

# MATKAKERTOMUS

EURL-NRL Workshop Mycotoxins and plant toxins

RIKILT, Wageningen

9.-10.10.2018

Marjo Kolmonen

EURL Workshop järjestettiin nyt ensimmäistä kertaa Rikilt Wageningen yliopiston toimesta, sillä EURL mandaatti siirtyi heille maaliskuun 2018 alusta Joint Research Center (JRC) Geelistä. Suomesta kokoukseen osallistui myös Tullilaboratorion edustaja Meri Kokkonen.

9.10.2018

Kesällä 2018 järjestettiin PT vertailukierros, joka koski deoksinivalenolin (DON) ja sen johdannaisten 3-AcDON, 15-AcDON ja DON-3-glukosidin analysointia vehnä- ja maissijauhonäytteistä. Kierrokselle osallistui 39 kansallista referenssilaboratoriota (NRL) ja kaiken kaikkiaan 49 laboratoriota ympäri Eurooppaa. Vertailututkimuksen tulosten perusteella voitiin todeta, että DON analysointi on hyväksyttävällä tasolla, sillä valtaosa osallistujista raportoi hyväksyttävän tuloksen, mutta sen johdannaisten analysoinnin kattavuudessa on paljon parannettavaa, sillä vain 8 NRL raportoi tuloksia asetyloiduille muodoille ja 3 NRL glukosidi-muodolle. Asetyloitujen muotojen epästabiilisuus aiheuttaa haasteita alhaisten määritysrajojen saavuttamiselle. Rikiltin tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että etenkin vehnänäytteissä 24 h kuluessa > 80 % 3AcDON ja 15AcDON hajosi DONksi. Maississa ei havaittu vastaavaa ilmiötä.

Pyrrolitsidiinialkaloidit (PA) kuuluvat kasvitoksiineihin, joita esiintyy erilaisissa kasveissa (*Senecio*, *Boraginaceae*, *Heliotropium*, *Crotalaria*). Niiden toksiset vaikutukset on tunnettu jo pitkään ja ne kohdistuvat etenkin karjaan aiheuttaen maksan veno-okklusiivista tautia, jossa maksan sinusoidaalisiin kapillaareihin kohdistuu toksinen vaurio, mikä johtaa pienten maksasuonten tukkeutumiseen. PA alkaloideja esiintyy mm. teessä, mausteissa ja hunajassa. EFSA on antanut lausunnon PA altistuksesta 2016 ja 2017. PA ovat hyvin heterogeeninen yhdisteryhmä, jolloin myös niiden toksisuus vaihtelee rakenteen mukaisesti. Potentiaalisia lajeja tunnetaan jo yli 5000. Keskeisimmät yhdisteet on tunnistettu (17 kappaletta), ja EU Komissio antaa mahdollisesti vuoden 2019 alkupuolella päätöksen enimmäispitoisuuksista. Tällä hetkellä pitoisuustietoa on vähän saatavilla ja käytössä olevien analyysimenetelmien määrä EU:n alueella on vähäinen. Menetelmän pystyttäminen on kallista standardiaineiden heikon saatavuuden ja hinnan vuoksi. Yhdisteiden rakenteellinen erilaisuus aiheuttaa haasteita analyysimenetelmälle ja käytössä olevien menetelmien määritysrajoissa on isoja vaihteluita. JRC järjesti vapaaehtoisen vertailumittauksen NRLlle vuonna 2017, mutta tuloksista oli selvästi havaittavissa menetelmän haasteet. Yhdisteiden kattavuudessa oli puutteita, samoin matriisivalikoimissa ja etenkin tee-matriisille raportoitiiin väärä negatiivisia tuloksia. Näiden haasteiden vuoksi EURL on kehittänyt analyttisiä menetelmiä perustuen LC-MSMS-tekniikkaan. Hyödyntäen HRMS-tekniikkaa ja nontargeting-analytiikkaa, voidaan useita yhdisteitä kattaa samalla analyysillä. EURL järjestää NRLlle menetelmäkoulutusta marraskuussa 2018, jotta suuremmalla osalla NRLsta olisi valmiuden näiden yhdisteiden analysointiin.

EURL Rikilt lähetti heti mandaattinsa aluksi kyselyn kaikille NRLlle, koskien NRLn resursseja analytiikan suhteen. Uusi valvonta-asetus velvoittaa heitä kartoittamaan jäsenmaiden laboratorioden nykytilanteen. Tällä hetkellä myko- ja kasvitoksiini NRL:t ovat hyvin heterogeeninen verkosto ja jäsenmaiden välillä on paljon eroja. Valtaosa laboratorioista on akkreditoituja. Osassa jäsenmaita on vain yksi NRL/virallinen

laboratorio, kun taas toisissa saattaa olla jopa 25 virallista laboratoriota. Vastausten perusteella vaihtelua esiintyi käytettävissä olevan henkilöstön määrässä sekä näytemäärissä. Analyysitekniikoiden suhteen valtaosa käyttivät samoja tekniikoita niin esikäsittelyssä kuin analysoinnissa. Laboratorioiden kattavuus säänneltyjen toksineiden suhteen oli kohtalainen. Usein menetelmä on validoitu, muttei akkreditoitu. Uuden valvonta-asetuksen myötä kaikkien valvontamenetelmien tulee olla akkreditoituja ensi vuonna. Eviran mykotoksiinimenetelmät kuuluvat akkreditoinnin piiriin. Eroja esiintyi myös määritysrajoissa. Erot aiheutuivat sen mukaan käytettiinkö menetelmää vain tarkastelemaan enimmäismääräkelpoisuutta vai tuottamaan myös tietoa riskinarviointia varten pienistä pitoisuuksistakin. Kasvitoksiinien osalta on vielä paljon kehitettävää analyysikattavuuden lisäämiseksi.

Ergotalkaloidit (EA) kuuluvat monitoroitaviin yhdisteisiin ja koska kromatografisten menetelmien käyttö ja ylläpito on vaativaa, EU Komissio on antanut EURLille tehtävän selvittää olisiko näille yhdisteille saatavilla ns. pikamenetelmiä, jotta tietoa saataisiin kerättyä helpommin. ELISA-tekniikalla on julkaistu muutama menetelmä viimeisen kolmen vuoden aikana, mutta haasteena on ergometriin laaja ristireagoivuus. EURL testasi myös Randox-laitteistoa jauhönäytteille, mutta näytteenkäsittely oli työläs (1-2 päivää), joten se ei soveltunut seulontamenetelmäksi. Selvityksen tulos olikin, ettei tällä hetkellä ole kaupallisesti saatavilla soveltuvaa testiä EA:lle. Myös eri matriisien kattavuus oli heikkoa. EURL antoi valmistajille suosituksia, että seulontamenetelmissä tulisi olla yksinkertainen näytteen esikäsittely, näytteenoton tulisi olla edustava, spesifisyyden parempi ja matriisivalikoiman laajempi.

10.10.2018

Toinen päivä alkoi lainsäädännön nykytilan katsannolla (Frans Verstraete). Monet asiat ovat edelleen odottavalla kannalla ja mitään suurempaa uudistusta ei tullut esille. Elintarvikkeiden osalta keskeiset keskustelun kohteena olevat yhdisteet ovat: sitriniini, EA, okratoksiini A (OTA), *alternaria* toksiniitit, DON sekä T-2 – ja HT-2 – toksiniitit. Sitriniini ei EFSA:n arvion mukaan vaadi välitöntä seurantaan viljoista ja viljapohjaisista elintarvikkeista, mutta sen esikäsittelylle kaavaillaan suoritusvaatimuksia (elintarvikkeiden lisäravinteet). EA raja-arvo tulee olemaan summa-arvo (12 EA) ja menetelmäkriteeri määritysrajalle perustuu lower bound – laskentaan. Torajyvien raja-arvoa mahdollisesti lasketaan (0,5 g/kg > 0,1 g/kg). OTAlle harkitaan ML arvoja (viikunat, auringonkukan siemenet, kaakaojauhe, mausteet), mutta vielä odotellaan EFSA:n lausuntoa. *Alternaria* toksiniitit ovat monitorointisuosituksen piirissä ja osalle yhdisteistä kaavaillaan ohjearvoja. Keskeisiä matriiseja ovat mm. prosessoidut tomaattituotteet, paprikajauhe sekä viljapohjaiset lastenruoat. DONin osalta ML arvoja päivitetään ja ne perustuvat summalaskentaan (DON, 3AcDON, 15AcDON ja DON-3-glukosidi). Vastaavasti myös T-2- ja HT-2 – toksineille kaavaillaan ML arvoa yhteissummana.

Rehuanalytiikan puolella ML arvoja suunnitellaan aflatoksiini B1:lle sekä EAlle. Muille yhdisteille on käytössä ohjearvo tai suuntaa antava arvo. Tietyissä rehutyypeissä sallitaan detoksifikaatio sekä erilaiset mykotoksiinin sijoitukset. Erilaisten modifioitujen muotojen esiintyminen (zearalenoni, fumonisiini) rehuissa on herättänyt keskustelua, mutta tällä hetkellä niiden lisäämistä seurannan piiriin ei katsota aiheelliseksi. Enniatiineja ei tällä hetkellä seurata rehuista, mutta niiden viimeaikaiset havainnot ovat herättäneet kysymyksen: tulisiko niitä tutkia kuitenkin tarkemmin? Aflatoksiinien osalta riskinarviointia päivitetään.

Kasvitoksiinien osalta tehtäväkenttä on laaja ja selkeitä painopisteitä on tällä hetkellä vaikea arvioida. PA ovat monitoroinnin piirissä (21 eri yhdistettä) ja niiden mittaaminen perustuu tällä hetkellä niiden yhteissummaan. Analytiikan kannalta haastavaa ovat tiukat vaatimukset menetelmän suorituskyvylle määritysrajan suhteen. ML arvoja pohditaan erilaisille yrttiutuille, teelle ja tietyille mausteille. Näistä tee matriisina on etusijalla. TA on annettu Komission asetus vuonna 2016 ja nyt sitä laajennetaan myös kattamaan viljapohjaiset lastentuotteet sekä maissin. ML arvot ovat olemassa. Muita esiin tulleita kasvitoksiineja olivat erukkahappo, ooppiumalkaloidit, THC, syanogeeniset glykosidit ja glykoalkaloidit.

Osa yhdisteistä seurataan elintarvikepuolella, osan ei katsota aiheuttavan riskiä rehuissa. Näidenkin yhdisteryhmien osalta analytiikalta vaaditaan mahdollisimman hyvää herkkyyttä.

Martien Spanjer ja Hans Mol esittivät CEN menetelmästandardointiprosessia. Standardimenetelmän valmisteluun kuluu noin 2,5 vuotta aikaa, riippuen paljolti siitä miten paljon on valmista validointidataa käytettävissä. Mykotoksiineille standardimenetelmiä löytyy jo useampia. Kasvitoksiinimenetelmät ovat standardoinnissakin tuleva kohderyhmä.

Menetelmän määrittäjä herätti keskustelua laajasti. Mykotoksiinien sallitut enimmäismäärät ovat analytiikan kannalta suuria, joten laitteistolta ei vaadita suurta herkkyyttä näiden pitoisuuksien analysoimiseksi. Toksikologi Ron Hoogenboom Rikilt:stä toi kuitenkin esille esityksessään, kuinka keskeistä riskinarvioinnin kannalta on saada myös tietoa alhaisista pitoisuuksista, joille altistutaan jatkuvasti. Tämä tieto on myös tärkeää, kun määritetään erilaisia turvarajoja saannin suhteen. EFSAlle kerättävästä riskinarviointiin käytettävästä datasta poistetaan se osuus, jossa menetelmän määrittäjä on liian korkea. Myös jäsenmaista saatavaa ruoankäyttötietoja hyödynnetään raja-arvojen laskennassa.

Käynnissä olevista projekteista esiteltiin MyToolBox ja MycoKey, jotka ovat jo muutaman vuoden olleet käynnissä. Ine va der Fels-Klerx esitteli liittyviä MycoKey-projektiin liittyviä tutkimuspaketteja (WP 1-10) sekä työkaluja, joita voidaan käyttää verkossa tai mobiiliapplikaation kautta. Projektin puitteissa on tehty paljon yhteistyötä Kiinan kanssa. Systemaattisen kirjallisuuden tarkasteluun (Cochrane) käytettäviä työkaluja (EndNote ja EPPI) esitteli Nathan Meijer, joka oli selvittänyt kirjallisuuteen perustuen Afrikan aflatoksiini-tilannetta. Altistuksen arvioinnissa voidaan käyttää hyödyksi myös biomonitoroinnin kautta saatavaa tietoa. Hans Mol esitteli Horozon2020-projektiin liittyvää tutkimusta, jossa selvitetään mykotoksiinien erittymistä humaanivirtsaan.

Vuonna 2017 aprikoosin ydinosan syanogeenisille glukosideille asetettiin ML arvo. Vuoden 2018 alkupuolella oli myrkytystapaus, jossa henkilö oli erehdyksissään syönyt viisi ydintä kerralla ja saanut myrkytysoireita. Yhdisteille on olemassa CEN menetelmä, mutta se on työläs ja aikaa vievä. Hans Mol esitteli vaihtoehdoisen LC-MSMS –menetelmän, joka perustui näiden yhdisteiden luontaiseen taipumukseen ionisoitua Na-addukteina. Tutkimuksen tuloksena annettiin varoitus ko. tuotteiden vaarallisuudesta, mikä on näkynyt niiden saatavuuden vähenemisenä.

Kokouksen lopuksi käsiteltiin seuraavan vuoden kokousaiheita. Kasvitoksiineihin liittyen saatetaan järjestää erillinen kokous. EURL halusi muistuttaa, että osalle kasvitoksiineista tarvitaan jäsenvaltiosta riippuen huumausainelupa (Suomessa Fimealta), ja että prosessiin kannattaa varata aikaa. Ensi vuoden PT ohjelmaan on suunniteltu maaliskuulle PT ergotalkaloideista ja toukokuulle PT kasvitoksiineista (troopaanialkaloidit).