Mycotoxin detection at RIKILT

Plant toxins-emerging risk

Monique de Nijs

Fusarium werkgroep, October 26, 2011, CBS Utrecht

RIKILT WAGENINGEN UR

Program

1. RIKILT
2. Mycotoxins
3. Plant toxins-emerging risk
4. Analytical challenges
5. Concluding remarks

RIKILT WAGENINGEN UR

RIKILT - Institute of Food Safety

www.rikilt.wur.nl

- Part of Wageningen UR since 1998
- About 200 employees

RIKILT WAGENINGEN UR

RIKILT - Institute of Food Safety

www.rikilt.wur.nl

- Detection, identification, functionality and effects of substances in food and feed;
- RIKILT:
  - Specific research, with CVI and RIVM, for the Netherlands new food safety authority (nVWA);
  - Is laboratory for VWA (including AID);
- Contract work:
  - According to guidance document;
  - Report duty, as any laboratory, when legal limits are exceeded;

RIKILT WAGENINGEN UR

RIKILT - *Activities and work fields*

Activities RIKILT

- Research analysis & toxicology
- Develop & validate (ref.) methods
- Quality assurance (ref.) labs
- Analyses (government & private)
- Consultancy & Training
- Emergency response service

Areas

- Food *Dioxin in eggs from Germany*
- Feed
- Tissue samples
- Environmental samples *Fire Moerdijk*

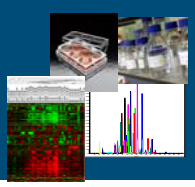
Fields

Chemical & natural contaminants
dioxins; pesticides; heavy metals; hormones; medicines; myco-, phyco-, plant toxins
GMOs
Authenticity & nutrients & Quality
Supply chain management
Climate change
Emerging risks
Radioactivity *Food samples Japan*

RIKILT WAGENINGEN UR

www.rikilt.wur.nl

RIKILT –Institute of Food Safety



RIKILT WAGENINGEN UR

www.rikilt.wur.nl

RIKILT - Cooperation

Research:
- Food Safety Authorities
- Wageningen University
- RIVM
- Various Universities: (Leiden; Amsterdam)
- TNO
- International projects

International projects
- Confidence
- Selamat
- Pegasus
- Nanolyse
- BioCop
- Go-global
- Nanodetect
- MycoRed
- MoniQA
- Emtox
- QSAFFE

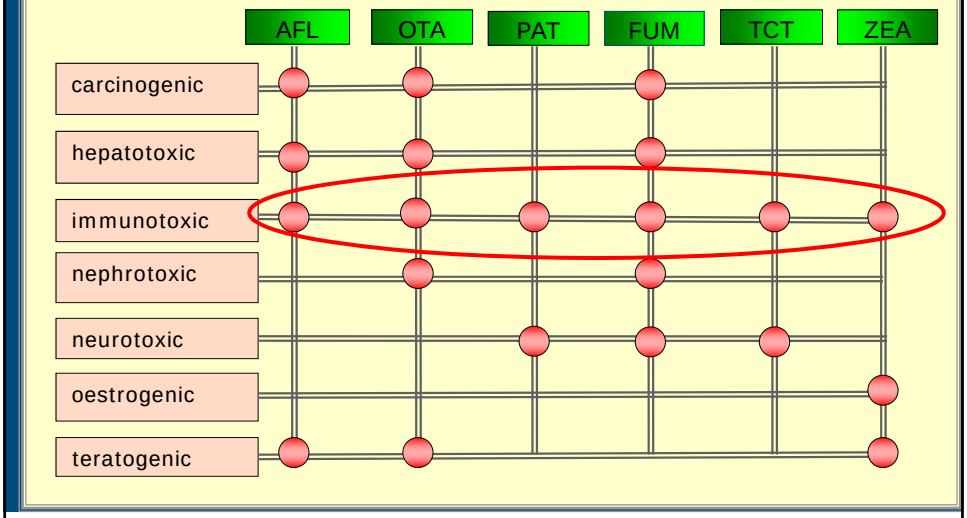
RIKILT WAGENINGEN UR

Program

1. RIKILT
2. Mycotoxins
3. Plant toxins-emerging risk
4. Analytical challenges
5. Concluding remarks

RIKILT WAGENINGEN UR

Mycotoxins - *Toxic effects*



RIKILT WAGENINGEN UR

Mycotoxins – *Challenges - Products*

994: Holy fire (lysergic acid deriv. *C. purpurea)*

1568: Pieter Brueghel *The Cripples*
'Holy fire' by ergot alkaloids in **rye**
(gangreen followed by *necrosis / hallucinations*)

2011: Ergots in **cereals**; EFSA opinion expected in 2012
Regulatory limits on groups of toxins (as opposed to ergot sclerotia)

RIKILT WAGENINGEN UR

Mycotoxins – *Challenges - Products*

- (Re-)introduction of crops:
  - Introduction of lupin as GMO-soy replacer: risk of phomopsin contamination (Australia & NZ limit of 5 µg/kg)

- Increased area of oats as healthy grain: no recent reports on occurrence of mycotoxins in oats in the Netherlands.

Oats sensitive for T-2/HT-2 contamination

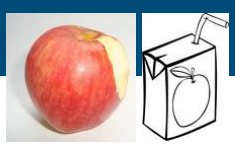
RIKILT WAGENINGEN UR

Mycotoxins – *Challenges - Handling*

- Up to now: patulin contamination of apple juice seems to be controlled:
  - bulk production of apples;
  - controlled storage and sorting;
  - quality control on juice;
- Currently: handicraft / local production:
  - lack of knowledge on contamination routes (uncontrolled storage, no sorting prior to processing);
  - use of new or old races (no experience);

  → patulin in artisanal produced apple juice (2009):

  (Gillard et al (2009) WMJ (1) 95-104)



RIKILT WAGENINGEN UR

Mycotoxins - *Challenges– Masked mycotoxins*

- Masked mycotoxin = mycotoxin that is metabolised by the plant into a, for the plant, harmless compound;
- Eg: deoxynivalenol-3-*β*-D-glucoside (D3G);
- First report 1985 by Miller JD & Young JC

  (Deoxynivalenol in an experimental Fusarium graminearum *infection of wheat, Canadian Journal Plant Pathology, (1985), 7, 132-134);*
- Relevance:
  - Occurrence: D3G analyzed by LC MS/MS;
  - Toxicity:
    - Increased exposure by release in intestinal tract?
    - Absorbed by intestinal cells?

RIKILT WAGENINGEN UR

Mycotoxins – *Challenges - Climate*

- Expected changes in range of latitudes, where certain fungi are able to compete;
  - *Example:* F. graminearum *growth: NIV increase;*
- Drought, flooding and other consequences of climate change may result in changed toxin profiles;
  - *Example: aflatoxins found in Italy since 2003, and in other parts of Central Europe;*
- Response of insects and plant diseases to climate change poorly understood, but increases expected;
- RIKILT's participation in EMTOX has resulted in a model to predict DON contamination (quantify) in wheat according to wheater in growing season;

RIKILT WAGENINGEN UR

Program

1. RIKILT
2. Mycotoxins
3. Plant toxins-emerging risk
4. Analytical challenges
5. Concluding remarks

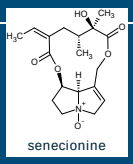
RIKILT WAGENINGEN UR

Plant toxins – *Contamination and exposure route*

RIKILT WAGENINGEN UR

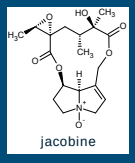
Plant toxins

Hundreds plant toxins known



Mostly mentioned:

- PA's: pyrrolizidinalkaloids;
- TA's: tropane-alkaloids;
- Aromatic compounds: essential oils; alkenylbenzenes (estragol; methyleugenol; safrool) (herbs);
- Lectins (legumes);
- Furanocoumarins (cruciferous plants);



RIKILT WAGENINGEN UR

Plant toxins – *Incidents and issues*

1990-1991 Belgium: >100 women kidney damage (transplants, cancer development)

Cause: aristolochic acids from *Aristolochia spp* ingredient in herbal preparations/TCM Slimming agents

Aristolochia Clematis (birthwort; pijpbloem)

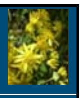
2001 Netherlands: >60 poisoning cases (epileptic seizures)

Cause: anisatin from ingredient in herbal tea

(Japanese instead of Chinese star anise)

RIKILT WAGENINGEN UR

Plant toxins – *Incidents and issues*



NACHRICHTEN-ARCHIV

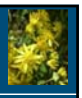
Supermarkt: Giftiges Greiskraut im Rucola

In einer Packung Rucola-Salat hat ein Kunde der Discounter-Kette Plus in Hannover nach Medienberichten einzelne Stängel einer giftigen Pflanze entdeckt. Das Gemeine Greiskraut (Senecio vulgaris) könne in größeren Mengen mitunter gefährliche Leberschädigungen hervorrufen, schrieb «Spiegel Online». Nach Angaben von Plus-Sprecherin Christina Stylianou sei die betroffene Charge komplett aus dem Sortiment genommen worden, um jedes Risiko auszuschließen. Der Lieferant des Salats sei kontaktiert und um eine stärkere Kontrolle der Lebensmittel gebeten worden.

2006 en 2009 Germany:
Weed (*Senecio vulgaris*) in rocket <2.5 mg/kg PAs
Issue: pyrrolizidine alkaloids, liver toxicity
⇒ feed: roughage
⇒ food: honey, herbs preparations/TCM

RIKILT WAGENINGEN UR

Plant toxins – *Incidents and issues*



Cor de Vries (links) en Merijn Vreugdenhil oogsten hun in de kas gekweekte rucola. Foto Joost van den Broek / de Volkskrant

Rucola van de gestoomde grond

De pittig smakende slasoort is definitief doorgebroken in Nederland. Ook telers ontdekken de jonge markt. 'Rond de 70 procent van de productie is al voor de oogst verkocht.'

Door **Tjerk Gualthérie van Weezel**

VK 110804

Vijf jaar geleden had Merijn Vreugdenhil (29) nog nooit rucola gegeten. Inmiddels snijdt de breedgeschouderde tuinder per week zo'n twaalfduizend kilo groene blaadjes van de *Eruca sativa*. Vanmorgen om half zes stond hij al achter de snijmachine, zodat de sla nog dezelfde dag vers verpakt richting de supermarkten en restaurants kan.

Rucola, ook wel raketsla genoemd, brak het afgelopen decennium door in Nederland. In 2010 groeide de omzet met 12 procent tot 17 miljoen euro. Het is een teer plantje, maar wel een groente waar je mee voor de dag kunt komen, zegt Vreugdenhil terwijl hij een paar blaadjes in zijn mond stopt.

'Als ik tijdens het uitgaan zeg dat ik rucola teel, krijg ik altijd de reactie: 'lekker'. En dat zijn jonge mensen tussen de 20 en de 40, er zit dus nog lang handel in.'

De sla komt oorspronkelijk uit Italië en wordt ook veel verbouwd in Frankrijk. Nog steeds is het grootste gedeelte van de rucola die in Nederland op het bord ligt uit die landen afkomstig. Maar sinds een jaar of zes hebben enkele Nederlandse glastuinbouwers zich erop gestort.

Zoals Merijn Vreugdenhil dus. Met zijn vader heeft hij een loonbedrijf dat machines en mensen levert om in de kassen van het Westland te zaaien of te oogsten. Vier jaar geleden kocht hij een oude oogstmachine voor radijs en bouwde hem om tot een slasnijder. 'Ik huurde een kas in de buurt om dat ding te testen. Ik zaaide rucola in en verkocht die uiteindelijk aan een verpakker die het weer doorverkocht aan de horeca en Duitse supermarkten. Hij vroeg of ik niet meer had. Zo is het begonnen.'

Nu verbouwt hij de raketsla met Cor de Vries, die de kassen levert. De opbrengst (of het verlies) wordt verdeeld. De Vries: 'Ons bedrijf teelt al jarenlang radijzen en mijn vader had ook lang lelies. Met die bloemen zijn we gestopt en de radijs wordt steeds minder populair. Rucola is nu een goede aanvulling.'

Hoewel er het hele jaar door geoogst kan worden, is rucola een echte zomergroente. 'Als er een zonnig weekend aankomt, weten we al hoe laat het is. Dan gaat de raketsla als een kanonskogel. Heel Nederland eet dan op de terrassen sla of pizza's met rucola erop. Op veel broodjes wordt nu zelfs ook rucola geserveerd.'

'De rucola wordt betaald', zegt De Vries. Vreugdenhil: 'En het is een stuk zekerder dan radijs, tomaten of komkommers. Rond de 70 procent van de productie is al voor de oogst verkocht aan vaste klanten.'

De concurrentie met de buitenlanders blijft fel, zegt De Vries. 'Zij telen in de open lucht of onder plastic. Dat is goedkoper dan in kassen. Maar wij hebben lagere transportkosten, langere houdbaarheid en vooral: geen onkruid. Waar de buitentelers handmatig moeten controleren of er geen andere gewassen tussen hun rucola zitten, kunnen wij zo oogsten en de blaadjes in grote bakken wegsturen.'

De grootste angst van de telers is klein kruiskruid. 'Als je daar een bak van eet, kun je het niet meer navertellen', zegt Vreugdenhil. 'Dus daar mag geen blaadje van tussen zitten. Als we dat aantreffen, gooien we de hele partij weg.'

Om het onkruid buiten de deur te houden, wordt de [illegible] sen een paar uur [illegible] stoom bewerkt 'to[illegible] eruit is'. Ecolog[illegible] eigenlijk o[illegible] 'Voo[illegible] [illegible] witte bladschi[illegible] treden als de blaa[illegible] den. Dan kun je de [illegible] gooien. Daarom spuiten we ook een keer met chemicaliën. De dosis houden we zo laag mogelijk, zodat we voldoen aan de strenge eisen van de Duitse supermarkten. Van hen mag er maar een zeer klein residu van pesticiden in de sla achterblijven.'

Inmiddels hebben Vreugdenhil en De Vries de teelt redelijk onder controle. Binnen 28 dagen kan er geoogst worden. Nu proberen ze het oogsten verbeteren. Een nieuwe snijmachine moet uitkomst bieden. Dat maakt het mogelijk om ook nog een goede 'tweede snee' te doen. Binnen tien dagen groeien er namelijk weer zoveel blaadjes aan, dat er nog een keer geoogst kan worden. 'Die hebben een iets pittiger smaak dan de eerste snee, omdat er meer voedingsstoffen in die overgebleven blaadjes terechtkomen', zegt De Vries.

Zo wordt het productieproces steeds verder geperfectioneerd. Nu is het een kwestie van de voorsprong op andere tuinders volhouden, want ze verwachten wel dat de

Slasoorten

Omzet in de supermarkt in 2010, in procenten

Slasoort	%
Rucola	7
Veldsla	5
Overig	3
Slamelange	34
Kropsla/botersla	8
Pakket/schotel	17
IJsbergsla	26

080311 © VK - rvdm. Bron: Productschap Tuinbouw

Alle rucola is wild, ook die tussen de tegels

Soms wordt rucola in de winkel of het restaurant aangeprezen als 'wilde rucola', maar alle rucola die op de markt komt is van de wilde variant. De 'tamme' versie groeit weliswaar harder en wordt groter, maar mist de scherpe smaak waar het bij rucola nu juist om gaat. De tamme wordt vrijwel niet verbouwd. Voor een 'echt' wild gevoel is rucola ook prima te plukken in de natuur. Het is een veelvoorkomend onkruid van Italië tot Nederland, waar het onder meer groeit tussen de stoeptegels.

De grootste angst van de telers is klein kruiskruid. 'Als je daar een bak van eet, kun je het niet meer naver-

RIKILT WAGENINGEN UR

Plant toxins – *Incidents and issues*

2010 Netherlands: Alfalfa contaminated with *Senecio vulgaris*:
- Alfalfa grown in coastal area's;
- Alfalafa used as animal feed for cattle and horses (pellets);

2010 Toxicity in cattle: little known on dose-response;
Carry-over several PA's to milk suspected (Jacoline)

RIKILT WAGENINGEN UR

Plant toxins – *Challenges – Carry-over*

Carry-over from feed to animal products:
- Jacoline from *Senecio jacobaea* (jacobskruiskruid) to milk
  - *Hoogenboom et al. (2011) FAC Part A (28) 359-372;*
- Incident in Afghanistan: possible PA's from other weeds carried over to goat milk/cheese;
- No reports on occurrence of plant toxins in meat.

RIKILT WAGENINGEN UR

Program

1. RIKILT
2. Mycotoxins
3. Plant toxins-emerging risk
4. Analytical challenges
5. Concluding remarks

RIKILT WAGENINGEN UR

Challenges – *Analytical methods*



Single compound chemical analysis

Multiple compound chemical analysis

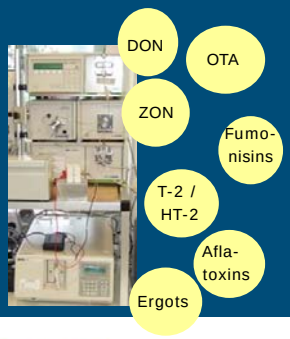
Single / multiple compound effect analysis

RIKILT WAGENINGEN UR

Challenges – *Chemical analysis*

Single compound methods:

- Optimized extraction;
- SPE and/or IAC clean-up (derivatisation);
- LC-UV, LC-Flu, GC-ECD



Multi-compound methods:

- Generic extraction;
- (limited) no clean up;
- LC-MS/MS

(RIKILT 37 mycotoxins + 10 plant toxins)

Aflatoxins
OTA DON
Fumonisins
ZON T-2/HT-2
Ergot alkaloids
Many other mycotoxins

Spanjer et al, *Food Additives and Contaminants (2008), 25, 472;*
Mol et al, *Anal. Chem. (2008), 80, 9450;*
Mol et al. *Food Additives and Contaminants (2011) accepted*

RIKILT WAGENINGEN UR

Challenges – *Chemical analysis*

Method:

- Analysis according to standard addition;
- Analysis is in duplicate;
- Positive samples confirmed;
- All ISO 17025 .

Most often used for mycotoxin analysis: *Sum of 3&15-Acetyl-DON; Deoxynivalenol (DON); Aflatoxin B1; Aflatoxin B2; Aflatoxin G1; Aflatoxin G2; Sterigmatocystin; Agroclavine; Beauvericin; Citreoviridin; Citrinin; Diacetoxyscirpenol (DAS); Fumagillin; Fumonisin B1; Fumonisin B2; Fumonisin B3; Mycophenolic acid; Neosolaniol; Ochratoxin A; Penicillic acid; Roquefortine C; HT-2 Toxin; T-2 Toxin; Verruculogen; Alternariol; Alternariol-methylether; Moniliformin; Nitropropionic acid; α-Zearalenol; ß-Zearalenol; Zearalenon (ZON)*

Extra*: D3G (masked mycotoxin) and plant toxins*

RIKILT WAGENINGEN UR

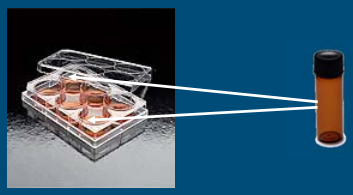
Challenges - *Emerging risks – Climate changes*

- Expected: changes in range of latitudes where certain fungi are able to compete;
  - *Example:* F. graminearum *growth: NIV increase*
- Drought, flooding and other consequences of climate change may result changed toxin profiles;
  - *Example: aflatoxins found in Italian cereals since 2003, and in other parts of Central Europe*
- Response of insects and plant diseases to climate change poorly understood, but increases expected.

RIKILT WAGENINGEN UR

Challenges – *Effect analysis (1/2)*

In vitro testing: effects of mycotoxins on gene expression

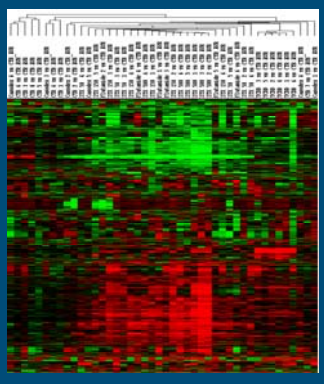


1. Culture human Caco-2 cells
2. Seed cells; expose to compounds or sample extracts of interest
3. Isolate RNA from Caco-2 cells;
4. Conversion in cDNA, amplify cDNA, labelling;
5. Hybridisation, detection and data acquisition;
6. Data analysis.

RIKILT WAGENINGEN UR

Challenges – *Effect analysis (2/2)*

Affected genes whole array
(44000 spots from 25000 genes)
- Red: up-regulated
- Green: down-regulated



Further method development, e.g.:
- Caco-2 cell line clones with luciferase expression when exposed to mycotoxins;
- Multiplex qRT-PCR on several specific up- and down-regulated genes;

RIKILT WAGENINGEN UR

Program

1. RIKILT
2. Mycotoxins
3. Plant toxins
4. Analytical challenges
5. Concluding remarks

RIKILT WAGENINGEN UR

Concluding remarks

Challenge: perform risk assessment on mycotoxins and plant toxins with any change in agrichain (new supplier, new recipe, new harvest, changed climate, changes in supply chain);

This demands exchange of information through the whole production chain and close cooperation between authorities, science, plant breeders and producers of feed and feed.

RIKILT WAGENINGEN UR

Natural toxins

Past performance is no guarantee of future results!

RIKILT WAGENINGEN UR

Thank you for your attention

Questions ?

RIKILT WAGENINGEN UR