

GMP+ Feed Certification scheme

D

GMP+ D4.11

Richtlinien und Konformitätskriterien bei Verfahren zur Analyse von Mykotoxinen (DON, ZEN und OTA) in Futtermittelausgangsstoffen

4.11

Version: 15. November 2013

DE

© GMP+ International B.V.

Alle Rechte vorbehalten. Die Informationen aus dieser Veröffentlichung dürfen heruntergeladen, ausgedruckt und auf dem Bildschirm zu Rate gezogen werden, sofern dies für den eigenen, nichtkommerziellen Gebrauch erfolgt. Sämtliche Nutzungen anderer Art bedürfen der vorherigen schriftlichen Genehmigung der GMP+ International B.V.

GMP+ International
info@gmplus.org
www.gmplus.org

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	3
1.1	ALLGEMEINES	3
1.2	AUFBAU DES GMP+ FEED CERTIFICATION SCHEME.....	3
2	VORWORT.....	5
3	ANLASS.....	6
4	DIE VOM PDV-VORSTAND FESTGELEGTEN NORMEN	7
5	AUFGABESTELLUNG DER SACHVERSTÄNDIGENKOMMISSION ...	8
6	ARBEITSWEISE	9
7	ERGEBNISSE.....	10
7.1	KRITERIEN / PARAMETER FÜR DIE BESTÄTIGUNGSVERFAHREN	10
7.1.1	Definitionen / Beschreibung der Kriterien un Parameter	10
7.1.2	Leistungskriterien für Bestätigungsverfahren	12
7.2	KRITERIEN / PARAMETER FÜR SCREENING-VERFAHREN.....	12
7.2.1	Definitionen / Beschreibung der Kriterien und Parameter.....	12
7.2.2	Leistungskriterien für Screening-Verfahren	13
8	RICHTLINIEN ZUR ANALYSE VON MYKOTOXINEN IN FUTTERMITTELAUSGANGSTOFFEN	14
8.1	BESTÄTIGUNGSVERFAHREN	14
8.2	SCREENING-VERFAHREN.....	15
9	INVENTARISIERUNG DER LEISTUNGSKRITERIEN FÜR DIE ANALYSEVERFAHREN SOWIE DIE LABORS, DIE BEREITS MYKOTOXINE IN FUTTERMITTELAUSGANGSSTOFFEN BESTIMMEN (ANHAND VON BESTÄTIGUNGS- UND SCREENING- VERFAHREN).....	16
9.1	BESTÄTIGUNGSVERFAHREN	16
9.2	SCREENING-VERFAHREN.....	16
10	SCHLUSSFOLGERUNGEN, EMPFEHLUNGEN	18
11	ZUSAMMENFASSUNG	19

1 EINFÜHRUNG

1.1 Allgemeines

Das *GMP+ Feed Certification scheme* ist im Jahr 1992 von der niederländischen Futtermittelindustrie als Antwort auf diverse mehr oder weniger schwere Zwischenfälle mit Verunreinigungen in Einzelfuttermitteln initiiert und entwickelt worden. Es war zunächst nur als nationales System konzipiert worden, hat sich jedoch zu einem internationalen System entwickelt, das von GMP+ International in Zusammenarbeit mit diversen internationalen interessierten Parteien verwaltet wird.

Obwohl das *GMP+ Feed Certification scheme* aus der Perspektive der Unbedenklichkeit von Futtermitteln entstanden ist, wurde im Jahr 2013 der erste Standard für Futtermittelnachhaltigkeit veröffentlicht. Zu diesem Zweck sind zwei Module entwickelt worden: *GMP+ Feed Safety Assurance* (das sich auf die Futtermittelsicherheit konzentriert) und *GMP+ Feed Responsibility Assurance* (das auf nachhaltige Futtermittel abzielt).

Das *GMP+ Feed Safety Assurance scheme* ist ein vollständiges Modul zur Gewährleistung der Futtermittelsicherheit auf allen Stufen in der Futtermittelkette. Eine nachweisliche Gewährleistung der Futtermittelsicherheit wird in vielen Ländern und Märkten als eine Art „Verkaufslizenz“ betrachtet und der *GMP+ FSA Modul* kann Unternehmen dabei ausgezeichnet unterstützen. Zur Erfüllung der Bedürfnisse aus der Praxis sind diverse Komponenten in der *GMP+ FSA Modul* integriert worden, wie etwa die Vorschriften für das Qualitätsmanagementsystem (ISO 9001), HACCP, Produktnormen, Rückverfolgbarkeit, Überwachung, Programme mit Grundbedingungen, der Kettenansatz und das Frühwarnsystem.

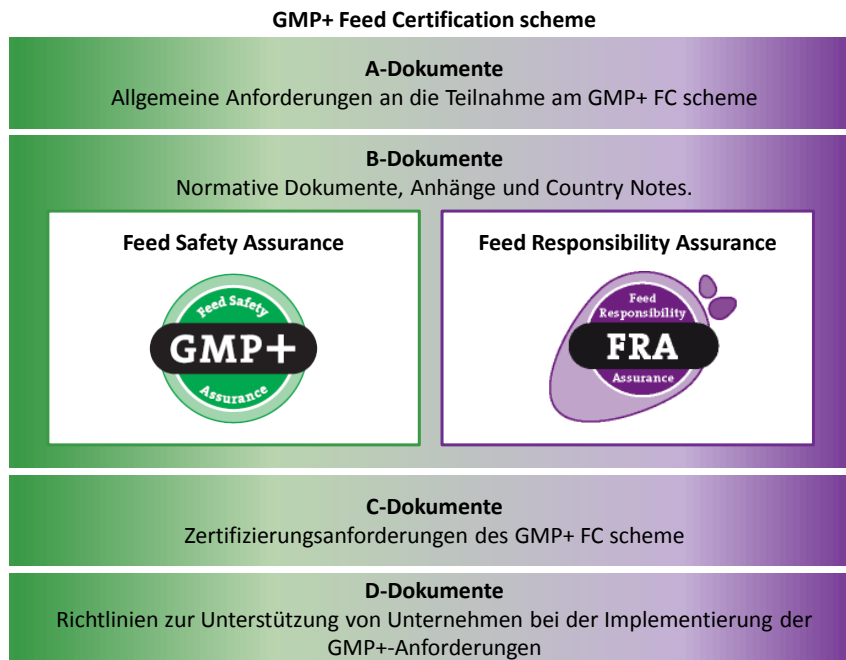
Mit der Entwicklung des „*GMP+ Feed Responsibility Assurance*“-Moduls entspricht GMP+ International dem Bedürfnis von GMP+-Teilnehmern. Die Futtermittelindustrie sieht sich stets mehr Fragen über eine verantwortungsbewusste Praxis konfrontiert, etwa über die Verwendung von Soja (einschließlich Sojaderivaten und Sojaerzeugnissen) und Fischmehl, das mit Respekt für Mensch, Tier und Umwelt hergestellt und vertrieben wird. Um einen nachhaltigen Herstellungsprozess und Vertrieb nachweisen zu können, kann ein Unternehmen eine Zertifizierung im Hinblick auf die *GMP+ Feed Responsibility Assurance* beantragen.

Gemeinsam mit den GMP+-Partnern definiert GMP+ International auf transparente Art und Weise deutliche Vorschriften zur Gewährleistung unbedenklicher und nachhaltiger Futtermittel. Zertifizierungsstellen sind somit in der Lage, eine unabhängige GMP+-Zertifizierung durchzuführen.

GMP+ International unterstützt die GMP+-Teilnehmer mit praktischen und nützlichen Informationen. Dies erfolgt mit Hilfe einer Reihe von Leitfäden sowie mit Hilfe von Datenbanken, Rundschreiben, Fragen- und Antwortenkatalogen und Seminaren.

1.2 Aufbau des *GMP+ Feed Certification scheme*

Die Dokumente innerhalb des *GMP+ Feed Certification scheme* gliedern sich in eine Reihe Serien. Die nächste Seite enthält eine schematische Wiedergabe des Inhalts des *GMP+ Feed Certification scheme*:



Alle jene Dokumente sind über die Website der GMP+ International verfügbar (www.gmpplus.org) .

Das vorliegende Dokument wird als GMP+ D4.11 *Richtlinien und Konformitätskriterien bei Verfahren zur Analyse von Mykotoxinen (DON, ZEN und OTA) in Futtermittelausgangsstoffen* bezeichnet.

Es ist kein Standard-Dokument, sondern eine Umfrage, in Zusammenarbeit mit dem Marktverband Tierfutter (*Productschap Diervoeder*) in 2003 durchgeführt. Dieses Dokument verwendet die Original-Texte aus dem Bericht. Die Informationen aus dieser Studie kann die Substanz an die GMP+ FSA Normen verbessern.

2 Vorwort

Vor Ihnen liegt der von der Sachverständigenkommission erstellte Bericht über Verfahren zur Analyse von Mykotoxinen in Futtermittelausgangsstoffen. Diese Sachverständigenkommission wurde im Juni 2003 vom Vorstand des Productschap Diervoeder berufen, nachdem konstatiert worden war, dass keine eindeutigen Richtlinien zur Bestimmung der Mykotoxine DON (Deoxynivalenol), OTA (Ochratoxin A) und ZEN (Zearalenon) vorlagen.

Die Sachverständigenkommission hat die Kriterien für geeignete Bestätigungs- und Screening-Verfahren zur Bestimmung der Mykotoxine in Futtermittelausgangsstoffen in drei Sitzungen formuliert. Zudem wurden Kriterien dafür festgelegt, was diese Verfahren mindestens leisten sollen, und es wurden Richtlinien zur Bestimmung der Mykotoxine formuliert.

Daraufhin hat die Sachverständigenkommission eine Inventarisierung durchgeführt, um festzustellen, inwieweit die Labors, die zurzeit Mykotoxinanalysen durchführen, die fraglichen Kriterien überhaupt erfüllen.

Der vorliegende Bericht ist als Leitfaden für die Labors zu betrachten, die Mykotoxine in Futtermittelausgangsstoffen bestimmen möchten. Schließlich und endlich kann dann, nachdem eine entsprechende (beispielsweise zusammen mit dem KDLL durchgeführte) Ringstudie die Differenzen zwischen den einzelnen Labors aufgedeckt hat, eine definitive Auswahl erfolgen.

Im Namen der Sachverständigenkommission hoffe ich, dass der vorliegende Bericht einen Beitrag dazu leistet.

Dr. L. Vellenga
Vorsitzender der Sachverständigenkommission

3 Anlass

Nachdem der Vorstand des Productschap Diervoeder am 11. Juni 2003 die Mykotoxin-Normen für DON (Deoxynivalenol), OTA (Ochratoxin A) und ZEN (Zearalenon) in verschiedenen Tierfuttermitteln festlegte, wurde konstatiert, dass schnelle und verlässliche (nach Möglichkeit validierte) Analyseverfahren benötigt werden, bevor diese Normen überhaupt in Kraft treten können. Die fraglichen Normen sind Teil der GMP-Regelung. Für Aflatoxine gelten bereits seit 1989 gewisse Grenzwerte für die Ergreifung von Maßnahmen und zur Ablehnung von Erzeugnissen.

Der Vorstand des Productschap Diervoeder hat sich bei der gleichen Sitzung mit der Einrichtung eines Sachverständigenausschusses einverstanden erklärt. Dieser Sachverständigenausschuss muss die verfügbaren Analyseverfahren auf Basis der heutigen Kenntnisse auf ihre Brauchbarkeit hin beurteilen.

4 Die vom PDV-Vorstand festgelegten Normen

Die Grenzwerte für die Ergreifung von Maßnahmen und zur Ablehnung von Erzeugnissen sind auf Rationsbasis festgelegt und beziehen sich auf die Mykotoxine DON, ZEN und Ochratoxin A. Einschlägige Literaturstudien zeigen, dass die genannten Mykotoxine schädliche Auswirkungen auf Haustiere in der Agrarwirtschaft haben können. Die Grenzwerte für die Ergreifung von Maßnahmen und zur Ablehnung von Erzeugnissen für die genannten Mykotoxine werden in die GMP+-Regelung eingehen.

Nachstehend finden Sie eine Übersicht über die für den Gehalt an den Mykotoxinen DON, ZEN und OTA in den einzelnen Tierfuttermitteln gültigen Normen.

Die Normen für Mykotoxine auf Rationsbasis sind:

		Ablehnungsgrenzwert	Maßnahmengrenzwert
DON			
	Schweine	1.000 µg/kg	800 µg/kg
	Masthühner, Legehennen und Puten	4.000 µg/kg	3.200 µg/kg
	Geflügel-Muttertiere	2.000 µg/kg	1.600 µg/kg
	Kälber bis zu 4 Monaten	2.000 µg/kg	1.600 µg/kg
	Milchvieh	3.000 µg/kg	2.400 µg/kg
	übrige Rinder	5.000 µg/kg	4.000 µg/kg
Zearalenon			
	Sauen/Mastschweine	250 µg/kg	200 µg/kg
	Ferkel/Aufzuchtsäue	100 µg/kg	80 µg/kg
	Geflügel	kein Grenzwert	kein Grenzwert
	Milchvieh/Farren und Färsen/Kälber	500 µg/kg	400 µg/kg
	Mastvieh	kein Grenzwert	kein Grenzwert
Ochratoxine A			
	Sauen/Mast-Schweine/Ferkel	50 µg/kg	40 µg/kg
	Geflügel	200 µg/kg	160 µg/kg
	Wiederkäuer	kein Grenzwert	kein Grenzwert

Da sich nun der Vorschlag des PDV-Vorstands auf Grenzwerte stützte, die nach Maßgabe der einzelnen Rationen festgelegt waren, stellte sich die Frage des Umgangs mit Alleinfuttermitteln. In diesem Zusammenhang (für Alleinfuttermittel also) wurde festgelegt, dass das Dreifache der Norm für das Endfutter (auf Rationsbasis) zulässig ist, sofern der fragliche Befund um eine entsprechende Hinweis- und Fütterungsempfehlung ergänzt wird.

5 Aufgabestellung der Sachverständigenkommission

Wie bereits gesagt, hat sich der PDV-Vorstand mit der Bildung einer Sachverständigenkommission einverstanden erklärt, die die Verfügbarkeit geeigneter Methoden sowie deren Brauchbarkeit und Validierung inventarisieren soll. Darüber hinaus sollte diese Sachverständigenkommission den Bedarf für neue Methoden inventarisieren.

Im Einzelnen wurde konkret vorgeschlagen, im Hinblick auf die Bestätigungs- und Screening-Verfahren die folgenden Daten zu inventarisieren:

Bestätigungsverfahren

- Auswertung der heute verfügbaren Bestätigungsverfahren (auf Basis der Bedingungen der Verfügung 2002/657/EG) für Mykotoxine im Hinblick auf die Präzision, Reproduzierbarkeit, Wiederholgenauigkeit, Validierung (bezüglich der Matrices), Recovery, Geschwindigkeit, Komplexität und Kosten.
- Nach Maßgabe dieser Auswertung ist dann festzustellen, welche Methoden für welche Mykotoxine bei welchen Matrices verlässlich eingesetzt werden können, und ob hier zusätzliche Untersuchungen erforderlich sind.

Rapid Testing

- Auswertung der heute verfügbaren Methoden für das Rapid Testing / Screening der Mykotoxine im Hinblick auf ihre praktische Brauchbarkeit, Verlässlichkeit, Geschwindigkeit und Kosten.

Nach Maßgabe dieser Auswertung ist dann festzustellen, für welche Mykotoxine noch Rapid Testing - Methoden fehlen und entwickelt werden müssen. Zudem muss die diesbezügliche technische Perspektive angegeben werden.

6 Arbeitsweise

Nach Maßgabe der Aufgabenstellung hat der Sachverständigenausschuss die Analyseverfahren (sowohl Bestätigungstests wie auch Screening-Verfahren) auf Basis der verfügbaren Literatur und der Expertise der Mitglieder des Sachverständigenausschusses beurteilt und diese an den folgenden Leistungskriterien gemessen:

Bezüglich der Bestätigungsverfahren:

- Wiederholgenauigkeit
- Reproduzierbarkeit innerhalb eines gegebenen Labors
- Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Labors
- Recovery

Bezüglich der Screening-Verfahren

- Empfindlichkeit
- Spezifität

Bevor eine solche Beurteilung erfolgen kann, müssen jedoch eindeutige Definitionen / Beschreibungen dieser Kriterien erstellt werden. Hierzu wurden nach Möglichkeit entsprechende CEN/ ISO-Berichte und andere Quellen hinzugezogen. Das Gleiche gilt für die Erstellung einer Analysenvorschrift zur Bestimmung von DON, ZEN und OTA.

Auf die entsprechenden Ergebnisse / Schlussfolgerungen / Empfehlungen werden der Beirat für Analysenangelegenheiten im Tierfuttersektor wie auch die Kommission für die Qualitätspolitik im Tierfuttersektor hingewiesen; diese werden auch von den Ergebnissen / Schlussfolgerungen / Empfehlungen unterrichtet. Die entsprechenden Unterlagen werden ihnen zur Einsicht vorgelegt, bevor sie der Vorstand des PDV zur endgültigen Abnahme erhält.

7 Ergebnisse

7.1 Kriterien / Parameter für die Bestätigungsverfahren

Dem CEN-CR 13505:1999 Dokument (**Anlage 1**) sind die Parameter zu entnehmen, die im Hinblick auf die Analyseverfahren zur Bestimmung von Mykotoxinen wichtig sind. Dabei handelt es sich um die Parameter für Bestätigungsverfahren. Nachstehend sind die Definitionen und / oder die spezifischen Eigenschaften dieser Parameter aufgeführt.

7.1.1 Definitionen / Beschreibung der Kriterien un Parameter

- **Untere Bestimmungsgrenze**
Dies ist die Hälfte des untersten Grenzwerts für die Ergreifung von Maßnahmen.
- **Wiederholgenauigkeit**
Wiederholgenauigkeit RSD_r (relative Standardabweichung innerhalb eines Labors): Dieser Präzisionsparameter bezieht sich auf die Inkorrektheit einer Methode innerhalb eines Labors. Dazu teilt man die Standardabweichung durch den Mittelwert der Testergebnisse, die nach der gleichen Methode mit identischem Testmaterial und unter den gleichen Bedingungen (gleiches ausführendes Personal, gleiche Apparatur, gleiches Labor und innerhalb eines kurzen Zeitintervalls) erhalten wurden, und multipliziert das Ergebnis mit $\times 100 \%$. Der RSD_r wird ausgedrückt in %.
- **Reproduzierbarkeit** (zwischen verschiedenen Labors);
Reproduzierbarkeit RSD_R (relative Standardabweichung zwischen verschiedenen Labors): Dieser Präzisionsparameter bezieht sich auf die Inkorrektheit einer Methode zwischen verschiedenen Labors. Dazu teilt man die Standardabweichung durch den Mittelwert der Testergebnisse, die nach der gleichen Methode mit identischem Testmaterial, jedoch unter anderen Bedingungen erhalten wurden (anderes Personal, andere Apparatur, anderes Labor und andere Zeiten), und multipliziert das Ergebnis mit $\times 100 \%$. Der RSD_R wird ausgedrückt in %.
- **Reproduzierbarkeit** (innerhalb eines Labors)
Reproduzierbarkeit RSD_{RL} : Übereinstimmung zwischen den Messergebnissen der gleichen Messgröße, die unter wechselnden Bedingungen erhalten wurden. Unter wechselnden Bedingungen versteht man den Beobachter, das Messinstrument, den Bezugsstandard, den Ort, die Nutzungsbedingungen und die Zeit. Der RSD_{RL} wird ausgedrückt in %.
- **Extraktionsverfahren**
Für die Mykotoxine DON, ZEN und OTA gilt, dass vorzugsweise Acetonitril/Wasser verwendet werden sollte. Für DON kann jedoch auch Wasser / PEG verwendet werden.
Bei stärkeartigen beziehungsweise stark fetthaltigen Produkten ist eine Vorbehandlung mit Chloroform oder Dichlormethan erforderlich.

- **Clean-Up**
Um eine richtige Vorbehandlung des Probenextrakts zu gewährleisten, sollte für die Mykotoxine DON, OTA und ZEN vorzugsweise eine IAC (Immunoaffinitätschromatographie) zur Anwendung gelangen.
- **Trennung/Nachweis**
Zur Trennung und für den Nachweis der Mykotoxine DON, OTA und ZEN sollte vorzugsweise eine HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) in Kombination mit einer Fluoreszenzanalyse oder UV zum Einsatz gelangen. Für DON eignet sich auch die GC (Gaschromatographie) in Kombination mit ECD (Electron Capture Detection). Für die Trennung und den Nachweis kann man aber auch das LC/MS-MS – Verfahren verwenden.
- **Nachweisgrenze:**
Für die Nachweisgrenze gilt, dass diese mindestens die Hälfte der unteren Bestimmungsgrenze betragen muss (siehe auch die Definition für die untere Bestimmungsgrenze).
- **Messprogramm**
Dieses Programm muss mindestens von der Hälfte des Maßnahmengrenzwerts bis zum doppelten Ablehnungsgrenzwert verlaufen.
- **Recovery**
Recovery (gemessene Konzentration in künstlich mykotoxinhaltigem Material – gemessene Konzentration in Blanko-Material) x 100 % / (bekannte Konzentrationserhöhung). Der Recovery-Wert wird ausgedrückt in %. Die beigefügte Menge muss mindestens eine substantielle Fraktion der vorhandenen Menge im Blanko-Material darstellen.
Im Idealfall MUSS das Blanko-Material so wenig von der zu prüfenden Analysensubstanz enthalten, dass dies unter der Bestimmungsgrenze liegt.
- **Richtigkeit**
Dies ist der Konzentrationsmesswert der zertifizierten Bezugssubstanz, geteilt durch den wahren zuerkannten Wert X 100 %. Ein wahrer zuerkannter Wert kann nur in Fällen von natürlich kontaminierten Materialien, zertifizierten Bezugssubstanzen, oder durch Analyse mit einem anderen (vermutlich präzisen) Verfahren bekannt sein. Die Konzentration des Blanko-Materials wurde durch direkte Analyse oder durch Standard-Addition ermittelt. In anderen Fällen, wo die Abweichung nicht bekannt ist, können die Werte des Ringtests als Bezugspunkte verwendet werden.
- **Messunsicherheit**
Dies ist der gleiche Wert wie die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors (RSD_{RL} %). Wenn die Messunsicherheit beispielsweise 30 % beträgt, bedeutet dies, dass bei einer Rückweisungsgrenze von 1000 ein Analyseergebnis von 1301 zur Rückweisung des Produkts führt.

7.1.2 Leistungskriterien für Bestätigungsverfahren

Die Analyseverfahren zur Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEN und OTA in Tierfuttermitteln und Futtermittelausgangsstoffen sowie die Labors, die diese Mykotoxinanalysen durchführen möchten, müssen mindestens die folgenden Leistungskriterien erfüllen. Diese Leistungskriterien wurden auf Basis der im CEN CR 13505:1999 Dokument (siehe Anlage 1) beschriebenen Performance Characteristics ermittelt.

Minimale Leistungskriterien für Desoxynivalenol (DON):

Konzentration ug/kg	Desoxynivalenol (DON)			
	RSD _{RL} %	RSD _r %	RSD _R , %	Recovery %
> 200	≤ 30	≤ 20	≤ 40	70-110

Minimale Leistungskriterien für Zearalenon:

Konzentration ug/kg	Zearalenon			
	RSD _{RL} %	RSD _r %	RSD _R , %	Recovery %
> 20	≤ 32,5	≤ 25	≤ 40	70-110

Minimale Leistungskriterien für Ochratoxin A:

Konzentration ug/kg	Ochratoxin A			
	RSD _{RL} %	RSD _r %	RSD _R , %	Recovery %
> 10	≤ 25	≤ 20	≤ 30	70-110

7.2 Kriterien / Parameter für Screening-Verfahren

Nachstehend sind die Parameter aufgeführt, die für (schnelle) Screening-Verfahren zur Bestimmung von Mykotoxin in Futtermittelausgangsstoffen wichtig sind. Zudem finden sich hier die Definitionen und / oder spezifischen Charakteristika für diese Parameter.

7.2.1 Definitionen / Beschreibung der Kriterien und Parameter

- **Empfindlichkeit**

Die Empfindlichkeit ist ein Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Ergebnis im Test auch als positiv eingestuft wird. Dies ist ein Maßstab für die Anzahl fälschlicherweise negativer Ergebnisse. Eine hohe Empfindlichkeit (100 %) bedeutet, dass keine fälschlich negativen Ergebnisse zu erwarten sind.

- **Spezifität**

Die Spezifität beinhaltet die Wahrscheinlichkeit, dass ein negatives Testergebnis auch als negativ interpretiert wird. Dies ist ein Maßstab für die Anzahl fälschlich positiver Ergebnisse bei einem Test. Eine hohe Spezifität (100 %) bedeutet, dass keine fälschlich positiven Ergebnisse zu erwarten sind.

7.2.2 Leistungskriterien für Screening-Verfahren

Geeignete Screening-Verfahren zur Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEN und OTA in Tierfuttermitteln und Futtermittelausgangsstoffen sowie auch die Labors, die diese Mykotoxinanalysen durchführen möchten, müssen die nachstehend genannten minimalen Leistungskriterien erfüllen.

Die Tabelle enthält die minimalen Leistungskriterien für Desoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN) und Ochratoxin A (OTA):

Konzentration ug/kg	Mykotoxin		
	DON	ZEN	OTA
Empfindlichkeit (Maß für fälschlicherweise negative Ergebnisse)	100 % bei Überschreitung Aktionsgrenze	100 % bei Überschreitung Aktionsgrenze	100 % bei Überschreitung Aktionsgrenze
Spezifizität (Maß für fälschlicherweise positive Ergebnisse)	Vorzugsweise >95 %	Vorzugsweise >95 %	Vorzugsweise >95 %

Die Screening-Verfahren zur Bestimmung der vorstehend genannten Mykotoxine können lediglich ein negatives oder positives Ergebnis erbringen. Bei einem positiven Ergebnis muss zudem immer eine Bestätigung (über ein Bestätigungsverfahren) erfolgen.

8 Richtlinien zur Analyse von Mykotoxinen in Futtermittel- ausgangsstoffen

8.1 Bestätigungsverfahren

Auf der Grundlage der NEN-Verfahrensvorschriften für ZEA und OTA hat die Sachverständigenkommission eine Richtlinie zur Bestimmung von DON, ZEN und OTA in Futtermittelausgangsstoffen entwickelt. Diese Richtlinie wurde daraufhin mit den standardmäßigen ISO-Verfahren sowie den firmeneigenen Labormethoden verglichen. Die Richtlinien zur Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEN und OTA in Futtermittelausgangsstoffen sind nachstehend beschrieben.

Allgemein:

1. Verwenden Sie kein unbearbeitetes Glas.
2. Vermeiden Sie Schimmelbildung bei der Lagerung und Aufbewahrung der Proben.

Spezifisch:

1. Man geht aus von mindestens 500 Gramm Probenmaterial. Dieses Probenmaterial wird gänzlich gemahlen und homogenisiert, bis eine Korngröße von ≤ 1 mm erreicht ist.
2. 25 Gramm des homogenisierten Probenmaterials in einen Mixer oder einen Messkolben überführen und 100 ml Acetonitril:Wasser (Volumenverhältnis 84:16) hinzufügen (bei Problemen mit der Phasentrennung 2,5 Gramm NaCl hinzufügen). Bei stark fetthaltigen Rohstoffen mit Chloroform oder saurem Dichlormethan extrahieren und mit Natriumbicarbonat rückextrahieren.

Hinweis: Dabei wird davon ausgegangen, dass das Probenmaterial < 20 % Wasser enthält. Im Fall von Breifutter muss beim Verhältnis Acetonitril:Wasser das bereits im Breifutter vorhandene Wasser berücksichtigt werden.

3. Die Suspension zwei Minuten lang mit hoher Geschwindigkeit vermischen. Oder mindestens 2 bis 3 Stunden schütteln.
4. Mehr als 10 ml über ein angefeuchtetes Filterpapier in einen Erlenmeyer einfiltrieren.
5. Nun wird eine Solid Phase Extraction (Feststoffextraktion) durchgeführt (IAC oder SPE).
6. Je nach Bedarf verdampft man das Eluat bis zur Trockne unter einer milden Stickstoff-Atmosphäre (bei 40-60 Grad Celsius) und löst den Extrakt in 2 ml mobiler Phase auf.
7. Danach erfolgt eine HPLC-Analyse durch Injektion von 100 μ l gelöstem Extrakt oder so viel weniger, wie zum Erzielen eines guten Nachweises und einer guten Trennung erforderlich ist.

8. Der Nachweis der Mykotoxine erfolgt mittels LC mit Fluoreszenzanalyse bei den für die betreffenden Mykotoxine spezifischen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen; oder über LC/MS-MS.

8.2 Screening-Verfahren

Im Hinblick auf geeignete Screening-Verfahren zur Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEN und OTA in Futtermittelausgangsstoffen kann man davon ausgehen, dass die ELISA – Methoden, die zurzeit als komplette Sätze auf dem Markt sind, zur Bestimmung der Mykotoxine DON, ZEN und OTA in einfachen Futtermitteln durchaus hinreichend sind.

Bei der Verwendung des Screening-Verfahrens zur Bestimmung der Mykotoxine in Futtermittelausgangsstoffen ist unbedingt sicherzustellen, dass die Gebrauchsanweisungen des Herstellers eingehalten werden.

In diesem Zusammenhang ist allerdings darauf hinzuweisen, dass bei stärkeartigen und stark fetthaltigen Produkten eine Vorbehandlung mit einem unpolaren organischen Lösungsmittel erforderlich ist.

9 Inventarisierung der Leistungskriterien für die Analyseverfahren sowie die Labors, die bereits Mykotoxine in Futtermittelausgangsstoffen bestimmen (anhand von Bestätigungs- und Screening-Verfahren)

9.1 Bestätigungsverfahren

Die Sachverständigenkommission hat eine Inventarisierung bei einer Reihe von Labors durchgeführt, die zurzeit bereits Mykotoxine in Futtermittelausgangsstoffen bestimmen.

Diese Inventarisierung hat gezeigt, dass die Labors die minimalen Leistungskriterien gemäß Kapitel 5.1.2 dieses Berichts erfüllen können.

Diese Inventarisierung bezog sich auf die folgenden Leistungsparameter:

- **Untere Bestimmungsgrenze**
- **Reproduzierbarkeit** (innerhalb eines Labors) RSD_{RL} der Messunsicherheit
- **Wiederholgenauigkeit**, RSD_r

Abgesehen von der Erfüllung der vorstehend genannten minimalen Leistungskriterien ist es zur Beurteilung der einzelnen Analyseverfahren sowie der Labors, die diese Analysen durchführen, wichtig, zu wissen, für welche Matrix der fragliche Test verwendet wurde und ob bereits eine vollständige Validierung (einschließlich Ringtest, beispielsweise über den KDLL) erfolgt ist.

Die Sachverständigenkommission legt viel Wert darauf, diesen letzteren Aspekt stark hervorzuheben, da mittels eines Ringtests die Differenzen zwischen den einzelnen Labors deutlich aufgezeigt werden können.

Es folgt eine Liste der Labors, die zurzeit Mykotoxine analysieren und die minimalen Kriterien gemäß Kapitel 5.1.2. dieses Berichts erfüllen können:

- **Masterlab, Putten**
- **CCL, Veghel**
- **Labco, Rotterdam**
- **TLR, Rotterdam**
- **RIKILT, Wageningen**
- **RIVM, Bilthoven**
- **TNO, Zeist**
- **Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht [Fakultät für Tiermedizin in Utrecht]**
- **Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer [Gesundheitsdienst für Tiere in Deventer]**

9.2 Screening-Verfahren

Aus verschiedenen Gründen sind schnelle (online) Screening-Verfahren wünschenswert und im Einsatz. Die praktische Brauchbarkeit (Online-Anwendung), die schnelle Verfügbarkeit der entsprechenden Analyseergebnisse und die Kosten für den Testsatz sind in diesem Zusammenhang ausschlaggebend.

Wenn jedoch ein Testsatz im Hinblick auf die Geschwindigkeit (das direkte Messergebnis) und die praktische Anwendbarkeit (Benutzerfreundlichkeit) die Bedingungen erfüllt, ist man in der Praxis geneigt, sich damit zufrieden zu geben. Wenn der Testsatz darüber hinaus auch noch in preistechnischer Hinsicht mit dem Bestätigungsverfahren konkurrieren kann, ist dies ein weiteres Argument, das für das Screening-Verfahren spricht.

Die Sachverständigenkommission ist der Auffassung, dass abgesehen von den vorstehend genannten Aspekten zumindest die Bedingung erfüllt sein sollte, dass der Testsatz fast bis gar keine fälschlicherweise negativen Ergebnisse erbringen darf. Somit muss also, anders ausgedrückt, eine hohe Empfindlichkeit gegeben sein.

Zudem ist es kostentechnisch wünschenswert, dass ein Screening-Verfahren wenig fälschlicherweise positive Ergebnisse zeigt. Nach jedem positiven Ergebnis muss schließlich eine Bestätigung erfolgen. Die Sachverständigenkommission ist der Meinung, dass sich ein Testsatz bei einer geringen Spezifität (also vielen fälschlicherweise positiven Ergebnissen) selbst "aus dem Markt preist".

Die zurzeit auf dem Markt erhältlichen (ELISA)-Testsätze, die die genannten Kriterien erfüllen, sind erhältlich bei:

- Euro-Diagnostica B.V.
Beijerinckweg 18
NL - 6827 BN Arnhem
Tel. + 33 (0)26 3630364
- R-Biopharm
Landwehrstrasse 54
D-64293 Darmstadt
Deutschland
Tel. + 49 (0) 6151 80 10 20

10 Schlussfolgerungen, Empfehlungen

Im Zusammenhang mit den Fragen, die der *Productschap Diervoeder* der Sachverständigenkommission vorgelegt hat, lassen sich auf der Grundlage der Untersuchungsergebnisse der Sachverständigenkommission folgende Schlussfolgerungen formulieren:

- Für beide (Bestätigungs- und Screening-) Verfahren wurden Richtlinien zur Bestimmung der Mykotoxine (DON, OTA und ZEN) in Futtermittelausgangsstoffen erstellt, die es den Labors ermöglichen, diese Analysen durchzuführen.
- Im Hinblick auf die Frage nach geeigneten Bestätigungsverfahren und Verfahren zur Bestimmung der Mykotoxine gelangt die Sachverständigenkommission zur Schlussfolgerung, dass zur Trennung und für den Nachweis der Mykotoxine DON, OTA und ZEN die HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) in Kombination mit der Fluoreszenzanalyse oder UV oder GC (Gaschromatographie) in Kombination mit ECD (Electron Capture) (DON) geeignet ist. Für die Trennung und den Nachweis eignet sich aber auch LC/MS-MS.
- Im Zusammenhang mit der Verwendung des Screening-Verfahrens verweist die Sachverständigenkommission bezüglich der Richtlinien auf die Gebrauchsanweisungen der zurzeit erhältlichen (ELISA) Testsätze.
- Die Inventarisierung der Labors, die zurzeit Mykotoxinanalysen durchführen, zeigt, dass alle an dieser Inventarisierung teilnehmenden Labors die minimalen Leistungskriterien im Hinblick auf die Bestätigungsverfahren erfüllen.
- In den Niederlanden und in Deutschland gibt es Screening-Verfahren, die diese Bedingungen erfüllen.
- Dass bei Verwendung von und auf Basis der in diesem Bericht genannten Richtlinien hinreichend verlässliche Analyseergebnisse im Hinblick auf die Mykotoxine DON, OTA und ZEN in Futtermittelausgangsstoffen erzielt werden können.
- Dass erst nach einem Ringtest (beispielsweise mit KDLL) die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Labors festgestellt werden kann. Für eine vollständige Validierung sind diese Daten unabdingbar.

Die Sachverständigenkommission spricht die folgenden Empfehlungen aus:

- Um die für eine vollständige Validierung benötigten Reproduzierbarkeitsdaten zwischen verschiedenen Labors zu erhalten, muss kurzfristig (noch im Jahr 2004) eine Ringuntersuchung (beispielsweise über KDLL) unter Einbeziehung der Labors begonnen werden, die die minimalen Leistungskriterien erfüllen.
- Die Messunsicherheit beim Analyseergebnis muss bekannt sein, damit man berechnen kann, bei welchem Resultat die Aktions- beziehungsweise Rückweitungsgrenze überschritten wird.

11 Zusammenfassung

Der Vorstand des *Productschap Diervoeder* (PDV) hat im Juni 2003 genaue Normen für die Mykotoxine DON (Desoxynivalenol), OTA (Ochratoxin A) und ZEN (Zearalenon) in verschiedenen Tierfuttern festgelegt. Dabei hat der Vorstand auch darauf hingewiesen, dass vor der Einführung dieser Normen erst schnelle, verlässliche und (nach Möglichkeit) validierte Analyseverfahren verfügbar sein müssen. Mit der Unterstützung des PDV-Vorstands wurde eine Sachverständigenkommission ins Leben gerufen, die die minimalen Leistungskriterien für die Bestätigungsverfahren wie auch die Screening-Verfahren formuliert hat (Kapitel 5.1.2 und 5.2.2).

Für beide (Bestätigungs- und Screening-) Verfahren wurden Richtlinien zur Bestimmung der Mykotoxine (DON, OTA und ZEN) in Futtermittelausgangsstoffen erstellt (Kapitel 5.1 und 5.2). Im Zusammenhang mit der Frage nach geeigneten Bestätigungsverfahren und zur Bestimmung der Mykotoxine meint die Sachverständigenkommission, dass zur Trennung und für den Nachweis der Mykotoxine DON, OTA und ZEN die HPLC (Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie) in Kombination mit einer Fluoreszenzanalyse oder UV oder auch GC (Gaschromatographie) in Kombination mit ECD (Electron Capture) (DON) zum Einsatz gelangen kann. Eine andere Option beinhaltet die Trennung und den Nachweis mit LC/MS-MS.

Im Hinblick auf das Screening-Verfahren verweist die Sachverständigenkommission auf die Gebrauchsanweisungen der zurzeit erhältlichen (ELISA) Testsätze.

Zudem hat die Sachverständigenkommission eine Inventarisierung durchgeführt, um festzustellen, inwieweit die Labors, die zurzeit Mykotoxinanalysen durchführen, die minimalen Leistungskriterien erfüllen (Kapitel 7). Dabei stellte sich heraus, dass alle an dieser Inventarisierung teilnehmenden Labors die fraglichen Bedingungen bezüglich der Bestätigungsverfahren erfüllen.

In den Niederlanden und in Deutschland gibt es Screening-Verfahren, die die diesbezüglichen Bedingungen erfüllen.

Die Sachverständigenkommission gelangt zu der Schlussfolgerung, dass bei Verwendung von und auf Basis der in diesem Bericht vorgeschlagenen Richtlinien durchaus hinreichend verlässliche Analysenergebnisse bezüglich der Mykotoxine DON, OTA und ZEN in Futtermittelausgangsstoffen erzielt werden können. In diesem Zusammenhang weist die Sachverständigenkommission allerdings darauf hin, dass erst nach einem Ringtest (beispielsweise mit dem KDLL) die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermittelt werden kann. Für eine vollständige Validierung sind diese Daten unabdingbar. Zudem wird empfohlen, auf jeden Fall die Messunsicherheit der Analysenergebnisse zu ermitteln, um berechnen zu können, bei welchem Resultat die Aktions- beziehungsweise Rückweisungsgrenze überschritten wird.

Hinzugezogene Literatur

- CEN Europäisches Komitee für Normierung; CR13505:1999; Lebensmittelanalyse - Biotoxine - Kriterien für analytische Verfahren für Mykotoxine
- Martin, S.W., Meek, A.H., und Willenberg, P. 1987. Veterinary Epidemiology: Principles and Methods. [Epidemiologie in der Veterinärmedizin: Prinzipien und Methoden]. Iowa State University Press, Ames
- NEN 7779:2003; Umweltschutz – Unsicherheit der Messergebnisse

Anlage 1: CR 13505: 1999 Food analysis –Biotoxins - criteria of analytical methods of Mykotoxins

Diese Anlage (5 MB) kann nach Wunsch per Post verschickt werden.

Zusammensetzung der Sachverständigenkommission:

Die Sachverständigenkommission für Analyseverfahren für Mykotoxine setzt sich aus den folgenden Mitgliedern zusammen:

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