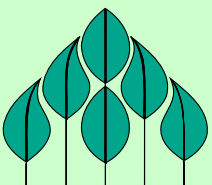


# Richtlijnen en acceptatiecriteria voor analysemethoden Mycotoxinen (DON, ZEN en OTA) in diervoeder(s)grondstoffen

Rapportage van de Expertgroep

Kwaliteitsreeks nr 96  
Juni 2004



Productschap Diervoeder

# Richtlijnen en acceptatiecriteria voor analysemethoden Mycotoxinen (DON, ZEN en OTA) in diervoeder(s)grondstoffen

Rapportage van de Expertgroep

Kwaliteitsreeks nr 96  
Juni 2004

Productschap Diervoeder  
Stadhoudersplantsoen 12  
2517 JL Den Haag  
Telefoon 070 – 370 85 03  
pdv@hpa.agro.nl  
www.pdv.nl

© PDV Den Haag

## Voorwoord

Voor u ligt de rapportage, zoals die door de Expertgroep Analysemethoden Mycotoxinen in diervoeder(s)grondstoffen is opgesteld. Deze expertgroep is door het Bestuur van het Productschap Diervoeder in juni 2003 ingesteld, nadat zij had geconstateerd dat er voor de bepaling van de Mycotoxinen DON (Deoxynivalenol), OTA (Ochratoxine A) en ZEN (Zearalenon) geen eenduidige richtlijnen voorhanden waren.

De Expertgroep heeft in een drietal bijeenkomsten de criteria waaraan confirmatie- en screeningsmethoden voor de bepaling van Mycotoxinen in diervoeder(s)grondstoffen moeten voldoen, opgesteld. Daarnaast zijn de minimale prestatie criteria opgesomd en zijn er richtlijnen voor de bepaling van de Mycotoxinen geformuleerd.

Vervolgens heeft de expertgroep een inventarisatie gedaan om vast te stellen in hoeverre de laboratoria, die op dit moment Mycotoxinen analyses verrichten, voldoen aan de gestelde criteria.

Deze rapportage moet als een leidraad worden gezien voor de laboratoria die Mycotoxinen in diervoeder(s)grondstoffen willen bepalen. Uiteindelijk zal, nadat via ringonderzoek (bijvoorbeeld in KDLL verband), de tussenlaboratorium verschillen bekend worden, een definitieve selectie plaats kunnen vinden.

Namens de Expertgroep hoop ik dat deze rapportage hier een bijdrage aan kan leveren.

Dr. L. Vellenga  
Voorzitter Expertgroep

## Inhoudsopgave

Voorwoord .....	1
1. Aanleiding .....	3
2. De vastgestelde normen door het PDV bestuur .....	3
3. Taakstelling Expertgroep .....	4
4. Werkwijze .....	4
5. Resultaten .....	5
5.1 <i>Criteria/parameters voor confirmatiemethoden</i> .....	5
5.1.1. Definities/omschrijving van criteria en parameters .....	5
5.1.2. Prestatie-criteria voor confirmatiemethoden .....	7
5.2. <i>Criteria/parameters voor screeningsmethoden</i> .....	7
5.2.1 Definities/omschrijving van criteria en parameters .....	7
5.2.2. Prestatie-criteria voor screeningsmethoden .....	8
6. Richtlijnen voor Analyse van Mycotoxinen in Diervoeder(s)grondstoffen.....	9
6.1 confirmatiemethode .....	9
6.2. screeningsmethoden.....	10
7. Inventarisatie van de prestatie-criteria van de analysemethodieken en de laboratoria die reeds Mycotoxinen in Diervoeder(s)grondsstoffen bepalen (zowel confirmatie- als screeningsmethoden). .....	11
7.1 Confirmatiemethoden.....	11
7.2 Screeningsmethoden .....	11
8. Conclusies, aanbevelingen .....	13
Samenvatting.....	14
Geraadpleegde literatuur .....	15
Bijlage 1: CEN 13505.....	16
Samenstelling Expertgroep:.....	17

## 1. Aanleiding

Naar aanleiding van de vaststelling van de Mycotoxinen normen voor DON (Deoxynivalenol), OTA (Ochratoxine A) en ZEN (Zearalenon) in verschillende diervoeders door het Bestuur van het Productschap Diervoeder op 11 juni 2003, is geconstateerd dat snelle, betrouwbare, (zo mogelijk gevalideerde) analysetechnieken beschikbaar moeten zijn, vooraleer de normen van kracht worden. De normen maken onderdeel uit van de GMP regeling. Voor aflatoxine gelden al sinds 1989 actie- en afkeurgrenzen.

Het Bestuur van het Productschap Diervoeder heeft in diezelfde vergadering met het formieren van een expertpanel ingestemd. Dit expertpanel moet op basis van de huidige kennis de beschikbare analysemethoden beoordelen op de bruikbaarheid.

## 2. De vastgestelde normen door het PDV bestuur

De actie/ en afkeurgrenzen zijn vastgesteld op rantsoenbasis en gelden voor de mycotoxinen DON, ZEN en Ochratoxine A. Uit een deskstudie die met betrekking tot mycotoxinen zijn gedaan, is gebleken, dat van de bovengenoemde mycotoxinen, nadelige effecten kunnen hebben voor landbouwhuisdieren. De afkeur- en actiegrenzen voor bovenstaande mycotoxinen zullen worden geïmplementeerd in de GMP<sup>+</sup>-regeling.

Onderstaand is een overzicht van de normen opgenomen, zoals die gelden voor de mycotoxinen DON, ZEN en OTA voor de verschillende diervoeders.

De normen voor mycotoxinen op rantsoenbasis zijn:

		<b>Afkeurgrens</b>	<b>Actiegrens</b>
DON			
	varkens	1.000 µg/kg	800 µg/kg
	vleeskuikens, leghennen en kalkoenen	4.000 µg/kg	3.200 µg/kg
	pluimvee moederdieren	2.000 µg/kg	1.600 µg/kg
	kalveren tot 4 maanden	2.000 µg/kg	1.600 µg/kg
	melkvee	3.000 µg/kg	2.400 µg/kg
	overig rundvee	5.000 µg/kg	4.000 µg/kg
Zearalenon			
	zeugen/vleesvarkens	250 µg/kg	200 µg/kg
	biggen/opfokgelten	100 µg/kg	80 µg/kg
	pluimvee	geen grens	geen grens
	melkvee/pinken/kalveren	500 µg/kg	400 µg/kg
	vleesvee	geen grens	geen grens
Ochratoxine A			
	zeugen/vleesvarkens/biggen	50 µg/kg	40 µg/kg
	pluimvee	200 µg/kg	160 µg/kg
	herkauwers	geen grens	geen grens

Omdat in het voorstel naar het PDV bestuur uitgegaan werd van grenzen op rantsoenniveau was de vraag aan de orde hoe moest worden omgegaan met enkelvoudige voedermiddelen. Voor enkelvoudige voedermiddelen is vastgesteld dat 3 x de norm voor eindvoeders (rantsoenbasis) kan worden aangehouden, mits de uitslag vergezeld gaat met een attenderings- en voederadvies.

### 3. Taakstelling Expertgroep

Zoals eerder aangegeven heeft het PDV bestuur ingestemd met het formeren van een expertgroep die de beschikbaarheid van methoden, de bruikbaarheid en de validatie ervan, zou moeten inventariseren. Daarnaast zou deze expertgroep de behoefte aan nieuwe methoden moeten inventariseren.

Meer concreet is voorgesteld om ten aanzien van bevestigingsmethoden en screeningsmethoden de volgende gegevens te inventariseren:

#### Confirmatiemethoden

- Evalueren van thans beschikbare confirmatiemethoden (op basis van de voorwaarden zoals genoemd in Beschikking 2002/657/EG) voor mycotoxinen m.b.t. nauwkeurigheid, reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid, validatie (m.b.t. de matrices), recovery, snelheid, complexiteit, kosten.
- Op basis van deze evaluatie vaststellen welke methoden voor welke mycotoxinen bij welke matrices betrouwbaar kunnen worden ingezet, en of er nog nader aanvullend onderzoek nodig is.

#### Rapid testing

- Evalueren van thans beschikbare methoden voor rapid testing / screening voor welke mycotoxinen op praktische bruikbaarheid, betrouwbaarheid, snelheid en kosten.
- Op basis van deze evaluatie vaststellen voor welke mycotoxinen rapid testing methoden ontbreken en zouden moeten worden ontwikkeld, alsook het technische perspectief daarvoor aangeven.

### 4. Werkwijze

Op basis van de taakstelling heeft het expertpanel de beschikbare literatuur en de expertise van de panelleden benut om de analysemethoden (zowel confirmatietesten als screeningsmethoden) te beoordelen en door deze te toetsen aan de volgende prestatiecriteria:

Voor wat betreft de confirmatiemethoden:

- herhaalbaarheid
- Binnenlaboratorium Reproduceerbaarheid
- Tussenlaboratorium reproduceerbaarheid
- Recovery

Voor screeningsmethoden

- Sensitiviteit
- Specificiteit

Voordat een dergelijke beoordeling kan plaatsvinden moeten eenduidige definities/ omschrijvingen van deze criteria opgesteld worden.

Hiervoor zijn waar mogelijk CEN/ ISO rapportages en andere bronnen geraadpleegd.

Voor het opstellen van het analysevoorschrift voor de bepaling van DON, ZEN en OTA geldt hetzelfde.

De resultaten/ conclusies/ aanbevelingen zullen onder de aandacht worden gebracht en voor advisering worden voorgelegd aan de Stuurgroep Analyseaangelegenheden Diervoedersector en de Commissie Kwaliteitsbeleid Diervoedersector alvorens het voor vaststelling aan het bestuur van het PDV zal worden voorgelegd.

## 5. Resultaten

### 5.1 Criteria/parameters voor confirmatiemethoden

In het CEN-CR 13505:1999 document (**bijlage 1**) zijn de parameters aangegeven die voor analysemethoden voor het bepalen van mycotoxinen van belang zijn. Het gaat hierbij om de parameters voor confirmatiemethoden.

Onderstaand zijn definities en/of specifieke kenmerken voor deze parameters opgesomd.

#### 5.1.1. Definities/omschrijving van criteria en parameters

- **Minimum bepaalbaarheidsgrens;**  
Dit is de helft van de laagste actiegrens.
- **Herhaalbaarheid;**  
Herhaalbaarheid,  $RSD_r$  (Relatieve binnen-laboratorium standaard deviatie): Dit precisiekenmerk is gerelateerd aan de binnen laboratorium onjuistheid van een methode. Het is de standaard deviatie gedeeld door het gemiddelde van de testuitslagen, verkregen met dezelfde methode op identiek testmateriaal, onder dezelfde omstandigheden (zelfde uitvoerder, apparatuur, laboratorium en binnen een korte tijdsinterval) x 100%. De  $RSD_r$  is uitgedrukt in %.
- **Reproduceerbaarheid (tussen laboratoria);**  
Reproduceerbaarheid,  $RSD_R$  (Relatieve tussen-laboratorium standaard deviatie): Dit precisiekenmerk is gerelateerd aan de tussen laboratorium onjuistheid van een methode. Het is de standaard deviatie gedeeld door het gemiddelde van de testuitslagen, verkregen met dezelfde methode op identiek testmateriaal, maar onder andere omstandigheden (andere uitvoerder, apparatuur, laboratorium en andere tijden) x 100%. De  $RSD_R$  is uitgedrukt in %.
- **Reproduceerbaarheid (binnen laboratoria)**  
Reproduceerbaarheid  $RSD_{RL}$ : Mate van overeenstemming tussen de meetresultaten van dezelfde meetgrootte, verkregen onder wisselende omstandigheden. De wisselende omstandigheden kunnen omvatten: de waarnemer, het meetinstrument, de referentiestandaard, de plaats, de gebruiksomstandigheden en de tijd.  $RSD_{RL}$  wordt uitgedrukt in %.
- **Extractiemethode;**  
Voor de mycotoxinen DON, ZEN en OTA geldt dat bij voorkeur gebruik moet worden gemaakt van acetonitril/water. Voor DON kan echter ook water/PEG worden gebruikt. Bij zetmeelachtige en vetrijke producten is een voorbewerking met chloroform of dichloormethaan noodzakelijk.
- **Clean up;**  
Om het monsterextract op een juiste wijze voor te bewerken geldt voor de mycotoxinen DON, OTA en ZEN dat bij voorkeur gebruik moet worden gemaakt van IAC (Immunoaffiniteitschromatografie).

- **Scheiding/detectie;**  
Voor de scheiding en de detectie van de Mycotoxinen DON, OTA en ZEN moet bij voorkeur gebruik worden gemaakt van de HPLC (Hogedruk vloeistofchromatografie) techniek in combinatie met fluorescentiedetectie of UV. Voor DON kan ook worden gebruik gemaakt van GC (Gaschromatografie) in combinatie met ECD (Electron-capture detectie). Ook is scheiding en detectie mogelijk met LC/MS-MS.
- **Detectielimiet;**  
Voor de detectielimiet geldt dat deze tenminste de helft van de minimale bepaalbaarheidsgrens moet bedragen (zie ook definitie van de minimale bepaalbaarheidsgrens).
- **Meettraject;**  
Dit traject moet minimaal lopen van een ½ maal de actiegrens tot 2 maal de afkeurgrens.
- **Recovery;**  
Recovery: (Gemeten concentratie materiaal waar mycotoxine aan is toegevoegd – gemeten concentratie in blanco materiaal) x 100% / (bekende verhoging in concentratie). Recovery is uitgedrukt in %. De toegevoegde hoeveelheid moet minimaal een substantiële fractie van de aanwezige hoeveelheid in het blanco materiaal zijn. Idealiter DIENT het blanco materiaal minder dan de bepaalbaarheidsgrens van de te testen analiet bevatten.
- **Juistheid;**  
Dit is de gemeten concentratie in gecertificeerd referentie materiaal, gedeeld door de ware toegekende waarde X 100%. Een ware toegekende waarde is alleen bekend in gevallen van nature gecontamineerde materialen, gecertificeerde referentie materialen, of door analyse met een andere (vermoedelijk nauwkeurige) methode. De concentratie van het blanco materiaal is verkregen door directe analyse of door gebruik van de standaard additie. In andere gevallen, als de afwijking niet bekend is, kunnen de waarden van de ringtest als referentiepunt gebruikt worden.
- **Meetonzekerheid;**  
Dit is dezelfde waarde als de binnen laboratorium reproduceerbaarheid (RSD<sub>RL</sub>%). Wanneer de meetonzekerheid bijv 30% bedraagt, betekent dit dat bij een afkeurgrens van 1000, een analyseresultaat van 1301 tot afkeuring van het product leidt.



### 5.1.2. Prestatie-criteria voor confirmatiemethoden

De analysemethoden voor het bepalen van de mycotoxinen DON, ZEN en OTA in diervoeders en diervoedergrondstoffen en de laboratoria die deze mycotoxine-analyses willen gaan verrichten moeten voldoen aan de navolgende minimale prestatie-criteria. Deze prestatie-criteria zijn berekend op basis van de performance characteristics, zoals beschreven in het CEN CR 13505: 1999 document (zie bijlage 1).

De minimale prestatie-criteria, zoals die gelden voor deoxynivalenol (DON) zijn:

Level ug/kg	Deoxynivalenol (DON)			Recovery %
	RSD <sub>RL</sub> %	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> , %	
> 200	≤ 30	≤ 20	≤ 40	70-110

De minimale prestatie-criteria, zoals die gelden voor zearalenone zijn:

Level ug/kg	Zearalenone			Recovery %
	RSD <sub>RL</sub> %	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> , %	
> 20	≤ 32,5	≤ 25	≤ 40	70-110

De minimale prestatie-criteria, zoals die gelden voor ochratoxine A zijn:

Level ug/kg	Ochratoxine A			Recovery %
	RSD <sub>RL</sub> %	RSD <sub>r</sub> %	RSD <sub>R</sub> , %	
> 10	≤ 25	≤ 20	≤ 30	70-110

## 5.2. Criteria/parameters voor screeningsmethoden

Onderstaand zijn de parameters aangegeven die, voor (snelle) screeningsmethoden voor het bepalen van mycotoxinen in diervoeder(s)grondstoffen, van belang zijn. Onderstaand zijn definities en/of specifieke kenmerken voor deze parameters opgesomd.

### 5.2.1 Definities/omschrijving van criteria en parameters

- **Sensitiviteit;**

De sensitiviteit duidt op de waarschijnlijkheid dat een positieve uitslag door de test ook als positief wordt geïdentificeerd. Dit is een maat voor aantal vals negatieve uitslagen. Een hoge sensitiviteit (100%) houdt in dat er geen vals negatieve uitslagen te verwachten zijn.

- **Specificiteit;**

De specificiteit duidt op de waarschijnlijkheid dat een negatieve uitslag van de test als negatief wordt aangewezen. Dit is een maat voor het aantal vals positieve uitslagen in een test. Een hoge specificiteit (100%) houdt in dat er geen vals positieve uitslagen te verwachten zijn.

### 5.2.2. Prestatie-criteria voor screeningsmethoden

De screeningsmethoden voor het bepalen van de mycotoxinen DON, ZEN en OTA in diervoeders en diervoedergrondstoffen en de laboratoria die deze mycotoxine-analyses willen gaan verrichten moeten voldoen aan de navolgende minimale prestatie-criteria

De minimale prestatie-criteria, zoals die gelden voor deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) en ochratoxine A (OTA) zijn:

Level ug/kg	Mycotoxine		
	DON	ZEN	OTA
Sensitiviteit (maat voor vals negatieve uitslagen)	100% bij overschrijding actiegrens	100% bij overschrijding actiegrens	100% bij overschrijding actiegrens
Specificiteit (maat voor vals positieve uitslagen)	Bij voorkeur >95%	Bij voorkeur >95%	Bij voorkeur >95%

De screeningsmethoden voor het bepalen van bovengenoemde Mycotoxinen kunnen alleen een negatief of positief resultaat vaststellen. Bij een positief resultaat zal daarnaast altijd bevestiging (met een confirmatiemethode) noodzakelijk zijn.

## 6. Richtlijnen voor Analyse van Mycotoxinen in Diervoeder(s)grondstoffen

### 6.1 *confirmatiemethode*

Op basis van de NEN procedures voor ZEA en OTA is door de Expertgroep een richtlijn voor de bepaling van DON, ZEN en OTA in diervoeder(s)grondstoffen ontwikkeld. Deze richtlijnen zijn vervolgens vergeleken met de standaard ISO methoden en de bedrijfseigen laboratorium methoden. De richtlijnen voor het bepalen van de mycotoxinen DON, ZEN en OTA in diervoeder(s)grondstoffen zijn:

#### **Algemeen:**

1. Gebruik geen onbewerkt glas
2. Voorkom schimmelvorming tijdens monsteropslag en –bewaring.

#### **Specifiek:**

1. Uitgaan van minimaal 500 gram monstermateriaal. Dit monstermateriaal in zijn geheel malen tot een korrelgrootte van  $\leq 1$  mm en homogeniseren.
2. 25 gram van het gehomogeniseerde monstermateriaal overbrengen in een blender of in een maatkolf en 100 ml acetonitril:water (84:16; V:V) toevoegen. (Als er problemen zijn met de fasescheiding, hieraan 2,5 gram NaCl toevoegen). Bij vetrijke grondstoffen extraheren met chloroform of zure dichloormethaan en terugextraheren met Na bicarbonaat.

N.B. Er wordt vanuit gegaan dat het monstermateriaal  $< 20\%$  water bevat. Bij brijvoerders moet bij de verhouding acetonitril:water rekening worden gehouden met het reeds aanwezige water in het brijvoeder.

3. De suspensie met hoge snelheid blenderen gedurende 2 minuten. Of schudden gedurende tenminste 2 à 3 uren.
4. Filtreer meer dan 10 ml over een bevochtigd filtreerpapier in een erlenmeyer.
5. Voer een Solid Phase Extraction uit (IAC of SPE).
6. Indien nodig, verdamp (40-60 graden Celsius) het eluaat tot droog onder een milde stroom stikstof en los het extract op in 2 ml mobiele fase.
7. Voer HPLC uit door injectie van 100  $\mu$ l opgelost extract of zoveel minder als noodzakelijk voor het bereiken van een goede detectie en scheiding.
8. Detectie van de mycotoxinen vindt plaats middels LC met fluorescentiedetectie bij voor de desbetreffende mycotoxinen specifieke excitatie en emissie golflengtes of met LC/MS-MS.

## **6.2. screeningsmethoden.**

Met betrekking tot de te accepteren screeningsmethoden voor het bepalen van de mycotoxinen DON, ZEN en OTA in diervoeder(s)grondstoffen kan gesteld worden, dat de ELISA methoden die op dit moment als complete kits op de markt zijn, toereikend zijn voor het bepalen van de mycotoxinen DON, ZEN en OTA in enkelvoudige voeders.

Bij het gebruik van de screeningsmethoden voor het bepalen van Mycotoxinen in Diervoeder(s)grondstoffen is het van groot belang de gebruiksvorschriften van de fabrikant te volgen.

Daarnaast moet hierbij worden aangetekend dat bij zetmeelachtige en vetrijke producten een voorbewerking met een apolair organisch oplosmiddel noodzakelijk is.

## **7. Inventarisatie van de prestatie-criteria van de analysemethodieken en de laboratoria die reeds Mycotoxinen in Diervoeder(s)grondstoffen bepalen (zowel confirmatie- als screeningsmethoden).**

### **7.1 Confirmatiemethoden**

Er is door de Expertgroep een inventarisatie gedaan bij een aantal laboratoria, die op dit moment al Mycotoxinen bepalen in diervoeder(s)grondstoffen.

Uit deze inventarisatie is naar voren gekomen dat de laboratoria kunnen voldoen aan de minimale prestatiecriteria, zoals opgenomen in hoofdstuk 5.1.2 van deze rapportage.

Deze inventarisatie had betrekking op de volgende prestatie kenmerken

- **Minimum bepaalbaarheidsgrens**
- **Reproduceerbaarheid** (binnen laboratoria) RSD<sub>RL</sub> of meetonzekerheid
- **Herhaalbaarheid**, RSD<sub>r</sub>

Naast het voldoen aan bovenstaande minimale prestatiecriteria is het voor het beoordelen van een analysetechniek en van de laboratoria die de bepalingen gaan uitvoeren van belang om te weten voor welke matrix men de test gebruikt heeft en of er al een volledige validatie (inclusief ringtest, bijvoorbeeld KDLL) heeft plaatsgevonden.

**De expertgroep hecht eraan om dit laatste aspect zeer te benadrukken, omdat via een ringtest de tussen laboratorium verschillen inzichtelijk worden gemaakt.**

De laboratoria die op dit moment Mycotoxinen analyseren en kunnen voldoen aan de minimale criteria, zoals opgenomen in hoofdstuk 5.1.2. van deze rapportage zijn:

- **Masterlab, Putten**
- **CCL, Veghel**
- **Labco, Rotterdam**
- **TLR, Rotterdam**
- **RIKILT, Wageningen**
- **RIVM, Bilthoven**
- **TNO, Zeist**
- **Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht**
- **Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer**

### **7.2 Screeningsmethoden**

Er zijn verschillende redenen waarom snelle (on-line) screeningsmethoden gewenst zijn en ook worden toegepast. De praktische bruikbaarheid (on-line toepassen), het snel beschikbaar zijn van het analyseresultaat en de kosten van de Testkit zijn belangrijke aspecten in deze.

Echter, wanneer de snelheid (direct meetresultaat) en de praktische toepasbaarheid (gebruikersvriendelijkheid) van een testkit aan de voorwaarden voldoen is men in de praktijk geneigd hier genoeg mee te nemen. Wanneer de testkit daarnaast ook nog, prijstechnisch gezien, kan concurreren met de confirmatiemethoden, is dit reden te meer om de screeningsmethoden toe te passen.

De expertgroep is van mening dat naast bovengenoemde aspecten op z'n minst voldaan moet worden aan de voorwaarde, dat de testkit nauwelijks tot geen vals negatieve uitslagen mag opleveren, met andere woorden de sensitiviteit moet hoog zijn).

Daarnaast is het vanuit kostenoverweging wenselijk dat een screeningsmethode weinig vals positieve resultaten laat zien. Immers, na ieder positief resultaat zal bevestiging noodzakelijk zijn. De Expertgroep is van mening dat bij een lage specificiteit (dus veel vals positieve uitslagen) een testkit zichzelf "uit de markt prijst".

De (ELISA) testkits die momenteel op de markt zijn en die voldoen aan de opgesomde criteria zijn verkrijgbaar bij:

- Euro-Diagnostica B.V.  
Beijerinckweg 18  
6827 BN Arnhem  
Tel 026 3630364
- R-Biopharm  
Landwehrstrasse 54  
D-64293 Darmstadt  
Duitsland  
Tel 00 49 6151 80 10 20

## 8. Conclusies, aanbevelingen

Naar aanleiding van de vragen die door het Productschap Diervoeder aan de expertgroep zijn gesteld wordt, op basis van de resultaten van het onderzoek door de expertgroep, het volgende geconcludeerd:

- Voor beide (confirmatie- en screenings-) methoden zijn richtlijnen voor de bepaling van de mycotoxinen (DON, OTA en ZEN) in diervoer(s)grondstoffen opgesteld, die het voor laboratoria mogelijk maken deze analyses uit te voeren.
- Voor de te gebruiken confirmatiemethoden en voor de bepaling van de mycotoxinen concludeert de expertgroep dat voor de scheiding en de detectie van de Mycotoxinen DON, OTA en ZEN gebruik kan worden gemaakt van de HPLC (Hogedruk vloeistofchromatografie) techniek in combinatie met fluorescentiedetectie of UV of van GC (Gaschromatografie) in combinatie met ECD (Electron-capture) detectie (DON). Ook is scheiding en detectie mogelijk met LC/MS-MS.
- Voor het gebruik van de screeningsmethoden verwijst de expertgroep voor wat betreft de richtlijnen, naar de gebruiksaanwijzingen van de op dit moment verkrijgbare (ELISA) testkits.
- Uit de inventarisatie onder de laboratoria, die op dit moment mycotoxinen-analyses verrichten blijkt dat alle bij deze inventarisatie betrokken laboratoria voldoen aan de minimale prestatie criteria, zoals die gelden voor de confirmatiemethoden.
- Er zijn in Nederland en Duitsland screeningsmethoden beschikbaar die voldoen aan de voorwaarden.
- Dat bij gebruikmaking van- en op basis van de in deze rapportage voorgestelde richtlijnen, voldoende betrouwbare analyse resultaten m.b.t. de mycotoxinen DON, OTA en ZEN in diervoeder(s)grondstoffen verkregen kunnen worden.
- Dat pas na een ringtest (bijv. KDLL) de tussen laboratorium reproduceerbaarheid kan worden vastgesteld. Voor een volledige validatie zijn deze gegevens onontbeerlijk.

De Expertgroep komt tot de volgende aanbevelingen:

- Om de voor een volledige validatie benodigde tussenlaboratorium reproduceerbaarheidgegevens beschikbaar te krijgen, dient op korte termijn (nog in 2004) een ringonderzoek (bijv. via KDLL) te worden gestart met de laboratoria die aan de minimale prestatie criteria voldoen
- De meetonzekerheid van het analyseresultaat dient bekend te zijn, zodat berekend kan worden, bij welke uitslag de actie en/of afkeurgrens wordt overschreden.

## Samenvatting

Het Bestuur van het Productschap Diervoeder (PDV) heeft in juni 2003 normen voor de Mycotoxinen DON (Deoxynivalenol), OTA (Ochratoxine A) en ZEN (Zearalenon) in verschillende diervoeders vastgesteld. Ze heeft daarbij aangegeven dat, vooraleer de normen van kracht worden, er eerst snelle, betrouwbare en (zo mogelijk gevalideerde) analysetechnieken beschikbaar moeten zijn.

Er is, op voorspraak van het PDV bestuur, een expertgroep geformeerd, die voor zowel confirmatiemethoden als screeningsmethoden de minimale prestatiecriteria heeft geformuleerd (hoofdstuk 5.1.2 en 5.2.2).

Voor beide (confirmatie- en screenings-) methoden zijn richtlijnen voor de bepaling van de mycotoxinen (DON, OTA en ZEN) in diervoer(s)grondstoffen opgesteld (hoofdstuk 5.1 en 5.2). Voor de te gebruiken confirmatiemethoden en voor de bepaling van de mycotoxinen geeft de expertgroep aan dat voor de scheiding en de detectie van de Mycotoxinen DON, OTA en ZEN gebruik kan worden gemaakt van de HPLC (Hogedruk vloeistofchromatografie) techniek in combinatie met fluorescentiedetectie of UV of van GC (Gaschromatografie) in combinatie met ECD (Electron-capture) detectie (DON). Ook is scheiding en detectie mogelijk met LC/MS-MS.

Voor de screeningsmethoden verwijst de expertgroep naar de gebruiksaanwijzingen van de op dit moment verkrijgbare (ELISA) testkits.

Vervolgens is door de expertgroep een inventarisatie gedaan, om vast te stellen in hoeverre de laboratoria, die op dit moment mycotoxinen-analyses verrichten, voldoen aan de minimale prestatie criteria (hoofdstuk 7). Het blijkt dat alle bij deze inventarisatie betrokken laboratoria voldoen aan deze voorwaarden, die gesteld worden aan de confirmatiemethoden.

Er zijn in Nederland en Duitsland screeningsmethoden beschikbaar die voldoen aan de voorwaarden.

De expertgroep concludeert dat bij gebruikmaking van- en op basis van de in deze rapportage voorgestelde richtlijnen, voldoende betrouwbare analyse resultaten m.b.t. de mycotoxinen DON, OTA en ZEN in diervoeder(s)grondstoffen verkregen kunnen worden. Ze tekent hierbij aan dat pas na een ringtest (bijv. KDLL) de tussen laboratorium reproduceerbaarheid kan worden vastgesteld. Voor een volledige validatie zijn deze gegevens onontbeerlijk. Ook wordt aanbevolen dat de meetonzekerheid van het analyse-resultaat bekend is, zodat berekend kan worden, bij welke uitslag de actie en/of afkeurgrens wordt overschreden.



## Geraadpleegde literatuur

- CEN European Committee for Standardization; CR13505:1999; Food Analysis-Biotoxins- Criteria of analytical methods of mycotoxins
- Martin, S.W., Meek, A.H., and Willenberg, P. 1987. Veterinary Epidemiology: principles and methods. Iowa State University Press, Ames
- NEN 7779:2003; Milieu – onzekerheid van meetresultaten

**Bijlage 1: CR 13505: 1999 Food analysis –Biotoxins- Criteria of analytical methods of mycotoxins**

Deze bijlage (5 MB) kan indien gewenst per post verstuurd worden.

## **Samenstelling Expertgroep:**

De samenstelling van de Expertgroep Analysemethoden Mycotoxinen is als volgt:

- Dr. Cor Arts, Arts Project Support te 's Hertogenbosch
- Dr. Machiel Blok, Veevoederbureau te Lelystad
- Dr. Guillaume Counotte, Gezondheidsdienst voor Dieren te Deventer
- Dr. Hans van Egmond, RIVM te Bilthoven
- Prof. Dr. Joanna Fink-Gremmels, Faculteit Diergeneeskunde, RUU te Utrecht
- Dr. Ir. Manfred Hensing, Nutreco international BV te Boxmeer
- Drs. Ir. Harm Janssens, TLR te Rotterdam
- Dr. David de Kloet, Wim Traag, RIKILT te Wageningen
- Dr. Rob Margry, CCL BV te Veghel
- Ing. Ton van Osenbruggen, Gerben Boonzaaijer, TNO Voeding te Zeist
- Ing. Bram Schuit, TLR te Rotterdam
- Drs. Marcel de Vreeze, NEN, Centrum voor Normalisatie te Delft
- Ir. Frans Verstraete, EC te Brussel
- Ir. Christine Rommens, Ing. Paulien van de Graaff, Productschap Diervoeder te Den Haag (secr.)
- Dr. Liebe Vellenga, Productschap Diervoeder te Den Haag (Voorzitter)