essentiële spoorelementen, werd het noodzakelijk om deze matrices te analyseren.



## Analyse van sporelementen in food en feed

### Snelle analysemethoden

De analytische scheikunde van sporelementen werd voor het eerst beschreven in 1820 aan de hand van gravimetrische methodes die gebruik maakte van PbS voor de analyse van lood. Een eeuw later, in 1925, slaagde Helmut Fischer erin sporelementen te detecteren door middel van een proces met Dithizon [3]. Als reagens kan Dithizon de aanwezigheid van sporelementen in kwalitatieve en kwantitatieve zin aantonen. Door binding van Dithizon met bepaalde elementen, worden binnenin de molecule gekleurde complexen gevormd, die oplosbaar zijn in niet-polaire organische solventen. De kleuring van deze oplossingen is zeer intens, en de typische kleur wordt bepaald door de atoomradius van het metaal dat in het complex aanwezig is. De reactietijden variëren tussen de verschillende sporelementen. Bijgevolg kunnen meerdere kleuringen voorkomen afhankelijk van de elementconcentraties. Hierdoor waren, naast het kwalitatieve resultaat (het Dithizon reagens bindt op Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Mn, Co, Ni,) ook semi-kwantitatieve indicaties met betrekking tot het contaminant mogelijk op een laag "parts per million" (ppm) niveau of zelfs op een "parts per billion" (ppb) niveau (Figuur 4). Verbeterde varianten van deze methode werden tot in de jaren '60 gebruikt voor het kwantificeren van metalen [4,5].

### Atoom Absorptie Spectroscopie (AAS)

In de jaren '60 werd de bestaande kennis over spectroscopie (begonnen in 1672 met de bevindingen van Newton dat zonlicht in kleuren kon gescheiden worden door het in een prisma te laten schijnen) aangewend om methodes te ontwikkelen voor de analyse van sporelementen in biologische matrices. De atoomabsorptiespectroscopie was geboren en was gebaseerd op het principe dat elektronen van vrije atomen in gasvormige toestand naar hogere atoomorbits kunnen overgaan door een bepaalde hoeveelheid energie te absorberen (straling van een bepaalde golflengte). Deze energie (golflengte) is specifiek voor een bepaald element, waardoor het naast kwantificatie kansen biedt om elementen te identificeren [6].

Een typische atoomabsorptiespectrometer bestaat uit een lichtbron die fotonen (energiebron) afgeeft, een atoomcel om vrije atomen van het analiet te produceren, een monochromator om de juiste golflengte te isoleren en een fotoversterkersbuis als detector. De rol van de detector is het converteren van een lichtsignaal naar een elektrisch signaal. De eerste AAS-modellen maakten gebruik van vlamverstuivers (F-AAS). De elementen worden via verstuiving in de vlam ingebracht vanuit een vernevelaar. In de vlam wordt het staal gedroogd, verdampt, geatomiseerd en geïoniseerd. De F-AAS is onderworpen aan spectrale, fysische en chemische interferenties die kunnen leiden tot onnauwkeurige resultaten. Detectielimieten (LOD) in de F-AAS zijn beperkt tot het ppm niveau door de relatieve inefficiëntie bij het inbrengen van het staal door pneumatische verneveling gecombineerd met de korte tijd waarbinnen de analietatomen zich in de straal bevinden en hun verdunning door de overvloedige aanwezigheid van vlamgassen (Figuur 4) [7,8].

Hoewel elektrothermische verstuivers (ET-AAS) ontwikkeld waren vóór vlamverstuivers, zijn ze niet populair geweest tot er recent verbeteringen op het detectieniveau werden aangebracht. Ze maken gebruik van grafietbuizen waarbij de temperatuur stapsgewijs verhoogd wordt. Elektrothermische verstuiving droogt eerst het staal en verdampt het solvent en onzuiverheden, atomiseert daarna het staal en verhit het daaropvolgend tot een extreem hoge temperatuur om de grafietbuis te zuiveren. De detectielimieten zijn fors verbe-

terd vergeleken met F-AAS tot om en nabij ppb gehalten, aangezien de atomen in ruimte beperkt worden (Figuur 4), maar de chemische interferenties zijn groot, net als de "memory effecten". ET-AAS is in het bijzonder onderhevig aan chloride interferenties. De optimalisering van het ET-AAS apparaat heeft ertoe geleid dat het een betrouwbaar en wijdverspreid instrument is om spoorelementen in levensmiddelen te analyseren en het is nog steeds een budgetvriendelijk en betrouwbaar alternatief voor de ICP-MS.

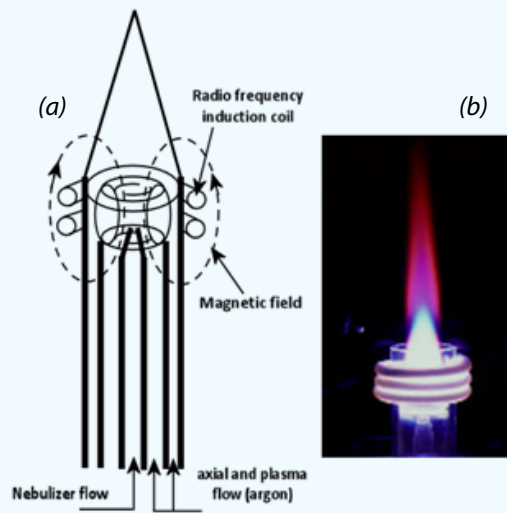
## **ICP-OES : Inductief gekoppeld plasma - optische emissiespectroscopie**

De kennis van optische emissiespectroscopie (OES) (1) vond haar oorsprong in de 18de eeuw, toen een jonge wetenschapper zijn waarnemingen van een helder geel licht beschreef, afkomstig van een vlam waarbij een mengeling van alcohol en zeezout verbrand werd [9]. De gele kleur verdween wanneer er geen zout aanwezig was in de alcohol. De techniek is gebaseerd op het feit dat atomen omgezet worden in een geëxciteerde toestand waarbij ze fotonen uitzenden met een specifiek spectrum wanneer ze terugvallen naar hun oorspronkelijke toestand. Eén van de eerste toepassingen was de bevestiging van nieuw ontdekte atomen in het begin van de 20ste eeuw. In het midden van de 20ste eeuw werd de techniek geoptimaliseerd en werd de kwantificatie van spoorelementen vergemakkelijkt. Metalen werden grotendeels gedetermineerd door middel van vlamboog/vonken (elektrische ontlading) om atomen te exciteren, terwijl het aanwenden van een vlam geschikter bleek voor alkalimetalen en andere gemakkelijk exciteerbare elementen.

In de jaren '60 en '70 nam de populariteit van zowel vlam als vlamboog/vonk optische emissiespectrometrie af door de succesvolle resultaten die de AAS-technologie boekte. De AAS-techniek heeft echter als voornaamste nadeel dat ze slechts één element per keer meet en dat de kalibratiemarges beperkt zijn. Toen in 1964 het gebruik van inductief gekoppelde plasma (ICP) bij atmosferische druk zijn nut bewezen had bij elementanalyse via OES [10], won de techniek bijgevolg opnieuw aan belang. Door het plasma werd een hoge stabiliteitsgraad verkregen, was het mogelijk verschillende elementen te exciteren en verhoogde de detectiegevoeligheid ten opzichte van vlam OES. Vanaf 1973 werd de techniek op grote schaal gebruikt. Bovendien namen meer en meer onderzoekers uit de academische wereld, overheden en de industrie deel aan de ontwikkeling en optimalisering van ICP.

(1) Ook gekend onder atoomemissiespectroscopie (AES)





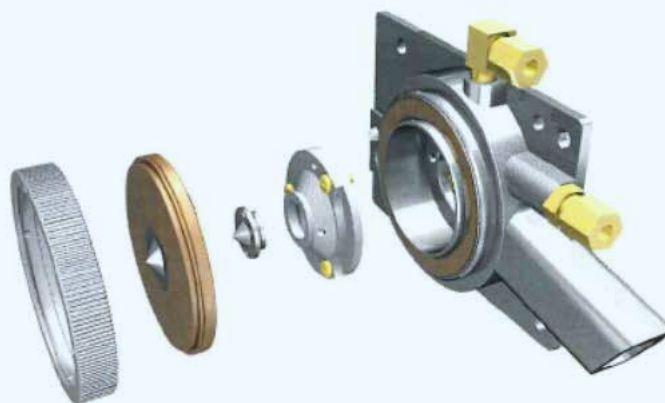
Figuur 2 : (a) Schematisch overzicht van een toorts die bestaat uit drie concentrische kwartsbuizen die in een watergekoelde, koperen radiofrequentiespoel zitten; (b) inductief gekoppeld plasma.

Het argon ICP wordt gevormd in een speciaal daartoe ontworpen toorts, die bestaat uit drie concentrische kwartsbuizen die in een watergekoelde, koperen radiofrequentiespoel zitten (Figuur 2a). Er worden drie stromen argon aangevoerd. Het binnenste gas of dragergas voert het verstoven staal in de ICP aan, terwijl het buitenste gas het plasma helpt vormen en verhindert dat de toorts smelt. Wanneer radiofrequentie-energie aan de spoel wordt geleverd, wordt een intens magnetisch veld gecreëerd. Initiële elektronen die door een vonk van een Teslaspoel gegenereerd worden, worden door het veld versneld en botsen met argonatomen, waardoor een zichzelf onderhoudend plasma geproduceerd wordt (Figuur 2b). Chemische interferenties worden doeltreffend geëlimineerd omdat de energie van het plasma veel groter is dan deze van een vlam zodat zelfs elementen die hittebestendige oxiden vormen, efficiënt geatomiseerd worden. Spectrale overlap is daarentegen een aanzienlijk groter probleem in ICP-OES dan in F-AAS omdat door de hogere temperatuur in principe alle elementen die in het plasma aanwezig zijn, atomen (en ionen) in verschillende excitatietoestanden zullen genereren. De voornaamste beperking van ICP-OES is het feit dat voor sommige toepassingen de haalbare detectielimieten, typisch op ppm niveau of iets lager, onvoldoende zijn (Figuur 4). Dit probleem werd ongeveer 25 jaar geleden opgelost door de ICP te koppelen aan de massaspectrometer [11].

## ICP-MS - Inductief gekoppelde plasma-massaspectroscopie

Quadrupool massaspectrometers (MS) werden reeds gebruikt bij gaschromatografie en de belangrijkste uitdaging tijdens de ontwikkeling van ICP-MS was het extraheren van ionen uit het hete, compacte plasma in het hoge vacuüm milieu van de massa-analysator. In moderne interfaces worden hiervoor twee watergekoelde, nikkel of platina 'cones' gebruikt (Figuur 3). ICP-MS heeft LOD's die vergelijkbaar zijn met deze van ET-AAS (ppb of lager, Figuur 4) maar behoudt daarnaast het vermogen om multi-element- en isotoopanalyses uit te voeren. Veel voorkomende ongemakken zijn de afzetting van vast materiaal op de top van de 'cones', voornamelijk wanneer analyses van suspensies met hoge gehalten aan opgeloste vaste stoffen worden uitgevoerd. Dit kan voorkomen worden door het staal te verdunnen, echter met een verhoging van de LOD tot gevolg. Belangrijker bij deze techniek is de aanwezigheid van isobare interferenties (vb. die van  $^{40}\text{Ar}$  op de meting van  $^{40}\text{Ca}$ ) en van polyatoomionen, afkomstig uit het plasma of de staalmatrix, bij dezelfde massa/lading verhouding als het analietion.





*Figuur 3 : Typische conussen (sampler en skimmer) die als interface tussen luchtdruk en de hoge vacuüm van de quadropool gebruikt worden in de ICP-MS apparaten.*

In de nieuwste generatie van commerciële ICP-MS apparaten zijn middelen ingebouwd om te vermijden dat er polyatoomion interferentie optreedt. Moderne instrumenten maken gebruik van botsing/reactiecellen waarbij een inert gas ( $\text{He}$ ) of reactiegas ( $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{O}_2$ ) de ionen opbreekt in hun atoomcomponenten of door reactie de atoommassa wijzigt. Alternatieve ICP-MS systemen met een magnetische sensor (sectorfield of hoge resolutie ICP-MS), time-of-flight massaspectrometers (TOF-ICP-MS) of een tweede quadropool (ICP-MS-MS) werden ontwikkeld om kwantificatieproblemen door interferenties te vermijden. Het enkelvoudige quadropool-gebaseerd systeem is momenteel echter het meest commercieel beschikbaar en biedt een oplossing voor de meeste klanten.

## **Neutronen activeringsanalyse**

Naast de spectroscopische analysetechnieken werd in 1936 een andere techniek voor elementanalyse ontdekt [12]: de neutronen activeringsanalyse (NAA) is gebaseerd op kernovergangen. Er werd ontdekt dat stalen die bepaalde zeldzame aardmetalen bevatten zeer radioactief werden nadat ze werden blootgesteld aan een neutronenbron. Om een NAA-analyse uit te voeren, wordt het staal via afstandsbediening in een kernreactor geplaatst en bestraald met een gekende stroom thermische neutronen. Stabiele isotopen kunnen deze neutronen opvangen en veranderen zo in radionucliden. Vervolgens wordt het staal verwijderd uit de reactor en de activatieproducten worden gekwantificeerd, gewoonlijk door middel van gammaspectrometrie. Instrumentele neutronen activeringsanalyse INAA was de eerste techniek die een niet-destructieve, multi-elementanalyse kon uitvoeren op kleine, vaste stalen met een LOD in het parts-per-million bereik. Nadeel is de noodzaak voor gespecialiseerde bestralingsinrichtingen en voor hoog opgeleid personeel, waardoor de beschikbaarheid van de techniek beperkt is tot nationale inrichtingen of werknemers die toegang hebben tot een lokale onderzoeksreactor.

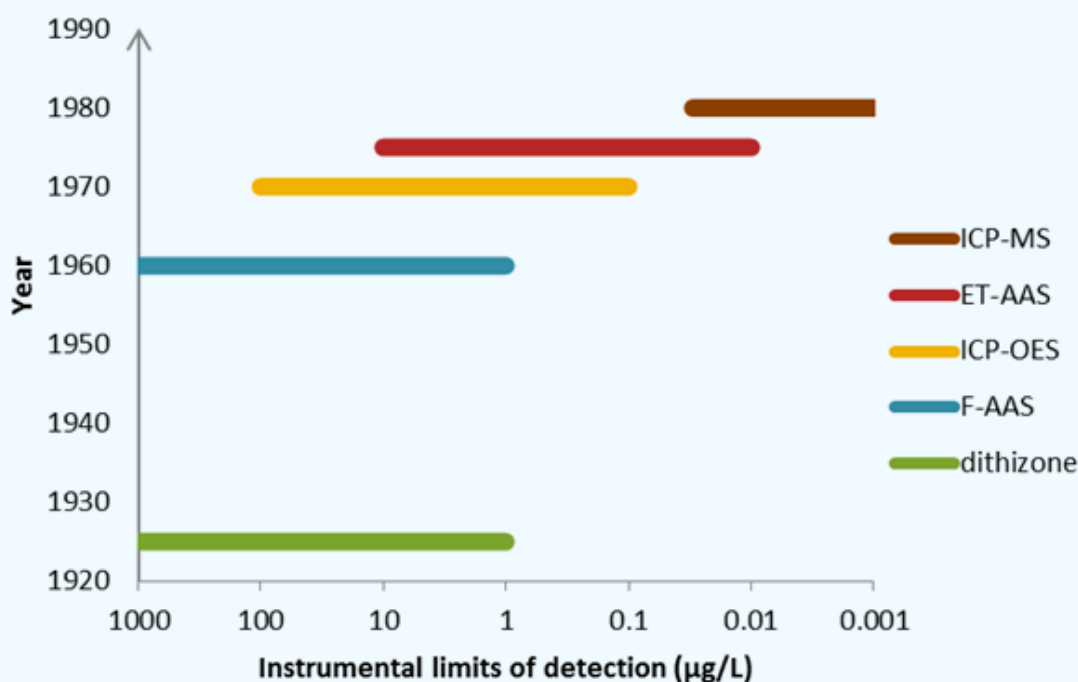
De voormelde technieken worden over het algemeen gebruikt voor de analyse van sporelementen in voeding en diervoeder. Voor geologische of archeologische doeleinden zijn meer technieken beschikbaar (vb. laser-geëxciteerde atoomfluorescentie spectrometrie, röntgenstralen fluorescentie (XRF) en laser-geïnduceerde afbraak spectroscopie).



## Vandaag...

Er is een groeiende tendens naar moderne ICP-MS apparaten (met botsings-/reactiecellen) in controlelabo's. Zo hebben bij de meest recente Ringtest (2016) van het Belgische Nationale Referentielaboratorium voor spoorelementen in voeding en diervoeder, 9 van de 10 deelnemers ICP-MS gebruikt voor de analyse van As, Cd en Pb, terwijl dit in 2010 nog maar 3 van de 8 labo's was. Ter bescherming van de Europese burgers legt de Europese Commissie beperkingen op voor spoorelementen in voeding en diervoeder, die zo laag als redelijkerwijs haalbaar zijn. In recente updates van de Europese verordening betreffende bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen (EC 1881/2006) [13,14,15] worden de laagste maximumgehalten voor Cd en Pb vastgelegd op respectievelijk 5 µg/kg en 10 µg/kg voor vloeibare zuigelingenvoeding. Rekening houdend met de voormalige regel (overeenkomstig EG 2007/333) [16] dat de kwantificatielimieten (LOQ=3.3\*LOD) voor levensmiddelen maximaal één of twee vijfde van de ML mogen bedragen, zouden de officiële controlelaboratoria in staat moeten zijn om Cd en Pb vanaf 1 µg/kg en 4 µg/kg te kwantificeren. Zelfs met moderne ICP-MS toestellen is het bijna onmogelijk om deze performantiecriteriën te halen. Dit heeft geleid tot een herziening van de performantiecriteriën en voor lage ML ( $\leq 10$  µg/kg) kan de kwantificatielimiet nu (vanaf april 2016) twee vijfde bedragen van de ML of eraan gelijk zijn [17].

Hoewel moderne analyseapparatuur het mogelijk maakte om zeer lage concentraties van spoorelementen te detecteren, wordt de reglementering nog steeds geconfronteerd met de beperkingen van de huidige analysemogelijkheden.



Figuur 4 : Historiek van populaire analysemethoden voor de kwantificatie van spoorelementen met instrumentele detectielimieten (µg/L). De verdunningsfactoren, die nodig zijn voor de staalvoorbereiding, zetten deze LOD-waarden om in LOD-waarden in matrices.

## Bibliografie

- (1) Paracelsus. Die dritte Defension wegen des Schreibens der neuen Recepte. Septem Defensiones 1538.
- (2) Hernberg, S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am. J. Ind. Med.* 2000, 38 (3), 244–254.
- (3) Fischer, H. Compounds of diphenylthiocarbazon with metals and their use in analysis. *Wiss. Veröffentlich. Siemens-Konzern* 1925, 4 (158).
- (4) Synder, L. J. Improved Dithizone Method for Determination of Lead. *Anal. Chem.* 1947, 19 (9), 684–687.
- (5) Saltzman, B. E. Colorimetric Microdetermination of Cadmium with Dithizone. *Anal. Chem.* 1953, 25 (3), 493–496.
- (6) Koirtjohann, S. R. A history of atomic absorption spectroscopy from an academic perspective. *Anal. Chem.* 1991, 63 (21), 1024A – 1031A.
- (7) Alloway, J. B. *Heavy Metals in Soils; Environmental Pollution*, 2013.
- (8) Barron, A. R. *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*; 2014.
- (9) Melvin, T.; Brashear, J. A. *Observations on light and colours (1752); 1914.*
- (10) Greenfield, S.; Jones, I. L. I.; Berry, C. T. High pressure plasmas as spectroscopic emission sources. *Analyst* 1964, 89, 713–720.
- (11) Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E. Spectrometric Determination of Trace Elements. *Anal. Chem.* 1980, 52, 2283–2289.
- (12) Hevesy, G.; Levi, H. *Danske Videnske. Selsk Mat fys Medd* 1936, 14 (5).
- (13) European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2006, L364 (78), 5–24.
- (14) European Commission. Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2014, L138 (75), 75–79.
- (15) European Commission. Commission Regulation (EU) 2015/1006 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2015, L161 (14), 1993–1995.
- (16) European Commission. Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2007, No. 333, 29–38.
- (17) European Commission. Commission Regulation (EU) 2016/582 of 15 April 2016 amending Regulation (EC) No 333/2007 as regards the analysis of inorganic arsenic, lead and polycyclic aromatic hydrocarbons and certain performance criteria for analysis. *Off. J. Eur. Union* 2016, L 101/3.

[karlien.cheyns@coda-cerva.be](mailto:karlien.cheyns@coda-cerva.be)



# Impact van de klimaatverandering op mariene toxines

Nathalie Gillard en Anne-Catherine Huet

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

## Opkomende mariene toxines

Mariene toxines omvatten een zeer grote groep van toxines die worden geproduceerd door dinoflagellaten, roodwieren, diatomeeën en ook bacteriën. Naast de welbekende toxines (de ASP-toxines, voluit de *Amnesic Shellfish Poisoning toxins*, die amnesie veroorzaken; de DSP-toxines, voluit de *Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins*, die diarree veroorzaken en de PSP-toxines, voluit de *Paralytic Shellfish Poisoning toxins*, die verlamming veroorzaken), zijn in de loop der jaren nieuwe toxines ontdekt, zoals azaspiracides (AZ), yessotoxines (YTX), pectenotoxines (PTX) en meer recent pinnatoxines, palytoxines, ciguatoxines, tetrodotoxines, brevetoxines en spirolides.

Deze opkomst van mariene toxines kan te wijten zijn aan 2 situaties: de opkomst van nieuwe toxines/analoge stoffen of de detectie van gekende toxines, maar in geografische gebieden waarin ze nog nooit werden aangetroffen.

**Tetrodotoxines** zijn een klasse van extreem toxische neurotoxines. In tegenstelling tot andere mariene toxines is hun accumulatie in visserijproducten (vissen en weekdieren) nooit in verband gebracht met microalgen, maar met bacteriën. Gevallen van intoxicatie door TTX bleven lange tijd beperkt tot Azië (Japan, China, Hong Kong, Thailand en Bangladesh). In Europa werden TTX voor het eerst gedetecteerd in Spanje in 2007 [1] en meer recent in Griekenland in 2012 [2], in Engeland in 2013 [3] en in Nederland in 2016.

**Ciguatoxines** zijn ook een soort van opkomende toxines. Hun aanwezigheid werd gedurende lange tijd enkel gerapporteerd in tropische gebieden (de Caraïben, de Indische Oceaan en de Stille Oceaan), maar recent ook op de Canarische eilanden, in de Middellandse Zee en in Australië [4]. Het is belangrijk om te benadrukken dat jaarlijks tussen de 50.000 en 500.000 intoxicaties te wijten zijn aan ciguatoxines, wat in feite de meest belangrijke oorzaak is van ziektes van niet-bacteriële oorsprong tengevolge van de consumptie van vis [5].

**Cyclische imines** (gymnodimines, pinnatoxines, pteriatoxines, spirolides) zijn een nieuwe klasse van mariene toxines waarvan het toenemend voorkomen in warm oceaanwater en de potentiële toxiciteit nopen tot waakzaamheid bij de monitoring [6].

## Mogelijke oorzaken van het opkomen van deze toxines: de klimaatverandering?

De klimaatverandering vormt een aanzienlijke bedreiging voor het overleven van mensen en dieren en heeft alombekende directe gevolgen, zoals het smelten van de ijskappen, de verhoging van de zeespiegel en de opwarming van de oceanen. Andere gevolgen zijn minder evident, maar zouden een even grote impact kunnen hebben: een verzuring van de oceanen die gelinkt is aan de verhoging van de concentratie aan CO<sub>2</sub> in de

atmosfeer [7], hogere windsnelheden, een verhoging van de stabiliteit van de waterkolommen die te wijten is aan temperatuurstratificatie, een wijziging van de circulatie van de watermassa's,... Al deze fenomenen zouden zo het evenwicht tussen diatomeeën en dinoflagellen, evenals de ecotoxicologie van deze soorten kunnen wijzigen [8] en dus uiteindelijk een impact kunnen hebben op de hoeveelheid en het type van mariene toxines dat geproduceerd wordt [9].

Het is quasi onmogelijk om een model op te stellen van het verband "klimaatsverandering-opkomen van mariene toxines" omwille van het groot aantal variabelen waarmee rekening moet worden gehouden. Er zijn echter duidelijke aanwijzingen dat de frequentie van de toxische episodes en de proliferatie van algen (HAB oftewel *Harmful Algae Bloom*) toeneemt [10], waarbij toxines frequent opduiken in nieuwe geografische gebieden.

Zo hebben ciguatoxines, tetrodotoxines, palytoxines, cyclische imines, ostreocines en ovatoxines, die in het verleden enkel werden aangetroffen in warme wateren, recentelijk incidenten veroorzaakt in gematigde gebieden.

De wetenschappelijke gemeenschap erkent echter ook dat niet alle gevallen enkel in verband gebracht kunnen worden met de klimaatopwarming.

Menselijke activiteiten [11] kunnen ook rechtstreeks verantwoordelijk zijn voor :

- de verspreiding van toxische soorten door het transport van ballastwater en -sediment (bijvoorbeeld aan de kusten van Schotland);
- de aanwezigheid in de Middellandse Zee van vissen waarin tetrodotoxines zich opstapelen naar aanleiding van de opening van het Suezkanaal en de invasie van vissoorten die afkomstig zijn uit de Rode Zee en de Indische Oceaan.
- de toename van gevallen van algenbloei tengevolge van eutrofiëring van de Zwarte Zee.

Ten slotte, maakt de verbetering van de analytische methodes ook een almaar gevoeliger detectie en identificatie van opkomende mariene toxines mogelijk. Het is dus ook mogelijk dat de gevallen die de laatste jaren worden gedetecteerd in verband gebracht kunnen worden met de analytische vooruitgang en niet gelinkt zijn aan de klimaatsverandering. Deze hypothese werd bijvoorbeeld aangehaald om het opkomen van cyclische imines en azaspiraciden te verklaren.

## Uitdagingen voor de volksgezondheid.

Vanuit het oogpunt van volksgezondheid, veroorzaakt de opkomst van mariene toxines in zeevruchten ernstige problemen.

Deze stoffen worden immers niet beoogd in de wetgeving en dus hebben de analytische methodes die doorgaans worden gebruikt in het kader van de controleplannen geen betrekking op deze stoffen. In Europa is de analytische strategie bijvoorbeeld gebaseerd op referentiemethodes die geëvolueerd zijn in de loop der jaren en die overgegaan zijn van biologische methodes naar fysico-chemische methodes (HPLC-UV voor ASP's, HPLC-fluorescentie voor PSP's en LC-MS/MS voor lipofiele toxines). De routinemethodes laten dus toe om gekende toxines te detecteren die zijn opgenomen in hun toepassingsveld, maar ze kunnen niet worden gebruikt om opkomende toxines te detecteren. Om de voedselveiligheid te garanderen, is het dus belangrijk dat de biologische methodes periodiek worden toegepast bij de controle van productiegebieden voor de detectie van opkomende mariene toxines, zoals voorzien in Verordening 2011/15/EU.

Ten slotte, is er vaak een gebrek aan analytische referentienormen en toxicologische gegevens voor opkomende toxines. Deze gebreken verhinderen ook respectievelijk de ontwikkeling van analytische methodes en het vastleggen van actielimieten.



## Bibliografie :

- [1] Rodriguez, P.; Alfonso, A.; Vale, C.; Alfonso, C.; Vale, P.; Tellez, A.; Botana, L.M. First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Anal. Chem.* 2008, 80, 5622–5629.
- [2] Vlamis A., Katikou P., Rodriguez I., Rey V., Alfonso A., Papazachariou A., Zacharaki T., Botana A., Botana L. First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins.* 2015, 7, 1779-1807.
- [3] Turner, A.D.; Powell, A.; Schofield, A.; Lees, D.N.; Baker-Austin, C. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Euro Surveill.* 2015, 20.
- [4] Kohli, G. S., Murray, S. A., Neilan, B. A., Rhodes, L. L., Harwood, D. T., Smith, K. F., Meyer, L., Capper, A., Brett, S., and Hallegraef, G. M. High abundance of the potentially maitotoxic dinoflagellate *Gambierdiscus carpenteri* in temperate waters of New South Wales, Australia. *Harmful Algae.* 2014, 39, 134–145.
- [5] Kohli, G. S., Farrell, H., and Murray, S. A. *Gambierdiscus*, the cause of ciguatera fish poisoning: an increased human health threat influenced by climate change, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) 2015, pp 273–312, De Gruyter, Berlin.
- [6] Stivala C.E., Benoit E., Araoz R., Servent D., Novikov A., Molgo J., Zakarian A. Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins. *Nat Prod Rep.* 2015, 32(3), 411-435.
- [7] Nikinmaa, M., and Anttila, K. (2015) Responses of marine animals to ocean acidification, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) pp 99–123, De Gruyter, Berlin. [8] Murray, S., John, U., and Kremp, A. *Alexandrium* spp.: genetic and ecological factors influencing saxitoxin production and proliferation, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) 2015, pp 125–154, De Gruyter, Berlin.
- [9] Otero, P., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Cabado, A. G., Vieites, J. M., and Botana, L. M. Effects of environmental regimens on the toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010, 29, 301–310.
- [10] Hallegraef, G. M. Harmful marine algal blooms and climate change: progress on a formidable predictive challenge, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) 2015, pp 181–193, De Gruyter, Berlin.
- [11] Botana L.M Toxicological perspective on climate change : aquatic toxins. *Chemical Research in Toxicology.* 2016, 29, 619-625

[info@cergroupe.be](mailto:info@cergroupe.be)



[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cwall99\\_lg.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cwall99_lg.jpg)



# Detectie van voedselallergenen: state of the art en perspectieven voor de voedingscontrole

Mélanie Planque<sup>1</sup>, Marjolein Vandekerckhove<sup>2</sup>, Isabel Taverniers<sup>2</sup> en Nathalie Gillard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CER Groep - Departement Gezondheid, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie

<sup>2</sup>ILVO, eenheid Technologie & Voeding, Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke

Voedselallergie wordt gedefinieerd als een nadelige immunologische respons na inname van bepaalde voedingsmiddelen die door een gezond persoon in dezelfde hoeveelheden wel worden verdragen. De symptomen en ernst van de reacties variëren van patiënt tot patiënt en worden geassocieerd met een variatie aan symptomen die in het ergste geval kunnen leiden tot een anafylactische shock [1]. Met een stijgende prevalentie die de laatste decennia wordt waargenomen, tonen huidige schattingen aan dat globaal 5% van de volwassenen en minstens 8% van de kinderen getroffen worden door een voedselallergie [2]. Ondanks de talrijke uitgevoerde klinische studies, houdt de tot nu toe enige preventieve maatregel in dat de verantwoordelijke allergene ingrediënten uit het dieet van de patiënt moeten worden vermeden. Hierdoor verplicht de Europese richtlijn EC/1169/2011 dat de 14 belangrijkste allergene ingrediënten moeten vermeld worden op het etiket indien aangewend als ingrediënt of product daarvan [3,4]. Echter kunnen voedingsproducten ook ongewenste allergene componenten bevatten - door bijvoorbeeld contaminatie in het productieproces - waar gevoelige allergische patiënten ook ernstig tegen kunnen reageren [5]. Ter bescherming van de allergische consumenten gaan voedingsproducenten hierdoor meer en meer gebruik maken van vrijblijvende waarschuwingsetikettering (PAL of *Precautionary Allergen Labelling*), zoals bv. "kan sporen van noten bevatten". Omdat er een gebrek is aan regulatie tussen deze PAL etikettering en het allergenen risicomangement, wordt PAL meer en meer aangewend waardoor deze onbetrouwbaar wordt en onnodig het dieet van de allergische consument beperkt [6].

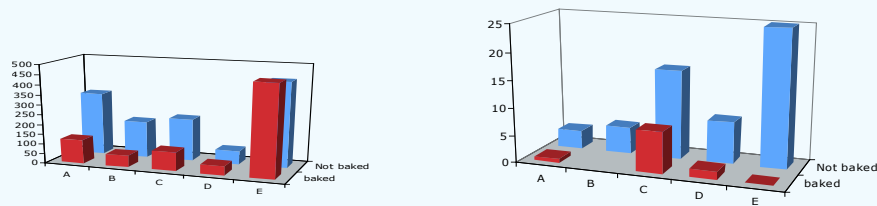
Ter bescherming van de allergische consumenten en om kostelijke terugroepingen van voedselproducten tegen te gaan, zijn betrouwbare detectiemethoden voor het opsporen van voedingsallergenen noodzakelijk. Echter hebben de voedselcontrole labo's te maken met moeilijkheden en beperkingen van de bestaande kits voor opsporing van voedselallergenen.

## 1/ Beschikbare methoden voor de detectie van allergenen in voeding

De meest gebruikte methoden zijn gebaseerd op de herkenning van proteïnen van de allergene voedingsmiddelen door gebruik te maken van specifieke antilichamen. Voorbeelden zijn *lateral flow devices* en *enzyme-linked immunosorbent assay's* (ELISA). Ondanks hun gebruiksvriendelijkheid, hoge specificiteit en sensitiviteit hebben eiwit-gebaseerde tests beperkingen. Ten eerste kunnen wijzigingen aan de te herkennen



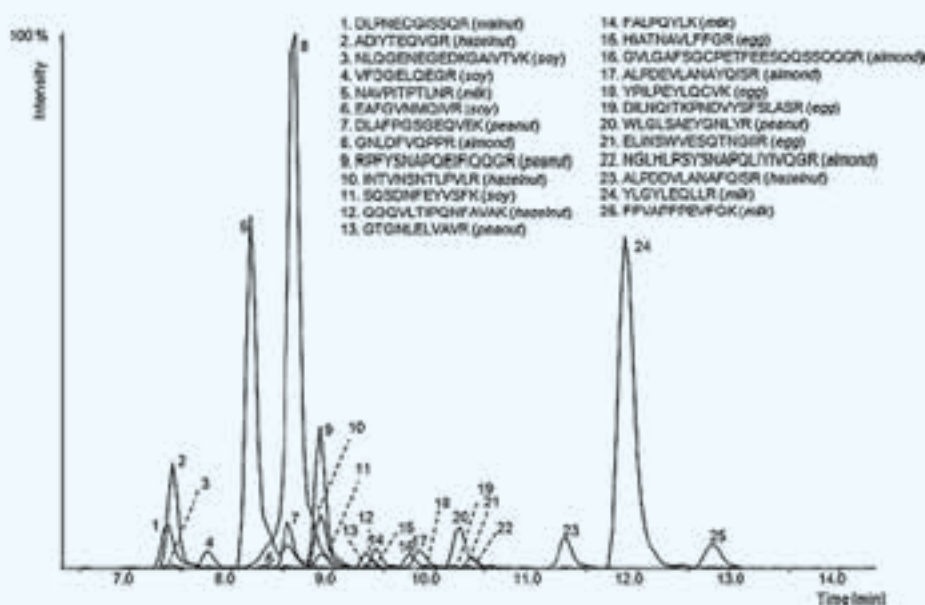
eiwitten door voedselbewerking en/of de aanwezigheid van interfererende componenten (zoals polyfenolen, hoog vetgehalte, enz.), de binding van deze antilichamen tegenwerken. Dit kan leiden tot onderschattingen of vals negatieve resultaten, zoals wordt aangetoond in Figuur 1 [7–10]. Ten tweede is er de mogelijkheid dat de antilichamen homologe proteïnen herkennen die aanwezig zijn in andere voedingsmiddelen, waardoor vals positieve resultaten kunnen ontstaan (= kruisreactiviteit).



*Figuur 1: Analytische resultaten voor 1000 mg/kg melkpoeder (Nationaal instituut voor Standaarden en Technologie SRM 1549a) aanwezig in gebakken (rood) en niet-gebakken koekjes (blauw) bekomen d.m.v. verschillende ELISA kits (A t/m E) voor (A) caseïne - en (B)  $\beta$ -lactoglobulin detectie [7]  
[ x-as: ELISA kits ; y-as: geschatte concentratie (eenheid van de kit) ]*

Naast de eiwit-gebaseerde methoden bestaan er DNA-gebaseerde methoden zoals de *real-time Polymerase Chain Reaction* (qPCR). Deze techniek is een indirecte methode, daar het de aanwezigheid van DNA aantooit van het allergene ingrediënt. De detectie van DNA is echter geen garantie dat de allergene proteïnen verantwoordelijk voor de allergische reactie, aanwezig zijn in het voedingsproduct. Ook kunnen bij deze techniek vals positieve resultaten bekomen worden (bijvoorbeeld verwarring tussen de detectie van kippen- en ei-DNA) [11]. Echter dient opgemerkt te worden dat vals positieve resultaten ook bekomen worden met ELISA, zoals sommige ELISA's voor mosterd die kruisreactiviteit vertonen met koolzaad [12].

De noodzaak aan betrouwbare analytische detectiemethoden, heeft onderzoekers aangezet tot het ontwikkelen van massaspectrometrische methoden als alternatieve techniek ter bevestiging [13]. *Ultra-high performance liquid chromatography* (= UHPLC-MS/MS) is gebaseerd op de analyse van peptiden na enzymatische digestie [14]. Ondanks de hoge investeringskost en de nood aan getraind personeel, heeft deze methode de voordelen dat ze verschillende allergenen kan analyseren in één enkele analyse (Fig. 2). UHPLC kan tevens over een hoge sensitiviteit en specificiteit beschikken en is niet afhankelijk van antilichaamherkenning, waardoor gewijzigde proteïnen nog gemakkelijker gedetecteerd kunnen worden.



Figuur 2: Chromatogrammen afkomstig van MRM (Multiple Reaction Monitoring) transitie van 7 allergene ingrediënten toegevoegd aan een referentiemateriaal, nl. een gebakken brood, met een concentratie van 1000 mg/kg per allergen ingrediënt [15].

## 2/ Voedselallergenen: resterende uitdagingen

Ondanks het beschikbaar zijn van diverse commerciële detectiekits voor allergenen, bruikbaar voor de voedselproducenten en -autoriteiten, blijft het detecteren en kwantificeren van voedselallergenen in de praktijk een grote uitdaging voor de laboratoria.

### 2.1 Gebrek aan opgelegde drempelwaarden

Drempelwaarden kunnen beschouwd worden als de maximale hoeveelheden allergenen die kunnen getolereerd worden zonder nadelige reacties te veroorzaken bij de patiënten. Tot op heden zijn er nog geen wettelijk opgelegde drempelwaarden voor allergenen, enkel de aan- of afwezigheid is tot nu het criterium. Dit zorgt er echter voor dat heel kleine hoeveelheden die gedetecteerd worden maar geen allergische reactie veroorzaken, toch gelabeld worden en dus geweerd worden uit het dieet van de patiënt.

Er werden reeds pogingen ondernomen om drempelwaarden te implementeren in de wetgeving rond etikettering. Zo werd het *Voluntary Incidental Trace of Allergen Labelling* (VITAL) systeem bedacht in Australië en Nieuw-Zeeland, om voedselproducenten te helpen in het risicomanagementsysteem betreffende kruiscontaminatie van allergenen tijdens de voedselproductie. VITAL gebruikt hiervoor globale drempelwaarden van rauwe en verhitte allergenen, gebaseerd op klinische data [16,17]. Dit systeem heeft echter nog geen enkele wetgevende waarde binnen Europa, ondanks het feit dat nationale voedselautoriteiten er vaak naar refereren tijdens de risicobepaling van allergenen.

## 2.2 Gebrek aan harmonisatie tussen detectiemethoden

### 2.2.1 Verschil tussen de gebruikte eenheden en referentiemateriaal

Er bestaan reeds tal van DNA-, proteïne- en peptide-gebaseerde methoden ontwikkeld door verschillende laboratoria en kit providers. Mede door deze wildgroei aan detectiekits op de markt, moeten de voedselindustrie en –autoriteiten een keuze maken tussen de verschillende methoden of deze in combinatie aanwenden. Het gebrek aan gemeenschappelijk referentiemateriaal en de discrepantie tussen de toegepaste eenheden bemoeilijkt onderlinge vergelijking tussen bestaande kits, zelfs tussen kits gebaseerd op dezelfde methode als weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Vergelijking van standaarden gebruikt door verschillende ELISA-leveranciers.

Leverancier	Formaat	Standaard	Sensitiviteit (LOQ)(mg/kg)	Bereik voor kwantificatie (mg/kg)
Kit 1	sandwich	Caseïne	0,5	0,5 -20
Kit 2	sandwich	Magere melkpoeder	1,0	1,0 – 10,0
Kit 3	competitie	Volle melkpoeder		
NIST SRM 8435 (weergegeven in caseïne)	1,6	1,6 – 25		
Kit 4	sandwich	Melkproteïne	0,312	0,312 – 20

Om dit probleem aan te pakken zou een algemene strategie moeten toegepast worden door gebruik te maken van opgelegde conversiefactoren tussen de verschillende eenheden, en zelfs beter door gebruik te maken van dezelfde referentiematerialen.



## 2.2.2 Sensitiviteitsbepaling

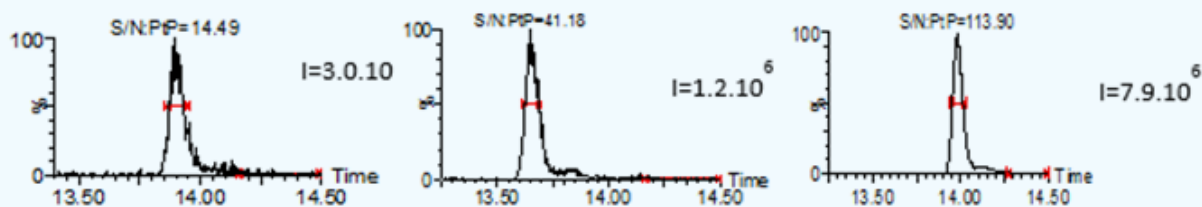
De sensitiviteit van detectiemethodes kan bekomen worden via verschillende benaderingen: mits toevoeging van proteïne extract aan een buffer of een bepaald voedingsproduct [21,22], of mits toevoeging van allergene ingrediënten aan voedingsproducten vóór of na bewerking [18, 20, 23].

Zo wordt de sensitiviteit van commerciële ELISA-kits vaak geschat op basis van proteïne extract dat aan een welbepaald voedingsproduct toegevoegd werd, dus na de productie ervan. Echter, om de werkelijke effectiviteit van de methode te garanderen, wordt de gevoeligheid meer en meer – zoals bij de UPHLC-MS/MS (Tabel 2 [15,18-20]) – geëvalueerd op basis van het toevoegen van allergene ingrediënten in bepaalde voedingsmiddelen vóór de bereiding. Deze strategie laat toe om een meer realistische beeld te krijgen van de sensitiviteit die werkelijk bekomen kan worden tijdens analyse van echte voedingsproducten.

Tabel 2: Gevoeligheid van verschillende UPHLC-MS/MS methodes ter detectie van allergene ingrediënten in bepaalde bereide voedingsproducten vergeleken met de VITAL drempelwaarden voor een portiegrootte van 40 g voedingsproduct.

	Melk	Ei	Pinda	Soja	Eenheden
<b>VITAL</b>	<b>2,5</b>	<b>0,7</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>mg totale proteïnen per kg</b>
Heick <i>et al.</i> [15]	10	50	10	50	mg totale proteïnen per kg
Gomaa <i>et al.</i> [18]	10	-	-	10	mg totale proteïnen per kg
Monaci <i>et al.</i> [19]	26	30	30	18	mg ingrediënt per kg
Planque <i>et al.</i> [20]	0.5	3,4	2,5	5	mg totale proteïnen per kg

Deze verschillende benaderingen kunnen echter leiden tot grote verschillen in de sensitiviteitsbepaling van een bepaalde methode. Een voorbeeld van verschil tussen LOQ's (*Limit of quantification*) bekomen via verschillende benaderingen wordt weergegeven in Figuur 3.



Figuur 3 : Chromatogrammen bekomen na analyse van het caseïne  $\alpha 1$  peptide FFVAPFPEVFGK (692,7 > 920,5), bekomen bij 0,5 mg melkproteïnen per kg in (A) gebakken koekjes (180 °C – 36 min) met een theoretische sensitiviteitsdrempelwaarde van 0,5 mg/kg rekening houdend met de drempelwaarde voor signaal ter opzichte van ruis ratio (S/N of signal to noise) = 10, (B) additie van het allergene proteïne extract in koekjes met een theoretische sensitiviteitsdrempelwaarde van 0,125 mg/kg en (C) additie van het proteïne extract in oplossing met een theoretische sensitiviteitsdrempelwaarde van 0,05 mg/kg. referentiemateriaal = melkpoeder NIST 1549a (25,6% proteïnen) [20].

De waarneembare verschillen tussen deze chromatogrammen tonen de noodzaak van een gestandaardiseerde gemeenschappelijke richtlijn aan bij de bepaling van de performantie van de methode (zoals beschreven is in [24]), alsook dat referentiestandaarden en –materialen noodzakelijk zijn om harmonisatie van de methoden te verwezelijken.

### 2.3 Detectiemethoden: *Fitness for purpose*

Routinelabo's hebben betreffende allergenendetectie volgende uitdaging aan te gaan: de grote diversiteit aan types voedselstalen voor analyse. Enerzijds is een beschikbare kit of methode niet gevalideerd voor alle monstertypes. Anderzijds hoort de routineservice van de laboratoria de betrouwbaarheid en precisie van alle monsters te kunnen garanderen, zelfs in de aanwezigheid van interfererende componenten en in sterk bewerkte voedingsstalen. De toepasbaarheid van een bepaalde methode moet daarom duidelijk gedefinieerd en afgelijnd worden. Hiernaast moeten methoden ook kwantitatief gevalideerd worden d.m.v. een duidelijke strategie, met nadruk op sterk bewerkte voedingsproducten en het gebruik van gecertificeerde referentiematerialen.

## 3/ Besluit

Allergische consumenten zijn op zoek naar "veilige" voedingsproducten om de verantwoordelijke allergenen uit hun dieet te kunnen schrappen. Voedselproducenten worden hierdoor in een richting geduwd die zal leiden tot vervanging van de misbruikte PAL etikettering d.m.v. een degelijke risicobeoordeling/management. Hierdoor moeten ze ook gebruik kunnen maken van betrouwbare detectiemethoden. De evolutie van gehanteerde methoden leidde reeds tot verbeterde gevoeligheden van detectie. Een voorbeeld is de UHPLC-MS/MS methode voor gebakken voedingsproducten met een sensitiviteit lager dan de drempelwaarden vastgelegd door het VITAL systeem. Echter is er nog een lange weg te gaan betreffende de harmonisatie van detectiesystemen.

## Referenties:

- [1] S. Wasserman, W. Watson, Food allergy, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 7 (2011) S7. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S7.
- [2] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment., *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 291–307; quiz 308. doi:10.1016/j.jaci.2013.11.020.
- [3] S.M. Gendel, Comparison of international food allergen labeling regulations, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63 (2012) 279–285. doi:10.1016/j.yrtph.2012.04.007.
- [4] Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004 Text with EEA relevance *OJ L 304, 22.11.2011, p. 18–63 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV) Special edition in Croatian: Chapter 15 Volume 020 P. 168 - 213.*
- [5] M.Q.I. Spanjersberg, A.C. Knulst, A.G. Kruizinga, G. Van Duijn, G.F. Houben, Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health, *Food Addit. Contam. Part A.* 27 (2010) 169–174. doi:10.1080/19440040903317513.
- [6] K.J. Allen, P.J. Turner, R. Pawankar, S. Taylor, S. Sicherer, G. Lack, N. Rosario, M. Ebisawa, G. Wong, E.N.C. Mills, K. Beyer, A. Fiocchi, H.A. Sampson, Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework?, *World Allergy Organ. J.* 7 (2014) 10. doi:10.1186/1939-4551-7-10.
- [7] V. Dumont, S. Kerbach, R. Poms, P. Johnson, C. Mills, B. Popping, S. Tömösközi, P. Delahaut, Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods, *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods.* 2 (2010) 208–215. doi:10.1111/j.1757-837X.2010.00081.x.
- [8] A. Iqbal, F. Shah, M. Hamayun, A. Ahmad, A. Hussain, M. Waqas, S.-M. Kang, I.-J. Lee, Allergens of *Arachis hypogaea* and the effect of processing on their detection by ELISA., *Food Nutr. Res.* 60 (2016) 28945. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4773821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed April 26, 2016).
- [9] S. Khuda, A. Slate, M. Pereira, F. Al-Taher, L. Jackson, C. Diaz-Amigo, E.C. Bigley, T. Whitaker, K.M. Williams, Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: sugar cookies., *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4195–203. doi:10.1021/jf3001839.
- [10] L. Monaci, M. Brohée, V. Tregoeat, A. van Hengel, Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA., *Food Chem.* 127 (2011) 669–75. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.113.
- [11] S.M. Albillos, Detection Problems Associated to Processed Food Allergens, *J. Food Process. Technol.* 03 (2012) 1–2. doi:10.4172/2157-7110.1000e104.
- [12] I. Taverniers, B. Van Droogenbroeck, M. De Loose. Soort-specifieke PCR detectie van mosterd species (*Sinapis alba*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*) als potentiële “verborgen” allergenen in voeding. *LabInfo* 12, 2014-07, p.23-28
- [13] L. Monaci, A. Visconti, Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens, *Trends Anal. Chem.* 28 (n.d.) 581–591. doi:10.1016/j.trac.2009.02.013.
- [14] N. Gillard, O. Gaëtan, P. Delahaut, Analyse d’allergènes alimentaires par LC-MS/MS, *LabInfo* (2015.) p21-28.

- [15] J. Heick, M. Fischer, B. Pöpping, First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 938–43. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.067.
- [16] K.J. Allen, B.C. Remington, J.L. Baumert, R.W. R Crevel, G.F. Houben, S. Brooke-Taylor, A.G. Kruizinga, S.L. Taylor, Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 156–164. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.042.
- [17] S.L. Taylor, J.L. Baumert, A.G. Kruizinga, B.C. Remington, R.W.R. Crevel, S. Brooke-Taylor, K.J. Allen, N. Zealand, G. Houben, Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel, *FOOD Chem. Toxicol.* 63 (2014) 9–17. doi:10.1016/j.fct.2013.10.032.
- [18] A. Gomaa, J. Boye, Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), *Food Chem.* 175 (2015) 585–92. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.017.
- [19] L. Monaci, R. Pilolli, E. De Angelis, R. Carone, M. Pascale, LC-tandem mass spectrometry as a screening tool for multiple detection of allergenic ingredients in complex foods, *ACTA IMEKO.* 5 (2016) 5–9. [https://acta.imeko.org/index.php/acta-imeko/article/view/IMEKO-ACTA-05 %282016%29-03](https://acta.imeko.org/index.php/acta-imeko/article/view/IMEKO-ACTA-05%282016%29-03) (accessed May 27, 2016).
- [20] M. Planque, T. Arnould, M. Dieu, P. Delahaut, P. Renard, N. Gillard, Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs., *J. Chromatogr. A.* 1464 (2016) 115–23. doi:10.1016/j.chroma.2016.08.033.
- [21] R. Korte, S. Lepski, J. Brockmeyer, Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using a non-targeted LC-HRMS multi-method., *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 3059–69. doi:10.1007/s00216-016-9384-4.
- [22] L. Monaci, R. Pilolli, E. De Angelis, M. Godula, A. Visconti, Multi-allergen detection in food by micro high-performance liquid chromatography coupled to a dual cell linear ion trap mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1358 (2014) 136–44. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.092.
- [23] J. Heick, M. Fischer, S. Kerbach, U. Tamm, B. Popping, Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits., *J. AOAC Int.* 94 1060–8. <http://europepmc.org/abstract/med/21919338> (accessed April 28, 2016).
- [24] V. Paez, W.B. Barrett, X. Deng, C. Diaz-Amigo, K. Fiedler, C. Fuerer, G.L. Hostetler, P. Johnson, G. Joseph, E.J.M. Konings, M. Lacorn, J. Lawry, H. Liu, E. Marceau, K. Mastovska, L. Monteroso, S.-J. Pan, C. Parker, M.M. Phillips, B. Popping, S. Radcliffe, C.A. Rimmer, M. Roder, A. Schreiber, J. Sealey-Voyksner, J. Shippar, D.P. Siantar, D.M. Sullivan, J. Sundgaard, J. Szpylka, J. Turner, B. Wirthwine, J.L. Wubben, S. Yadlapalli, J. Yang, J.M. Yeung, J. Zweigenbaum, S.G. Coates, Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for Detection and Quantitation of Selected Food Allergens, *J. AOAC Int.* 99 (2016) 1122–1124. doi:10.5740/jaoacint.SMPR2016.002.

m.planque@cergroupe.be ; infoInr@cergroupe.be



# Analyse van pijnboompitten die PNS (pine nut syndrom) veroorzaken

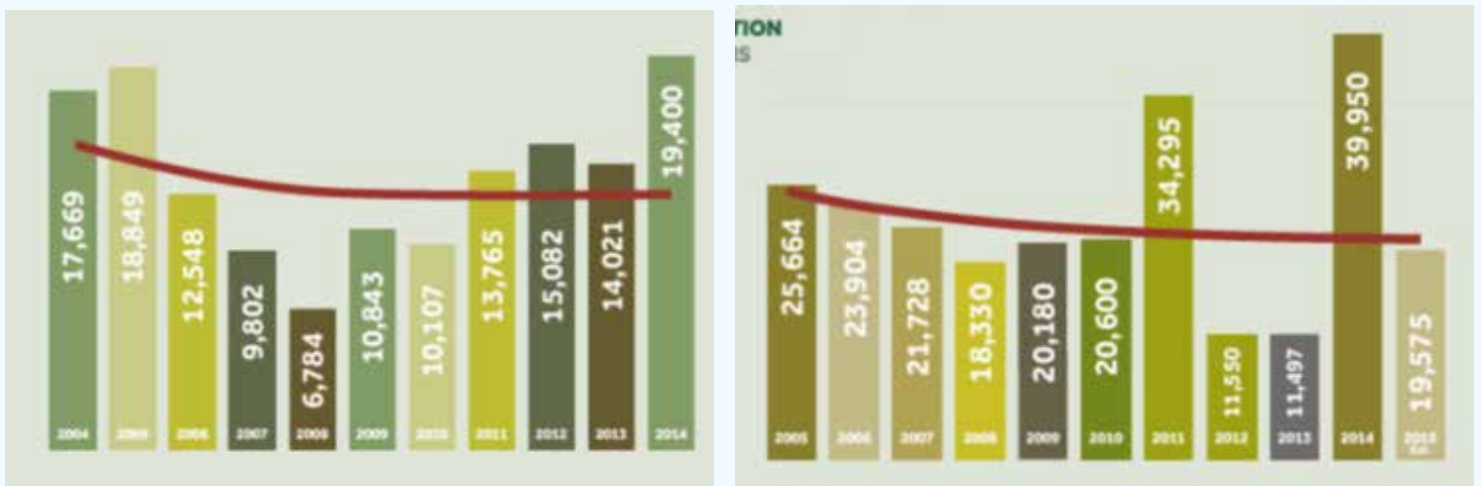
Jeroen Vancutsem<sup>1</sup>, Koen Doms<sup>2</sup> en Hans Rediers<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FAVV, FLVVT, Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren

<sup>2</sup> Laboratorium voor Microbiële Procesecologie en -beheersing, KU Leuven – campus De Nayer

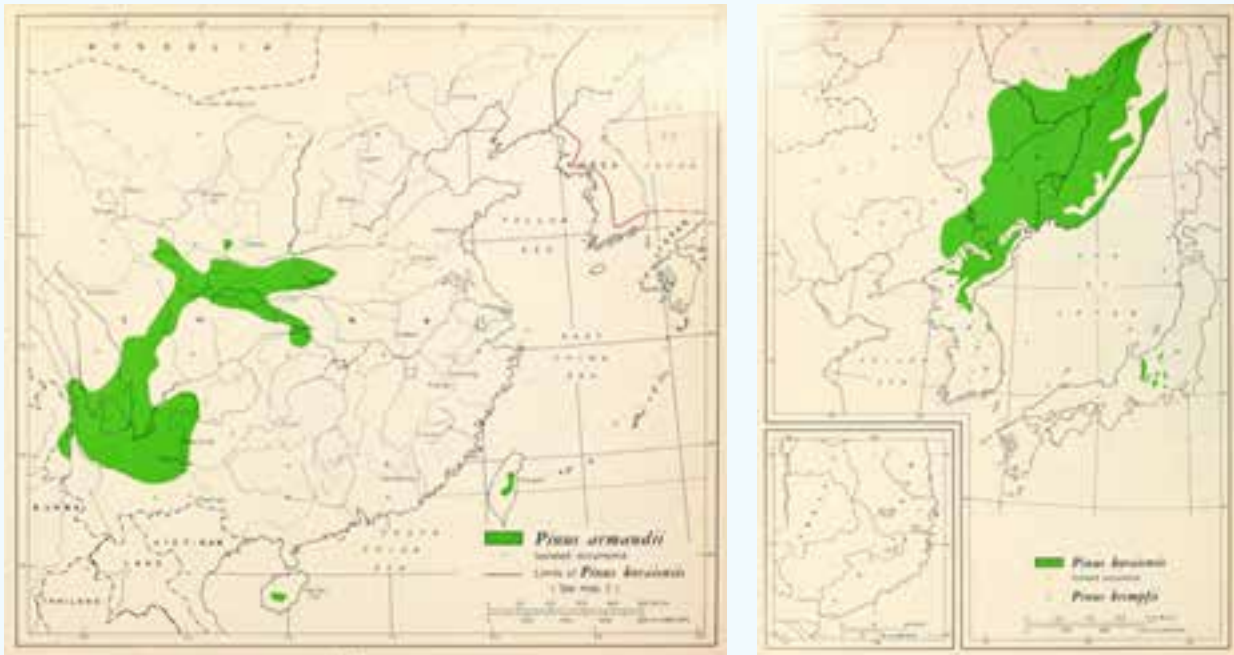
## Inleiding

Er is wereldwijd steeds meer interesse in pijnboompitten. Dit heeft verschillende gevolgen. In het zuidoosten van Siberië is *Pinus koraiensis* economisch belangrijk, waardoor het intensief oogsten kan zorgen voor lokale ecologische schade. Daarnaast zijn de prijzen voor pijnboompitten sterk gestegen door de hogere consumptie de laatste jaren en de cyclische productie van 2-7 jaar (productie zie figuur 1). Na een slechte oogst steeg de prijs zelfs van 10€/kg naar 40€/kg in 2009. Hierdoor kwamen er toen ook niet-eetbare pijnboompitsoorten op de internationale markt zoals pijnboompitten van *P. armandii*, die in voornamelijk in China voorkomt (verspreiding zie figuur 2).



Figuur 1: Productie van pijnboompitten (links) en export (rechts)



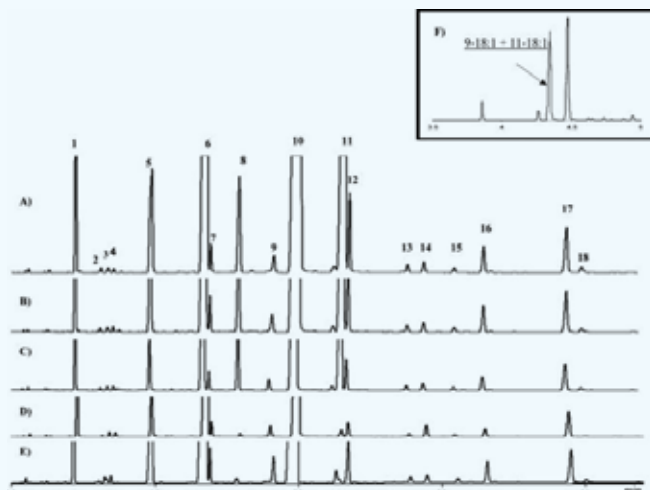


Figuur 2: Verspreiding *P. armandii* (links) en *P. koraiensis* (rechts)

## Pine nut syndrom (PNS)

Het eten van pijnboompitten van *P. armandii* veroorzaakt het 'pine nut syndrom' (PNS). 1 tot 2 dagen na het eten ervan wordt een bittere smaak waargenomen die meestal enkele dagen, maar soms enkele weken kan aanhouden. Waarom deze pijnboompitten PNS veroorzaken kon nog niet achterhaald worden. Een interessante hypothese is dat deze pijnboompitten, in tegenstelling tot sommige andere *Pinus*-soorten zoals *P. pinea*, veel pinoleenzuur (zie figuur 3) bevatten dat het entero-endocriene systeem om cholecystokinine (CCK) aan te maken stimuleert.





Figuur 3: Typische chromatogrammen van vetzuurmethylesters van (A) *P. koraiensis*; (B) *P. armandii*; (C) *P. sibirica*; (D) *P. gerardiana*; (E/F) *P. pinea* met GC-FID met (11) = pinoleenzuur (bron: Fardin-kia et al., 2012)

CCK zorgt onder andere voor meer productie van gal door de lever en zorgt er ook voor dat gal wordt afgegeven in het maag-darmkanaal. De overmaat aan gal zou voor een “cross-wiring” in het brein kunnen zorgen van de bitter smaakreceptoren in de tong en die van het maag-darmkanaal met een bittere nasmaak tot gevolg. Deze hypothese biedt ook een mogelijke verklaring voor het lang aanhouden van de symptomen omdat door enterohepatische recirculatie sommige metabolieten van de lever die via het galkanaal geëxcreteerd worden in de twaalfvingerige darm opnieuw geabsorbeerd worden.

Een lijst met eetbare pijnboomsoorten werd gepubliceerd door de FAO (Tabel 1). Pijnboomsoorten niet opgenomen in de tabel worden als niet eetbaar beschouwd.

Tabel 1: Tabel met eetbare pijnboomsoorten (FAO, 1998; Zonneveld, 2008)

<i>P. ayacahuite</i>	Mexico, Centraal Amerika
<i>P. albicaulis</i>	W Canada en VS
<i>P. cembra</i>	Europa (Alpen en Karpaten)
<i>P. flexilis</i>	W Canada en VS
<i>P. gerardiana</i> *	O Afghanistan, Pakistan, N India
<i>P. koraiensis</i> *	O China, Japan, Korea, ZO Siberië
<i>P. lambertiana</i>	W VS (California, Oregon)
<i>P. monticola</i>	NW VS en aanliggend Canada
<i>Piñon pines</i> *	N Mexico, ZW VS
<i>P. pumila</i>	O Siberië, O China, Korea, N Japan
<i>P. sibirica</i> *	Russia (Centraal Siberië), Mongolië
<i>P. strobiliformis</i>	N Mexico, ZW VS
<i>P. coulteri</i>	VS (Californië)
<i>P. pinea</i> *	Mediterraan Europa en Nabije Oosten
<i>P. ponderosa</i>	W Canada en VS
<i>P. sabiniana</i>	VS (Californië)
<i>P. roxburghii</i>	India
<i>P. torreyana</i>	VS (Californië)

\*: de economisch meest belangrijke soorten

## Analysemethoden

### Visueel

In 2010 werd een visuele analysemethode uitgewerkt door het FLVVT. Op basis van referentiemonsters (zie figuur 4) die bekomen werden via het Antigifcentrum en een operator werd een identificatiemethode op punt gesteld aan de hand van visuele kenmerken. Pijnboompitten van verschillende soorten kunnen onderling verschillen voor wat grootte en vorm betreft. De parameters die bijdragen tot de identificatie zijn het aantal pijnboompitten per 100 g en de doorval bij een zeef met een maaswijdte van 4 mm.



Figuur 4: Pijnboompitten (A) *P. pinea*, (B) *P. armandii*, (C) *P. gerardiana*, (D) *P. koraiensis*, (E) *P. sibirica*, (F) *P. massoniana*, (G) *P. yunnanensis*, (H) *P. pumila* (foto's niet op schaal)



## GC-FID

Van 2011 tot 2013 werden door het LFSAGx bevestigingsanalyses met GC-FID uitgevoerd volgens de methode ontwikkeld door Destailats *et al.* (2010). De pijnboompitten worden geïdentificeerd op basis van de verschillende verhouding vetzuren in de verschillende soorten: de diagnostische index (DI).

De DI wordt gedefinieerd als:  $DI = \frac{(5,9 - 18 : 2 + 5,9,12 - 18 : 3 + 5,11,14 - 20 : 3)}{(18 : 1 n - 9 \text{ en } n - 7) + 18 : 2 n - 6 + 20 : 2 n - 6} \times 10$

met de waarden van de individuele vetzuren uitgedrukt als % van het totaal gehalte vetzuren

Gebaseerd op de publicatie van Wolff *et al.* (2000) kon een referentie-DI bepaald worden voor de verschillende pijnboompitsoorten (zie tabel 2).

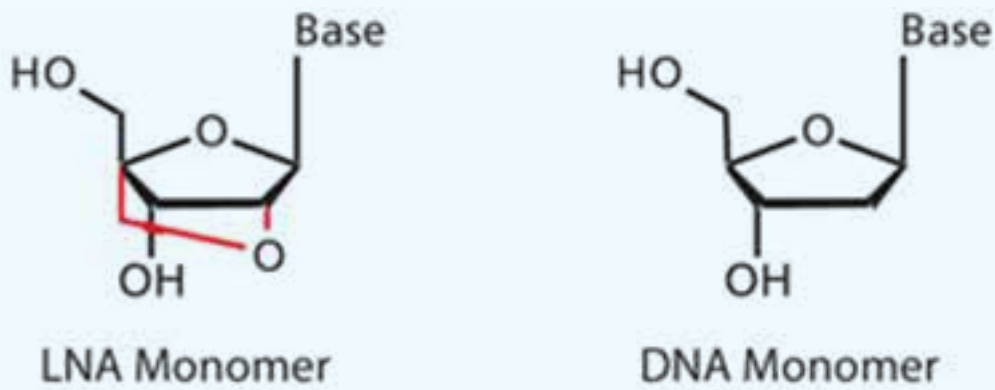
Tabel 2: DI-waarde voor verschillende pijnboompitsoorten (Wolff *et al.*, 2000)

Species	<i>P. gerardiana</i>	<i>P. pinea</i>	<i>P. koraiensis</i>	<i>P. armandii</i>	<i>P. sibirica</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>P. tabuliformis</i>	<i>P. yunannensis</i>
DI	0,17	0,34	2,50	2,92	3,03	3,55	3,82	4,30

De methode kan gebruikt worden indien het monster geen mengsel is van verschillende pijnboompitsoorten aangezien anders een intermediair signaal bekomen wordt. Bij een mengsel is manuele scheiding van de pitten noodzakelijk.

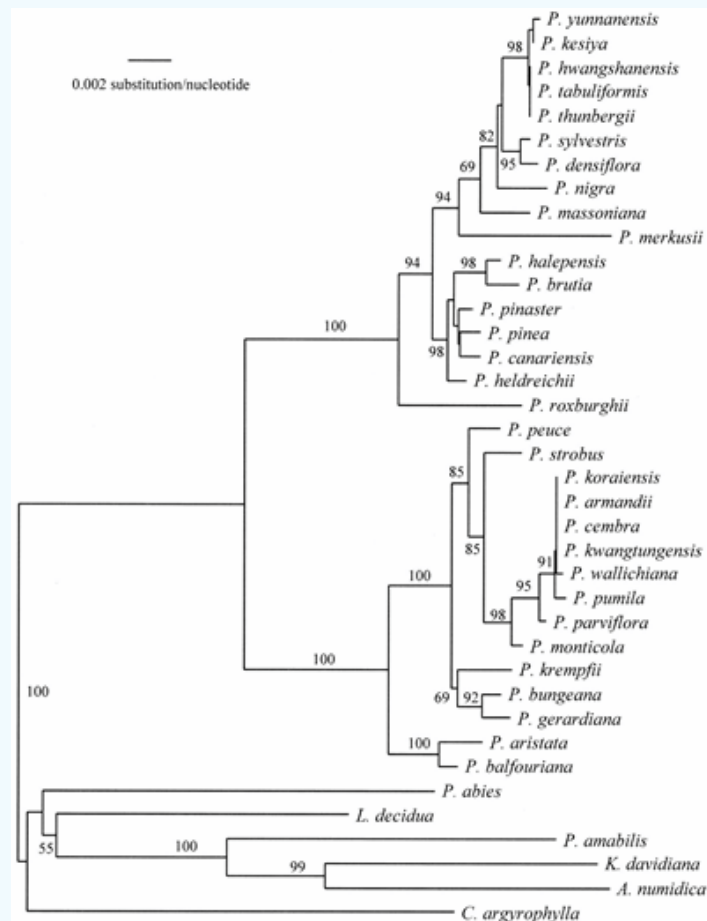
## RT-PCR

Omdat visuele scheiding niet altijd even eenvoudig is, omdat sommige species goed op elkaar lijken en omdat niet elke pijnboompit er hetzelfde uitziet, werd in het FLVVT in 2013-2014 een nieuwe methode ontwikkeld in het kader van een masterproef van de KULeuven. Daarbij werd een recent daarvoor gepubliceerde RT-PCR-methode met enige wijzigingen praktisch uitgewerkt: Handy *et al.* (2013) kozen in het plastidegenoom interessante regio's waar gezocht werd naar single nucleotide polymorphisms (SNP's) die uniek zijn voor *P. armandii*. Drie kandidaat-regio's werden geselecteerd en getest. Er werden primers ontworpen om deze SNP's op te sporen met een ampliconlengte van +/- 150 bp. Tijdens de masterproef werden de primers verder geoptimaliseerd. DNA werd geëxtraheerd met de DNeasy Blood and Tissue kit (FLVVT: Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food). Daarnaast werden LNA-probes (Locked Nucleic Acid) gebruikt. LNA-probes zijn probes met gemodificeerde aminozuren waarbij de ribosering vastgezet wordt met een methyleenbrug tussen het 2'-O atoom en het 4'-C atoom (zie figuur 5). Door de moleculen vast te zetten, blijven ze in een ideale confirmatie voor de Watson-Crick binding: de binding verloopt sneller en is stabiel.



Figuur 5: LNA- en DNA-monomeer

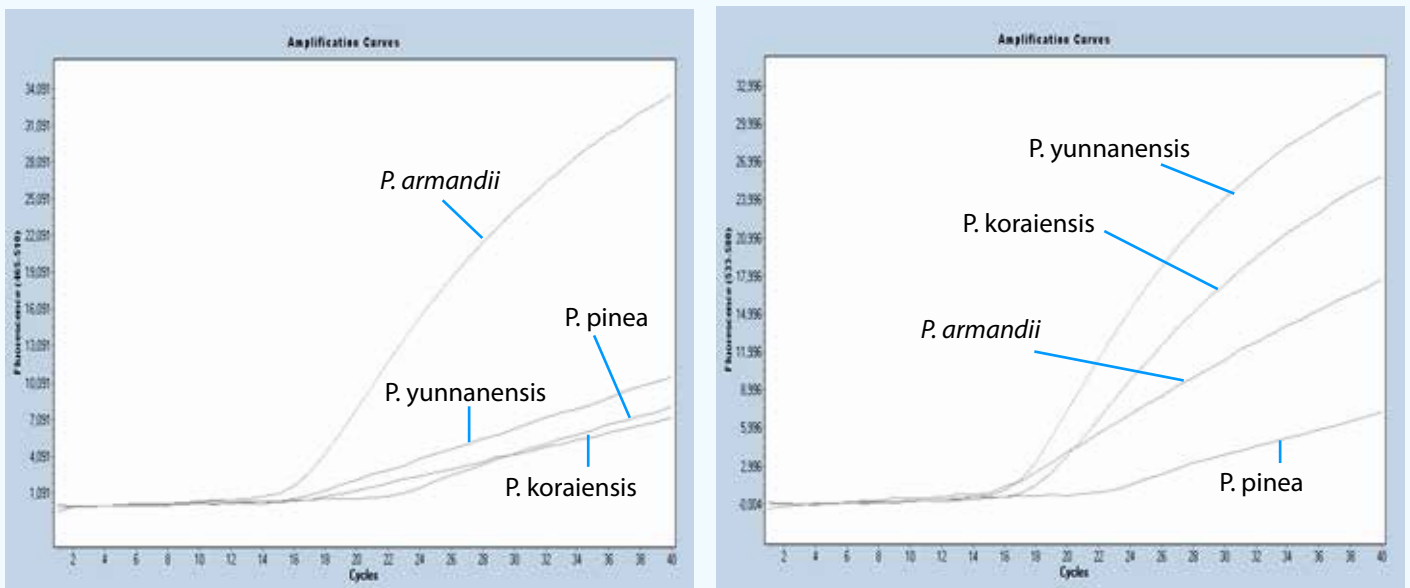
Naast de FAM-BHQ1-probe werd een blockerprobe (HEX-BHQ1) ontwikkeld met één base verschil die ontworpen is om te binden met genetisch gerelateerde species waaronder de belangrijkste *P. koraiensis* (zie figuur 6).



Figuur 6: Fylogenetische verwantschap tussen Euraziatische Pinus-species (Wang et al., 1999)



HEX en FAM kunnen in dezelfde RT-PCR run waargenomen worden, wat ook kan gebruikt worden om bijvoorbeeld een indicatie te geven van andere soorten pijnboompitten (zie figuur 7).



Figuur 7: Amplificatiecurve van enkele soorten pijnboompitten met signaal FAM (links) en HEX (rechts)

Er werden verscheidene matrices via deze werkwijze geanalyseerd waarbij tot nog toe geen kruisreactiviteit werd vastgesteld. Een volgende stap is het detecteren van *P. armandii* in mengsels waarbij volgens de literatuur *P. armandii* kan aangetoond worden vanaf een concentratie van 1%.

## Literatuur:

- Destailats, F., Cruz-Hernandez, C., Giuffrida, F., & Dionisi, F. (2010). Identification of the botanical origin of pine nuts found in food products by gas-liquid chromatography analysis of fatty acid profile. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4): 2082–2087
- Doms, K. (2014). Identificatie van pijnboompitten van *Pinus armandii* door middel van qPCR (71p)
- FAO (1998). Seeds, fruits, and cones. In: *Non-wood forest products from Conifers*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Fardin-kia, A. R., Handy, S. M., & Rader, J. I. (2012). Characterization of Pine Nuts in the U.S. Market, Including Those Associated with “ Pine Mouth ”, by GC-FID. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2701–2711.
- FAVV (2011). Pijnboompitten met bittere nasmaak...? Nieuwsbrief van het federaal voedselagentschap 9e jaargang, Nr 41
- FAVV (2014). <http://www.afsca.be/tips/pijnboompitten.asp>
- Flesch, F. (2010). Pignons de pin et dysgueusie retardée (19p)
- Handy, S. M., Timme, R. E., Jacob, S. M., & Deeds, J. R. (2013). Development of a locked nucleic acid real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Pinus armandii* in mixed species pine nut samples associated with dysgeusia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(5): 1060–1066.
- INC (2016). Nuts & dried fruits global statistical review 2015/2016.
- Kitsteiner j. (2013). *Permaculture Plants: Pine Trees for Pine Nuts*. Bron: internet (<http://tcpermaculture.com/site/2013/11/13/permaculture-plants-pine-trees-for-pine-nuts/>), geraadpleegd op 06/01/2017.
- Köbler, H., Monakhova, Y.B., Kuballa, T., Tschiersch, C., Vancutsem, J., Thielert, G., Mohrning, A. and, & Lachenmeier, D. W. (2011). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics to identify pine nuts that cause taste disturbance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6877–6881.
- Möller, G. (2010). The curious case of the epicurean nut. *Food Technology Magazine* 64(5):1–6
- Pasma, W.J., Heimerikx, J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O’Shea, M., Gambelli, L., H., & H.F.J., Einerhand, A.W.C., Scott, C., Keizer, H.G. and Mennen, L. I. (2008). The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids in Health and Disease*, 7: 10.
- Poeder, S. (2015). Bedreigt onze pestoconsumptie de Siberische tijger? *National Geographic* 29/12/2015
- [www.pinenut.com](http://www.pinenut.com) (2010): Why the price of pine nuts increased - the imported ones - and how to save \$10 - \$15 per pound 23/06/2010
- Slaght, J.C. (2015) Making Pesto? Hold the Pine Nuts. *New York Times* 19/10/2015
- Wang, X.R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., Szmidt, A.E (1999). Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *MATK*, *RPL20-RPS18* spacer, and *TRNV* intron sequences. *American Journal of Botany*; 86(12):1742-53.
- Wolff, R. L.; Pédrone, F.; Pasquier, E.; Marpeau, A. M. General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of  $\Delta^5$ -olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. *Lipids* 2000, 35, 1–22.
- Zonneveld, B. J. M. (2011). Pine nut syndrome : a simple test for genome size of 12 pine nut – producing trees links the bitter aftertaste to nuts of *P. armandii* Zucc. ex End. *Plant Systematics and Evolution*. 297: 201–206.

[Jeroen.Vancutsem@favv.be](mailto:Jeroen.Vancutsem@favv.be)



# Opsporen van STEC-uitscheidende runderen aan de hand van Droplet Digital PCR: Een detectie met duizenden druppels

Bavo Verhaegen, Els Van Coillie en Koen De Reu

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO) – Eenheid Technologie & Voeding, Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle

## Inleiding

De darmbacterie *Escherichia coli* is een over het algemeen onschadelijke bacterie die deel uitmaakt van de gezonde darmflora bij mens en dier. Toch kunnen enkele types *E. coli*, zoals de Shiga-toxine producerende *E. coli* of STEC, milde tot zeer ernstige ziektes veroorzaken bij de mens. Het vermogen van deze bacterie om Shiga-toxines als specifieke gifstoffen te produceren kan leiden tot diarree, bloedstollingstoornissen en nierfalen met soms de dood tot gevolg, vooral bij jonge kinderen en ouderen [1]. Herkauwers en vooral runderen worden beschouwd als het belangrijkste reservoir van STEC. Terwijl deze dieren zelf zelden of nooit ziekteverschijnselen vertonen, liggen ze vaak aan de basis van STEC uitbraken bij de mens door direct contact met de besmette dieren of door voeding gecontamineerd met STEC. Hoe STEC zich weet te onderhouden binnen de runderpopulatie is echter nog niet volledig duidelijk. Geïnfecteerde dieren kunnen opgespoord worden door STEC-aanwezigheid te bepalen in mest. Sommige runderen scheiden opmerkelijk hoge aantallen STEC uit. Deze worden “super-shedders” genoemd en spelen waarschijnlijk een cruciale rol in het onderhouden van STEC infecties in de runderpopulatie [2]. Het bepalen van de uitgescheiden hoeveelheden STEC in mest kan veel duidelijkheid scheppen omtrent de overdracht van STEC, de contaminatiebronnen en de effectiviteit van bepaalde behandelingen op hoeveniveau.

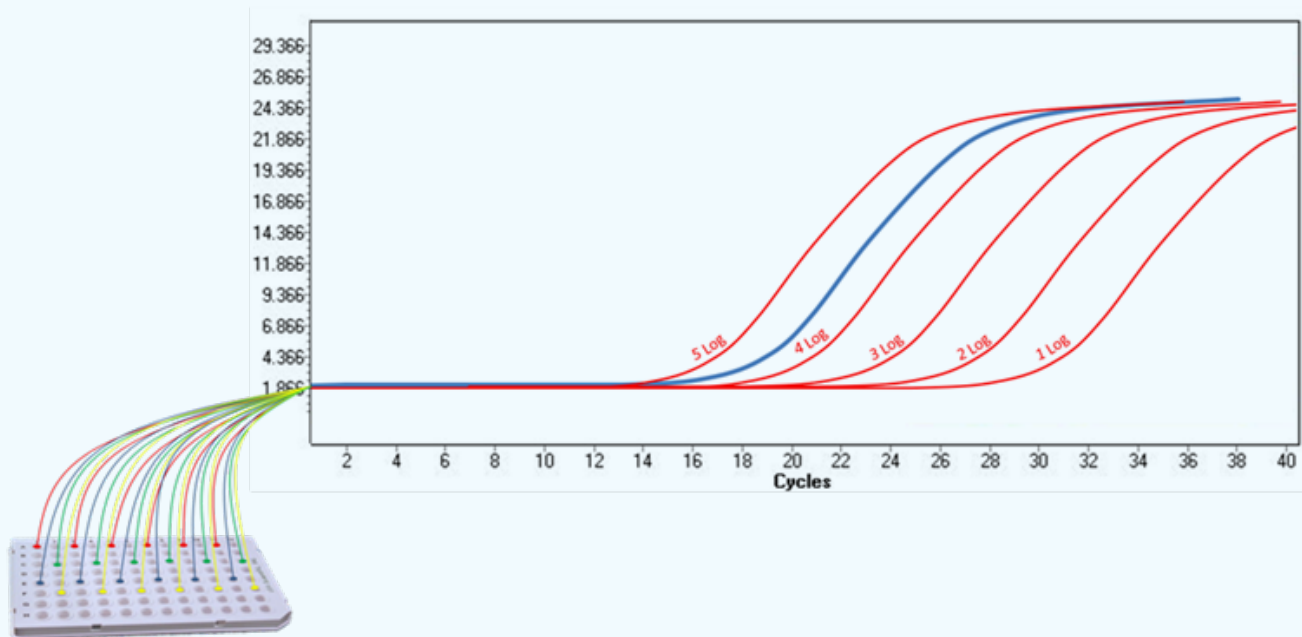
## Kwantificatie van STEC

De kwantificatie van STEC werd in het verleden uitgevoerd aan de hand van directe microbiologische uitplantingen met verdunningsreeksen, wat tijdrovend en niet steeds betrouwbaar bleek. Een belangrijke reden hierbij is dat de meeste isolatiemediën voor STEC nog onvoldoende specifiek zijn en dus geen onderscheid toelaten tussen commensale *E. coli* en STEC.



## A. Kwantitatieve PCR

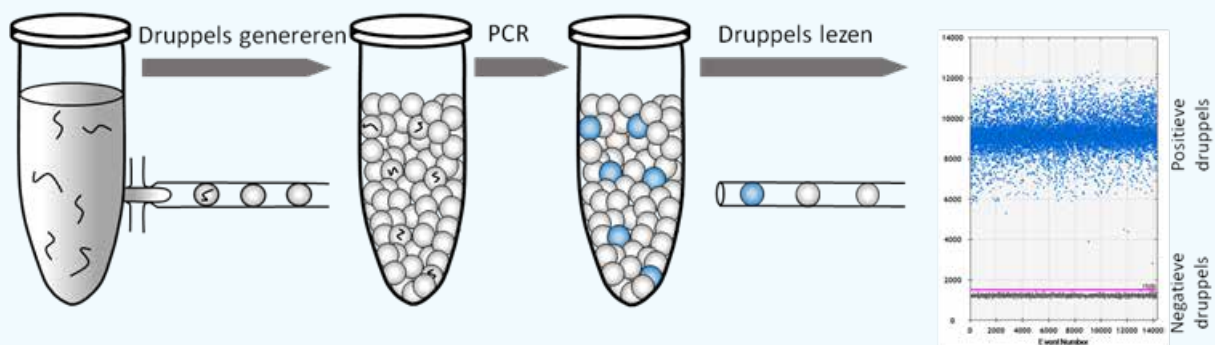
Tegenwoordig wordt voor de bepaling van de uitscheidingsprofielen en de contaminatiebronnen van STEC op hoeveniveau steeds vaker gebruik gemaakt van DNA-kwantificatietechnieken, zoals de kwantitatieve PCR (qPCR), gebaseerd op de kwantificatie van Shiga-toxinegenen (*stx1* en *stx2*) [3]. Bij deze techniek wordt de toename van de specifieke DNA-fragmenten continu opgevolgd, door toevoeging van een fluorescerende kleurstof (Figuur 1). Voor de kwantificatie is een standaard verdunningsreeks vereist waarvan de exacte hoeveelheid kopieën gekend is. Aan de hand van deze standaardreeks kan de initiële hoeveelheid DNA-fragmenten in het onbekende staal bepaald worden. Een nadeel aan deze techniek is de noodzaak van de aanmaak en analyse van een betrouwbare onafhankelijke standaardreeks voor elk gen dat geanalyseerd wordt, die gelijktijdig de PCR moet ondergaan.



*Figuur 1: De qPCR techniek meet de toename van de DNA fragmenten gedurende elke PCR cyclus. Gelijktijdig met het te onderzoeken staal (blauw) dient de standaardreeks (rood) de PCR te ondergaan.*

## B. Droplet Digitale PCR

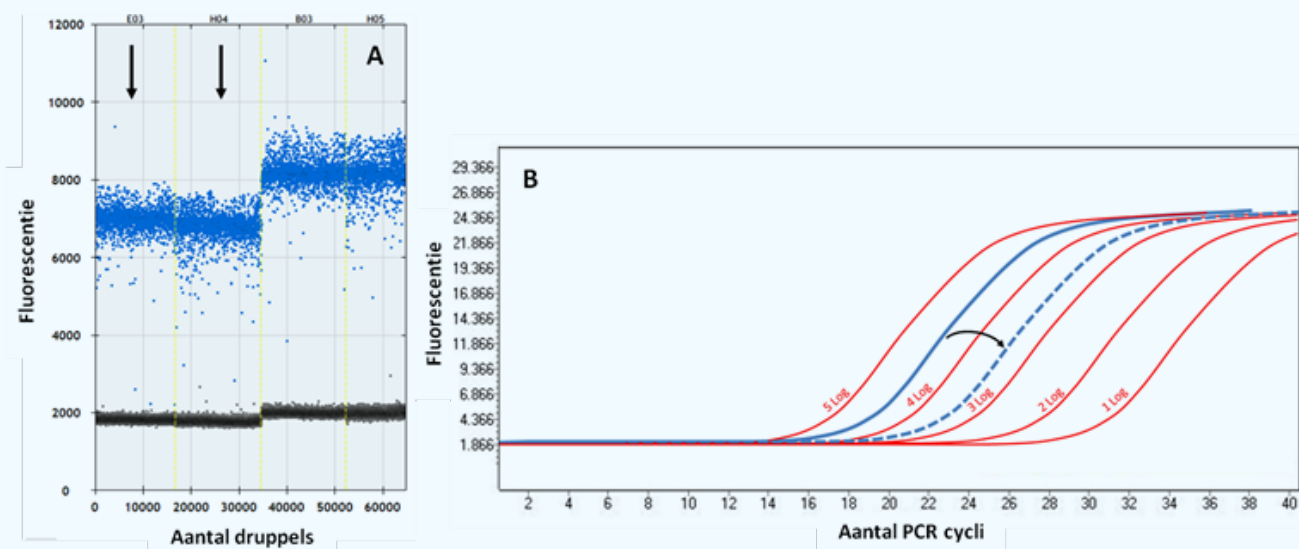
Recentelijk wordt er ook gebruik gemaakt van een nieuwe, 'derde generatie' PCR technologie of digitale PCR. Droplet Digitale PCR (ddPCR) is een voorbeeld van digitale PCR. Hierbij wordt een staal in duizenden nanodruppeltjes verdeeld en vervolgens wordt elk druppeltje onderzocht op de aanwezigheid van het DNA fragment dat verantwoordelijk is voor de Shiga-toxines (Figuur 2). De DNA-fragmenten worden zodanig verdeeld over de duizenden druppeltjes, zodat één druppeltje idealiter nul of één DNA-fragment zal bevatten. Op basis van de verdeling aan positieve en negatieve druppeltjes kan de software een accurate kwantificatie op het hele staal uitvoeren, zonder de analyse van een vereiste standaardreeks zoals het geval is bij qPCR.



Figuur 2: Het overzicht van de werking van een droplet digital PCR (QX200, Bio-Rad, Marnes-la-Coquettes, France)

De bekomen resultaten voor de kwantificatie van de Shiga-toxinegenen gebruik makend van de ddPCR zijn zeer vergelijkbaar met deze bekomen met de qPCR. Enkel de kwantificatie van zeer hoge hoeveelheden DNA-fragmenten blijkt niet mogelijk voor de ddPCR, aangezien in dit geval alle druppeltjes één of meerdere DNA-fragmenten bevatten en niet langer een verdeling positieve en negatieve druppeltjes kan worden gemaakt. Dit kan echter eenvoudig worden opgelost door het staal te verdunnen [4].

De aanwezigheid van remmende stoffen in het te onderzoeken staal kan aanleiding geven tot PCR-inhibitie. Zoals geïllustreerd in Figuur 3 kan PCR-inhibitie aanleiding geven tot een lager signaal bij de ddPCR. Maar zolang een duidelijk scheiding tussen positieve en negatieve druppeltjes waarneembaar is, blijft een accurate kwantificatie mogelijk. Bij de qPCR daarentegen kan PCR-inhibitie aanleiding geven tot een uitgestelde toename van de DNA-fragmenten met als gevolg een onderschatting van de hoeveelheid STEC. Deze gevoeligheid van de qPCR voor PCR-inhibitie is echter heel erg afhankelijk van de gebruikte qPCR-Mastermix [4].



Figuur 3: Effect van PCR-inhibitie (pijlen) op de kwantificatie van STEC met ddPCR (A) en qPCR (B)

## Conclusie

Beide DNA-kwantificatietechnieken bieden duidelijke voordelen voor kwantificatie van STEC ten opzichte van klassieke microbiologische uitplantingen. Hoewel de resultaten van beide technieken zeer vergelijkbaar zijn, blijft het grootste voordeel van de ddPCR de onafhankelijkheid van een standaardreeks voor de kwantificatie. Om deze reden zou het gebruik van de ddPCR kunnen worden overwogen voor de identificatie van "STEC super-shedders" onder runderen, zowel voor het opsporen van de belangrijkste contaminatiebronnen als voor het nagaan van het effect van behandelingen in de runderpopulatie.

**Referenties:**

1. Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 142–201
2. Persad A.K., LeJeune J.T. (2014). Animal reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiological Spectrum*. 2 (4), 1-14.
3. Lawal, D., Burgess, C., McCabe, E., Whyte, P., Duffy, G. (2015). Development of a quantitative real time PCR assay to detect and enumerate *Escherichia coli* O157 and O26 serogroups in bovine recto-anal swabs. *Journal of Microbiological Methods*. 114, 9–15
4. Verhaegen B., De Reu K, De Zutter L, Verstraete K., Heyndrickx M., Van Coillie E. (2016). Comparison of Droplet Digital PCR and qPCR for the Quantification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Bovine Feces. *Toxins*. 8 (157), 1-11.

[bavo.verhaegen@ilvo.vlaanderen.be](mailto:bavo.verhaegen@ilvo.vlaanderen.be)

# Het gebruik van real time PCR kwantificatie voor de telling van thermofiele *Campylobacter* species op pluimveekarkassen

David Triest, Alexandra Duarte, Katelijne Dierick en Nadine Botteldoorn

NRL Levensmiddelenmicrobiologie, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel

Zowel in België als in de rest van Europa vormt *Campylobacteriosis* de meest voorkomende bacteriële infectieziekte die kan worden overgedragen van dier op mens. [1] Het contact met alsook de consumptie van *Campylobacter* geïnfecteerd kippenvlees speelt hierbij een belangrijke rol. De *Campylobacter* status van kippenvlees wordt dan ook nauwgezet gemonitord en maakt deel uit van het officiële controleprogramma van het FAVV.

Momenteel is er nog geen Europese wetgeving met betrekking tot voedselveiligheid en/of criteria voor proceshygiëne omtrent *Campylobacter* op pluimveekarkassen, maar onderhandelingen zijn hierover lopende. Een voedselveiligheids criterium aan- of afwezigheid van *Campylobacter* is niet haalbaar. Een proceshygiëne-criterium daarentegen is meer realistisch.

Algemeen wordt aangenomen dat het aantal *Campylobacter* cellen op pluimveekarkassen een groot effect heeft op het aantal ziektegevallen bij de mens (EFSA opinie). [2] Het accuraat kwantificeren van *Campylobacter* op pluimveekarkassen is dan ook uitermate belangrijk om zwaar gecontamineerde karkassen te kunnen detecteren en specifieke maatregelen te introduceren. Voor het kwantificeren van *Campylobacter* kan de ISO/TS 10272-2 (2006) referentiemethode gebruikt worden, dewelke gebaseerd is op de klassieke telling op mCCDA medium en waarbij een bevestiging van de kolonies noodzakelijk is. Pas 96 uur na de staalname is het resultaat hierbij gekend. Om een sneller resultaat te bekomen kan men de qPCR methode gebruiken, dewelke beduidend sneller is in vergelijking met de cultuur-gebaseerde referentiemethode. Deze snelle kwantificatie is dan ook van groot belang binnen de voedingsindustrie om acties te kunnen ondernemen wanneer het proceshygiëne criterium van toepassing zou worden.

Er stelt zich echter een probleem met het feit dat de standaard qPCR methode levende bacteriële cellen niet kan onderscheiden van dode. Recent werd er een aangepaste qPCR methode ontwikkeld die dit probleem aanpakt door gebruik te maken van PMA (propidium monoazide), i.e. een DNA bindend reagens dat ervoor zorgt dat er een onderscheid kan worden gemaakt tussen levende en dode cellen (Figuur 1).





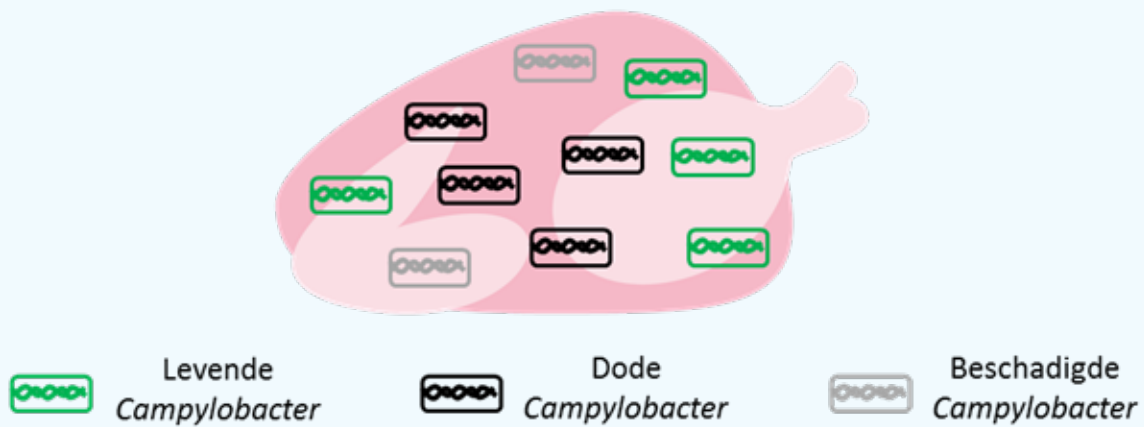
Figuur 1: Principe van de PMA-qPCR methode.

PMA bindt zich, na een blootstelling aan licht, aan het DNA van cellen met een beschadigd membraan (dode cellen). Bijgevolg wordt enkel het DNA van cellen met een intact membraan (levende cellen) geamplificeerd door middel van qPCR.

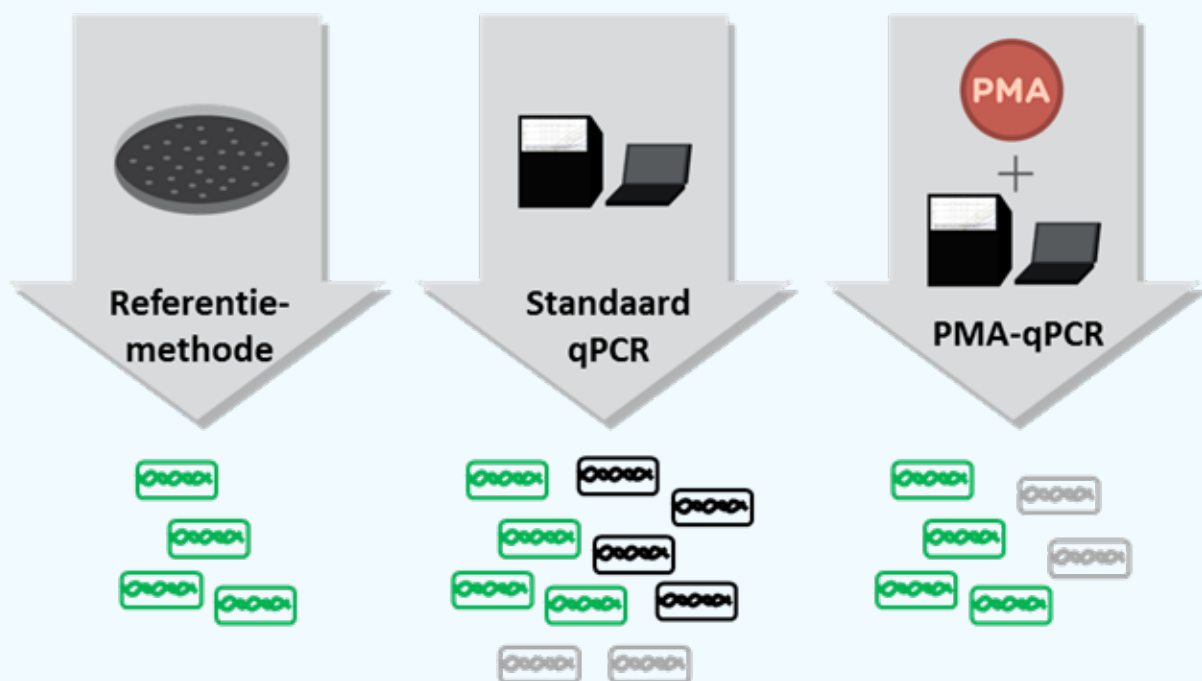
Legende: blauw = membraan, zwart = DNA van dode cellen, groen = DNA van levende cellen, rood = PMA.

Vooralsnog hebben maar een uiterst beperkt aantal studies de betrouwbaarheid van deze PMA-qPCR methode, die in theorie dus enkel levende cellen zou moeten kwantificeren, onderzocht ten opzichte van de referentiemethode.

Een ander belangrijk aspect is dat *Campylobacter* cellen in gecontamineerd voedsel vaak beschadigd zijn door toedoen van de verschillende verwerkings- en bewaringsprocessen waaraan het voedsel onderhevig is, zoals bijvoorbeeld koeling of invriezen. Deze beschadigde cellen kunnen dan gevoelig worden voor producten die ze normaal gezien verdragen en het werd reeds aangetoond dat bepaalde producten die gebruikt worden in de referentiemethode wel degelijk dodelijk kunnen zijn voor dergelijke cellen. Bijgevolg is er een onderschatting van het aantal levende cellen wanneer het gecontamineerde voedsel onderhevig is aan een zogenaamde stressconditie. Deze onderschatting met de referentiemethode vormt dan ook een gevaar voor de consument aangezien potentieel zwaar gecontamineerde karkassen mogelijk niet gedetecteerd worden. Tot op heden is de geschiktheid van de PMA-qPCR methode met betrekking tot het correct kwantificeren van het aantal levende cellen, inclusief de beschadigde, nog niet onderzocht geweest. De studie van Duarte *et al.* (2015) [1], uitgevoerd binnen de dienst Voedselpathogenen van het WIV-ISP tijdens het Campytrace project, bracht hier verandering in en tracht dit te achterhalen door zowel de PMA-qPCR methode als de standaard qPCR methode te testen op natuurlijk en artificieel gecontamineerde pluimveekarkassen met *Campylobacter jejuni* en *Campylobacter coli*. Bovendien werd er een vergelijking gemaakt met de referentiemethode. Een schematisch overzicht van de bestudeerde methodes in deze studie wordt weergegeven in Figuur 2.



## Kwantificatie methodes



Figuur 2: Methodes voor *Campylobacter* kwantificatie op pluimveekarkassen.

Drie methodes werden met elkaar vergeleken in de studie van Duarte et al. (2015)1: de cultuur-gebaseerde referentiemethode (links), de standaard qPCR methode (midden) en de PMA-qPCR methode (rechts). In tegenstelling tot de referentiemethode en de PMA-qPCR methode, kan de standaard qPCR methode geen onderscheid maken tussen levende (groen) en dode (zwart) *Campylobacter* cellen. Beschadigde *Campylobacter* cellen (grijs) worden mogelijk niet gekwantificeerd in de referentiemethode in vergelijking met de (PMA)-qPCR methode.



Vijf verschillende stresscondities werden getest waaraan karkassen over het algemeen onderhevig zijn tijdens het verwerkings- en bewaringsproces, gaande van blootstelling aan: warmte, koude, invriezen, een zuurbehandeling en een behandeling met waterstofperoxide. Een zelf-ontwikkelde PMA-qPCR methode werd hiervoor gebruikt. De belangrijkste conclusies uit de bekomen resultaten waren de volgende: (i) Zoals verwacht kwam het resultaat van het kwantificeren van *Campylobacter* met de klassiek telmethode het best overeen met deze bekomen via de PMA-qPCR methode in plaats van de standaard qPCR methode. (ii) De referentiemethode maakt wel degelijk een onderschatting van het aantal levende cellen in vergelijking met de PMA-qPCR methode indien de karkassen onderhevig waren aan warmte, koude, invriezen of een zuurbehandeling. (iii) Een behandeling met waterstofperoxide was de enige stressconditie die geen daling teweegbracht in het aantal levende *Campylobacter* cellen, volgens zowel de referentiemethode als de (PMA-)qPCR methode, erop wijzend dat *Campylobacter* zich efficient aanpast aan deze stressconditie. (iv) Invriezen zorgde voor de grootste daling in het aantal levende *Campylobacter* cellen in zowel de referentiemethode als de PMA-qPCR methode. Dit laatste duidt erop dat invriezen van karkassen een interessante strategie kan zijn bij het ontwikkelen van richtlijnen om het aantal gevallen van *Campylobacteriosis* bij de mens te verminderen.

#### Referenties:

1. Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass rinses (Duarte A, Botteldoorn N, Coucke W, Denayer S, Dierick K, Uyttendaele M. Food Microbiology 48 (2015): 182-190).
2. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain (EFSA Panel on Biological Hazards. EFSA Journal 2011: 9(4):2015).

Campytrace project RF 11/6241 gefinancierd door Belgische Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu

[Nadine.Botteldoorn@wiv-isp.be](mailto:Nadine.Botteldoorn@wiv-isp.be)



# Salmonella-infecties : Identificatietechnieken voor een succesvol uitbraakonderzoek

*Sophie Bertrand, Wesley Mattheus, Pieter-Jan Ceysens, Mathieu Gand, Raymond Vanhoof*  
Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), Nationaal Referentiecentrum voor Salmonella en Shigella (NRCSS), J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel, België

*Nadine Botteldoorn, Sarah Denayer*  
Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), NRL Voedingsmicrobiologie, J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel, België

*Nancy Roosens, Sigrid De Keersmaecker*  
Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP), Platform Biotechnologie en Moleculaire Biologie (PBB), J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel, België

## Inleiding:

Ondanks alle inspanningen geleverd in de laatste decennia blijven *Salmonella* infecties een belangrijk probleem voor de Volksgezondheid. Deze infecties vormen, na *Campylobacter*, de belangrijkste oorzaak van bacteriële gastro-enteritis in de Westerse wereld. Hoewel de meerderheid van Salmonelloses geen antibiotica-behandeling vereist, is bij infecties van ouderen, personen met immunodeficiëntie of peuters een antibiotica-therapie onvermijdelijk. Ook in het geval dat er geen behandeling nodig is, vertoont de besmette persoon gedurende verschillende dagen symptomen van koorts, diarree, braken en hoofdpijn, wat gekoppeld is aan een lange of korte periode van werkonbekwaamheid. Om de hieraan gerelateerde maatschappelijke kost van *Salmonella* infecties te minimaliseren, is het cruciaal om zo snel mogelijk het aantal zieken te beperken door de besmette producten uit de handel te nemen.

## Surveillance systeem ingesteld in België :

Zoals de meeste Europese landen, heeft België een zeer performant *Salmonella* surveillance systeem. Dit systeem is gebaseerd op de opvolging van Salmonelloses bij de bevolking door het Nationaal Referentiecentrum (NRCSS). Tegelijkertijd wordt er een strikt toezicht op de voedingsmiddelen en op de primaire sector uitgevoerd, door een nauwe samenwerking tussen het Agentschap voor de Voedselveiligheid (FAVV), de nationale referentielaboratoria (NRL, sector voeding) en het NRCSS.

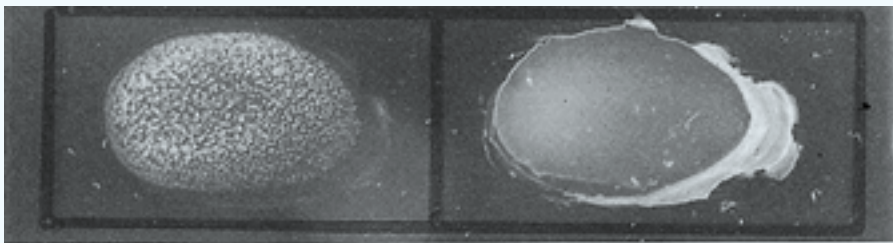
In de praktijk worden de stammen geïsoleerd van patiënten, en stammen geïsoleerd uit levensmiddelen en uit de diergeneeskundige sector naar het NRCSS of naar het NRL gestuurd voor typering en subtypering. Door de onderlinge vergelijking van de stammen kunnen besmettingsbronnen opgespoord en geëlimineerd worden. Er moet trouwens bemerkt worden dat vanaf januari 2017, alle typering en subtypering in het NRCSS worden uitgevoerd, om nog gemakkelijker de gegevens te kunnen vergelijken.



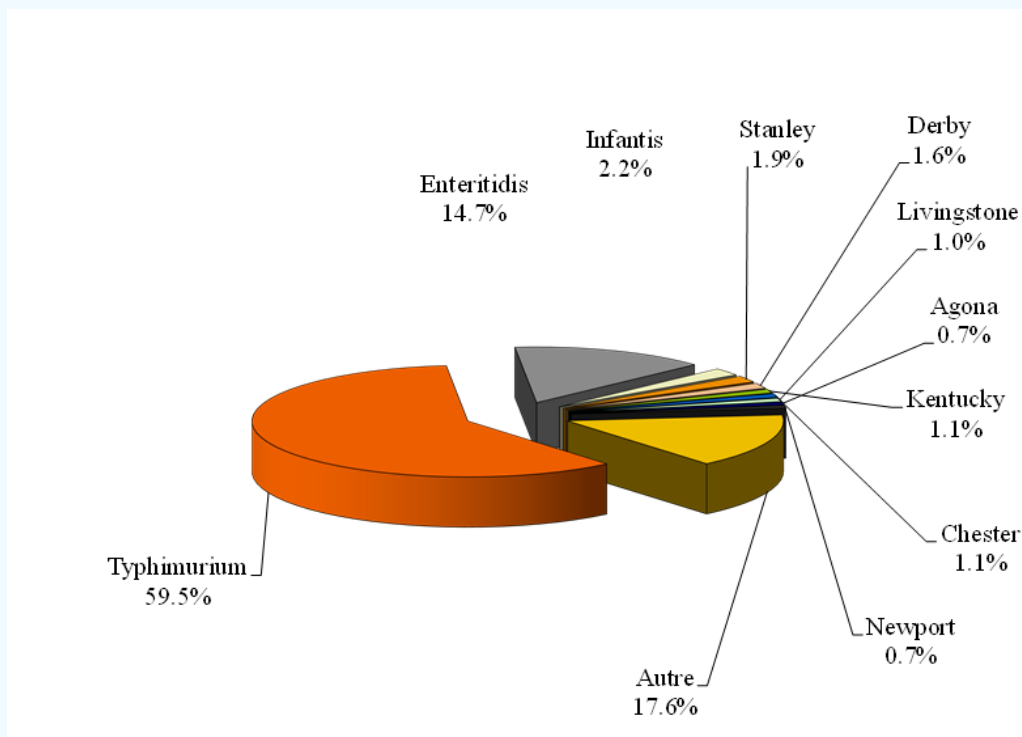
## Klassieke methodes om de *Salmonella*-stammen te typeren :

*Salmonella* zijn Gram-negatieve bacteriën die behoren tot de familie van de *Enterobacteriaceae*, en zijn opgesplitst in twee genera (*S. enterica* en *S. bongori*). *S. enterica* zelf is onderverdeeld in 6 subsoorten. Het genus *Salmonella* telt meer dan 2579 serotypes die bepaald worden door combinaties van specifieke versies van de somatische O-antigenen, flagellaire H-antigenen en capsulaire Vi-antigenen. De aanwezigheid van specifieke antigenen wordt traditioneel bepaald door middel van specifieke antilichamen volgens het schema van Kauffmann en White.

In de praktijk worden alle stammen die naar het NRCSS en het NRL gestuurd worden nog steeds onderworpen aan een eerste analyse met snelle-plaatagglutinatie om het serotype te bepalen (Figuur 1). Deze eerste analyse is snel, goedkoop en essentieel, maar wel vaak onvoldoende om de oorsprong van een contaminatie te vinden. Immers, de meerderheid (85%) van de *Salmonella*-infecties in de Westerse wereld zijn gelinkt aan minder dan 10 verschillende serotypes (1 en Figuur 2). Subtypering van deze stammen is derhalve fundamenteel om een formele link te leggen tussen de stam afkomstig uit de voeding en de stam afkomstig van de patiënt.



Figuur 1. Snelle-plaatagglutinatie; links : positieve reactie; rechts : negatieve reactie.



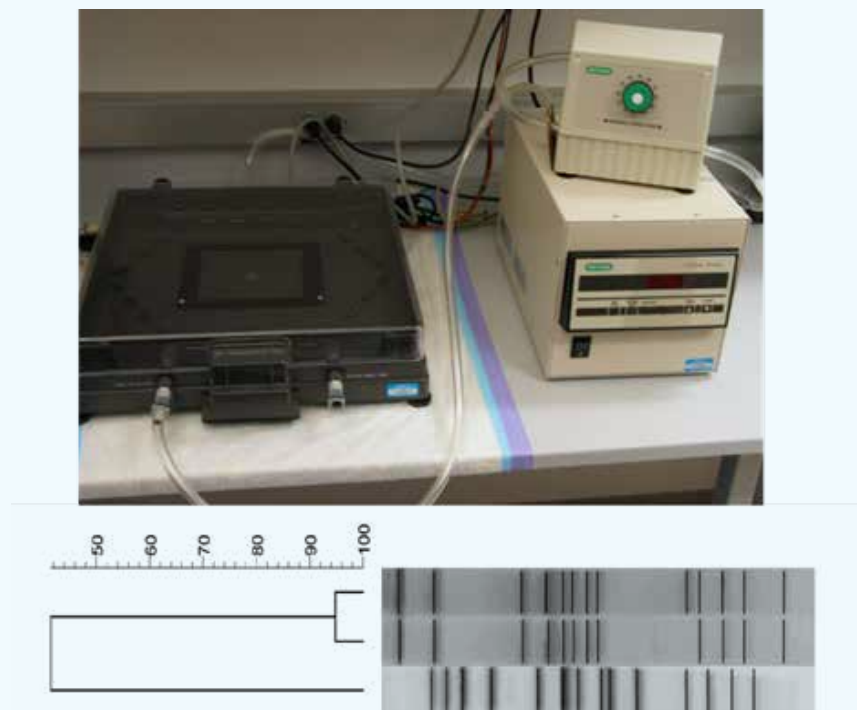
Figuur 2: De tien voornaamste serotypes betrokken bij *Salmonella*-infecties bij de mens in België in 2015

## Technieken voor subtypering :

### 1) Pulsed field gel elektroforese (PFGE):

Deze techniek bestaat erin de stammen onderling te vergelijken gebaseerd op het migratieprofiel van hun DNA-fragmenten (Figuur 3). Deze techniek heeft ruimschoots haar waarde aangetoond in tal van *Salmonella* uitbraakonderzoeken in de loop van het laatste decennium (2, 3). Zo werd in België de oorsprong van de contaminatie tijdens de *Salmonella* Ohio-uitbraak in 2005 opgespoord via PFGE analyses (3). Dit uitbraakonderzoek was een echt succes, aangezien ze niet enkel gericht was op de identificatie van de besmettingsbron, maar eveneens toeliet om maatregelen op te stellen om toestellen en hun onderdelen te ontsmetten en duidelijkere hygiëneregels te communiceren met seizoensgebonden personeel dat de landstalen nog niet beheerst (3).

De techniek van PFGE heeft eveneens als voordeel universeel te zijn en kan dus toegepast worden op de 2600 verschillende serotypes van *Salmonella*. Echter, recent internationaal onderzoek toonde aan dat PFGE twee stammen met een identiek PFGE profiel niet noodzakelijk klonaal verwant zijn, en dat andere methodes meer geschikt zijn voor epidemiologisch onderzoek (zie onder). Hierdoor raakt deze techniek momenteel in onbruik, en zal ze op korte termijn vervangen worden door andere typeringsmethoden die verderop in deze tekst beschreven worden.



Figuur 3: Toestel voor PFGE en voorbeeld van 3 DNA-profielen vergeleken met deze methode.

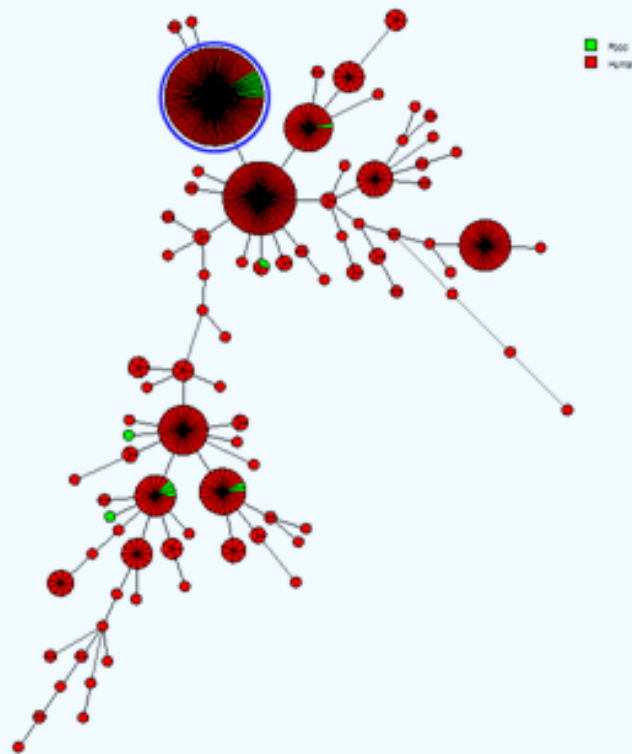


2) MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis):

Deze techniek heeft tot doel de *Salmonella*-stammen onderling te vergelijken op basis van de lengte en het aantal herhalingen van bepaalde herhaalde genoomregio's. Twee stammen worden als identiek of verwant beschouwd naargelang er geen, of een beperkte variatie is van deze herhaalde regio's. Deze techniek is echter niet universeel en vergt een specifieke ontwikkeling voor elk serotype. Momenteel wordt deze techniek in België routinematig gebruikt voor de subtypering van twee van de meest voorkomende serotypes bij *Salmonella*-infecties : *S. Enteritidis* (5) en *S. Typhimurium* (4).

Recent toonden we aan dat voor *S. Typhimurium* deze techniek soms te discriminerend was, door een sterke variatie van bepaalde herhaalde regio's binnen de verwante of identieke stammen (4).

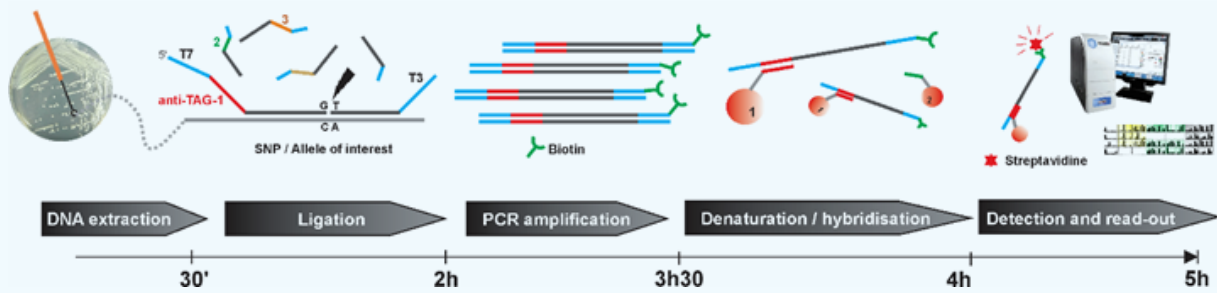
Voor *S. Enteritidis*, dat als één van de meest klonale serotypes beschouwd wordt, is deze techniek zeer discriminerend, zelfs indien één profiel voor de meerderheid van de geteste stammen in België (28%) geïdentificeerd werd (5). De routinematige uitvoering van deze subtyperingen heeft het onlangs (2016) mogelijk gemaakt deel te nemen aan een Europees onderzoek van een *S. Enteritidis* uitbraak die verschillende Europese landen getroffen heeft en waarbij de besmettingsbron gevonden werd (Figuur 4).



*Figuur 4: Fylogenetische boom van de verschillende MLVA-profielen van Salmonella-stammen van menselijke oorsprong in het rood aangeduid en van alimentaire oorsprong in het groen aangeduid die in 2016 geïsoleerd werden. De blauwe cirkel in de figuur is het profiel gelinkt aan de uitbraak die in verschillende Europese landen aangetroffen werd.*

- 3) Nieuwe generatie sequentiebepalingen, of *Next Generation Sequencing* (NGS) :
- Deze techniek bestaat erin het gehele genoom van de stam te in kaart te brengen om daarna de genomen onderling te vergelijken. Deze techniek is een belangrijke revolutie in de microbiële laboratoria, aangezien ze universeel is en ze de klassieke methodes van typering en subtypering zou kunnen vervangen. Er bestaan ten minste twee methodes om deze NGS data te vergelijken: de vergelijking van de "core genome MLST" en de vergelijking van puntmutaties (SNPs). De "core genome MLST"-methode laat het toe de sequenties van duizenden genen, de zogenaamde "housekeeping genes", te vergelijken. Dit is momenteel de methode waarbij het mogelijk is een snelle harmonisering van de vergelijking tussen laboratoria of tussen verschillende landen te verkrijgen. De vergelijking van puntmutaties is ongetwijfeld de meest discriminerende methode en kan hierdoor té discriminerend zijn. Ze vereist een vergevorderde harmonisering van deze analyse tussen laboratoria, evenals de opmaak van een nomenclatuur waarbij het mogelijk is informatie op een begrijpbare manier tussen de verschillende stakeholders uit te wisselen. Recent publiceerden we een eerste studie waar deze techniek werd toegepast in het onderzoek rond een Belgische *Salmonella* uitbraak (6). Deze methode heeft onlangs eveneens haar belang en haar toegevoegde waarde aangetoond in een onderzoek naar een epidemie die verschillende Europese landen trof, aangezien ze 3 verschillende groepen stammen kon onderscheiden (waarvan de besmetting afkomstig was van een verschillende oorsprong) binnen een populatie van *S. Enteritidis* met een zeer zeldzaam MLVA-profiel (de gegevens worden binnenkort gepubliceerd). Voorlopig blijft NGS echter nog steeds erg duur (voornamelijk wanneer ze moet worden toegepast voor de analyse van een beperkt aantal stammen per keer) en is ze, op dit ogenblik, nog niet snel genoeg. Er ligt immers meer dan een week tussen de aankomst van de stammen in het laboratorium en de verkregen sequenties en hun data-analyse. Al deze parameters worden momenteel geanalyseerd door de wetenschappelijke gemeenschap teneinde deze beloftevolle en universele techniek een plaats te geven in het arsenaal van beschikbare tests en om correct de kost/efficiëntie van deze routinetechniek in onze laboratoria te beoordelen.
- 4) Technieken van gerichte genotypering:
- Wanneer enkel bepaalde kenmerken van een bacterie moeten geïdentificeerd worden (bijvoorbeeld de aan- of afwezigheid van bepaalde genen die een resistentie aan bepaalde antibiotica toekennen), is een benadering met gerichte genotypering efficiënter en meer rendabel dan een analyse van het volledige genoom. We hebben onlangs nieuwe methodes ontwikkeld en gevalideerd die gebaseerd zijn op de Luminex technologie waarbij (i) de subtypering van *S. Typhimurium* (7) mogelijk gemaakt wordt evenals het opsporen van meer dan 50 genen of mutaties die verantwoordelijk zijn voor de resistentie aan (ii) beta-lactamen (8) en (iii) aan fluorquinolonen (Figuur 5). Deze methode is gebaseerd op de emissie van fluorescerende signalen geassocieerd met de aanwezigheid van doelwitgenen of puntmutaties. Steunend op deze ervaring, zijn we eveneens bezig met de ontwikkeling van een test waarbij het mogelijk is een genoserotypering (of serotypering op basis van het DNA) uit te voeren van de meest voorkomende serotypes in varkens en pluimvee in België (Salmstid project). Deze techniek zal ter beschikking worden gesteld van de eerstelijnslaboratoria met het oog op tijdwinst in de wedloop om de *Salmonella* die volgens de Europese regelgeving (EU Verordening nr. 2160/2003) dienen bestreden te worden, op te sporen. Het grote voordeel van deze multiplex techniek is het feit dat ze een groot aantal stammen terzelfdertijd kan analyseren (96 stammen/analyse), dat ze goedkoop is en gemakkelijk kan worden aangepast aan nieuwe doelwitten.





Figuur 5 : Schema met de verschillende stappen van de analyse door de "Luminex" techniek van gerichte gentypering

## Conclusies:

Er bestaan verschillende methodes die *Salmonella* kunnen typeren en subtyperen, elk met specifieke voor- en nadelen. De keuze van de gebruikte methode hangt af van de situatie waarmee we geconfronteerd worden, van het aantal te analyseren stammen, alsook van de tijd en het beschikbare budget. Door recente technologische evoluties zal de snelheid en de resolutie waarbij een besmettingsbron van *Salmonella* kan geïdentificeerd en verwijderd worden, de komende jaren nog sterk toenemen.

## Referenties:

1. CNR *Salmonella* & *Shigella*. Rapport annuel 2015. Souches de *Salmonella* & *Shigella* isolées en Belgique en 2015. D/2016/2505/19. 2016.
2. Kinross, P., van Alphen, L., Martinez Urtaza, J., Struelens, M., Takkinen, J., Coulombier, D., Makela, P., Bertrand, S., Mattheus, W., Schmid, D., Krisztalovics, K., Frank, C., Mooijman, K., Gossner C. Multidisciplinary investigation of a cross-border outbreak of *Salmonella* Stanley infections associated with turkey meat in the EU, 2011-2012. *Eurosurveillance*, vol 19 (19). 2014.
3. Bertrand S., Dierick K., Heylen K., De Baere T., Pochet B., Robesyn E., Lokietek S., Van Meervenne E., Imberechts H., De Zutter L. & Collard J.-M. Lessons learned from the management of a national outbreak of *Salmonella* Ohio linked to pork meat processing and distribution. *J. of Food Protection*, 73 (3) 529-534, 2010.
4. Wuyts, V., De Laminne de Bex, G., Wildemauwe, C., Roosens, N. H.C., Marchal, K., Mattheus, W., C.J. De Keersmaecker, S., Bertrand S. Investigation of the added value of multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis (MLVA) for public health surveillance of human *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium in Belgium, 2010-2012. *PlosOne*. 31; 8(12). 2013.
5. Bertrand S, De Lamine de Bex G, Wildemauwe C, Lunguya O, Phoba MF, Ley B, Jacobs J, Vanhoof R, Mattheus W. Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (MLVA) Typing Tools Improved the Surveillance of *Salmonella* Enteritidis: A 6 Years Retrospective Study. *PLoS One*. Feb 18;10(2):e0117950. 2015
6. Wuyts V, Denayer S, Roosens NH, Mattheus W, Bertrand S, Marchal K, Dierick K, De Keersmaecker SC. Whole Genome Sequence Analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 Outbreaks from a National Reference Laboratory's Viewpoint. *PLoS Curr. Outbreaks* Sep11 ; 7. 2015
7. Wuyts V, Mattheus W, Roosens N, Marchal K, De Keersmaecker S. A and Bertrand S multiplex oligonucleotide ligation-PCR as a complementary tool for subtyping of *Salmonella* Typhimurium *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015,6831.DOI: 10.1007/s00253-015-6831-7
8. Ceyskens PJ, Garcia-Graells C, Fux F, Botteldoorn N, Mattheus W, Wuyts V, De Keersmaecker S, Dierick K, Bertrand S. Development of a Luminex xTAG® assay for cost-effective multiplex detection of  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2016, 2016 Sep;71(9):2479-83.

## Dankwoord

De auteurs wensen het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV), de Vlaamse en Franse Gemeenschappen te bedanken voor hun uitstekende medewerking. Het NRL-VTI wordt 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 deels gefinancierd door het Belgische Ministerie van Sociale Zaken dankzij een fonds binnen het systeem van gezondheidsverzekering. De Salmstid studie wordt gefinancierd door de FOD Volksgezondheid (Contract RT 14/5, Salmstid1).

[Sophie.bertrand@wiv-isp.be](mailto:Sophie.bertrand@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](http://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)
8-12.05.2017	The IDF/ISO Analytical Week 2017	Madison, Wisconsin, United States of America	<a href="http://www.fil-idf.org/events/upcoming-events/">http://www.fil-idf.org/events/upcoming-events/</a>
15.05.2017	Colloquium Wie doet wat voor bijen?	Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen	<a href="http://www.levedebijen.be/Bijen/nl/colloquium/inschrijvingspagina_696.aspx">http://www.levedebijen.be/Bijen/nl/colloquium/inschrijvingspagina_696.aspx</a>
23.05.2017	International symposium on crop protection	Gent, Belgium	<a href="http://www.ugent.be/bw/crop-protection/iscp/en">http://www.ugent.be/bw/crop-protection/iscp/en</a>
24.05.2017	Trends in Food Analysis VIII	Gent, Belgium	Organised by the Flemish Chemical Society – Food section <a href="https://www.kvcv.be/index.php/nl/trends-in-food-analysis-viii">https://www.kvcv.be/index.php/nl/trends-in-food-analysis-viii</a>
29.05 – 2.06.2017	12th European Foundation of Plant Pathology meeting	Dunkerque, France	<a href="http://efpp12sfp10.univ-littoral.fr/">http://efpp12sfp10.univ-littoral.fr/</a>
1-2/06/2017	8th International Fresenius Conference “Health Claims and Functional Ingredients”	Atrium Hotel Mainz/Germany	<a href="https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/8th-international-fresenius-conference-health-claims-and-functional-ingredients/">https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/8th-international-fresenius-conference-health-claims-and-functional-ingredients/</a>
4-8.06.2017	14th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology	Aberdeen, Scotland	<a href="http://www.bageco.org/">http://www.bageco.org/</a>
19-20.06.2017	19th International Fresenius AGRO Conference “Behaviour of Pesticides in Air, Soil and Water”	Atrium Hotel Mainz/Germany	<a href="https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/19th-international-fresenius-agro-conference-behaviour-of-pesticides-in-air-soil-and-water/">https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/19th-international-fresenius-agro-conference-behaviour-of-pesticides-in-air-soil-and-water/</a>
19-21.06.2017	4th World Congress on Mass Spectrometry	London, England	<a href="http://massspectrometryeurope.blogspot.be/">http://massspectrometryeurope.blogspot.be/</a>
21-22.06.2017	6th International Fresenius Conference “Residues of Food Contact Materials in Food”	Park Inn by Radisson Köln City West, Cologne/Germany	<a href="https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/6th-international-fresenius-conference-residues-of-food-contact-materials-in-food/">https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/6th-international-fresenius-conference-residues-of-food-contact-materials-in-food/</a>



25-28.06.2017	CoCoTea 2017 : 4th International Conference on Cocoa Coffee and Tea	Turin, Italy	<a href="http://www.cocoteacongress.com/">www.cocoteacongress.com/</a>
09-12.07.2017	IAFP Annual meeting (IAFP = International Association Food Protection)	Florida, USA	<a href="https://www.foodprotection.org/annual-meeting/">https://www.foodprotection.org/annual-meeting/</a>
09-13.07.2017	FEMS 7th Congress of European Microbiologists	Valencia, Spain	<a href="http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/landing/Pages/default.aspx">http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/landing/Pages/default.aspx</a>
13-14.07.2017	International Conference on Food Contaminants (ICFC 2017) in Braga, from the 13th to the 14th of July 2017	Braga, Portugal	<a href="http://www.icfc2017.uminho.pt/">http://www.icfc2017.uminho.pt/</a>
7-9.08.2017	4th World Congress on Chromatography	Rome, Italy	<a href="http://chromatography.conferenceseries.com/">http://chromatography.conferenceseries.com/</a>
20-25.08.2017	37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs) - DIOXIN 2017	Vancouver, Canada	<a href="http://www.dioxin2017.org/">http://www.dioxin2017.org/</a>
28-30.08.2017	8th Annual Congress on Analytical and Bioanalytical Techniques	Bruxelles / Belgium	<a href="http://analytical-bioanalytical.alliedacademies.com/scientific-program-pdfs">http://analytical-bioanalytical.alliedacademies.com/scientific-program-pdfs</a>
7-8.09.2017	The 3rd international INSECTA conference 2017	Berlin, Germany	The conference aims to give an overview of the state-of-the-art of insect technology and the prospects and constraints of the use of insects as food, feed and non-food in Europe and worldwide. Technological, commercial, ecological, political and ethical issues are discussed. <a href="http://insecta-conference.com/">http://insecta-conference.com/</a>
18-19.09.2017	46th World Congress on Microbiology	Dublin, Ireland	Theme: Perceiving the challenges of the inter-disciplinary world of microbes through Research, Response & Regulation <a href="http://microbiology.conferenceseries.com/europe/">http://microbiology.conferenceseries.com/europe/</a>
21-22.09.2017	22nd Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	Organized by the Belgian Society for Food Microbiology vzw/aslb (BSFM) <a href="http://www.bsfm.be">www.bsfm.be</a>
11-14.09.2017	1st MycoKey International Conference Global Mycotoxin Reduction in the food and feed chain	Ghent, Belgium	<a href="http://www.mycokey.eu/global-mycotoxyn-reduction-in-the-food-and-feed-chain-first-announcement/">http://www.mycokey.eu/global-mycotoxyn-reduction-in-the-food-and-feed-chain-first-announcement/</a>
21.09.2017	Darmgezondheid: gezondheid zit in de darmen	Breda, Nederland	<a href="http://www.aoaclowlands.nl">http://www.aoaclowlands.nl</a>
24-27.09.2017	131st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting And Exposition	Atlanta, USA	<a href="https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Iimis/iCore/Events/Event_Display.aspx?EventKey=17AM&amp;WebsiteKey=cf9be5e4-94bf-42f8-9cad-561acbe5ce94">https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Iimis/iCore/Events/Event_Display.aspx?EventKey=17AM&amp;WebsiteKey=cf9be5e4-94bf-42f8-9cad-561acbe5ce94</a>



1-4.10.2017	3rd IMEKOFODS Conference "Metrology Promoting Standardization and Harmonization in Food and Nutrition"	Thessaloniki, Greece	<a href="http://imekofoods3.web.auth.gr">http://imekofoods3.web.auth.gr</a>
04-06.10.2017	EuroFoodChem XIX Conference	Budapest, Hungary	<a href="http://www.eurofoodchem2017.mke.org.hu/">http://www.eurofoodchem2017.mke.org.hu/</a>
18-20.10.2017	2nd World Conference on Innovative Animal Nutrition and Feeding (WIANF)	Budapest, Hungary	<a href="http://wianf.akcongress.com/index.php/conference">http://wianf.akcongress.com/index.php/conference</a>
25-26.10.2017	11th International Fresenius Conference "Contaminants and Residues in Food"	Atrium Hotel Mainz/Germany	<a href="https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/11th-international-fresenius-conference-contaminants-and-residues-in-food/">https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/11th-international-fresenius-conference-contaminants-and-residues-in-food/</a>
29.10.2017 – 03.11.2017	IDF World Dairy Summit 2017	Belfast, United Kingdom	<a href="http://www.fil-idf.org/events/upcoming-events/">http://www.fil-idf.org/events/upcoming-events/</a>
07-10.11.2017	8th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS (RAFA), Recent Advances in Food Analysis	Prague, Czech Republic	<a href="http://www.rafa2017.eu">www.rafa2017.eu</a> <a href="http://www.rafa2017.eu/pdf/Flyer/FLYER_RAFA_2017_02-01-2017.pdf">http://www.rafa2017.eu/pdf/Flyer/FLYER_RAFA_2017_02-01-2017.pdf</a>
4-7.12.2017	International miCROPe Symposium 2017 MICROBE-ASSISTED CROP PRODUCTION - OPPORTUNITIES, CHALLENGES & NEEDS	Vienna, Austria	<a href="http://micrope.org/">http://micrope.org/</a>





# Labinfo