

Die Anwendung von Bioassays im Rahmen der Dioxin EU-Gesetzgebung

Johannes Haedrich, Alexander Kotz, Kerstin Wahl, Rainer Malisch

EU-RL Dioxine (Freiburg)



c/o Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg (Germany)

Network of EU-RL and NRLs for Dioxins and PCBs



The EU network of the European Union Reference Laboratory (EU-RL) and the National Reference Laboratories (NRL) for Dioxins and PCBs in Feed and Food includes laboratories from 27 EU member states.



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)

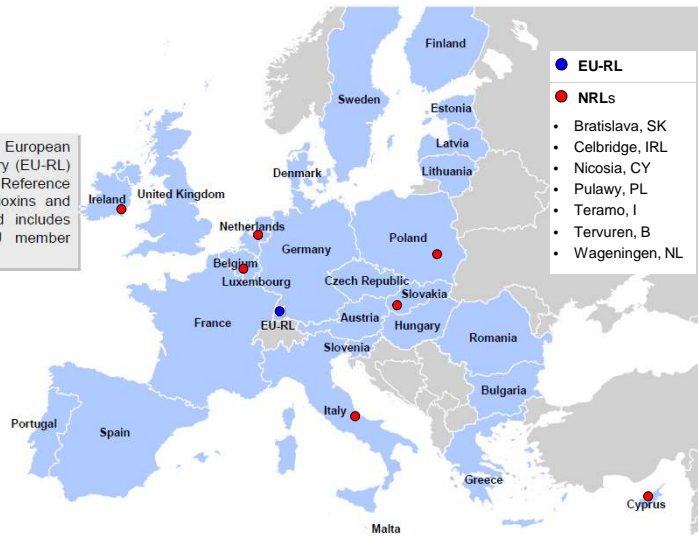
3



NRLs performing Bioassays



The EU network of the European Union Reference Laboratory (EU-RL) and the National Reference Laboratories (NRL) for Dioxins and PCBs in Feed and Food includes laboratories from 27 EU member states.



- EU-RL
- NRLs
 - Bratislava, SK
 - Celbridge, IRL
 - Nicosia, CY
 - Pulawy, PL
 - Teramo, I
 - Tervuren, B
 - Wageningen, NL



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)

4



EU-Referenzlaboratorien

Wesentliche Aufgaben der EU Referenzlaboratorien

gemäß Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz

- Information nationaler Referenzlaboratorien (NRL) über **Analyseverfahren**, einschließlich Referenzverfahren, Koordinierung der praktischen Regelungen bei der Anwendung und Information über Fortschritte
- Durchführung von **Vergleichsuntersuchungen** mit NRLs und Gewährleistung von Anschlussmaßnahmen zur Sicherstellung der analytischen Zuverlässigkeit
- **Wissenschaftliche Unterstützung** der Europäischen Kommission
- **Wissenschaftliche Unterstützung** von NRLs
- Durchführung von **Schiedsuntersuchungen für NRLs** im Bedarfsfall



EU-RL für Dioxine und PCB in Lebensmitteln und Futtermitteln

Arbeitsgebiete im EU-RL für Dioxine und PCB:

- Forschungslabor für **physikalisch – chemische** Methoden zur Bestimmung von Dioxinen und PCB (dioxinähnliche und nicht-dioxinähnliche PCB) in Lebensmitteln und Futtermitteln (Screeningmethoden und Bestätigungsmethoden)
- Forschungslabor für **bioanalytische** Screeningmethoden zur Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB in Lebensmitteln und Futtermitteln



Präsentation

Roadmap

- 1. Dioxine und PCBs: Strategie der Europäischen Union
- 2. Probenaufarbeitung und Messung
- 3. Neue Kriterien für die Anwendung von Screeningverfahren
- 4. Validierung und Qualitätskontrolle
- 5. Kosten und Effizienz



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)



Kontaminationsfälle

Auswahl von Kontaminationsfällen

- 1998 Zitrustrester / kont. Kalk zur Neutralisation (Brasilien)
- 1999 Belgische Dioxinkrise / Transformatorenöl in Futterfett (B)
- 1999 Futtermittel / kontaminierter Kaolinit als Fließhilfsstoff (D)
- 2002 Cholinchlorid / kontaminierter Trägerstoff (B)
- 2003 Futtermittel / kontaminierte Bäckereiabfälle in Futtermitteln (D)
- 2004 Kartoffelprodukte (NL) / kontaminierter Kaolinit als Fließhilfsstoff (D)
- 2006 Fett aus Gelatineproduktion (NL)
- 2007 Guarkernmehl / Dioxine, Pentachlorphenol (Indien)
- 2008 Büffel-Mozzarella / unsachgemäße Müllverbrennung (I)
- 2008 Schweinefleisch / kontaminierte Bäckereiabfälle in Futtermitteln (Irland)
- 2010 Hühnereier / kontaminiertes Maismehl aus Ukraine (NL)
- 2011 Mischfutter / kontaminierte Futterfette (D)
- 2012 Bio-Hühnereier / kontaminiert mit dl-PCBs (D)

1 Mrd. US\$ direkte Kosten
3 Mrd. US\$ indirekte Kosten



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)



EU-Strategie

Strategie der EU-Kommission



EUROPEAN
COMMISSION

- Mitteilung der Kommission: „Community strategy for dioxins, furans and PCBs“ COM (2001) 593 of 24.10.2001
- Ziel: Verringerung des Vorkommens von Dioxinen und dioxinähnlichen PCBs in der Umwelt, im Tierfutter und in Lebensmitteln
- 3 Säulen
 - **Höchstmengen (HM)**: falls überschritten, keine weitere Verwendung des Produkts innerhalb der EU
 - **Auslösewerte (AL)**: Frühwarnsystem; falls überschritten, Ermittlung der Ursachen/Kontaminationspfade
 - **Zielwerte**: sollen erreicht werden für eine dauerhafte Verringerung nahrungsbedingter Exposition
- toxikologisch relevante Zielverbindungen: 29 Kongenere



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)

9



Zielverbindungen: 29 Kongenere

WHO-TEFs for human risk assessment based on the conclusions of the World Health Organization (WHO) — International Programme on Chemical Safety (IPCS) expert meeting which was held in Geneva in June 2005 (Martin Van den Berg et al., 'The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds', *Toxicological Sciences* 93(2), 223-241 (2006))

	Congener	TEF value	Congener	TEF value
7 Dioxine	Dibenzo-p-dioxins ('PCDDs')		'Dioxin-like' PCBs Non-ortho PCBs and Mono-ortho PCBs	
	2,3,7,8-TCDD	1		
	1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho PCBs	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003			
10 Furane	Dibenzofurans ('PCDFs')		Mono-ortho PCBs	
	2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
	1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
	2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003			

12 dioxinähnliche PCBs

TEF = Toxic Equivalency Factor

Abbreviations used: 'T' = tetra; 'Pe' = penta; 'Hx' = hexa; 'Hp' = hepta; 'O' = octa; 'CDD' = chlorodibenzodioxin; 'CDF' = chlorodibenzofuran; 'CB' = chlorobiphenyl.



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)

10



EU Legal Limits (Food)

Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011

Food Sample	AL - PCDD/Fs	ML - PCDD/Fs	AL - dl-PCBs	ML - PCDD/Fs+PCBs	Unit
Bovine animals, sheep	1,75	2,5	1,75	4,0	pg/g fat
Poultry	1,25	1,75	0,75	3,0	pg/g fat
Pig meat	0,75	1,0	0,5	1,25	pg/g fat
Animal liver, liver products		4,5		10	pg/g fat
Fish and fish products	1,5	3,5	2,5	6,5	pg/g fw
Eel and eel products		3,5		6,5	pg/g fw
Marine oils		1,75		6,0	pg/g fat
Milk, dairy products, butterfat	1,75	2,5	2,0	5,5	pg/g fat
Eggs and egg products	1,75	2,5	1,75	5,0	pg/g fat
Mixed animal fats	1,0	1,5	0,75	2,5	pg/g fat
Vegetable oils and fats	0,5	0,75	0,5	1,25	pg/g fat
Foods for infants, children		0,1		0,2	ng/kg fw

ML: Höchstmenge; AL: Auslösewert



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)

11



EU Legal Limits (Feed)

Commission Regulation (EU) No 277/2012 of 28 March 2012

Feed Sample	AL - PCDD/Fs	ML - PCDD/Fs	AL - dl-PCBs	ML - PCDD/Fs+PCBs	Unit*
Feed, plant origin	0,5	0,75	0,35	1,25	pg/g ww
Vegetable oil	0,5	0,75	0,5	1,5	pg/g ww
Feed, mineral origin	0,5	0,75	0,35	1,0	pg/g ww
Animal fat, milk fat, egg fat	0,75	1,5	0,75	2,0	pg/g ww
Animal products, milk, eggs	0,5	0,75	0,35	1,25	pg/g ww
Fish Oil	4,0	5,0	11	20	pg/g ww
Fish, fish products	0,75	1,25	2,0	4,0	pg/g ww
Fish protein, hydrol.	1,25	1,75	5,0	9,0	pg/g ww
Feed additives: Clay etc.	0,5	0,75	0,5	1,5	pg/g ww
Feed additives: Trace Ele	0,5	1,0	0,35	1,5	pg/g ww
Premix tures	0,5	1,0	0,5	1,5	pg/g ww
Compound feed		0,75	2,5	1,5	pg/g ww

* based on a moisture content of 12%

ML: Höchstmenge; AL: Auslösewert



European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food
Freiburg (Germany)

12



Screeningverfahren

Bioanalytische Screeningverfahren

- seit mehr als einem Jahrzehnt in der Europäischen **Amtlichen Überwachung** (Feed, Food) angewendet
- **CALUX** Bioassay: stabil transfizierte Ratten- und Maus-Hepatomazellen
- **aber**: Nutzungsrechte bei Vertriebsfirmen
- relevante **Leistungsparameter**
 - Empfindlichkeit
 - Sichtbare Wiederfindung
 - Reproduzierbarkeit
 - Cut-off Konzentration
 - falsch-negativ Rate
 - Selektivität !



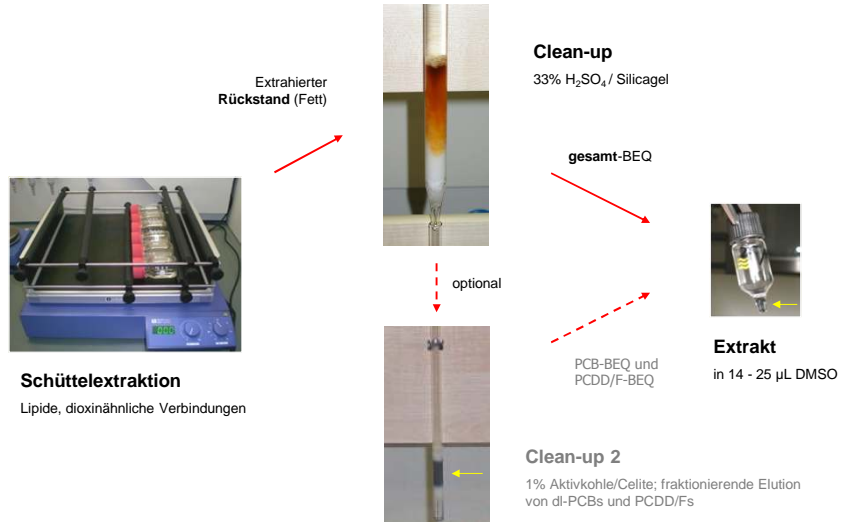
Selektivität

Wie selektiv ist der CALUX Bioassay?

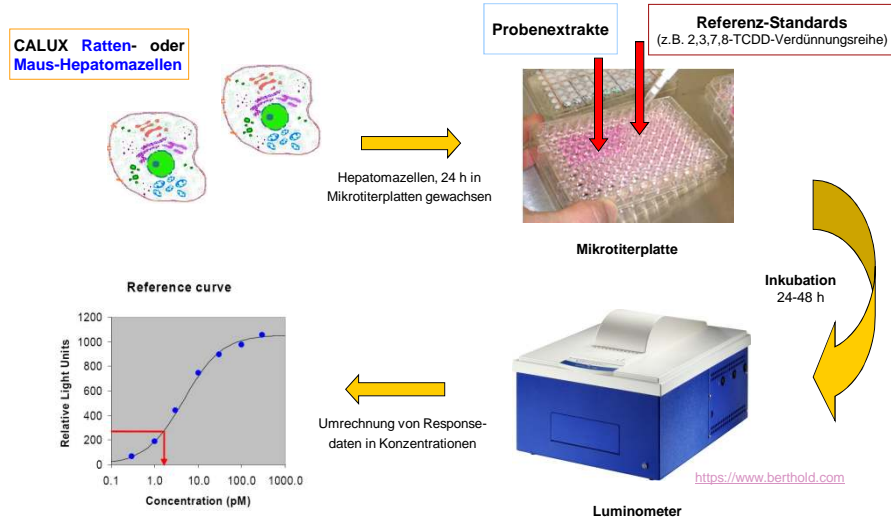
- **Alle Ah-Rezeptor aktiven Verbindungen** im Probenextrakt tragen zur Zellantwort bei
- Ziel (theoretisch): **selektive** Zellresponse nur auf die ML/AL-geregelten 29 Kongeneren
- Selektivität ggf. steigerbar durch Optimierung von **Extraktion** und **Clean-up**
- **Sonderstellung** des CALUX Bioassays, z.B. im Vergleich mit Immunoassays:
instabile AhR-Agonisten (PAKs), die die Aufreinigung ggf. überstanden haben, werden während der ersten 20 h Exposition durch die Hepatomazellen metabolisiert



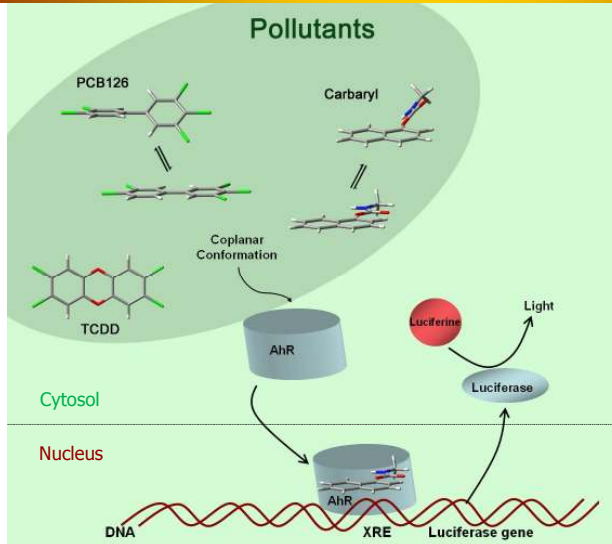
Extraktion und Clean-up



CALUX Bioassay



AhR-mediated Induction of Gene Expression



CALUX = Chemically Activated Luciferase Gene Expression

Stabil transfizierte Ratten- oder Maus-Hepatomazellen

AhR = Aromatic Hydrocarbon Receptor



Neue Kriterien für die Leistungsfähigkeit von Screeningverfahren



Neue EU-Verordnungen

Neuregelung der Analysenkriterien

- Verordnung (EU) Nr. 252/2012 der Kommission vom 21 März 2012 (**food**) zur Festlegung von Probenahmeverfahren und **Analysenmethoden für die amtliche Kontrolle** der Gehalte an Dioxinen, dioxinähnlichen PCB und nicht dioxinähnlichen PCB in bestimmten Lebensmitteln und zur Aufhebung der Verordnung (EG) 1883/2006, OJ L 84, 23.03.2012, p. 1
- Verordnung (EU) Nr. 278/2012 der Kommission vom 28 März 2012 (**feed**) zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 hinsichtlich der **Bestimmung der Gehalte an Dioxinen und polychlorierten Biphenylen**, OJ L 91, 29.03.2012, p. 8



EUROPEAN
COMMISSION



Komplementäre analytische Methoden

Zwei komplementäre analytische Prinzipien / Zielrichtungen

- **GC/HRMS – hochspezifisch** hinsichtlich der nachzuweisenden 29 Kongenere
 - erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung einzelner Kongene
 - Ergebnis wird als Summenwert berechnet und mit dem geltenden **Grenzwert** (+ MU) verglichen
 - gerichtsverwertbar abgesicherte Ergebnisse
 - Ermittlung von Kongenerenmustern, Kontaminationspfaden
 - Ermittlung von zeitlichen Trends,
 - Bestimmung der Gehalte auch im Bereich der Hintergrundbelastung (u.a. für Intake-Abschätzungen und Re-Evaluierung von Grenzwerten)
- **Bioassay Screening – nicht analytischspezifisch**
 - detektiert Effekte, die in biologischen Zielstrukturen induziert werden
 - Vergleich mit einem **Cut-off -Wert** führt zu **ja/nein**-Entscheidung bezüglich Einhaltung von Grenzwerten (HM, AL)



Screeningmethoden

Ziel des Einsatzes von Screeningverfahren

- Auswahl derjenigen Proben, deren Gehalt an PCDD/Fs und dioxinähnlichen PCBs festgelegte **Höchstgehalte** oder **Auslösewerte** vermutlich **überschreitet**.
- Die Konzentration von PCDD/Fs und der Summe von PCDD/Fs und dioxinähnlichen PCBs in diesen Proben muss durch ein kongeneren-spezifisches **Bestätigungsverfahren** (GC/HRMS) abgesichert werden.



Klassifizierung

Klassifizierung von Methoden

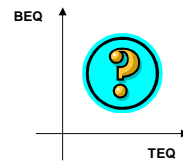
- **Qualitative** Methoden (z.B. Bioanalytische Methoden)
 - vergleichen das bioanalytische Ergebnis mit einem **Cut-off** Wert, und
 - liefern eine **ja/nein-Entscheidung** hinsichtlich des möglichen Überschreitens der interessierenden Konzentration
- **Semi-quantitative** Methoden (Bioanalytische oder phys.-chemische Methoden)
 - liefern darüber hinaus einen **numerischen Wert** als ungefähren Anhaltspunkt für die in der Probe tatsächlich vorliegende TEQ-Konzentration
- **Quantitative** Methoden (phys.-chemische Methoden)
 - entsprechen den gleichen Anforderungen hinsichtlich Genauigkeit, Messbereich und Präzision wie die Bestätigungsverfahren.
 - Ist eine Quantifizierung erforderlich, müssen die quantitativen Methoden genauso validiert werden wie die Bestätigungsverfahren.



Bioanalytical Equivalents (BEQs)

Report von bioanalytischen Ergebnissen

- Bioassay-Ergebnisse: jetzt anzugeben in **Bioanalytical EQuivalents** (BEQs)
- EU-Grenzwerte: angegeben in Toxic Equivalents (TEQs)
- **Korrespondenz** von BEQs mit TEQs ?
 - Eigenschaften der Probenmatrix (Variabilität)
 - Kongenerenmuster (Variabilität)
 - Verluste während Extraktion und Clean-up
 - Anwesenheit anderer AhR-Agonisten im Probenextrakt
 - Unterschiede zwischen TEF-Werten und REP-Faktoren
 - andere



Neue Kriterien

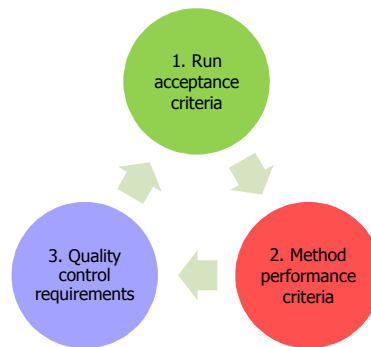
Neue Kriterien für Screeningverfahren

- basierend auf 1 Jahrzehnt Erfahrung mit analytischen Kriterien für Bioassays
- erhebliche **Streubreiten** bioanalytischer Ergebnisse in **EU-RL PT Studien**
- Einsatz des CALUX als „quantitatives“ Screening oft **missverstanden**
- Erforderlich: Implementierung neuer Anforderungen für **Validierung und QC**
- **Überarbeitung** der existierenden gesetzlichen Vorgaben durch eine EU-RL/NRL-Expertengruppe



Anforderungen

Kriterien und Anforderungen



Run Acceptance

1. Akzeptanzkriterien

- **Assay-Kriterien:** Kalibratoren, Standardkurve, Anpassung, Arbeitsbereich
- **Berichtsfähige Konzentration** (reporting level): $\geq 3x$ Methoden-Leerwert
- **Numerische Ergebnisse** müssen korrigiert werden um
 - Methoden (oder Matrix) -Leerwert
 - sichtbare Wiederfindung (Referenzprobe)
- **Sichtbare Wiederfindung** (Referenzprobe):
 - 30 – 130 % für gesamt-BEQ
 - 25 – 60 % für PCB-BEQ
 - 50 – 130 % für PCDD/F-BEQ



Method Performance

2. Leistungs- und Validierungskriterien

- **Wiederholbarkeit** $RSD_i \leq 20\%$
- **Reproduzierbarkeit** (laborintern) $RSD_R \leq 25\%$
- **Cut-off Wert**, basierend auf
 - Interessierender Konzentration (HM, AL)
 - GC/HRMS-Messunsicherheit
 - BEQ/TEQ-Verhältnis
 - falsch-negativ-Rate $< 5\%$
 - Bioassay- RSD_R
- **Falsch-negativ-Rate** (β -Fehler) $< 5\%$



Quality Control

3. Anforderungen an die Qualitätskontrolle (QC)

- **QC-Proben** in jeder Probenserie, QC-Charts
 - Methoden-Leerwertprobe
 - Wiederfindungs-Kontrollprobe
- **Bestätigung** von Screening-Ergebnissen mittels GC/HRMS
 - **2 - 10 %** der **negativen** Proben (je nach Probenmatrix und Erfahrung des Labors)
 - **alle verdächtigen** Proben (mögliche Überschreitung von Grenzwerten)

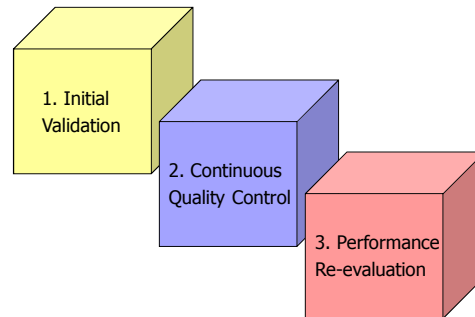


<http://www.thermoscientific.com>



Validierung und QC

Validierung und QC bioanalytischer Methoden

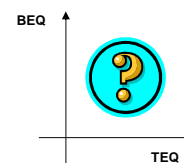


Initial Validation

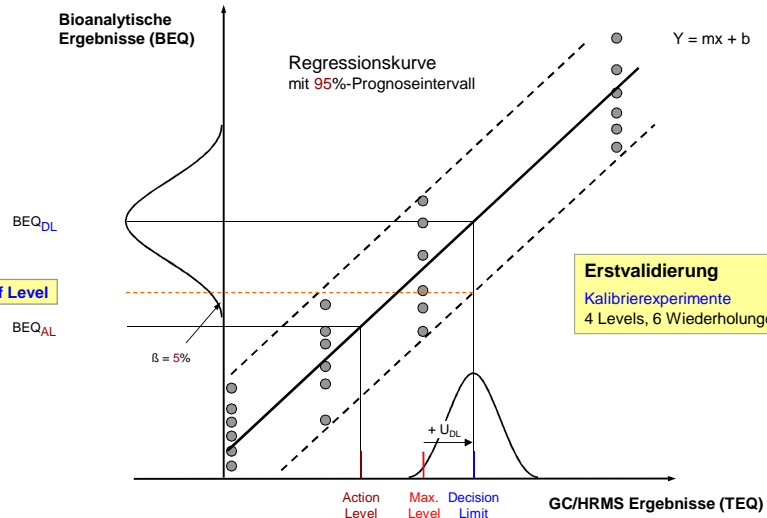


Erstvalidierung (Initial Validation)

- Evaluierung der **grundlegenden Methodenperformance**
 - **keine** Berücksichtigung der Variabilität: physik. Eigenschaften, Kongenerenmuster
- Matrix-bezogene **Kalibrierexperimente**
 - "Leere" Proben, dotiert an der interessierenden Konzentration (e.g. bei **0x**, **0.5x**, **1x** und **2x** ML)
 - **6** Wiederholungen auf jeder Konzentrationsstufe
 - Extraktion, Clean-up und Messung (unter Bedingungen laborinterner Reproduzierbarkeit)
- Evaluierung der Kalibrierergebnisse
 - lineare Regression, 95%-Prognoseintervall
 - diverse Leistungskennndaten
 - **BEQ/TEQ**-Verhältnis
 - **Bioassay cut-off** Konzentration



Initial Validation



Quality Control



2. Fortlaufende Routine-QC

- **Verifizieren** der Akzeptanzkriterien für Probenreihen
- **Bestätigungsanalysen** mittels GC/HRMS
 - 2 - 10 % der als "negativ" beurteilten Proben
 - alle als "verdächtig" eingestuft Proben
- **QC-Datenbank** für jede Probenart/Probengruppe
 - alle bestätigten Ergebnisse (von "negativen" und "verdächtigen" Proben)
 - Ergebnisse aus Ringversuchen oder aus Kontaminationsfällen



<http://www.thermoscientific.com>

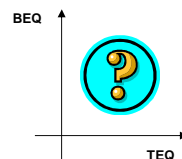


Performance Re-evaluation

3.

Erneute Überprüfung der Leistungsfähigkeit (fortlaufend)

- **QC-Datenbank** (BEQ/TEQ-Datenpaare)
 - Berücksichtigung der Variabilität in physik. Eigenschaften und Kongenerenmustern
 - 20+ bestätigte Ergebnisse je Probenart, in einem Bereich bis zu 2x ML
- **Re-Evaluierung** der Methodenperformance
 - tatsächliche falsch-negativ Rate < 5% ?
 - BEQ/TEQ-Verhältnis
 - div. Leistungsdaten
 - Cut-off kann neu festgelegt werden (falls erforderlich)



Performance Re-evaluation

Bioanalytische
Ergebnisse (BEQ)

BEQ_{DL}

Cut-off Level

BEQ_{AL}

$\beta = 5\%$

Regressionskurve
mit 95%-Prognoseintervall

$Y = mx + b$

Performance Re-evaluation

Kalibriexperimente
 ≥ 20 bestätigte Probenergebnisse

Action
Level

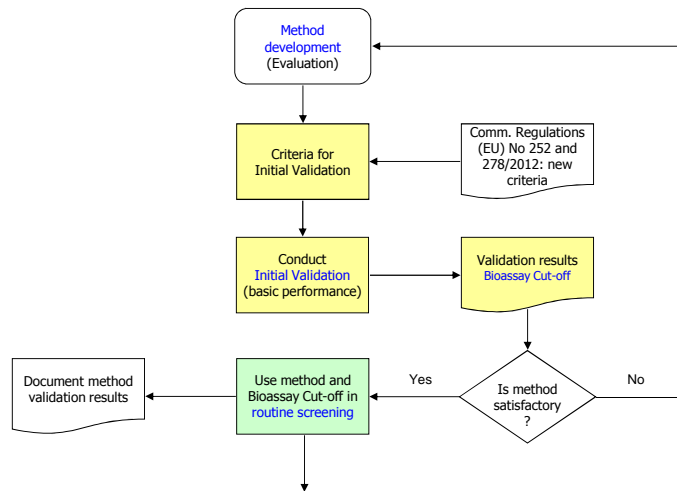
Max.
Level

Decision
Limit

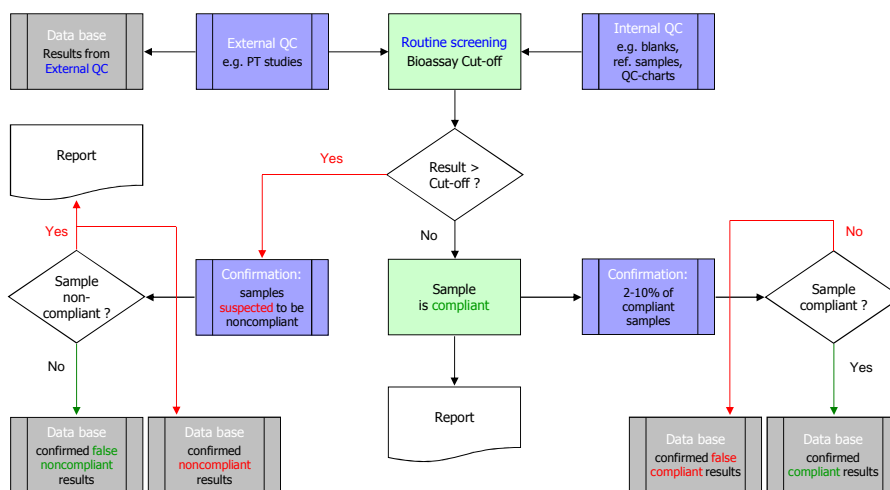
GC/HRMS Ergebnisse (TEQ)



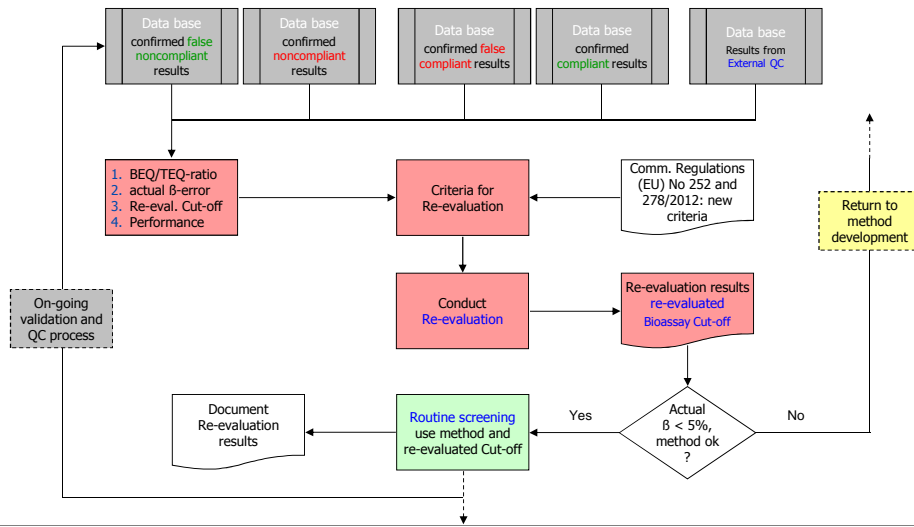
Scheme 1: Initial Validation



Scheme 2: QC



Scheme 3: Performance Re-evaluation



EU-RL Validierungsstudien



EU-RL Validierungsstudien

EU-RL Validierungsstudien (1)

- Assay, Extraktions- und/oder Clean-up-Methoden **modifiziert/optimiert**
- **Total-BEQs**, gemessen auf DR-CALUX H4IIE Ratten-Hepatomazellen ¹⁾
 - Fett (Rind)
 - Fleisch (Rind)
 - Leber (Rind)
 - Fisch
 - Fischöl
 - Eier
 - Milchfett
 - Vollmilch



¹⁾ BioDetection Systems, Amsterdam (NL)

EU-RL Validierungsstudien

EU-RL Validierungsstudien (2)

- Assay, Extraktions- und/oder Clean-up-Methoden **modifiziert/optimiert**
- **PCDD/F- und dl-PCB-BEQs**, separat gemessen auf H1L6.1c2 Maus-Hepatomazellen ²⁾
 - Fett (Rind)
 - Fischöl
 - Eier (in progress)
 - Milchfett
 - Vollmilch
 - weitere in Vorbereitung



²⁾ University of California Davis (USA)

Praktische Beispiele

Beispiel: Vollmilch

- Erstvalidierung: **Vollmilch** (Handel), dotiert
- Re-evaluierung: **Milchfett** (Humanmilch), kontaminiert (WHO study) ^{a)}
- Analyse: **PCDD/F-** und **dl-PCB-BEQ** (separat)
- Cut-off Werte: für **PCDD/F-ML**, **PCDD/F+PCB-ML**, **dl-PCB-AL**
- Messung auf: H1L6.1c2 mouse hepatoma cells (UC Davis, USA)

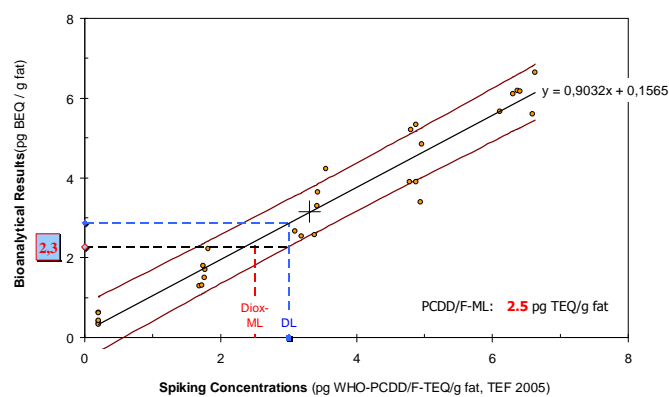


^{a)} kontaminierte Kuhmilch war nicht verfügbar;
MLs, ALs sind für human milk fat nicht festgelegt



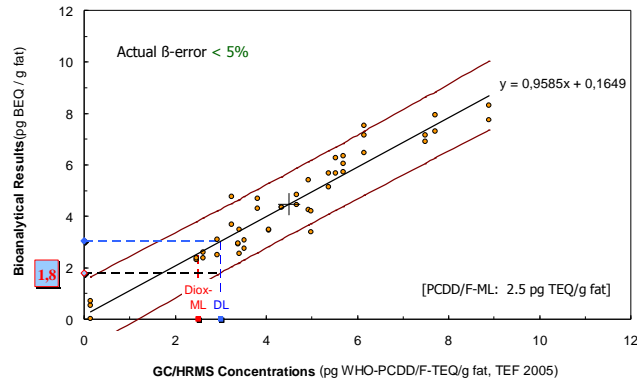
Initial Validation (PCDD/Fs)

Initial Validation: **WHOLE MILK - PCDD/Fs** Calibration with Spiked Samples



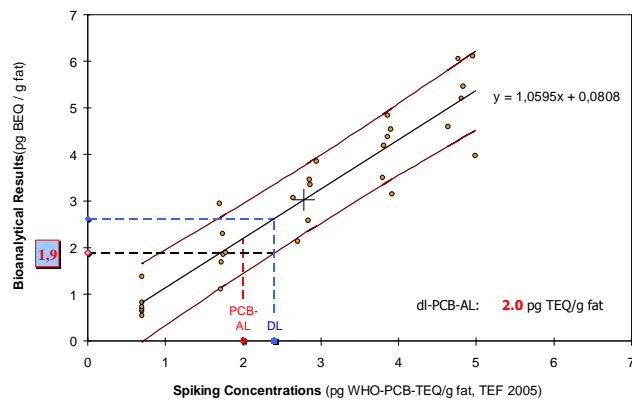
Re-evaluation (PCDD/Fs)

Performance Re-evaluation: Human MILK FAT - PCDD/Fs Calibration with Confirmed Samples



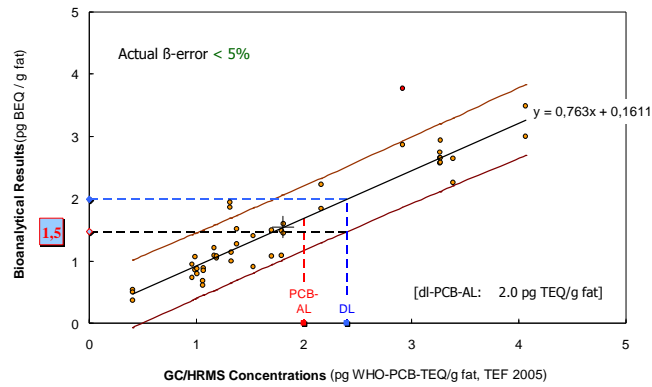
Initial Validation (dl-PCBs)

Initial Validation: WHOLE MILK - dl-PCBs Calibration with Spiked Samples



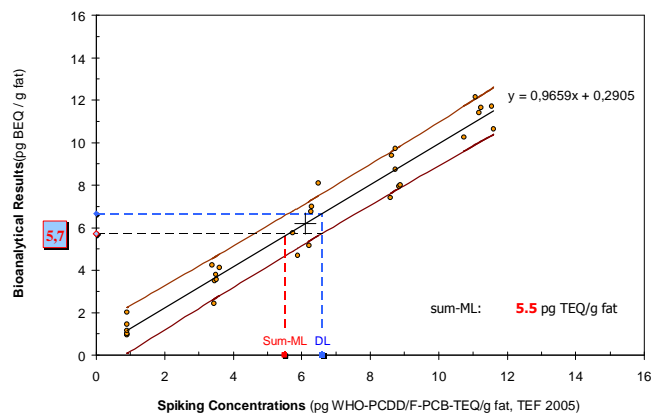
Re-evaluation (dl-PCBs)

Performance Re-evaluation: Human MILK FAT - dl-PCBs Calibration with Confirmed Samples



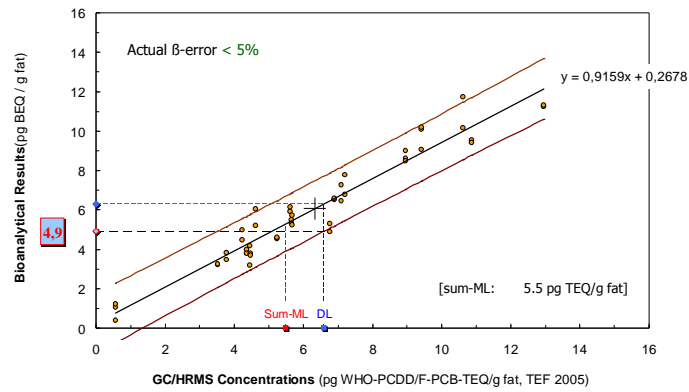
Initial Validation (PCDD/Fs+dl-PCBs)

Initial Validation: WHOLE MILK - PCDD/Fs+dl-PCBs Calibration with Spiked Samples



Re-evaluation (PCDD/Fs+dl-PCBs)

Performance Re-evaluation: Human MILK FAT - PCDD/Fs+dl-PCBs Calibration with Confirmed Samples

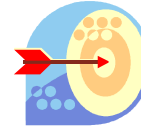


EU-RL PT Studien



EU-RL Vergleichsuntersuchungen

EU-RL PT Studien



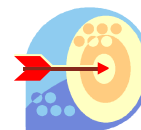
- werden 2x jährlich durchgeführt
- offen für NRLs, OFLs (über NRLs), ggf. Privatlaboratorien
- Proben kontaminiert im Bereich **relevanter Konzentrationen** (i.a. HM, AL) von PCDD/Fs, dl-PCBs, NDl-PCBs
- **Futtermittel, Lebensmittel**
 - 2008: 1. Guarkernmehl, 2. Fischöl
 - 2009: Dosenwurst (Schweinefleisch)
 - 2010: 1. Ei und Maismehl (Ukraine) ¹⁾, 2. Milchfett und Schweinefett
 - 2011: 1. Grasmehl, 2. Fisch und Fischöl
 - 2012: 1. Schweinefleisch und Schweinefett, 2. Hühnerlei (Vollei, Trockenei)

¹⁾ gemeinsam mit RIKILT, Wageningen (NL)



EU-RL Vergleichsuntersuchungen: Ergebnisse

Ergebnisse aus EU-RL PT Studien



- Bioassay-Scores = $(X - X_a) / \sigma t$
 - X_a = assigned value (berechnet aus GC/HRMS-Ergebnissen der Teilnehmer)
 - σt = target-SD (20%; zum Vergleich: 10% bei Bestätigungsmethoden)
- Bioassay-Scores < -3 und > +3: **Defizite** in der Leistungsfähigkeit der Methoden (unsachgemäße Handhabung, Änderung der Zellantwort durch Co-Eluenten im Probenextrakt)
 - Bioassay-Scores **streuen** teilweise erheblich
 - häufig: im **selben** PT neben akzeptablen Ergebnissen auch besonders niedrige / hohe Ergebnisse
 - in einigen Fällen: **einseitige Verschiebungen**, z.B.
- vor dem Hintergrund von Laboratorien mit Bioassay-Scores > 3: **erhöhte BEQ-Gehalte** deuten **nicht** zwangsläufig auf dioxinähnliche, toxikologisch relevante Verbindungen („novel risks“) hin. Bestätigungsuntersuchungen notwendig, bevor Hinweise auf „novel risks“ abgesichert sind.
- Bioassay-Scores < 3: führen bei Proben, die über HM kontaminiert sind, ggf. zu **falsch-negativen Befunden**



Kosten und Effizienz



Voraussetzungen

Allgemeine Voraussetzungen

- vollständig eingerichtetes **S1 Zellkulturlabor** ¹⁾
- **Grundwissen** für den Umgang mit Zellkulturen
- stabil transfizierte **Ratten-** oder **Maus-Hepatomazellen**
- ausführliche Beschreibung aller **Arbeitsabläufe**
- Kenntnisse aus der Rückstandsanalytik (insbesondere Erfahrung aus Arbeiten im Spurenbereich zur Bestimmung von Kontaminanten mit GC/MS von Vorteil)
- gute Zusammenarbeit mit einem **GC/HRMS-Labor**
- Literaturstudien



¹⁾ Sicherheitsstufe 1: kein Risiko für Gesundheit und Umwelt



Kosten

Grundausstattung, laufende Kosten ¹⁾

- Räumlichkeiten (Grundfläche, Infrastruktur mit Anforderungen an S1-Labor)
- apparative Grundausstattung 80.000 – 100.000 €
- Verbrauchsmaterial 25 – 30 € / Probe
- Lizenzgebühr, jährlich 10.000 – XX.000 €
- Lizenzgebühr je Probe 30 – 50 € / Probe
- Kosten für Validierung und QC (einschl. GC/HRMS-Absicherung)
- Kosten für Bereitstellung und Durchführung der Bestätigungsanalysen (GC/HRMS)
- Wissenschaftliche und Technische Mitarbeiter



¹⁾ Stand: 2010



Implementierung

Einführung der CALUX-Technologie

- Einarbeitungsphase 6 Monate
- Optimierung und Validierung 2 - 3 Monate je Matrix
- nur Befolgen der Herstellerprotokolle 2 Monate



Untersuchungskapazitäten

Untersuchungskapazitäten (1)

- generell abhängig von Automatisierungsgrad, Ausstattung und Personal
- weitere wesentliche Faktoren
 - Probenerfassung und -management
 - Herstellen der Laborprobe aus den für eine repräsentative Probenahme vorgeschriebenen Probemengen : Je nach Matrix teilweise recht hoher Aufwand (z.B. Fleisch zerkleinern im Fleischwolf; dann Herstellung des repräsentativen Aliquots). Bei Fischproben (oder Fleischproben mit noch anhaftenden Knochen, zB. Hühnchen) ist der Aufwand noch deutlich höher. Auch Futtermittelproben können aufwändig sein. Besonders aufwändig sind beispielsweise Gras- und Silageproben, die getrocknet, zerkleinert und homogenisiert werden müssen.
 - Erstellen und Mitteilung der Befunde; Datenverwaltung im Labormanagementsystem; Bedienung von Übermittlungspflichten

Somit kann beispielsweise allein die Probenvorbereitung und -erfassung von 10 Fleischproben bis zur Herstellung der Laborprobe etwa einen Arbeitstag pro Person ausmachen.



Untersuchungskapazitäten

Untersuchungskapazitäten (2)

- EU-RL / Bioanalytischer Forschungsbereich

Zur Orientierung werden die Untersuchungskapazitäten nur zur Durchführung von Aufarbeitung von bereits fertig hergestellten Laborproben (d.h. ohne Zeiten für Probenmanagement, Probenvorbereitung usw) und Messung abgeschätzt. Es werden kontinuierliche Arbeitsmöglichkeiten das Jahr über ohne möglicherweise auftretende Probleme wie Blindwertprobleme oder Kontaminationen der eingesetzten Zell-Linien angenommen. Diese optimalen Bedingungen sind somit nicht übertragbar auf Routinebedingungen; die Zahlen dienen eher als Abschätzung, was mit der hier etablierten Methodik und Qualitätssicherung sowie Zuarbeit aus anderen Bereichen (für Probenmanagement, -vorbereitung, GC/HRMS-Absicherungen usw.) maximal leistbar ist :

- gesamt-BEQ 20 Proben / 52 h (z.B. Montag 8h – Mittwoch 12h)
1800 Proben / Jahr (2 Mitarbeiter)
- PCDD/F- und dl-PCB-BEQ (separat) 14 Proben / 52 h (z.B. Montag 8h – Mittwoch 12h)
1200 Proben / Jahr (2 Mitarbeiter)



Zusammenfassung

Zusammenfassung, Ausblick



- CALUX bei **sachgemäßem** Einsatz gut geeignet zur **Vorselektion** verdächtiger Proben
- **Neue Kriterien** in Kraft seit 2012
- Neue **Cut-off Werte** spiegeln die Leistungsfähigkeit der Methode
- EU-RL Validierungsstudien belegen **Einhaltbarkeit** der neuen EU-Anforderungen
- Für **jedes** Anwenderlabor unerlässlich: merklicher Aufwand für Einführung, Validierung und QC
- Unerlässlich: gute Zusammenarbeit mit **GC/HRMS-Labor**
- Regelmäßige **erfolgreiche** Teilnahme an **externen PTs**
- Streuung bei PT-Ergebnissen zeigen: **erhöhte BEQ-Gehalte** resultieren nicht notwendigerweise aus dioxinähnlichen, toxikologisch relevanten Verbindungen
- EU-RL **Guideline** "Validierung bioanalytischer Methoden" in Vorbereitung
- Veröffentlichung optimierter, vollständiger **Methoden**
- **Externe QC**: jährlich 2 EU-RL PT Studien (Futtermittel, Lebensmittel)



Vielen Dank für Ihre freundliche Aufmerksamkeit !

Fragen, Feedback ?

