

Contract nr NP/67/027

**Een snelle *in vitro* biologische test voor
controle van dioxine-achtige stoffen in
voeding.
(An *in vitro* bioassay for screening dioxin-like
substances in food samples)**

**G. Schoeters – Milieutoxicologie
R. Van Cleuvenbergen – Milieumetingen
Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek
Boeretang 200
Mol
Belgium**

2001/TOX/R/022

April 2001

Operationele Samenvatting

Van de landbouw en de voedingsindustrie wordt verwacht dat ze aan de consument gezonde en veilige producten aanbiedt. Het is de taak van de overheid om voldoende kwaliteitsgaranties in te bouwen, die gebaseerd zijn op wetenschappelijke gegevens.

Dit eindrapport geeft de resultaten weer van een studie die gedurende drie jaar werd uitgevoerd aan de Vito (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek). De bedoeling was om een monitoringsinstrument te ontwikkelen dat kan ingezet worden om verhoogde concentraties aan persistente gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen (PHAHs) met dioxine activiteit op te sporen in voedingswaren. De studie werd geïnitieerd voor de dioxine crisis. De Belgische dioxinecrisis (1999) illustreerde op een sinistere wijze de dringende noodzaak van een goed uitgebouwd voedselbewakingsprogramma voor dioxines en verwante stoffen in de menselijke voeding. De voordelen van een dergelijk monitoringsprogramma voor economie, voor de maatschappij, voor volksgezondheid zijn momenteel algemeen aanvaard en kaderen in elk beleid gericht naar duurzame ontwikkeling.

Als resultaat van onze studie beschikken we nu over een gevalideerde bioassay die kan ingezet worden om voedingswaren te screenen op de aanwezigheid van verhoogde concentraties aan stoffen met dioxine-activiteit. Op basis van een vergelijkende studie opteerden we om te werken met het CALUX testsysteem waarvan we de toepassing op voedingsstalen hebben uitgewerkt. Dit CALUX testsysteem is gebaseerd op een genetisch gemodificeerde rat lever cellijn die *in vitro* wordt gekweekt. De cellen geven een kwantificeerbaar lichtsignaal nadat stoffen met dioxine activiteit binden op de intracellulaire aryl hydrocarbon (Ah) receptor. De bindingsaffiniteit met de receptor kan direct in verband gebracht worden met het toxisch potentieel van de stof. De meest giftige dioxine - congener (tetrachloro-p-dioxin = 2,3,7,8 TCDD) heeft de hoogste bindingsaffiniteit en wordt als standaard gebruikt in elke meetreeks. De resultaten van de bioassay meting kunnen dan ook uitgedrukt worden in toxiciteitsequivalenten van 2,3,7,8 TCDD (TEQ) en op die manier vergeleken worden met chemische dioxine metingen. De celkweek methode werd geoptimaliseerd en geminiaturiseerd zodat routine analyse in 96 well platen mogelijk werd. In een volgende stap moesten de cellen worden blootgesteld aan PHAHs die aanwezig zijn in melkproducten, eieren en vlees. Een standaard procedure werd ontwikkeld voor vetextractie en isolatie van de stoffen uit het vetextract om interferentie van het lichtsignaal met andere componenten uit de voedingsmatrix maximaal te vermijden. Het is belangrijk om het achtergrond signaal zo laag mogelijk te houden en daardoor een lage detectielimiet te bekomen. Technisch was dit een grote uitdaging. Uitgaande van 1 g dierlijk vet bekwamen we een detectielimiet van ongeveer 0,1 pg TEQ per g vet, de kwantificatielimiet is ongeveer 0,4 pg TEQ/g vet wat vergelijkbaar is met deze van chemische dioxine metingen met HRGC-MS.

De herhaalbaarheid (precisie onder dezelfde experimentele condities in een kort tijdsbestek), uitgedrukt door de variatiecoëfficiënt (CV), bedraagt ongeveer 0,10. De intralaboratorium reproduceerbaarheid (precisie over verloop van tijd) is lager (cv van 0,26 voor stalen met gehalten groter dan 2 pg TEQ/g vet).

De resultaten van de bioassay werden vergeleken met de resultaten van chemische analyses (HRGC-MS) die werden uitgevoerd op dezelfde voedingsstalen (62 melkstalen, 17 kaasstalen, 6 vleesvetstalen, 5 eierstalen). De correlatie tussen CALUX-TEQ en TEQ-dioxines/furanen, TEQ-PCBs en TEQ-dioxines/furanen +PCBS was hoog significant ($p <$

0,0001) met respectievelijke Spearman's Rank correlatiecoëfficiënten van 0,72, 0,67 en 0,73 in melkstalen. Dezelfde significante correlaties werden terug gevonden voor de resultaten van de eistalen. De kaas- en vleesvetstalen vertoonden echter geen significante correlatie tussen de CALUX metingen en de chemische metingen. Dit is mogelijk te wijten aan de bijzonder lage gehalten die in de kaasstalen werden aangetroffen (gemiddeld <1 pg TEQ/g vet) en in het klein aantal vleesvetstalen dat werd gemeten en bovendien een zeer kleine spreiding tussen de gemeten gehalten vertoonde. In alle stalen die de norm voor dioxines in voedingswaren overschreden, werden verhoogde CALUX-TEQ concentraties gemeten boven 6 pg TEQ/g vet. Geen enkel van deze stalen scoorde negatief met CALUX.

De CALUX-TEQ waarden lagen gemiddeld boven de chemische PCDD/F TEQ metingen. Wanneer echter de chemische TEQ waarden van dioxines/furanen en PCBs werden gecombineerd was de bekomen TEQ waarde hoger dan de gemeten CALUX waarde. Dit kan verklaard worden doordat het biologisch meetsysteem rechtstreeks de binding meet met de intracellulaire Ah receptor van de aanwezige dioxines, furanen en PCBs in het extract en dus ook direct eventuele interacties tussen de stoffen mee in rekening brengt. Toxicologisch is dit alleszins een relevante benadering. Het bouwt ook extra veiligheid in tov de meting van alleen maar de dioxine/furanen TEQ die meestal wordt uitgevoerd.

Aanbevelingen

- 1. CALUX metingen verdienen ingezet te worden als screeningsinstrument voor de routine matige bepalingen van potentieel giftige PHAHs in voedingswaren. De bioassay laat toe om relatief snel een groot aantal stalen te screenen. Stalen met verhoogde concentraties kunnen worden geïdentificeerd. De bioassay is echter niet specifiek. Om zeker te weten welke stoffen verantwoordelijk zijn voor het verhoogde CALUX signaal moeten de positieve stalen verder chemisch geanalyseerd worden. Wij suggereren voor een monitoringsprogramma een procedure waarbij de chemische analyses beperkt worden tot stalen die positief scoren in de CALUX. De kostelijke en arbeidsintensieve chemische metingen zouden dan gebeuren alleen maar op relevante stalen die verder dienen onderzocht te worden. Vermits wij in onze studie geen vals negatieve stalen identificeerden met de CALUX kunnen wij deze werkwijze aanbevelen als een resultaat van deze studie.*
- 2. Wanneer CALUX TEQ waarden variëren tov merker PCB metingen of PCDD/F-TEQ metingen, kan dit te wijten zijn aan de aanwezigheid van andere chemische stoffen. De aard van deze stoffen dient geïdentificeerd om uit te sluiten dat het hier om andere gehalogeneerde persistente stoffen gaat die in de voedingsketen terechtkwamen.*

In een tweede deel van de studie werden diverse voedingsstalen onderzocht (34 vleesstalen, 34 visserijstalen) die aangekocht werden in verschillende voedingszaken. Deze stalen werden alleen maar met CALUX gemeten. De studie was te beperkt om een beeld te geven van de gehalten in representatieve voedingsstalen en om definitieve conclusies te trekken met betrekking tot de gemeten gehalten. Vleesstalen bevatten gemiddelde CALUX-TEQ waarden tussen 1 and 2 pg TEQ/vet, visstalen vertoonden gemiddeld hogere concentraties die in haringstalen opliepen tot 39 pg TEQ/ vet. Wanneer deze gegevens worden uitgedrukt per g vers product, waren de mediaan concentraties het hoogst in de haringstalen (2,2 pg TEQ), gevolgd door stalen varkensvlees (0,7 pg TEQ) en

de eistalen (0,7 pg TEQ). Wanneer we de bijdrage van voedingswaren tot de TEQ lichaamsbelasting willen inschatten, vb. in het kader van een risicobeoordeling, moeten we bijkomend rekening houden met de relatieve bijdrage van de voedingswaren tot het algemeen dieet. Om dit in te schatten hebben we beroep gedaan op buitenlandse voedselconsumptiegegevens vermits er voor België geen recente gegevens beschikbaar zijn. Dagelijkse TEQ innames werden berekend door de voedselconsumptiegegevens te combineren met de mediaan TEQ gehalten die we gemeten hebben in de diverse voedingswaren. Omwille van bovenvermelde beperkingen dienen deze berekeningen erg voorzichtig te worden geïnterpreteerd.

Naast gegevens over absolute TEQ gehalten in de gemeten voedingsstalen, wordt ook belangrijke informatie bekomen wanneer de spreiding van de gehalten tussen verschillende soorten stalen vergeleken wordt. De variatiecoëfficiënt van mengmonsters (melk en eieren) was relatief laag: metingen van individuele melk- en kipstalen toonden CV die respectievelijk opliepen tot 0,80 en 0,50. Stalen van rundvet en varkensvet vertoonden een kleinere spreiding. Visstalen, met uitzondering van de zalmstalen, hebben hoge variatiecoëfficiënten. Een groep stalen kan dus gekarakteriseerd worden op basis van de gemiddelde TEQ gehalten en op basis van de heterogeniteit tussen de stalen. Deze informatie kan gebruikt worden om stalen of voedingswaren te identificeren die prioritair verder onderzocht moeten worden.

Aanbevelingen

3. *Dit biologisch meetsysteem kan worden gebruikt om snel verhoogde gehalten in voedingsstalen op te sporen en kan op die manier bijdragen tot het identificeren van ongekende besmettingsbronnen. Wij bevelen dan ook aan om deze metingen op regelmatige basis uit te voeren op een representatieve set van stalen. De stalen dienen individueel geanalyseerd te worden. Wanneer de variatiecoëfficiënt aangeeft dat de spreiding tussen de gemeten CALUX TEQ gehalten groot is betekent dit dat er gevaar bestaat dat een deel van de consumenten blootgesteld wordt aan verhoogde gehalten die bij stalen van een andere locatie of oorsprong niet voorkomen. Door verdere systematische controles kunnen eventueel ongekende besmettingsbronnen worden geïdentificeerd.*
4. *CALUX is een beloftevol instrument dat kan ingezet worden als deel van een bewakingsprogramma voor voedselveiligheid maar ook voor de studie van omgevingsstalen (natuurlijke populaties) waarbij gehalten aan PHAHs in dierlijke vetten kunnen opgevolgd worden in functie van tijd en locatie. De volgende stap die nu moet genomen worden is een internationale validatiestudie die een noodzakelijke voorwaarde is voor verdere internationale acceptatie van de test en de meetresultaten.*