Recherche contractuelle
Contractueel Onderzoek

Rapport annuel
Jaarverslag

2016

.be

INHOUDSTAFEL

Voorwoord **2**

Activiteiten 5

De selectieprocedure 6
Internationale netwerken 11
Studiedagen 11
Structuur en organisatie 11

Projecten geselecteerd in 2016 13

Dierengezondheidsbeleid 15
Plantengezondheidsbeleid 21
Voedselveiligheid 29

Projecten beëindigd in 2016 39

Dierengezondheidsbeleid 43
Plantengezondheidsbeleid 65
Voedselveiligheid 89

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos **2**

Activités 5

Procédure de sélection 6
Réseaux internationaux 11
Journées d'étude 11
Structure et organisation 11

Projets sélectionnés en 2016 13

Politique sanitaire des animaux 15
Politique sanitaire des végétaux 21
Sécurité des aliments 29

Projets finalisés en 2016 39

Politique sanitaire des animaux 43
Politique sanitaire des végétaux 65
Sécurité des aliments 89

Voorwoord

De cel Contractueel Onderzoek kent elk jaar toelagen toe aan wetenschappelijk onderzoek inzake voedselveiligheid en gezondheidsbeleid van dieren en planten, en investeert aldus in de toekomst van de consument, de landbouw, en de Belgische onderzoekswereld. Elk van de betoelaagde projecten levert bovendien resultaten op die het beleid ondersteunen.

Er bestaat sinds 2009 evenwel een belangrijke daling in het budget. In 2015 verscherpte deze daling zich nog: niet alleen werd ingevolge de 6e staatshervorming in het kader van de overdracht van de bevoegdheid dierenwelzijn een belangrijk bedrag overgeheveld naar de Gewesten, ook werd het resterende budget met 20 % verminderd. Sindsdien wordt het budget verder ingekrompen met 2 % per jaar. In harde cijfers: in 2014 bedroeg het budget nog € 5.563.000, in 2016 slechts € 3.791.000.

We blijven vragende partij voor een normalisatie van het budget binnen afzienbare termijn.

Ondanks de budgettaire beperkingen werd beslist om in 2016 opnieuw zowel thematische (RT), vrije (RF) als transnationale (RI) projecten te betoelagen, gezien de specifieke verdiensten van elk betoelagingskanaal. De thematische onderzoeksprogramma's worden top-down bepaald door de overheid en komen tegemoet aan duidelijk gespecifieerde noden binnen het voedselveiligheidsbeleid en het gezondheidsbeleid van dieren en planten. Het vrije kanaal laat de onderzoekers toe om vanuit de "state of the art" nuttige onderzoeks-onderwerpen onder de aandacht van de overheid te brengen. De transnationale projecten bieden de onderzoekers een forum om over de grenzen heen synergiën te creëren, waardoor met een relatief beperkt

Avant-propos

Chaque année, la cellule Recherche contractuelle octroie des subsides à la recherche scientifique en matière de sécurité des aliments et de politique sanitaire des animaux et végétaux, et investit de la sorte dans l'avenir du consommateur, de l'agriculture et du secteur belge de la recherche. Chaque projet subsidié livre en outre des résultats qui viennent appuyer la politique.

Depuis 2009 toutefois, le budget est en forte diminution. Cette tendance à la baisse s'est encore accentuée en 2015 : non seulement, en vertu de la 6ème réforme de l'État, un montant important a été transféré aux Régions dans le cadre du transfert de la compétence relative au bien-être animal, mais le budget restant a en outre été réduit de 20%. Depuis lors, le budget continue de diminuer à raison de 2% par an. En chiffres absolus : le budget s'élevait encore à € 5.563.000 en 2014, il n'était plus que de € 3.791.000 en 2016.

Nous restons demandeurs d'une normalisation du budget dans un futur proche.

En dépit des contraintes budgétaires, il a de nouveau été décidé en 2016 de subsidier à la fois des projets thématiques (RT), des projets libres (RF) et des projets transnationaux (RI), compte tenu des mérites spécifiques de chaque canal de subventionnement. Les programmes de recherche thématiques sont définis top-down par l'autorité et rencontrent des besoins clairement identifiés en matière de politique de sécurité des aliments et de politique sanitaire des animaux et végétaux. Le canal libre permet aux chercheurs, au départ de la technique de pointe, d'attirer l'attention de l'autorité sur des sujets de recherche utiles. Les projets transnationaux offrent aux chercheurs un forum pour la création de synergies par-delà les frontières, ce qui permet avec un budget national

nationaal budget belangrijke expertise kan worden opgebouwd, onderzoek op topniveau kan worden uitgevoerd, en een grote hoeveelheid gegevens kan worden gegenereerd.

In het kader van de budgettaire behoedzaamheid wordt inzetten op synergiën steeds belangrijker. Met het RI-kanaal biedt Contractueel Onderzoek sinds 2014 reeds enige mogelijkheden in dit opzicht, maar er bestaan nog andere opties tot samenwerking die verder onderzocht moeten worden, zowel binnen de FOD Volksgezondheid als daarbuiten. Hierbij moet naast een potentiële combinatie van budgetten ook een meer doorgedreven coördinatie van het betoelaagde onderzoek met een betere toegankelijkheid van gegevens een belangrijke rol spelen.

Ongetwijfeld zal de "redesign" van de gezondheidsadministraties, die recent werd opgestart, interessante mogelijkheden bieden. We kijken uit naar wat de toekomst biedt.

relativement limité d'acquérir une expertise importante, d'accomplir des recherches au top-niveau et de générer une grande quantité de données.

Dans le cadre de la prudence budgétaire, la mise en place de synergies ne cesse de gagner en importance. Par le biais du canal RI, la Recherche contractuelle offre depuis 2014 quelques possibilités dans cette optique, mais d'autres options de collaboration existent, tant au sein du SPF Santé publique qu'en-dehors, qu'il faut étudier plus en détail. À cet égard, outre une combinaison potentielle de budgets, une coordination plus approfondie de la recherche subsidiée avec une meilleure accessibilité des données a un rôle important à jouer.

Il ne fait aucun doute que le « redesign » des administrations en charge de la santé, entamé récemment, présentera des possibilités intéressantes. Nous sommes impatients de découvrir ce que l'avenir nous réserve.

Marc DE WIN
Diensthoofd a.i. Contractueel Onderzoek
Chef de service a.i. Recherche contractuelle

Dominique VANDEKERCHOVE
Celhoofd Contractueel Onderzoek
Chef de cellule Recherche contractuelle

Activités
Activiteiten

SELECTIEPROCEDURE

Thematische projecten (RT)

Ingevolge het beperkte budget werden voor de oproep 2016 slechts zes onderzoeksthema's gedefinieerd, dit met het oog op een voldoende grote resterende enveloppe voor de vrije projecten.

De zes thema's worden in de onderstaande tabel weergegeven, samen met het aantal ingediende voorstellen per thema.

PROCÉDURE DE SÉLECTION

Projets thématiques (RT)

En raison du budget limité, seuls six thèmes de recherche ont été définis pour l'appel 2016, afin de conserver une enveloppe suffisamment large pour les projets libres.

Le tableau suivant reprend ces six thèmes ainsi que le nombre de propositions introduites par thème.

	Onderzoeksthema - Thème de recherche	**Aantal - Nombre**
DIERENGEZONDHEID - SANTÉ ANIMALE		
1	VTEFFECT Doeltreffendheid en kostenefficiëntie van vaccinatie van runderen tegen VTEC O157 met commerciële vaccins onder Belgische omstandigheden Efficacité et rapport coût/efficacité de la vaccination des bovins contre VTEC 0157 à l'aide de vaccins commerciaux dans des conditions belges	1
PLANTENGEZONDHEID - SANTÉ VÉGÉTALE		
2	ANOPLOPH Alternatieve bestrijdingsmethodes voor *Anoplophora glabripennis* en *Anoplophora chinensis* Méthodes alternatives de lutte contre *Anoplophora glabripennis* et *Anoplophora chinensis*	1
3	GAPHANNEX Onderzoek ter opheldering van kennislacunes met betrekking tot de quarantaineorganismen *Diaporthe vaccinii*, *Ditylenchus destructor*, *Eotetranychus lewisi* en *Candidatus* Phytoplasma ulmi Étude visant à combler les lacunes au niveau des connaissances en ce qui concerne les organismes de quarantaine *Diaporthe vaccinii, Ditylenchus destructor, Eotetranychus lewisi* et *Candidatus* Phytoplasma ulmi	1
VOEDSELVEILIGHEID - SÉCURITÉ DES ALIMENTS		
4	INNIBEL Innameschatting van nikkel via voeding voor de Belgische bevolking en onderzoek naar bronnen van nikkelcontaminatie Estimation de l'ingestion et étude des sources de contamination de nickel pour la population belge via l'alimentation	3
5	ANAPLANTOX Ontwikkeling van een multitargetmethode ter analyse van plantentoxines in voedingssupplementen Élaboration d'une méthode "multitarget" pour l'analyse des toxines végétales dans les compléments alimentaires	2
6	METAGECO Karakterisering van microbiële ecosystemen via metagenoomanalyse met het oog op de monitoring van hygiëne en voedselveiligheid in grootkeukens Caractérisation des écosystèmes microbiens par le biais d'une analyse métagénomique en vue du contrôle de l'hygiène et de la sécurité des aliments dans les cuisines de collectivité	3

De uiterste datum voor het indienen van de RT-intentieverklaringen was 11 september 2015. In totaal werden er 11 RT-intentieverklaringen ingediend.

Tijdens de eerste fase van de evaluatieprocedure werden de RT-intentieverklaringen onderworpen aan een relevantieanalyse en een wetenschappelijke analyse.

De relevantie-analyse werd uitgevoerd door de vertegenwoordigers binnen het Beoordelingscomité van DG Dier, Plant en Voeding (DG4) en van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV). Dit gebeurde op basis van vijf criteria: de mate waarin het voorstel beantwoordt aan de vereisten geformuleerd in het thema, de waarde en bruikbaarheid van de verwachte resultaten, de oplossings-gerichtheid van het onderzoek, de meerwaarde ten opzichte van lopend of bestaand onderzoek, en de potentiële bijdrage aan beleidsbeslissingen.

De wetenschappelijke analyse werd uitgevoerd door de deskundigen binnen het Beoordelingscomité van de *Vlaamse Inter-universitaire Raad* (VLIR) en de *Académie de Recherche et d'Enseignement supérieur* (ARES), en door de wetenschappelijk adviseurs. Hiertoe werden de intentie-verklaringen getoetst aan vier criteria: het wetenschappelijk niveau, de methodologie, de originaliteit en de haalbaarheid.

De RT-intentieverklaringen werden geklasseerd per thema, waarbij het klassement gebaseerd was op de gecombineerde relevantie- en wetenschappelijke score.

Op basis van het klassement werden in totaal 10 RT-intentieverklaringen als prioritair onderzoeksvoorstel doorverwezen naar de tweede fase, waarbij minstens één voorstel per thema weerhouden bleef.

In de tweede fase werden deze project-voorstellen onder een meer uitgewerkte vorm voorgelegd aan een extern College van deskundigen. Per thema brachten de deskundigen een geargumenteerd advies uit over de ingediende RT-voorstellen. Hierop baseerde het Beoordelingscomité zijn advies aan de Minister. Finaal heeft de Minister 6 RT-projecten goedgekeurd voor betoelaging op het vastleggingskrediet 2016, voor een totaal bedrag van € 1.480.000. Dit betekent een slaagkans van gemiddeld 69,44% per thema, en over het geheel genomen een slaagkans binnen het RT-kanaal van 54,55%.

Vrije projecten (RF)

Ook voor de vrije projecten was de uiterste datum voor het indienen van de voorstellen 11 september 2015. Zevenenveertig (47) onderzoeksvoor-

La date limite d'introduction des déclarations d'intention RT était le 11 septembre 2015. Au total, 11 déclarations d'intention RT ont été introduites.

Au cours de la première phase de la procédure d'évaluation, les déclarations d'intention RT ont été soumises à une analyse de pertinence et à une analyse scientifique.

L'analyse de pertinence a été réalisée par les représentants au sein du Comité d'évaluation de la DG Animaux, Végétaux et Alimentation (DG4) et de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) en fonction de cinq critères : la mesure dans laquelle la proposition répond aux exigences formulées dans le thème, la valeur et l'employabilité des résultats attendus, le caractère orienté «solutions» de la recherche, la valeur ajoutée par rapport à la recherche en cours ou existante et la contribution potentielle à des décisions politiques.

L'analyse scientifique a été réalisée par les experts au sein du Comité d'évaluation du *Vlaamse Interuniversitaire Raad* (VLIR) et de l'*Académie de Recherche et d'Enseignement supérieur* (ARES), ainsi que par les conseillers scientifiques. À cette fin, les déclarations d›intention ont été confrontées à quatre critères : le niveau scientifique, la méthodologie, l'originalité et la faisabilité.

Les déclarations d'intention RT ont été classées par thème, le classement étant basé sur le score combiné de pertinence et scientifique.

Sur la base de ce classement, 10 déclarations d'intention au total ont été retenues au titre de propositions de recherche prioritaires pour un renvoi en deuxième phase, avec au moins une proposition retenue pour chaque thème.

Au cours de la deuxième phase, ces propositions de projets présentées sous une forme plus élaborée ont été soumises à un Collège externe d'experts. Pour chaque thème, les experts ont rendu un avis argumenté sur les propositions RT introduites. Sur cette base, le Comité d'évaluation a rédigé son avis au Ministre. Le ministre a finalement approuvé 6 projets RT pour l'octroi de subsides sur le crédit d'engagement 2016, pour un montant total de € 1.480.000. Il en résulte un taux de réussite de 69,44% en moyenne par thème, et dans l'ensemble un taux de réussite de 54,55% dans le canal RT.

Projets libres (RF)

Pour les projets libres, la date limite d'introduction des propositions était également le 11 septembre 2015. Quarante-sept (47) propositions

stellen werden ingediend onder de vorm van een RF-intentieverklaring, ter ondersteuning van het beleid inzake voedselveiligheid en gezondheidsbeleid dier en plant.

De beoordeling van de ontvankelijkheid werd uitgevoerd door de cel Contractueel Onderzoek en door de vertegenwoordigers binnen het Beoordelingscomité van DG Dier, Plant en Voeding (DG4) enerzijds en het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) anderzijds. De vijf criteria die werden toegepast, zijn de tijdige indiening, de vorm, de betrokken onderzoeksdomeinen, de bevoegdheid van de federale overheid voor de materie van het voorgestelde onderwerp, en de afwezigheid van overlap met één van de thema's vermeld in de RT-oproep.

Eén intentieverklaring werd unaniem als onontvankelijk beschouwd en uitgesloten van verdere evaluatie. Intentieverklaringen waarbij over de ontvankelijkheid geen consensus werd bereikt, bleven behouden in de lijst met verder te evalueren projectvoorstellen.

De verdere beoordeling van de 46 ontvankelijk verklaarde RF-intentieverklaringen gebeurde in twee fasen. Tijdens de eerste fase werden de intentieverklaringen onderworpen aan een relevantieanalyse en een wetenschappelijke analyse.

De relevantie-analyse werd uitgevoerd door de vertegenwoordigers binnen het Beoordelingscomité van DG Dier, Plant en Voeding (DG4) en van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV). Dit gebeurde op basis van twee criteria: de opportuniteit en geschiktheid als beleidsondersteunend onderzoek, en het belang van het voorgestelde onderzoek voor het beleid.

De wetenschappelijke analyse werd uitgevoerd door de deskundigen binnen het Beoordelingscomité van de *Vlaamse Interuniversitaire Raad* (VLIR) en de *Académie de Recherche et d'Enseignement supérieur* (ARES), en door de wetenschappelijk adviseurs. Hiertoe werden de intentieverklaringen getoetst aan vier criteria: het wetenschappelijk niveau, de methodologie, de originaliteit en de haalbaarheid.

Het klassement van de intentieverklaringen is gebaseerd op de gecombineerde relevantie- en wetenschappelijke score. Daarnaast wordt het klassement ook opgemaakt per activiteits-domein, met de bedoeling om per domein tenminste één intentieverklaring te selecteren voor de prioritaire lijst.

de recherche ont été introduites sous forme de déclarations d'intention RF en support à la politique en matière de sécurité des aliments et à la politique sanitaire des animaux et végétaux.

L'évaluation de la recevabilité a été effectuée par la cellule Recherche contractuelle et par les représentants au sein du Comité d'évaluation de la DG Animaux, Végétaux et Alimentation (DG4) d'une part, et de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) d'autre part. Les cinq critères appliqués sont le respect du délai d'introduction, la forme, les domaines de recherche couverts, la compétence de l'autorité fédérale dans la matière du sujet présenté, et la non-redondance vis-à-vis des thèmes figurant dans l'appel spécifique des offres RT.

Un consensus de non-recevabilité existait pour une déclaration d'intention, qui a été exclue de l'évaluation ultérieure. Les déclarations d'intention pour lesquelles un consensus de recevabilité n'était pas atteint, ont été maintenues dans la liste de propositions de projets à évaluer ultérieurement.

L'évaluation des 46 déclarations d'intention RF déclarées recevables a ensuite été réalisée en deux phases. Durant la première phase, les déclarations d'intention ont été soumises à une analyse de pertinence et à une analyse scientifique.

L'analyse de pertinence a été réalisée par les représentants au sein du Comité d'évaluation de la DG Animaux, Végétaux et Alimentation (DG4) et de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) en fonction de deux critères : l'opportunité et l'adéquation de la recherche en termes de soutien à la politique, et l'intérêt de la recherche proposée pour la politique.

L'analyse scientifique a été réalisée par les experts au sein du Comité d'évaluation du *Vlaamse Interuniversitaire Raad* (VLIR) et de l'*Académie de recherche et d'enseignement supérieur* (ARES), ainsi que par les conseillers scientifiques. Pour ce faire, les déclarations d'intention ont été confrontées à quatre critères : le niveau scientifique, la méthodologie, l'originalité et la faisabilité.

Le classement des déclarations d'intention est basé sur le score combiné de pertinence et scientifique. Le classement est en outre également établi par domaine d'activité, dans le but de sélectionner par domaine au moins une déclaration d'intention pour la liste prioritaire.

Op basis van het klassement werden zeven intentieverklaringen als prioritair onderzoeksvoorstel en drie intentieverklaringen als reservevoorstel doorverwezen naar de tweede fase.

In de tweede fase werden deze projectvoorstellen onder een meer uitgewerkte vorm voorgelegd aan een extern College van deskundigen. Op basis van de rapporten van de Colleges bracht het Beoordelingscomité vervolgens een advies uit aan de Minister, die rekening houdend met dit advies tenslotte de zeven prioritaire projecten heeft goedgekeurd voor betoelaging. Uitgaande van 46 ontvankelijke projectvoorstellen vertegenwoordigt dit een slaagkans van 15,22% binnen het RF-kanaal.

Er werd in 2016 aan de RF-projecten aldus een totaal bedrag aan toelagen toegekend van € 1.519.000.

Transnationale projecten (RI)

De mogelijkheid om het Belgische luik van transnationale projecten te betoelagen, zoals gecreëerd door het KB van 21 december 2013[1], werd in 2016 reeds voor de derde keer in praktijk gebracht door deelname aan de tweede joint call van Euphresco (European phytosanitary research coordination). Hiervoor was een enveloppe van € 275.000 gereserveerd, dit op het vastleggingskrediet 2017 wegens de laattijdige afsluiting in het kalenderjaar van de selectieprocedure.

Euphresco begon in 2006 als een ERA-Net binnen het 6e kaderprogramma voor onderzoek en technologische ontwikkeling (FP6), dat vanaf 2010 onder FP7 werd verdergezet als Euphresco II. In april 2014 werd Euphresco een duurzaam, zelfbedruipend netwerk. Het netwerksecretariaat werd gehuisvest bij EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). In september 2016 besliste de EPPO-Raad om, vanaf 1 januari 2017, Euphresco officieel te integreren in de EPPO werking. Dit heeft belangrijke implicaties voor de verbreding van het netwerk: alle EPPO leden zullen vanaf dat ogenblik lid worden van Euphresco. Er werd daarnaast beslist dat 2% van de jaarlijkse EPPO bijdragen zullen worden geoormerkt voor de ondersteuning van het Euphresco secretariaat. Niet-NPPO (National Plant Protection Organization)-leden zullen het netwerk blijven financieren via aparte bijdragen. In 2016 bestond het netwerk uit 32 partners van 25 landen; in 2017 zal dit uitgebreid worden naar (minimum) 69 partners uit 55 landen.

1 Nu vervangen door het KB van 18 november 2015

Sur la base de ce classement, sept déclarations d'intention ont été retenues au titre de propositions de recherche prioritaires pour un renvoi en deuxième phase ainsi que trois déclarations d'intention au titre de projets de réserve.

Au cours de la deuxième phase, ces propositions de projets présentées sous une forme plus élaborée ont été soumises à un Collège externe d'experts. En se fondant sur les rapports des Collèges, le Comité d'évaluation a ensuite rendu un avis au ministre qui, en tenant compte de cet avis, a finalement approuvé les sept projets prioritaires pour l'octroi d'un subside. En partant de 46 propositions de projets recevables, ceci représente un taux de réussite de 15,22% dans le canal RF.

Un montant total de € 1.519.000 a ainsi été accordé aux projets RF en 2016.

Projets transnationaux (RI)

La possibilité de subsidier le volet belge de projets transnationaux, créée par l'AR du 21 décembre 2013[2], a été utilisée pour la troisième fois déjà en 2016 pour la participation au deuxième «joint call» (appel conjoint) d'Euphresco (European phytosanitary research coordination). Une enveloppe de € 275.000 avait été réservée à cet effet, et ce sur le crédit d'engagement 2017 en raison de la clôture tardive de la procédure de sélection au cours de l'exercice 2016.

Euphresco a démarré en 2006 en tant que réseau ERA-Net du 6ème programme-cadre de recherche et de développement technologique (FP6); à partir de 2010, le réseau a été poursuivi en tant qu'Euphresco II dans le cadre du FP7. En avril 2014, Euphresco est devenu un réseau durable et auto-suffisant. Le secrétariat du réseau est hébergé auprès de l'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). En septembre 2016, le Conseil de l'EPPO a décidé d'intégrer officiellement Euphresco dans le fonctionnement de l'EPPO à partir du 1er janvier 2017. Cette décision a des implications importantes pour l'élargissement du réseau : dès cet instant, tous les membres de l'EPPO deviendront membres d'Euphresco. En outre, il a été décidé que 2% des cotisations annuelles EPPO seraient affectées au soutien du secrétariat Euphresco. Les membres non-NPPO (National Plant Protection Organization) continueront de financer le réseau via des cotisations distinctes. En 2016, le réseau était constitué de 32 partenaires issus de 25 pays; en 2017, il s'élargira à (minimum) 69 partenaires issus de 55 pays.

2 Maintenant remplacé par l'AR du 18 novembre 2015

In 2016 lanceerde Euphresco een tweede joint call onder zijn nieuwe structuur. De leden identificeerden 50 mogelijke onderzoekstopics rond diagnostiek, velddetectie, biologie, karakterisering en epidemiologie van schadelijke organismen, " pest risk assessment", "mapping" en modellering. Uit deze lijst heeft de FOD Volksgezondheid vier voor België prioritaire topics geselecteerd. Contractueel Onderzoek was de transnationale topic Coördinator voor één van deze thema's (Little Cherry Virus).

Op 25 april 2016 lanceerde Contractueel Onderzoek samen met het Euphresco secretariaat de oproep tot het indienen van projectvoorstellen voor de vier topics. Omdat de FOD Volksgezondheid zijn toelagen enkel kan toekennen aan onderzoekers van Belgische onderzoeksinstellingen, konden enkel zij reageren op deze oproep. De uiterste datum voor het indienen van de projectvoorstellen was 31 mei 2016. Er werden in totaal 4 projectvoorstellen ingediend voor 3 topics. Een transnationale evaluatie resulteerde in de toekenning van een toelage aan het EURAVELCH (Little Cherry Virus) en het Be-PSN (Belgian network and activities in the frame of the International Plant Sentinel Network) project. Het onderzoek rond deze thema's gefinancierd door de FOD Volksgezondheid werd aldus ingebed in twee transnationale onderzoeksprojecten. Eén project dat de ontwikkeling van nieuwe diagnostische methoden voor *Synchytrium endobioticum* (wratziekte bij aardappelen) beoogde, is uiteindelijk niet van start gegaan omdat een transnationale partner die beschikte over belangrijke wetenschappelijke achter-grond in deze materie geen subsidies kon vrijmaken.

Projecten geselecteerd voor betoelaging tijdens de cyclus 2015

Wegens het laattijdig afsluiten in het kalenderjaar van de RI-selectieprocedures binnen het Euphresco en het ANIHWA netwerk in 2015, werden de drie projecten die via deze weg werden geselecteerd ingebracht op het vastleggingskrediet 2016. Ook het project RT 15/10 ALLERSENS 1 werd ingeboekt op het budget 2016, dit wegens gebrek aan middelen in 2015.
De betrokken projecten vertegenwoordigen een totale waarde van € 792.000. Ze werden beschreven in het jaarverslag 2015.

En 2016, Euphresco a lancé un deuxième «joint call» sous sa nouvelle structure. Les membres ont identifié 50 thèmes de recherche possibles en matière de diagnostic, de détection sur le terrain, de biologie, de caractérisation et d'épidémiologie d'organismes nuisibles, de «pest risk assessment» (évaluation du risque phytosanitaire), de «mapping» et de modélisation. Sur cette liste, le SPF Santé publique a sélectionné quatre thèmes prioritaires pour la Belgique. La Recherche contractuelle était le coordinateur transnational de l'un de ces thèmes (Little Cherry Virus).

Le 25 avril 2016, la Recherche contractuelle a lancé conjointement avec le secrétariat d'Euphresco l'appel à l'introduction de propositions de projets pour les quatre thèmes. Le SPF Santé publique ne pouvant accorder ses subsides qu'aux chercheurs d'institutions de recherche belges, seules ces dernières étaient habilitées à réagir à cet appel. La date limite d'introduction des propositions de projets était le 31 mai 2016. Au total, quatre propositions de projets ont été introduites pour trois thèmes. Une évaluation transnationale a débouché sur l'octroi d'un subside à EURAVELCH (Little Cherry Virus) et au projet Be-PSN (Belgian network and activities in the frame of the International Plant Sentinel Network). La recherche sur ces thèmes financée par le SPF Santé publique s'est intégrée ainsi dans deux projets transnationaux. L'un des projets, qui visait à développer de nouvelles méthodes diagnostiques pour *Synchytrium endobioticum* (galle verruqueuse dans les pommes de terre), n'a finalement pas débuté parce qu'un partenaire transnational disposant d'un bagage scientifique important dans cette matière n'a pas pu dégager de subsides.

Projets sélectionnés pour l'octroi d'un subside au cours du cycle 2015

En raison de la clôture tardive des procédures de sélection RI dans le cadre d'Euphresco et du réseau ANIHWA lors de l'exercice 2015, les trois projets sélectionnés par ce biais ont été inscrits sur le crédit d'engagement 2016. De même, le projet RT 15/10 ALLERSENS 1 a été inscrit au budget 2016, faute de moyens en 2015.

Les projets en question représentent une valeur totale de € 792.000. Ils ont été décrits dans le rapport annuel 2015.

INTERNATIONALE NETWERKEN

Met het oog op de coördinatie en samenwerking op het gebied van dierengezondheids- en fytosanitair onderzoek nam de cel Contractueel Onderzoek in 2016 deel aan drie internationale netwerken:

- SCAR CWG Animal Health and Welfare (Standing Committee on Agricultural Research Collaborative Working Group), rond dierengezondheid en dierenwelzijn
- STAR-IDAZ (Global Strategic Alliances for the Coordination of Research on the Major Infectious Diseases of Animals and Zoonoses), rond dierengezondheid, dit via het regionale netwerk STAR-IDAZ.be, in samenwerking met de Universiteit van Gent, de universiteit van Luik en het CODA
- Euphresco (European phytosanitary research coordination), rond planten-gezondheid; dit is een verderzetting van de ERA-Net Euphresco activiteiten, nu ingebed in EPPO.

STUDIEDAGEN

Contractueel Onderzoek heeft op 28 januari 2016 in samenwerking met DG Dier, Plant en Voeding van de FOD Volksgezondheid een studienamiddag georganiseerd rond het thema *Campylobacter* bij braadkippen. Een 60tal geïnteresseerden nam hieraan deel.

Daarnaast werd - eveneens in samenwerking met DG Dier, Plant en Voeding - op 27 oktober 2016 voor de negende keer een symposium georganiseerd. Er werden onderzoeksresultaten gepresenteerd betref-fende dierengezondheid, met name projecten in het domein van de bijen, vector-overgedragen ziekten, zoönosen, en nieuwe diagnostische technieken. Ook STAR-IDAZ was vertegenwoordigd, met een presentatie over de transnationale samenwerking in het dierengezondheidsonderzoek. Zo'n 120 mensen namen aan dit symposium deel.

STRUCTUUR EN ORGANISATIE

Met het oog op een verbeterde tegemoetkoming aan de actuele noden van zowel de onderzoekswereld als de administratie, werd in 2012 een herziening van de wettelijke basis van het contractuele onderzoek opgestart. Dit proces werd op 1 maart 2016 afgerond met het MB betreffende de goedkeuring van het huishoudelijk reglement van het Beoordelingscomité voor de toekenning van toelagen voor wetenschappelijk onderzoek inzake voedselveiligheid en sanitair beleid van dieren en planten.

RESEAUX INTERNATIONAUX

En vue d'une meilleure coordination et collaboration dans le domaine de la recherche phytosanitaire et en santé animale, la cellule Recherche contractuelle a participé à trois réseaux internationaux en 2016 :

- SCAR CWG Animal Health and Welfare (Standing Committee on Agricultural Research Collaborative Working Group), dans le domaine de la santé animale et du bien-être animal;
- STAR-IDAZ (Global Strategic Alliances for the Coordination of Research on the Major Infectious Diseases of Animals and Zoonoses), dans le domaine de la santé animale, via le réseau régional STAR-IDAZ.be, en collaboration avec l'Université de Gand, l'Université de Liège et le CERVA;
- Euphresco (European phytosanitary research coordination), dans le domaine phytosanitaire; il s'agit de la poursuite des activités de l'ERA-Net Euphresco, maintenant intégrées dans l'EPPO.

JOURNÉES D'ÉTUDE

Le 28 janvier 2016, la Recherche contractuelle a organisé en collaboration avec la DG Animaux, Végétaux et Alimentation du SPF Santé publique une après-midi d'étude sur le thème de *Campylobacter* dans les poulets de chair. Une soixantaine d'intéressés y ont participé.

Par ailleurs, – également en collaboration avec la DG Animaux, Végétaux et Alimentation –, un symposium a été organisé pour la neuvième fois le 27 octobre 2016. Les résultats d'études en matière de santé animale y ont été présentés, notamment des projets dans le domaine des abeilles, des maladies à transmission vectorielle, des zoonoses, et de nouvelles techniques diagnostiques. STAR-IDAZ y était également représenté, avec une présentation sur la collaboration transnationale dans le domaine de la recherche en santé animale. Quelque 120 personnes ont participé à ce symposium.

STRUCTURE ET ORGANISATION

Afin de mieux répondre aux besoins actuels tant du monde de la recherche que de l'administration, une révision de la base légale de la recherche contractuelle a débuté en 2012. Ce processus s'est achevé le 1er mars 2016 par l'AM relatif à l'approbation du règlement d'ordre intérieur du Comité d'évaluation pour l'octroi de subsides à la recherche scientifique en matière de sécurité des aliments et de politique sanitaire des animaux et végétaux.

Projets sélectionnés en
Projecten geselecteerd in

2016

Project Projet	Titel Titre	Blz. Page
	Dierengezondheidsbeleid **Politique sanitaire des animaux**	
RT 16/1 VTEFFECT 1	Assessment of the effectiveness and cost-effectiveness of the vaccination against STEC O157 of cattle in farms on the excretion of and intestinal colonization by O157 and non-O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in farms and at slaughterhouses and on their incidence in calf diarrhea	16
RF 16/6303 GROUPMEDIPIG	Homogeniteit, stabiliteit en versleping van geneesmiddelen ingemengd in het voeder en drinkwater voor groepsbehandeling van varkens	18
RF 16/6304 EMERDIAH5	Optimalisation du diagnostic virologique et sérologique dans le cadre de la surveillance influenza aviaire en préparation à l'émergence de nouveaux virus HPH5Nx	19
RF 16/6305 EVAFLU	Evolutie, pathobiologische kenmerken en pandemisch potentieel van varkensinfluenzavirussen	20
	Plantengezondheidsbeleid **Politique sanitaire des végétaux**	
RT 16/2 ANOPLOPH 1	Alternatieve bestrijdingsmethodes voor *Anoplophora glabripennis* en *Anoplophora chinensis*	22
RT 16/3 GAPHANNEX 1	Onderzoek ter opheldering van kennislacunes met betrekking tot de quarantaineorganismen *Diaporthe vaccinii*, *Ditylenchus destructor*, *Eotetranychus lewisi* en *Candidatus* Phytoplasma ulmi	24
RI 16/A-198 EURAVELCH	Ontrafelen van het Little cherry ziektecomplex op Europese schaal met als doel de transnationale sterkte op vlak van diagnostiek en ziektebeheersing te verbeteren	26
RI 16/I-224 Be-PSN	Belgisch netwerk en activiteiten in het kader van het Internationale Plant Sentinel Netwerk (Euphresco-IPSN2): BePSN	27
	Voedselveiligheid **Sécurité des aliments**	
RT 16/4 INNIBEL 2	Innameschatting van nikkel via voeding voor de Belgische bevolking en onderzoek naar bronnen van nikkelcontaminatie	30
RT 16/5 ANAPLANTOX 1	Ontwikkeling van een multi-targetmethode ter analyse van plantentoxines in voedingssupplementen	32
RT 16/6 METAGECO 2	Comparaison des performances de l'analyse métagénétique et de la microbiologie classique pour la caractérisation de la microflore des surfaces, des mains et des denrées alimentaires dans différents type de cuisines de collectivité	33
RF 16/6302 AMR-ARRAY	Système de micro-array en phase liquide pour la détection rapide des déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques: développement et valorisation dans une perspective « One Health / Une seule santé »	34
RF 16/6306 nanofood@	Implementatie en validatie van een analytische methodologie om technisch vervaardigde nanomaterialen in voedseladditieven te evalueren	35
RF 16/6307 ViroBee	Wintersterfte bij honingbijen (*Apis Mellifera*): identificatie van gekende en nieuwe honingbijvirussen geassocieerd met zwakke kolonies door middel van state of the art virale metagenoom technieken	36
RF 16/6308 CITRIRISK	Het voorkomen van citrinine in de Belgische voedsel- en voederketen en het risico voor mens en dier	37

Politique sanitaire des animaux
Dierengezondheidsbeleid

© Melissa Schalke - epictura.fr

RT 16/1 VTEFFECT 1

Assessment of the effectiveness and cost-effectiveness of the vaccination against STEC O157 of cattle in farms on the excretion of and intestinal colonization by O157 and non-O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in farms and at slaughterhouses and on their incidence in calf diarrhea

Coördinator:
Prof. Eric Cox (UGent)
Promotoren:
Prof. Jacques Mainil (ULiège)
Prof. Lieven De Zutter (UGent)
Prof. Brecht Devleesschauwer (UGent)

Toelage: € 298.000
Periode: 1/11/2016 - 31/10/2019 (36 maanden)

Doelstellingen van het project

Volgens de definitie en details van het onderzoeksthema VTEFFECT moet het project kunnen evalueren wat het voordeel is van vaccinatie van runderen tegen O157:H7 AE-STEC met twee in het buitenland beschikbare commerciële vaccins, namelijk Econiche™ (Bioniche Life Sciences) en *Escherichia coli* Bacterial Extract (Epitopix). Het Econiche™ vaccin bevat Type 3-gesecreteerde effectorproteïnen (T3SE). Dit zijn proteïnen die tussenkomen bij het ontstaan van de typische « attaching and effacing» (AE) lesies die ontstaan door infectie met AE-STEC. Het tweede vaccin, het *Escherichia coli* Bacterieel Extract (Epitopix) bevat « Outer Membrane Siderophore Receptor and Porins (OM-SRP) » van O157:H7 AE-STEC bevat, die betrokken zijn in opname door de bacteriën van onder andere ijzer. Aangezien T3SE en OM-SRP gedeeld worden tussen O157:H7 en andere AE-STEC moet niet alleen de werkzaamheid van beide vaccins op de carriër status en uitscheiding van O157:H7 nagegaan worden, maar ook op deze van niet-O157 AE-STEC. Echter, vorig jaar werd de distributie van het Econiche™ vaccin gestopt. Er zal daarom een nieuw vaccin uitgetest worden, waarmee in het voorjaar van 2016 door het Roslin Institute in Edinburgh veldstudies werden uitgevoerd, en waarvoor een licentie aanvraag wordt ingediend. Dit vaccin bevat de antigenen EspA, intimin en H7 Flagellin (Roslin Institute Edinburgh), ook aanwezig in Econiche™, en het adjuvans Quil A™ (Brenntag Biosector) (McNeill et al., 2015). Zou dit vaccin toch niet beschikbaar komen gedurende het project, dan zal de focus van het project volledig liggen op het SRP vaccin (Epitopix). Het Epitopix vaccin heeft een voorwaardelijke licentie voor gebruik in de USA bij gezonde runderen van 5 maanden en ouder. De primaire vaccinatie bestaat uit 3 subcutane injecties met respecievelijk 2 tot 4 weken en ten minste 6 weken interval, gevolgd door een jaarlijkse hervaccinatie. Desalniettemin suggereert een recente studie dat een primaire vaccinatie bestaande uit 2 injecties voldoende is om het aantal uitscheidende dieren met 53% te reduceren en « supershedders » met 77.3% terug te dringen (Cull et al. 2012). Een andere studie suggereert echter dat deze dubbele primovaccinatie geen effect heeft op uitscheiding van niet-O157 STEC (Cernicchiarro et al., 2014). Daartegenover staan de resultaten tot hiertoe bekomen met het Roslin vaccin. Dit vaccin induceert antistoffen die kruisreageren met alle geteste niet-O157 STEC, suggererend dat dit vaccin wel een invloed zou kunnen hebben op uitscheiding van niet-O157 STEC. Dit moet echter nog wel bevestigd worden onder praktijkomstandigheden.

Daarom moeten de in dit project geplande veldstudies de volgende vragen beantwoorden:

i) Reduceert vaccinatie de faecale excretie van en de rectale/intestinale kolonisatie door O157:H7 AE-STEC?
ii) Reduceert vaccinatie de faecale excretie van en de rectale/intestinale kolonisatie door niet-O157 AE-STEC?
iii) Vermindert vaccinatie de prevalentie van AE-STEC bij kalveren met diarree?
iv) Zijn twee en drie vaccinaties met het SRP en het Roslin vaccin even efficiënt?
v) Wat is de reductie in karkascontaminatie door vaccinatie?
vi) Wat zijn de kosten/baten van vaccinatie voor de rundveehouder en voor de samenleving?

RF 16/6303 GROUPMEDIPIG

Homogeniteit, stabiliteit en versleping van geneesmiddelen ingemengd in het voeder en drinkwater voor groepsbehandeling van varkens

Coördinator:
Prof. Siska Croubels (UGent)
Promotoren:
Prof. Patrick De Backer (UGent)
Prof. Mia Eeckhout (UGent)
Dr. Els Daeseleire (ILVO)
Prof. Jeroen Dewulf (UGent)
Dhr. Erik Hoeven (BEMEFA)
Dhr. Yvan Dejaegher (BEMEFA)

Toelage: € 151.000
Periode: 1/1/2017 - 31/12/2019 (36 maanden)

Doelstellingen van het project

Dit project zal antwoord bieden op volgende vragen:

1. Hoe homogeen zijn gemedicineerde voormengsels vooraleer ingemengd te worden en hoe homogeen zijn gemedicineerde diervoeders na inmenging door de mengvoederfabrikant in de mengvoederfabriek of via het fijndoseersysteem op het varkensbedrijf, en hoe homogeen en stabiel blijven deze voeders in de tijd (m.a.w. treedt er ontmenging op gedurende transport, in de silo op het bedrijf en gedurende transport binnen het bedrijf)?
2. Hoe homogeen zijn geneesmiddelen in farmaceutische formulaties bestemd voor inmenging in voeder vooraleer ingemengd te worden en hoe homogeen zijn diervoeders na inmenging van deze geneesmiddelen door de varkenshouder via een doseerder op de voederlijn, en hoe homogeen en stabiel blijven ze tot op het moment van inname?
3. Hoe homogeen zijn geneesmiddelen in farmaceutische formulaties bestemd voor inmenging in drinkwater vooraleer ingemengd te worden en hoe homogeen zijn deze geneesmiddelen na inmenging door de varkenshouder via een drinkwatertank of doseerder op de waterlijn, en hoe homogeen en stabiel blijven ze tot op het moment van inname?
4. In welke mate treedt er versleping op in het varkensbedrijf na toediening van diergeneesmiddelen in diervoeders en drinkwater?
5. Welke zijn de kritische factoren uit de ganse keten, van productie tot inname van voeders en drinkwaters met toegevoegde geneesmiddelen, om een optimale afgifte van het geneesmiddel bij het varken te garanderen en om de versleping te beheersen?

RF 16/6304 EMERDIAH5

Optimalisation du diagnostic virologique et sérologique dans le cadre de la surveillance influenza aviaire en préparation à l'émergence de nouveaux virus HPH5Nx

Coordinateur :
Dr. Bénédicte Lambrecht (CODA-CERVA)
Promoteurs :
Dr. Mieke Steensels (CODA-CERVA)
Dr. Sylvie Marché (CODA-CERVA)

Subside : € 111.000
Période : 1/1/2017 - 31/12/2017 (12 mois)

Objectifs du projet

Depuis 2004, plusieurs virus influenza aviaire hautement pathogène (HPAI) de sous-type H5 ont acquis la capacité d'infecter et de circuler dans la faune sauvage. Considérant le risque d'introduction, de circulation et les capacités de réassortiment de ces virus HPAI H5 (cf. §2.5), il est important d'avoir des outils de détection et d'identification rapides. Pour l'instant, le test de diagnostic moléculaire est un test de Real RT-PCR (RRT-PCR), spécifique de l'ARN viral de la matrice (M), permettant la détection rapide de tous les virus influenza A. Ensuite, afin de détecter les virus influenza aviaire notifiables (NAI), la présence des virus H5 et H7 est testée par un 2ème test de RRT-PCR spécifique de ces sous-types. Finalement, le sous-typage de la neuraminidase (NA: N1 à N9) et le pathotypage de l'hémagglutinine (HA); i.e. pour distinguer les virus influenza aviaire faiblement pathogène (LPAI) des HPAI, sont faits par le test d'inhibition de l'hémagglutination (HI) et/ou par séquençage. Ce sous-typage exige l'isolement du virus Influenza Aviaire (AI) impliquant un délai de 3 jours à 2 semaines. Afin de réduire le temps nécessaire pour ces identifications plus spécifiques, il faudrait pouvoir utiliser un test permettant l'identification du sous-type et du pathotype directement dans les échantillons de terrain. Nous proposons l'utilisation de la technique 'Multiplex-Luminex Reaction' (MLR). Nous établirons si la technique MLR présente une sensibilité suffisante pour être réalisée directement sur des matériels de terrain (organes et swabs), comme indiqué dans la littérature [1], permettant une identification rapide sans devoir isoler la souche virale.
Afin de mettre en évidence la circulation des virus HP H5 dans la population de la volaille et parmi les oiseaux sauvages, le test de sérologie utilisé est le test de HI (test de référence) mais ce test ne permet pas de détecter tous les sous-types de virus H5 en un seul essai. L'utilisation d'ELISA commerciaux reconnaissant les anticorps anti-H5 (ELISA-H5), pourraient permettre de détecter la circulation d'un plus grand nombre de virus H5 en un seul test et fournir un outil de diagnostic plus facile à utiliser et plus performant.

RF 16/6305 EVAFLU

Evolutie, pathobiologische kenmerken en pandemisch potentieel van varkensinfluenzavirussen

Coördinator:
Prof. Kristien Van Reeth (UGent)

Toelage: € 199.000
Periode: 1/3/2017 - 28/2/2019 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

De belangrijkste onderzoeksvragen en doelstellingen zijn:

- Een goed beeld verkrijgen van de meest voorkomende influenzavirus subtypen en genotypen bij varkens in Vlaanderen; vergelijken van de situatie met deze in andere Europese landen, de VS en Azië
- Vergelijken van de huidige varkensinfluenzavirussen met deze uit het verleden, en met de influenzavirussen van de mens
- Tijdig opsporen van "nieuwe" varkensinfluenzavirussen met mogelijk verhoogd risico voor varken en/of mens
- Beschikken over varkensinfluenzavirus stammen voor toegepast en fundamenteel onderzoek
- Heeft de versnelde evolutie van varkensinfluenzavirussen gevolgen voor de pathogenese en virulentie bij de natuurlijke gastheer?
- In welke mate hebben mensen van verschillende leeftijden kruisreagerende beschermende antistoffen tegenover verschillende H1 varkensinfluenzavirussen?
- Welke zijn de verschillen in de pathogenese van influenzavirussen bij het varken, de fret en de mens?
- Kan het fret transmissie model worden verbeterd zodanig dat het betrouwbare aanwijzigen geeft voor de transmissie van varkensinfluenzavirussen in de menselijke populatie?
- Betere inzichten in mogelijke determinanten (bvb. bepaalde aminozuur sekwenties in het HA of bepaald soort reassortanten) van influenza virus adaptatie aan het varken en de mens
- Een betere analyse van het zoönotische en pandemisch risico van verschillende soorten varkensinfluenzavirussen

Politique sanitaire des végétaux
Plantengezondheidsbeleid

© Oleg Doroshin - 123rf.com

RT 16/2 ANOPLOPH 1

Alternatieve bestrijdingsmethodes voor *Anoplophora glabripennis* en *Anoplophora chinensis*

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotor:
Dhr. Bruno Gobin (Proefcentrum voor Sierteelt)

Toelage: € 199.000
Periode: 1/1/2017 - 31/12/2018 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

Het hoofddoel van dit onderzoek is een antwoord geven op volgende algemene onderzoeksvraag: *"Wat zijn de meest geschikte beheersingsmaatregel(en) voor* Anoplophora glabripennis *(ALB) of* Anoplophora chinensis *(CLB) in België, rekening houdend met de verschillende mogelijke uitbraakscenario's?"*
Om deze vraag te beantwoorden, zal ons onderzoek opgesplitst worden in vier deelvragen. Deze zullen samen de vereiste gegevens genereren voor het formuleren van bruikbare richtlijnen evenals beslissingsschema's waarop de overheid onmiddellijk beroep kan doen bij een uitbraak. De bekomen gegevens zullen eveneens als input dienen bij de ontwikkeling van een op te stellen geïnformatiseerd spatiaal simulatiewerktuig (hierna kortweg simulatiewerktuig genoemd) waarop in eerste instantie de overheid, en in tweede instantie de sector, beroep kunnen doen na vaststelling van een infectiehaard of ter preventie van toekomstige uitbraken:

- *Welke methodes kunnen volgens de literatuur, onderzoekers en experten gehanteerd worden ter beheersing van ALB en/of CLB*?
  Hierbij wordt de nadruk gelegd op:
  - preventieve beheersingsmaatregelen: monitoring en detectie ((attractant) vallen, snuffelhonden, bankerplanten, survey technieken,...), in kaart brengen van risicoplaatsen (zie verder), opleiding van mensen die in contact komen met mogelijke insleep op risicoplaatsen, enz.
  - curatieve beheersingsmaatregelen: chemische bestrijding, biologische bestrijding, rooien, netten, perimeter rond haard waar de maatregel toegepast moet worden, enz.

- *Hoe succesvol zijn de geïdentificeerde maatregelen tegen ALB en/of CLB?*
  Hierbij wordt de slaagkans en/of bestrijdingsgraad van de beheersmaatregel beschreven a.d.h.v. relevante parameters en in overleg met ervaringsdeskundigen en de betrokken sectoren.

- *Wat is de kostprijs voor het toepassen van elke maatregel?*
  Voor elke maatregel wordt een raming van de kostprijs berekend; rekening houdend met de slaagkans en/of bestrijdingsgraad van elke methode

- *Welke risicoplaatsen bestaan er in België m.b.t. de insleep van ALB of CLB en hoe groot is het risico op insleep voor elke locatie?*
  Het in kaart brengen van de verschillende risicoplaatsen (boomkwekerijen, havens, opslag en transportplaatsen van dood hout uit risicogebieden) dient als referentiekader waarbinnen een mogelijke beheersingsactie in de toekomst zal moeten uitgevoerd worden, en bijgevolg als referentiekader waarbinnen ons simulatiewerktuig zal ontwikkeld worden.

RT 16/3 GAPHANNEX 1

Onderzoek ter opheldering van kennislacunes met betrekking tot de quarantaineorganismen *Diaporthe vaccinii, Ditylenchus destructor, Eotetranychus lewisi* en *Candidatus* Phytoplasma ulmi

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotoren:
Prof. Dany Bylemans (pcfruit vzw)
Dr. Bernard Watillon (CRA-W)

Toelage: € 298.000
Periode: 1/1/2017 - 31/12/2018 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

De onderzoeksvragen voor het project zijn de volgende:

Diaporthe vaccinii
- Is *D. vaccinii* aanwezig in de fruitteelt of in de wilde waardplanten in België (fytosanitaire status)?
  - Ontwikkeling moleculaire diagnostiek (specifieke qPCR)
  - Survey in de fruitteelt (*Vaccinium* soorten)
  - Survey in de wilde waardplanten (*Vaccinium* soorten)
  - Toepassing diagnostiek op stalen verzameld tijdens survey
- Welke potentiële impact kan aanwezigheid in wilde waardplanten hebben op de teelt van kleinfruit (bosbessen)?
  - Studie rond mogelijkheid tot verspreiding van de schimmel tussen wilde waardplanten en gekweekte *Vaccinium* soorten.
- Welke beheersmaatregelen kunnen het gevaar inperken?
  - Onderzoek naar de gevoeligheid van courante blauwe bes variëteiten.
  - Efficiëntie van gewasbeschermingsmiddelen in de beheersing van *D. vaccinii* op blauwe bes.

Ditylenchus destructor
- Wat is het spectrum van waardplanten van belang voor insleep en overleving in België?
  - Desktopstudie naar gekende waardplanten en onderzoek naar importcijfers (hoeveelheid en oorsprong).
  - Aanvullen hiaten waardplantenreeks met voor België belangrijke gewassen of variëteiten.
- Hoe lang overleeft *D. destructor* in grond in afwezigheid van waardplanten?
  - Overlevingsproeven in functie van tijd en klimatologische omstandigheden.
- Welke maatregelen voor grond kunnen uitgewerkt worden als deel van beheersingsmaatregelen voor dit organisme?
  - Onderzoek naar bestaande behandelingswijzen en hun impact op *D. destructor.*

Eotetranychus lewisi

- Is *E. lewisi* aanwezig in België?
    - Survey in sierteelt- en fruitteeltsector.
    - Bij aanwezigheid worden gegevens verzameld over de levenscyclus en potentiële natuurlijke vijanden.

Candidatus Phytoplasma ulmi

- Is *Candidatus* Phytoplasma ulmi aanwezig in België?
    - Survey
    - Bij aanwezigheid worden gegevens verzameld over de aanwezigheid van (potentiële) vectoren.

RI 16/A-198 EURAVELCH

Ontrafelen van het Little cherry ziektecomplex op Europese schaal met als doel de transnationale sterkte op vlak van diagnostiek en ziektebeheersing te verbeteren

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotor:
Prof. Sébastien Massart (ULiège)

Toelage: € 75.000
Periode: 1/11/2017 - 31/10/2019 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

Toetreden tot een transnationaal netwerk van partners die werken rond de Little cherry ziekte:

- Informatie vergaren over de distributie in de EU ter actualisering van de distributiekaart voor beide virussen.
- Netwerken en stroomlijnen van het onderzoek tussen de labo's om de output te maximaliseren met een rationeel gebruik van middelen.
- Reflecterende over de gevolgen voor de toekomstige EU quarantainewetgeving.

Een beter inzicht verwerven in de pathogenese van de waardplanten met Little cherry ziektesymptomen door middel van "high throughput sequencing", ook "Next Generation Sequencing" – NGS genoemd (ontrafelen van het Little cherry ziektecomplex):

- Een breder zicht krijgen op de pathogenese in zoete en zure kersen en sier Prunus spp., en inzicht verwerven in de epidemiologie van het pathogeen naargelang de waardplant of geografische verschillen.
- Het verhogen van de kennis over de aanwezigheid van virussen en andere pathogenen die mogelijk een invloed op het ziektecomplex hebben. Dit zal de optimalisatie van de bestaande specifieke LChV1 & 2 diagnostische testen en hun rationele keuze stroomlijnen. Verder is het mogelijk dat nieuwe virussen (of phytoplasmas) worden geïdentificeerd die een rol spelen in het ziektecomplex. Dit zal zeker een significante verbreding van de bestaande kennis betekenen, met name voor het grote aantal monsters dat typische Little cherry virussymptomen ontwikkelt maar negatief test voor beide virussen.

RI 16/I-224 Be-PSN

Be-PSN Belgisch netwerk en activiteiten in het kader van het Internationale Plant Sentinel Netwerk (Euphresco-IPSN2): BePSN

Coördinator:
Mevr. Anne Ronse (Agentschap Plantentuin Meise)
Promotoren:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Dr. Anne Chandelier (CRA-W)

Toelage: € 75.000
Periode: 16/4/2017 - 15/4/2019 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

Botanische tuinen en arboreta (BG&A) beschikken over uitstekende wetenschappelijke collecties van een grote verscheidenheid aan planten die vaak buiten hun natuurlijk geografisch bereik groeien. Deze kunnen worden gebruikt als sentinelplanten voor vroegtijdige opsporing van zowel opkomende als potentieel invasieve plagen. In dit kader werd het International Plant Sentinel Network (IPSN1) gelanceerd door EUPHRESCO (EUropean PHytosanitary RESearch COordination), een internationaal duurzaam netwerk van organisaties die onderzoeksprojecten financieren en nationale fytosanitaire onderzoeksprogramma's coördineren. IPSN1 ontwikkelde een transnationaal netwerk bestaande uit BG&A, diagnoselaboratoria en Nationale Plantenbeschermingsorganisaties (NPPO), om samen een "early warning" systeem voor nieuwe en opkomende plantenziekten en-plagen te ontwikkelen. Het was gericht op de ontwikkeling van tools en vond plaats in een beperkt aantal landen.
Met het huidige project willen we een gelijkaardig Belgisch netwerk opzetten, gericht op de ondersteuning van het nationale plantengezondheidsbeleid door vroegtijdige waarschuwing voor nieuwe bedreigingen, en ondertussen mee instappen in het nieuwe transnationale IPSN2-initiatief.
Er werden Belgische prioriteiten aangeduid rond vier thema's belangrijk voor de nationale ecosystemen, bomen en gewassen, en die aansluiten bij het Euphresco/IPSN2-programma en de doelstellingen van het BePSN. Vier casussen werden geselecteerd voor het ontwikkelen, testen en valideren van de werking en performantie van het Belgisch netwerk. Deze zijn:
1. opkomende *Thaumetopoea pityocampa* in coniferen
2. *Sirococcus tsugae* in ceders (*Cedrus* spp.)
3. een gezondheidssurvey op eiken (*Quercus* spp.)
4. aanwezigheid van fytoplasmen en wortelknobbelnematoden in bomen.

Het BePSN zal een lokaal plan ontwikkelen voor een toekomstig duurzaam en zelfvoorzienend netwerk dat kan uitgroeien tot een mondiaal netwerk. Het zal bovendien deelnemen aan de validatie van online rapporteringsapplicaties en datamining in ontwikkeling binnen het IPSN.

Sécurité des aliments
Voedselveiligheid

© Larisa Lofitskaya - fotolia.fr

RT 16/4 INNIBEL 2

Innameschatting van nikkel via voeding voor de Belgische bevolking en onderzoek naar bronnen van nikkelcontaminatie

Coördinator:
Prof. Gijs Du Laing (UGent)
Promotoren:
Prof. Bruno De Meulenaer (UGent)
Prof. Anita Van Landschoot (UGent)
Prof. Peter Ragaert (UGent)

Toelage: € 189.000
Periode: 1/3/2017 - 28/2/2019 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

De algemene onderzoeksvraag stelt in welke mate levensmiddelen aanwezig op de Belgische markt aanleiding geven tot blootstelling aan nikkel via de verschillende (gekende) contaminatieroutes en zodoende een potentieel (chronisch en acuut) risico naar volksgezondheid vormen, rekening houdend met subgroepen in de Belgische populatie.

Specifieke onderzoeksvragen zijn:

a) In welke mate (prevalentie en concentratie) zijn levensmiddelen aanwezig op de Belgische markt gecontamineerd met nikkel?
b) Welke levensmiddelen kennen een hogere graad van contaminatie en hoe werden deze mogelijks gecontamineerd?
c) Welke variabiliteit is er aanwezig op de gemeten contaminatie binnen eenzelfde groep levensmiddelen?
d) Hoe beschikbaar/biotoegankelijk is het nikkel dat aanwezig is in deze levensmiddelen?
e) Welke factoren spelen een determinerende rol bij de contaminatie van bier tijdens de productie (o.a. nieuwe versus oude installaties, temperatuur/tijd van verblijf in tanks/vaten, zuurtegraad wort/bier, hulpstoffen, etc.) om onverklaarbare hoge concentraties teruggevonden in de EFSA (2015) studie te kunnen verklaren?
f) Welke determinerende factoren spelen een rol bij de migratie vanuit voedselcontactmaterialen gebruikt in de voedingsindustrie (verschillende types roestvrij staal, primair verpakkingsmateriaal, ouderdom, voedingssimulantia en procesindicatoren zoals tijd/temperatuur, pH en ionensterkte, aanwezigheid van liganden die Ni kunnen complexeren)?
g) Welke determinerende factoren spelen een rol bij de migratie vanuit huishoudmaterialen (zoals kookpotten, thermosflessen)?
h) In welke mate worden de Belgische bevolking en subpopulaties blootgesteld (chronisch en acuut) aan nikkel vanuit de Belgische levensmiddelen (rekening houdend met verschillende consumptiepatronen voor kinderen, jongeren, volwassenen, ouderen, vegetariërs en de nieuwe Belgische consumptiedata 2014 en rekening houdend met de biotoegankelijkheid van Ni in levensmiddelen)?
i) Is er een te verwachten toxicologisch effect door deze blootstelling voor de gewone bevolking alsook voor nikkel-gevoelige groepen?

j) Wat is de impact op de blootstelling van het stellen van additionele specifieke migratielimieten voor voedselcontactmaterialen (via scenario-analyse)?

Naast nikkel zullen o.a. ook chroom en andere elementen mee geanalyseerd worden in de verschillende levensmiddelen en uitloogoplossingen afkomstig van de migratietesten. Dit zou kunnen helpen om de oorsprong van het nikkel te achterhalen, gezien nikkel meestal samen met andere elementen, zoals chroom, in de contactmaterialen aanwezig is. Dit project zal zo echter ook op dezelfde vragen een antwoord kunnen bieden voor wat de aanwezigheid van andere elementen in de voeding, waaronder chroom, en hun uitloging uit voedselcontactmaterialen betreft.

RT 16/5 ANAPLANTOX 1

Ontwikkeling van een multi-targetmethode ter analyse van plantentoxines in voedingssupplementen

Coördinator:
Dr. Lieve Herman (ILVO)
Promotoren:
Dr. Els Van Pamel (ILVO)
Dr. Els Daeseleire (ILVO)
Dr. Christof Van Poucke (ILVO)
Dr. Nathalie Gillard (CER-Groupe)

Toelage: € 248.000
Periode: 1/2/2017 - 31/7/2019 (30 maanden)

Doelstellingen van het project

Dit onderzoek richt zich op het verkrijgen van een betere kennis omtrent de aanwezigheid van plantentoxines in voedingssupplementen en daarmee gecorreleerd, op de detectiemethodologie vereist voor de analyse op de aan-/afwezigheid ervan in voedingssupplementen. De focus van dit onderzoekt ligt op het bieden van een antwoord op volgende onderzoeksvragen:

- Welke plantentoxines in voedingssupplementen opgelijst in de projectoproep (gebaseerd op het Koninklijk Besluit en amendementen) zijn het belangrijkst in functie van toxicologische/prevalentie/consumptie data indien beschikbaar (prioritering in kader van de veiligheid voor de consument);
- Hoe kan een brede waaier aan verschillende componenten geëxtraheerd worden uit verschillende matrices van voedingssupplementen gebruik makend van een generische staalvoorbereiding en extractieprotocol (optimalisatie van extractie- en opzuiveringsprotocol(len));
- Welke multi-component analysemethodes laten toe om specifiek en gevoelig lage concentraties aan meerdere plantentoxines in verschillende matrices te detecteren en te kwantificeren (optimalisatie en validatie multi-analyte LC-MS methodologie);
- Wat is de performantie van de nieuw ontwikkelde methodes (in-house validatie en internationale ringtest) en hoe verhouden ze zich ten opzichte van reeds bestaande methodes (vergelijking met screeningsmethodes).

RT 16/6 METAGECO 2

Comparaison des performances de l'analyse métagénétique et de la microbiologie classique pour la caractérisation de la microflore des surfaces, des mains et des denrées alimentaires dans différents type de cuisines de collectivité

Coördinateur:
Prof. Georges Daube (ULiège)
Promoteur:
Prof. Marc Heyndrickx (ILVO)

Subside: € 248.000
Période: 1/11/2016 - 31/10/2018 (24 mois)

Objectifs du projet

Ce projet exploratoire et innovant vise à apporter des réponses aux questions suivantes :

- Est-ce que la métagénétique avec son approche sans a priori et indépendante de la culture peut compléter avantageusement la microbiologie classique par culture pour la caractérisation des flores microbiennes sur les surfaces des cuisines de collectivité et pour prédire les risques de contamination des aliments ? Où est sa valeur ajoutée ? Quelles sont ses limites ?
- Dans quelles mesures les résultats des analyses microbiologiques par culture et/ou par métagénétique sont-ils corrélés avec les contrôles visuels réalisés par l'AFSCA ?
- A la lumière des résultats obtenus, quel protocole analytique proposer pour objectiver la maîtrise de l'hygiène dans les cuisines de collectivités (endroits et nombre de prélèvements, procédure d'échantillonnage et de transport des échantillons, paramètres à déterminer, méthodes analytiques à mettre en œuvre au laboratoire, mode d'expression des résultats) ?
- Grâce aux résultats obtenus lors de cette première étude, quels critères microbiologiques proposer à l'AFSCA pour une première programmation faisant appel à la métagénétique ?

RF 16/6302 AMR-ARRAY

Système de micro-array en phase liquide pour la détection rapide des déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques: développement et valorisation dans une perspective « One Health / Une seule santé »

Coördinateur:
Prof. Pierre Wattiau (CODA-CERVA)
Promoteurs:
Dr. Katelijne Dierick (WIV-ISP)
Dr Sophie Bertrand (WIV-ISP)
Dr. Christof Van Poucke (ILVO)
Dr. Nathalie Gillard (CER-Groupe)

Subside: € 173.000
Période: 1/6/2017 - 30/11/2018 (18 maanden)

Objectifs du projet

Le premier but du projet est de développer un test qui remplit toutes les conditions nécessaires pour l'application dans les laboratoires de diagnostic de routine et qui est clairement compétitif en termes de procédures et de matériel. Ces exigences sont les suivantes:

- L'analyse doit examiner tous les déterminants génétiques retenus de la RAM dans un (ou max deux) test(s). Par rapport à des systèmes commerciaux existants, le coût et le temps de travail manuel associés au nouveau système doivent être fortement concurrentiels et la portée élargie
- Le test doit être entièrement validé, à savoir donner des résultats qui sont qualitativement équivalents ou meilleurs que les résultats obtenus avec les procédures officielles actuellement recommandées en termes de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité. Il doit se prêter à l'accréditation sous la norme ISO 17025
- Le test doit se prêter facilement à de futures mises à jour (pas de revalidation complète requise)
- Son développement doit être totalement sous le contrôle des promoteurs (aucun problème de propriété intellectuelle protégée, contrôle technique complet)
- Le test doit pouvoir être facilement implémenté dans tout laboratoire fourni avec l'équipement nécessaire

Le deuxième but du projet est d'évaluer le test développé sur des souches issues de campagnes officielles de surveillance de la RAM, de laboratoires de microbiologie de routine ou de projets de recherche et

- de relier les nouvelles données recueillies avec les caractéristiques phénotypiques des souches
- d'évaluer la valeur ajoutée apportée par le nouveau système: preuves moléculaires des résistances observées - y compris la résistance sous-clinique - et leur évolution au fil du temps, capacité de transfert horizontal, détection des profils de résistance atypiques (éventuellement nouvelles), etc.

RF 16/6306 nanofood@

Implementatie en validatie van een analytische methodologie om technisch vervaardigde nanomaterialen in voedseladditieven te evalueren

Coördinator:
Dr. Jan Mast (CODA-CERVA)
Promotor:
Dr. Nadia Waegeneers (CODA-CERVA)

Toelage: € 199.000
Periode: 1/10/2016 - 30/9/2018 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

Volgende specifieke vragen worden onderzocht:
- Bevatten de titaniumdioxide (E171), zilver (E174) en goud (E175) voedseladditieven een fractie nanopartikels?
- Wat is de kristalstructuur van deze voedseladditieven en de chemische samenstelling van de individuele partikels?
- Kan de groottedistributie van de partikels in deze voedseladditieven worden bepaald met aantal-gebaseerde methoden, zoals vermeld in de EU Regelgeving 1169/2011 over voedselinformatie voor consumenten [1], en in lijn met de EC-definitie van een nanomateriaal? Wat zijn de onzekerheden geassocieerd met deze meting?
- Kan de concentratie aan zilver, goud en titaniumdioxide nanopartikels in de voedseladditieven accuraat en precies worden bepaald?

Om deze vragen te beantwoorden zal een gevalideerde methodologie ontwikkeld worden voor de karakterisering van de fractie nanopartikels in voedseladditieven E171, E174 en E175. De methodologie combineert fysische karakterisering door elektronenmicroscopie-gebaseerde technieken zoals 'transmission (TEM) en scanning (SEM) electron microscopy', met chemische karakterisering door spectroscopische technieken, zoals 'energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX)' en 'Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS en SP-ICP-MS)'.

Deze methodologie maakt een systematische aanpak mogelijk voor de controle (toezichthouders), applicatie (consumenten) en uitvoering (producenten) van EU-verordening 1169/2011 voor nanomaterialen in goedgekeurde voedseladditieven. Op die manier kunnen volgende meer algemene vragen beantwoord worden:
- Kan de analyse van de nanofractie in de zuivere E171, E174 en E175 voedseladditieven worden aangepast, zodanig dat deze kan worden toegepast voor de analyse van de voedseladditieven in een voedselmatrix, bv. door aanpassing van staalvoorbereiding?
- Kunnen de resultaten en methoden bijdragen tot de re-evaluatie van de risico's met betrekking tot de veiligheid van deze voedseladditieven door de European Food Safety Authority (EFSA), in overeenstemming met Verordening (EU) nr. 257/2010?
- Kan deze kennis worden gebruikt om algemene richtlijnen te ontwikkelen voor de screening en de systematische opsporing en karakterisering van de nanofractie in de oorspronkelijke voedseladditieven en in de voedselmatrix?

RF 16/6307 ViroBee

Wintersterfte bij honingbijen (*Apis Mellifera*): identificatie van gekende en nieuwe honingbijvirussen geassocieerd met zwakke kolonies door middel van state of the art virale metagenoom technieken

Coördinator:
Prof. Jelle Matthijnssens (KU Leuven)
Promotor:
Prof. Dirk de Graaf (UGent)

Toelage: € 248.000
Periode: 1/1/2017 - 31/12/2018 (24 maanden)

Doelstellingen van het project

De hypothesen van deze studie zijn dat het viroom van de honingbij voor een groot deel onbekend is, dat sommige van deze ongekende virussen een cruciale rol spelen bij het ontstaan van Winter Loss (WL) en Colony Collapse Disorder (CCD) wereldwijd, en dat het bestrijden van dergelijke virussen een gunstig effect zal hebben op de algemene gezondheid van bijenpopulaties. Dit project beoogt het beantwoorden van de volgende onderzoeksvragen:

VRAAG 1: Welke ongekende honingbijvirussen zijn er in Vlaanderen? Onze geoptimaliseerde screeningsmethode zal gebruikt worden om het viroom van de honingbij in Vlaanderen in detail te bepalen.

VRAAG 2: Wat is de verspreiding en prevalentie van deze nieuwe (en gekende) virussen in Vlaanderen? q(RT)-PCR testen zullen geoptimaliseerd worden voor een selectie van relevante virussen, en 300 bijenkolonies uit heel Vlaanderen zullen gescreend worden voor de aanwezigheid en de virale lading van deze virussen.

VRAAG 3: Welke virussen zijn geassocieerd met WL in Vlaanderen? Statistische analyses zullen uitgevoerd worden om correlaties te bepalen tussen gestorven kolonies en de aanwezigheid van bepaalde virussen, of de virale lading van bepaalde (combinaties) van virussen.

VRAAG 4: Kunnen we virussen isoleren die geassocieerd zijn met WL? Men zal trachten virussen geassocieerd met WL te isoleren, wat ons in de toekomst zal toelaten om strategieën te ontwikkelen om deze virussen te detecteren en te bestrijden.

RF 16/6308 CITRIRISK

Het voorkomen van citrinine in de Belgische voedsel- en voederketen en het risico voor mens en dier

Coördinator:
Prof. Sarah De Saeger (UGent)
Promotoren:
Prof. Siska Croubels (UGent)
Prof. Dr. Mathias Devreese (UGent)
Dr. Julie Kiebooms (CODA-CERVA)
Dr. Bart Huybrechts (CODA-CERVA)
Dr. Emmanuel Tangni (CODA-CERVA)

Toelage: € 438.000
Periode: 16/10/2016 - 15/10/2020 (48 maanden)

Doelstellingen van het project

Het Europese voedselagentschap (EFSA) publiceerde in 2012 een wetenschappelijke opinie inzake citrinine (CIT) waarbij de nadruk gelegd werd op de nood aan bijkomende kwantitatieve incidentie- en toxiciteitsgegevens opdat een risicoanalyse m.b.t de aanwezigheid van CIT in voedsel/voeder zou kunnen uitgevoerd worden (EFSA 2012). Aan de hand van een geïntegreerde aanpak zullen de onderzoeksgroepen bijdragen tot het verwerven van informatie m.b.t het voorkomen van CIT in diervoeders en verschillende voedingsmiddelen beschikbaar op de Belgische markt waarbij de focus ligt op het ontdekken van alle relevante innamebronnen en hun relatief belang. De referentiematerialen (RM) voor CIT die reeds ontwikkeld werden voor het CEN-project, zullen ter beschikking gesteld worden aan de partners in CITRIRISK. Afhankelijk van de resultaten van het voorkomen van CIT in de verschillende matrices, zal CODA-CERVA bijkomende RM aanmaken. Daarnaast zal er onderzoek uitgevoerd worden naar de toxicokinetiek en orale biologische beschikbaarheid van CIT bij vleeskippen en varkens, en zal de carry-over naar eetbare weefsels (spierweefsel en nieren bij varkens en vleeskippen; eieren bij leghennen) onderzocht worden. Het varken dient daarbij tevens als toxicokinetisch model voor de mens, gezien de opmerkelijke gelijkenissen in anatomie en fysiologie van o.a. het maag-darmstelsel, lever en nier. Op heden is reeds één fase I metaboliet van CIT gekend, het dihydrocitrinone (DH-CIT), doch m.b.v. hoge resolutie massaspectrometrie (HRMS) zullen andere potentiële fase I en II metabolieten opgespoord worden teneinde de biotransformatie van CIT te ontrafelen. Dit zal het voorgestelde project in staat stellen de volgende objectieven te realiseren:

1. Ontwikkelen en valideren van geschikte (U)HPLC-MS/MS methoden voor de bepaling van CIT in diervoeders, 10 verschillende voedingsmiddelengroepen als ook in verschillende eetbare weefsels van dierlijke oorsprong.
2. Kwantitatieve data verzamelen over het voorkomen van CIT in 10 voedingsmiddelengroepen (totaal 400 stalen) en 100 diervoeders beschikbaar op de Belgische markt.
3. Het toxicokinetisch profiel opstellen van CIT in varkens en vleeskippen als ook de absolute orale biologische beschikbaarheid bepalen bij deze nutsdieren. Kennis van de orale biologische beschikbaarheid laat toe om de systemische blootstelling na te gaan, en is noodzakelijk om een goede risico-evaluatie uit voeren.

4. De carry-over nagaan van CIT in diervoeders naar dierlijke producten bestemd voor menselijke consumptie.
5. Toxiciteit en orgaanschade nagaan in varkens, vleeskippen en leghennen.
6. Potentiële fase I en II metabolieten opsporen met HRMS.
7. Risico-evaluatie uitvoeren voor België.

Projets finalisés en
Projecten beëindigd in

2016

Project Projet	Titel Titre	Blz. Page
	Dierengezondheidsbeleid **Politique sanitaire des animaux**	
RT 11/06 COXIELLA 2	Analyse du risque zoonotique de transmission à l'homme de *Coxiella burnetii* au départ d'élevages caprins, ovins et bovins contaminés en Belgique et évaluation de l'efficacité de mesures de contrôle et de prévention	44
RT 11/08 CLEANDESOPT 1	Optimalisatie van reiniging en ontsmetting in de veehouderij	46
RF 11/6244 PoRRS@vac	Ontwikkeling van aanpasbare geattenueerde en vectorvaccins ter bescherming tegen het porcien reproductief en respiratoir syndroom (PRRS), essentieel voor een succesvolle bestrijding	48
RF 11/6245 MINSPEC-PRO	Evaluatie van de toediening van een *Chlamydia psittaci* vaccin bij vleeskippen	50
RT 12/05 LYMPHINDIC 1	La lymphadénite mandibulaire en tant qu'indicateur de l'état de santé des porcs d'abattage : prévalence, étiologie et indicateurs de risque pour la santé publique	52
RT 12/04 MYCOPLASMA 1	Onderzoek naar de prevalentie en epidemiologie van *Mycoplasma gallisepticum* en *Mycoplasma meleagridis* stammen, en opsporen van wildreservoirs	54
RF 13/6271 ANTIVIRES	Werkingsmechanisme en barrière tot resistentie van antivirale middelen tegen het mond- en klauwzeervirus en het klassieke en Afrikaanse varkenspestvirus	57
RT 14/06 EQIAVEC 1	Recensement des vecteurs potentiels d'anémie infectieuse équine (AIE) en Belgique, étude de leur période d'activité, des facteurs influençant celle-ci et mesures de protection	59
RF 15/6295 PEDetect	Validatie van diagnostische testen voor de detectie en monitoring van het porciene epidemische diarree virus in België	62
	Plantengezondheidsbeleid **Politique sanitaire des végétaux**	**Blz.** **Page**
RT 12/08 MONOCHAMUS 1	Étude des populations de *Monochamus* spp. présentes en Belgique en vue d'évaluer leur aptitude à propager le nématode du pin et de développer une stratégie de lutte préventive	66
RF 12/6264 DEVIRGENCY	Detectie van lage besmettingsdichtheden, kennis van virulentiegroepen en generatietijd van aardappelcysten *(Globodera* spp.*)* als tools voor inperking van aardappelmoeheid	68
RT 13/05 HARMVECT 1	Risico voor de veiligheid van de voedselketen op introductie van schadelijke insecten en ziekte overdragende vectoren via het internationaal verkeer	70
RT 13/06 POWADIS 1	Evaluatie van de risico's van de introductie en de verspreiding van de wratziekte (*Synchytrium endobioticum*) in België en aanbevelingen voor bestrijdingsmaatregelen	74
RT 13/07 NEMASPREAD 1	Onderzoek naar quarantaine nematoden in nevenstromen: risico op verspreiding en mogelijkheden tot preventie	76
RT 13/08 STATUSQ 1	Fytosanitaire status van schadelijke organismen voor planten en plantaardige producten in België	78

RT 14/07 DEPITRIM 1	Detectie, bestrijdingsmaatregelen en impactstudie voor Epitrix in België	82
RF 14/6290 FYLIBER	Onderzoek van de aanwezigheid van fytoplasma's en de bacterie *Candidatus* Liberibacter solanacearum in de aardappel- en wortelteelt met optimalisatie en implementatie van moleculaire diagnostiek	86
	Voedselveiligheid **Sécurité des aliments**	**Blz.** **Page**
RF 11/6241 CAMPYTRACE	Kwantificatie en moleculaire differentiatie van *Campylobacter* in de productieketen van braadkippen om interventies te definiëren met als doel een daling in het aantal humane campylobacteriosen te bekomen	90
RF 11/6242 UGM-MONITOR	Développement d'une plateforme de biologie moléculaire et d'une base de données (évaluation des risques) destinées à la détection dans l'alimentation des organismes génétiquement modifiés non-autorisés (UGM) en Europe	93
RF 11/6243 PEPTIDO-GENOMIQUE	Approches peptidomique et génomique à la détection et à l'identification des composants protéiques d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente	98
RT 12/10 ALTPOLYCARB	Studie van de eventuele migratierisico's van materialen die in contact komen met levensmiddelen voor kinderen jonger dan 3 jaar	100
RF 12/6260 THYREOMERK	Biomerker benadering als alternatieve methode voor het opsporen van residuen van exogeen toegediende thyreostatica bij nutsdieren in het kader van het controleprogramma	104
RF 12/6261 ALTER	*Alternaria* mycotoxinen in levensmiddelen: Voorkomen en invloed van voedselverwerking	107
RT 14/08 APESTICON 1	Développement d'une procédure d'évaluation des risques associée à l'utilisation des appareils d'application des produits phytopharmaceutiques dans le cadre de l'article 8 de la Directive 2009/128 et développement de protocoles de contrôles spécifiques adaptés	110
RT 14/09 ZENDONCONVERT 1	Onderzoek naar het conversieprofiel van gemaskeerd deoxynivalenol en zearalenone in het gastro-intestinaal stelsel van het varken en de mens	112
RF 14/6285 PERCHLOREM	Studie en remediëring van perchloraat in de teelt van bladgewassen onder glas	116

Politique sanitaire des animaux
Dierengezondheidsbeleid

RT 11/06 COXIELLA 2

Analyse du risque zoonotique de transmission à l'homme de ***Coxiella burnetii*** au départ d'élevages caprins, ovins et bovins contaminés en Belgique et évaluation de l'efficacité de mesures de contrôle et de prévention

Coordinateur :
Prof. Claude Saegerman (ULiège)
Promoteurs :
Prof. Robert Renaville (ULiège)
Dr. Guy Czaplicki (ARSIA)
Dr. Philippe Léonard (ULiège)
Prof. Mieke Uyttendaele (UGent)
Prof. Nathalie Kirschvink (UNamur)
Dr. Marjan Van Esbroeck (ITG)
Dr. Christine Grignet (ULiège)
Chercheur :
Dr. Fabiana Dal Pozzo (ULiège)

Subside : € 400.000
Période : 1/1/2012 - 31/3/2016 (54 mois)

Résultats des recherches

La fièvre Q est une zoonose due à une bactérie intracellulaire très résistante dont l'aire de répartition est mondiale. Elle a connu en 2008 et 2009 deux pics épidémiques de cas humains au Pays Bas. Le projet COXIELLA 2 avait pour but de réaliser une analyse quantitative du risque zoonotique de transmission de *C. burnetii* à l'homme au départ des troupeaux de ruminants domestiques en Belgique. Une étude longitudinale dans des élevages caprins, ovins et bovins contaminés par *C. burnetii* a été réalisée afin de déterminer dans quelle mesure ce pathogène est présent, se maintient et enfin dans quelle mesure la pression infectieuse fluctue au cours du temps. Un objectif prioritaire du projet était l'évaluation du statut sanitaire 'fièvre Q' des personnes vivant dans l'entourage immédiat des animaux (personnes à risque). En complément, une plus large enquête sérologique a été menée sur 4 groupes de la population ayant une probabilité différente de rentrer en contact avec le pathogène (étudiants en médecine vétérinaire ayant des contacts fréquents avec des animaux, étudiants n'ayant pas ou très peu de contacts avec des animaux, étudiants d'une Ecole d'Agriculture et vétérinaires praticiens ruraux et d'animaux de compagnie).

Au cours du projet COXIELLA 2, un suivi longitudinal a été réalisé pendant les hivers 2012-13 et 2013-14. Concernant les troupeaux bovins, la séroprévalence apparente intra-troupeau, calculée uniquement à partir des animaux âgés > 24 mois, a varié entre 0% et 37%. L'excrétion de la bactérie dans les échantillons biologiques a été constatée plus fréquemment chez des bovins séropositifs âgés > 24 mois et particulièrement dans le lait. La caractérisation génétique de la bactérie réalisée par la méthode SNP a permis d'identifier au moins 2 génotypes différents chez les bovins (SNP 2 et 6), avec la détection d'un seul génotype par élevage. Le suivi des troupeaux caprins avait comme objectif primaire l'évaluation de la durée à long terme de l'immunité vaccinale humorale en conditions de terrain. L'excrétion de *Coxiella* a été détectée à partir de chèvres non vaccinées et vaccinées, un résultat conforme avec la littérature existante.

Toutefois, on a observé que la vaccination réduisait significativement la fréquence d'excrétion par le lait et la voie génitale et réduisait aussi de manière significative la quantité de bactéries excrétées par le lait (exprimée en copies génomiques). La caractérisation génétique de la bactérie réalisée par la méthode SNP a permis d'identifier quatre génotypes chez les caprins (SNP 1, 2, 5 et 6), avec la détection de plusieurs génotypes par élevage (co-circulation). La séroprévalence apparente pour fièvre Q chez les moutons allaitants était très faible, mais un nombre très élevé d'animaux séronégatifs excréteurs a été détecté. Le suivi longitudinal d'un troupeau ovin laitier devenu positif à la fièvre Q au début de 2014 a été réalisé avec des prélèvements effectués avant et après vaccination. Ce suivi a permis de montrer l'efficacité de la vaccination sur l'excrétion animale et la contamination environnementale.

L'enquête sérologique conduite sur les personnes à risque a mis en évidence une séroprévalence apparente de 36,8% parmi les fermiers et leurs familles, avec une différence entre les personnes travaillant uniquement dans une ferme bovine (séroprévalence apparente de 15,9%), dans une ferme caprine (séroprévalence apparente de 64,7%) ou ceux qui travaillent dans les deux (séroprévalence apparente de 100%). Une séroprévalence très élevée (83,8%) a été obtenue chez les vétérinaires ayant une activité principalement rurale.

La vaccination de tous les animaux plus âgés de 8 mois a été mise en place chez 6 troupeaux bovins infectés (étude en conditions non-expérimentales d'efficacité du vaccin Coxevac®). Les prélèvements après vaccination ont permis de mettre en évidence une réduction de la charge bactérienne dans l'environnement de la ferme.

RT 11/08 CLEANDESOPT 1

Optimalisatie van reiniging en ontsmetting in de veehouderij

Coördinatoren:
Dr. Koen De Reu (ILVO)
Prof. Marc Heyndrickx (ILVO)
Promotoren:
Prof. Jeroen Dewulf (UGent)
Ir. Johan Zoons (Proefbedrijf Pluimveehouderij)
Ir. Ellen Vervaet (Proefbedrijf Pluimveehouderij)
Onderzoeker:
Dr. Kaat Luyckx (ILVO)

Toelage: € 270.000
Periode: 1/9/2012 - 31/8/2015 (36 maanden)

Onderzoeksresultaten

Een hygiënische en kwaliteitsvolle voedselproductie is van groot belang, gezien de toenemende eisen van de Westerse consument i.v.m. voedselveiligheid en –kwaliteit en de druk van de Europese reglementeringen. De veehouderij speelt hier een belangrijke rol. Een essentieel onderdeel van een goed hygiënemanagement op een landbouwbedrijf is de reiniging en ontsmetting (R&O) van de stalomgeving. Het hoofddoel van het project was het opstellen en uittesten van geoptimaliseerde en alternatieve R&O protocollen voor pluimvee- en varkensstallen. Dat werd gekoppeld aan het ontwikkelen en gebruiken van geoptimaliseerde meetsystemen om de effectiviteit van de toegepaste R&O protocollen te evalueren. Het onderzoek bestond uit veldproeven op verschillende bedrijven waar verscheidene reinigingsprotocollen naast elkaar uitgetest werden. In het eerste jaar werd een evaluatiemethodologie opgesteld om de effectiviteit van R&O protocollen tijdens veldproeven in braadkippenstallen te evalueren. De gevoeligheid van verschillende staalnamemethoden werd nagegaan en het gebruik van een visuele reinheidsinspectie en ATP hygiënemonitoring geëvalueerd. Hierbij werden de meest geschikte staalnamemethoden en bijhorende parameters geselecteerd. De studie toonde aan dat het meest geschikte meetsysteem om R&O te evalueren in braadkippenstallen bestaat uit: agar contactplaatjes (ACP) voor totaal aeroob kiemgetal na ontsmetting (NO), swabstalen vóór reiniging (VR), na reiniging (NR) en NO voor tellingen van totaal aeroob kiemgetal en *Enterococcus* spp. en detectie van *E. coli* en *Salmonella*. Dit meetsysteem werd vervolgens gebruikt om verschillende reinigingsprotocollen te vergelijken in braadkippenstallen. Hierbij werd het verschil tussen het al dan niet overnacht inweken van stallen en het gebruik van warm (60 °C) of koud water tijdens reiniging uitgetest in 12 braadkippenstallen op 5 bedrijven. Het toepassen van een inweekstap voorafgaand aan de hogedrukreiniging met reinigingsproduct, toont over alle bedrijven heen een significant sterkere daling van totaal aeroob kiemgetal en *Enterococcus* spp. Er kon geen verschil aangetoond worden tussen protocollen waarbij warm of koud water gebruikt wordt tijdens de reiniging. Drinkbakjes, afvoerputjes en vloerspleten werden als kritische punten geïdentificeerd door ATP analyse NR en tellingen van totaal aeroob kiemgetal VR, NR en NO op swabstalen. Resultaten van *E. coli* en *Salmonella* detectie op swabstalen bevestigden deze waarneming. In het tweede jaar lag de focus op de varkenssector. Het meetsysteem om de stalhygiëne in biggencompartimenten te beoordelen, was gebaseerd op het meetsysteem ontwikkeld

voor braadkippenstallen. Er werd eveneens gebruik gemaakt van swabstalen om zo gevoelig mogelijk te werken. Het effect van een commercieel competitief exclusie (CE) protocol en een klassieke R&O op de omgevingscontaminatie, prestatie van de biggen en het antibioticumgebruik werd nagegaan in 6 identieke biggencompartimenten op ILVO Dier, dit gedurende drie opeenvolgende leegstanden en productieronden. De studie toonde aan dat de infectiedruk in de CE compartimenten na een microbiële reiniging niet zo sterk gedaald was als in de ontsmette compartimenten (controle). Bovendien was de infectiedruk in de CE compartimenten tijdens huisvesting eveneens niet lager. Ondanks het efficiënt aanbrengen van de CE bacteriën, was de infectiedruk na 3 ronden niet gedaald. De resultaten gaven aan dat het geteste CE protocol geen beter alternatief is voor een klassieke R&O in biggenbatterijen. Daarnaast werd het effect van een verlengde leegstand nagegaan in biggenbatterijen. Er werden gedurende 3 leegstanden telkens 3 identieke biggencompartimenten opgevolgd gedurende 10 dagen. De studie toonde aan dat een verlengde leegstand van 10 dagen zonder het toepassen van extra bioveiligheidsmaatregelen geen impact had op de infectiedruk van totaal aeroob kiemgetal, *E. coli*, fecale coliformen, MRSA en *Enterococcus* spp. in biggenbatterijen. Ten slotte werd de residuele flora na reiniging en na ontsmetting in braadkippenstallen geïdentificeerd. Daaruit bleek dat nog een grote diversiteit aan bacteriën aanwezig was. De meest dominante bacteriën behoorden tot de genera *Brevibacterium*, *Brachybacterium* en *Staphylococcus* na reiniging en *Bacillus*, *Brevibacterium* en *Staphylococcus* na ontsmetting. Daarnaast werd op beide staalnamemomenten *Enterococcus faecium* als meest dominant species van *Enterococcus* spp. geïdentificeerd. Op het selectieve medium voor *Enterobacteriaceae* waren de genera *Enterobacter*, *Pantoea* en *Aeromonas* (non *Enterobacteriaceae*) dominant na reiniging terwijl *Escherichia*, *Lelliottia* en *Pantoea* dominant waren na ontsmetting. Bovendien werden species pathogeen voor pluimvee en mensen geïdentificeerd, niet alleen na reiniging maar ook na ontsmetting. Daarnaast werd de gevoeligheid tegenover het gebruikte ontsmettingsmiddel bepaald voor 28 geselecteerde isolaten. De MBC (minimum bactericidal concentration) resultaten toonden geen trend in selectie van minder gevoelige isolaten voor het gebruikte ontsmettingsmiddel na ontsmetting.

RF 11/6244 PoRRS@vac

Ontwikkeling van aanpasbare geattenueerde en vectorvaccins ter bescherming tegen het porcien reproductief en respiratoir syndroom (PRRS), essentieel voor een succesvolle bestrijding

Coördinator:
Prof. Hans Nauwynck (UGent)
Promotoren:
Prof. Herman Favoreel (UGent)
Prof. Merijn Vanhee (UGent)
Prof. Wander Van Breedam (UGent)
Onderzoekers:
Dr. Isaura Christiaens (UGent)
Dr. Ivan Trus (UGent)

Toelage: € 399.783
Periode: 1/1/2012 - 28/2/2016 (48 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het porcien reproductief en respiratoir syndroom virus (PRRSV) is moeilijk onder controle te houden met de huidig geregistreerde vaccins. Commerciële, geïnactiveerde vaccins induceren totaal geen beschermende immuniteit na primo-vaccinatie in naïeve dieren. Wanneer de stam in het vaccin genetisch overeenkomt met de circulerende stam kunnen ze hoogstens een boost-reactie geven. De werkzaamheid van de geattenueerde vaccins is het laatste decennium sterk achteruitgegaan door het genetisch en antigenisch wegdrijven van de circulerende virussen. Als antwoord hierop werden in het laboratorium van de promotor reeds via een nieuwe techniek geïnactiveerde vaccins ontwikkeld, die momenteel verder getest worden voor commercieel gebruik (autovaccins).

Het project PoRRS@vac had twee doelen voor ogen: enerzijds wilden we via een ingenieus selectiesysteem een protocol opstellen voor de ontwikkeling van een aanpasbaar, **geattenueerd vaccin** en anderzijds wilden we een **vectorvaccin** ontwikkelen, dat de structurele eiwitten van PRRSV tot expressie brengt.

Twee geattenueerde kandidaatvaccins, A en B, werden aangemaakt en gebruikt voor een *in vivo* experiment, waarbij werd nagegaan of ze in staat waren om klinische en virologische bescherming te bieden. A was in staat een complete bescherming te bieden, B kon dit niet, dit door overattenuatie van het virus. Daarom werd het experiment herhaald met een minder geattenueerde versie. Vaccinatie met deze kandidaat zorgde eveneens voor een complete bescherming. Om na te gaan of de nieuwe kandidaten ook bij een heterologe challenge bescherming kunnen bieden, werd kandidaat vaccin A gebruikt in een *in vivo* vaccinatie-challenge experiment, waarbij de dieren gevaccineerd werden met een commercieel vaccin of onze kandidaat A en vervolgens gechallenged werden met een recent Belgisch veldisolaat (Flanders 13). In tegenstelling tot bij de homologe set-up werd geen volledige klinische en virologische bescherming gezien. Er werd wel een beschermend effect gezien op klinische symptomen (minder koorts) en een reductie in virale uitscheiding en viremie. Het effect was vergelijkbaar met dat na vaccinatie met het commerciële levende vaccin. Momenteel zijn deze kandidaatvaccins in transfer naar bedrijven.

In het tweede deel van het project werd gebruik gemaakt van een **vectorvirus** voor de ontwikkeling van een vaccin voor PRRSV. Een serie van recombinante vectorvaccins werd gemaakt voor enerzijds enkelvoudige eiwitten en anderzijds voor de twee structurele complexen waaruit het PRRSV virion bestaat.

In een eerste experiment werden de vector+GP3 en vector+GP4 recombinanten *in vivo* uitgetest. Hierbij werd onderzocht of de recombinante vaccins in staat waren om PRRS-virusspecifieke antilichamen op te wekken. Na vaccinatie konden er geen virusspecifieke antilichamen gedetecteerd worden, maar wel eiwitspecifieke antilichamen tegen het geïnsereerde eiwit. Hieruit werd geconcludeerd dat de structuur van de eiwitten wel geëxprimeerd wordt door de recombinante virussen, maar wellicht verschilt van deze in het PRRSV virion of in PRRSV-geïnfecteerde cellen.

In een tweede experiment werden de vector+GP2/GP3/GP4 en vector+GP5/M kandidaten uitgetest in een vaccinatie-challenge experiment. Hiervoor werden jonge biggen eerst gevaccineerd met de vector+GP2/GP3/GP4, vector+GP5/M of een combinatie van beide en vervolgens gechallenged met PRRSV Lelystad. Vaccinatie met de vectorvaccins was niet in staat om antilichamen te induceren tegen het PRRS-virus. Er werd wel een betere neutraliserende antilichaamrespons en beperkt gereduceerde viremie gezien na vaccinatie met vector+GP5/M. Aangezien vaccinatie met deze vectorvaccins niet succesvol was, werden de verschillende vaccinatieroutes (IM, IN, oraal) niet vergeleken.

RF 11/6245 MINSPEC-PRO

Evaluatie van de toediening van een *Chlamydia psittaci* vaccin bij vleeskippen

Coördinator:
Prof. Daisy Vanrompay (UGent)
Promotor:
Dr. Sven Arnouts (UGent)
Onderzoeker:
Dr. Cindy De Boeck (UGent)

Toelage: € 239.462
Periode: 15/8/2013 - 16/8/2016 (36 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het MINSPEC-PRO project bestond uit drie verschillende werkpakketten en een implementatiefase. Voor het eerste werkpakket werd een longitudinale studie uitgevoerd om de kinetiek van een *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) infectie in vleeskippenbedrijven te evalueren en eventuele interacties met andere respiratoire pathogenen zoals *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), *Mycoplasma spp.*, infectieus bronchitis virus (IBV) en aviair metapneumovirus (aMPV) te bestuderen. Een tweede objectief was om een optimaal *C. psittaci* vaccinatieschema voor vleeskippen te kunnen opstellen waarbij ook het vaccinatietijdstip voor het rMOMP-His vaccin bepaald werd met het oog op een daaropvolgend experiment. De kinetiekstudie werd uitgevoerd op drie Belgische vleeskuikenbedrijven (bedrijf A, B en C) waar er per stal 20 eendagskuikens willekeurig geselecteerd en individueel gemerkt werden ter observatie en onderzoek. Dagelijks werd de mortaliteit op de bedrijven bijgehouden en wekelijks werden de geselecteerde vleeskuikens beoordeeld voor aanwezigheid van klinische symptomen. Daarnaast werden er wekelijks ook faryngeale swabs, bloed- en luchtstalen genomen om de dynamiek van respiratoire infecties, de algemene gezondheidstoestand en *C. psittaci* infectiedruk te onderzoeken. Op alle drie de bedrijven werden klinische respiratoire symptomen geobserveerd bij de vleeskuikens vanaf een leeftijd van 7 dagen. De vleeskuikens waren seronegatief voor IBV, ondanks vaccinatie, en daar deze pathogeen bijgevolg afwezig was werd er geen RT-PCR uitgevoerd voor IBV. Maternale antilichamen tegen aMPV werden op alle bedrijven teruggevonden vanaf een leeftijd van 1 dag aangezien de moederdieren van de vleeskuikens gevaccineerd werden. Maternale antilichamen tegen *Mycoplasma spp.* werden enkel gevonden op bedrijf C op een leeftijd van 1 dag. Ook werden er antilichamen tegenover ORT gevonden op twee bedrijven, namelijk bedrijf B waar een infectie optrad op dag 28 en bedrijf C waar een infectie op een leeftijd van 35 dagen gedetecteerd werd. Relatief hoge maternale antistoftiters tegenover *C. psittaci* werden op alle bedrijven gevonden, wat wijst op een infectie van de moederdieren en op een mogelijkheid tot horizontale en verticale transmissie van deze pathogeen. De antistoftiters voor *C. psittaci* vertoonden op alle drie de bedrijven een gelijkaardig verloop waarbij het aantal seropositieve dieren op een leeftijd van 1 dag gelijk was met dit op slachtleeftijd. Tussen deze twee tijdstippen werd seroconversie vastgesteld en bijgevolg een *C. psittaci* infectie, waarbij er op twee bedrijven een mogelijke interactie was met ORT.

Het objectief voor het tweede werkpakket bestond uit de aanmaak van het rMOMP-His vaccin in grote hoeveelheden. Hiervoor werden COS-7 cellen getransfecteerd met de expressievector pcDNA4::MOMP-V5-His. Deze transfectie werd geëvalueerd met een directe immunofluorescentiekleuring. Indien de transfectie succesvol was, werd het medium van de cellen verwijderd en werd er wasbuffer toegevoegd. De cellen werden daarna ingevroren bij -80°C en na twee vries-dooi cycli werd de wasbuffer verzameld en gecentrifugeerd. Het supernatans met het rMOMP-His werd daarna opgezuiverd door middel van affiniteitschromatografie. Er werd SDS-PAGE en Western Blotting uitgevoerd op de opgezuiverde fracties om de aanwezigheid van het rMOMP-His na te gaan. De concentratie ervan werd bepaald met behulp van een BCA test.

In het derde en laatste werkpakket werd het opgezuiverde rMOMP-His vaccin uit het tweede werkpakket geëvalueerd onder veldomstandigheden. Ter voorbereiding van dit veldexperiment werden verschillende transfecties en opzuiveringen uitgevoerd om de nodige hoeveelheid rMOMP-His vaccin voor 300 vleeskippen (150 mg) te bekomen. Het eigenlijke veldexperiment vond plaats in een vleeskuikenbedrijf waar in twee niet aanpalende stallen 300 vleeskuikens per stal geïsoleerd (compartiment) werden. Binnen deze 300 geïsoleerde vleeskuikens werden er 25 willekeurig geselecteerd en individueel gemerkt met pootringen voor staalname. De resultaten van dit preliminair rMOMP-His veldexperiment zijn veelbelovend, maar verdere en meer gedetailleerde experimenten zijn nodig om het rMOMP-His vaccin bij vleeskippen grondiger te evalueren.

RT 12/05 LYMPHINDIC 1

La lymphadénite mandibulaire en tant qu'indicateur de l'état de santé des porcs d'abattage : prévalence, étiologie et indicateurs de risque pour la santé publique

Coordinateur :
Prof. Claude Saegerman (ULiège)
Promoteurs :
Dr. Hein Imberechts / Dr. David Fretin / Dr. Marc Govaerts (CODA-CERVA)
Dr. Kris Huygen (WIV-ISP)
Dr. Vanessa Mathys / Dr. Fauville-Dufaux (WIV-ISP)
Dr. Bouke De Jong / Dr. Leen Rigouts (ITG-Antwerpen)
Chercheurs :
Dr. Joseph Denoel (ULiège)
Mlle Lucille Duytschaever (CODA-CERVA)
Dhr. Nicolas Bruffaerts (WIV-ISP)
Mme Muriel Vincent (WIV-ISP)

Subside : € 349.852
Période : 1/12/2012 - 7/3/2016 (40 mois)

Résultats des recherches

L'étiologie des lésions pyogranulomateuses découvertes à l'abattage des porcs charcutiers, et le risque de santé publique qui en découle, demeurent mal connus. Si les lésions de lymphadénite de type granulomateux sont classiquement attribuées aux infections par les membres du complexe *Mycobacterium avium* (MAC), l'implication de *Rhodococcus equi* (anciennement *Corynebacterium equi*) est également reconnue. L'importance relative de ces 2 actinomycétales ou d'autres pathogènes additionnels ne fait l'objet que de rapports ponctuels et n'est pas systématiquement définie.

Dès lors, les objectifs du projet étaient :
- estimer la prévalence de la lymphadénite granulomateuse chez les porcs d'abattage en Belgique;
- identifier les microorganismes qui jouent un rôle dans la lymphadénite granulomateuse du porc d'abattage en Belgique;
- étudier les propriétés et les risques zoonotiques de ces microorganismes;
- réaliser une analyse coûts et bénéfices de différentes stratégies d'inspection des viandes;
- développer et valider un test permettant de déterminer le statut de l'exploitation en ce qui concerne les agents zoonotiques de la lymphadénite mandibulaire du porc.

Les résultats des cinq work packages (WP) peuvent être résumés comme suit.

Concernant le WP 1 [Estimation de la prévalence de la lymphadénite granulomateuse chez les porcs d'abattage], un pourcentage de lymphadénite granulomateuse du porc d'abattage en Belgique de l'ordre de 1% (sur un total de 116.276 porcs) a été observé.

Concernant le WP 2 [Identification des microorganismes qui jouent un rôle dans la lymphadénite mandibulaire (lymphadénopathie granulomateuse) du porc d'abattage], parmi 266 échantillons testés (suite au WP 1), trois pathogènes principaux ont été isolés : *Mycobacterium* (*M.*) *avium* subsp. *hominissuis* (MAH) (N=16 ; 5%), *Mycobacterium bohemicum* (N=5 ; 2%) et *Rhodoccocus equi* (N=195 ; 73%).

Concernant WP3 [Propriétés et risques zoonotiques de ces microorganismes], la détermination des sous-espèces parmi les souches MAC humaines a permis de mettre en évidence la prédominance (98.9%) de l'espèce *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) chez les patients belges. En ce qui concerne le génotypage des souches MAC d'origine humaine, sur les 92 souches génotypées, 43 génotypes différents ont été obtenus. Certains génotypes sont nettement plus représentés. Il s'agit du type 12 (16 isolats humains), le type 15 (7 isolats) et le type 22 (5 isolats). Suite au WP2, des analyses ont été réalisées sur les 54 premières souches porcines isolées. Leur génotypage révèle la présence de 10 génotypes différents dont 5 en commun avec les souches d'origine humaine. Parmi les génotypes les plus représentés chez les souches porcines, on retrouve le type 12 (28 isolats) et le type 22 (7 isolats). En outre, les souches de MAH isolées chez l'homme et le porc d'abattage en Belgique présentent des profils variés de virulence dans un modèle murin.

Concernant le WP4 [Analyse coûts et bénéfices de différentes stratégies d'inspection des viandes] lorsque l'obligation d'inciser les ganglions était d'application, une moitié des ganglions étaient réellement incisés (54%). En moyenne les experts officiels ont détectés 36% des abcès détectés par la personne recrutée sur le projet (avec une variation importante entre experts : de 0 à 82%). L'incision ganglionnaire n'était pas pratiquée d'une manière optimale. De plus, une bonne part des ganglions mandibulaires, surtout le droit, sont incisés par les abatteurs lors de l'éviscération, et participent à la contamination des carcasses.

Concernant la WP5 [Développer et valider un test permettant de déterminer le statut de l'exploitation en ce qui concerne les agents zoonotiques de la lymphadénite mandibulaire du porc] 800 sérums ont été prélevés en abattoir provenant de 11 fermes d'engraissement et 15 fermes de naissance identifiées. L'analyse de l'ensemble des 800 sera par le kit ID Screen® Mycobacterium avium Indirect Multi-species (ID-Vet) a mis en évidence 4 échantillons positifs (0,5%) et 3 échantillons douteux (3,74%).

RT 12/04 MYCOPLASMA 1

Onderzoek naar de prevalentie en epidemiologie van *Mycoplasma gallisepticum* en *Mycoplasma meleagridis* stammen, en opsporen van wildreservoirs

Coördinator:
Prof. Patrick Butaye / Prof. Pierre Wattiau (CODA-CERVA)
Promotoren:
Prof. An Martel (UGent)
Dr. Sarah Welby (CODA-CERVA)
Dr. Mia Vanrobaeys (DGZ)
Dr. Christian Quinet (ARSIA)
Onderzoeker:
Dr. Tinne Michiels (CODA-CERVA)

Toelage: € 300.000
Periode: 1/10/2012 - 28/2/2016 (41 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het doel van dit project was om beter inzicht te krijgen in de epidemiologie van *Mycoplasma gallisepticum* en *Mycoplasma meleagridis* in België teneinde advies te kunnen geven ter preventie van infecties. Daarnaast werd ook *Mycoplasma synoviae* opgenomen in het project aangezien deze ook symptomen met een zware impact op de pluimveesector veroorzaakt.

In totaal werkten 87 legkipbedrijven, 102 vleeskipbedrijven en 17 kalkoenbedrijven mee aan deze studie. De bedrijfsprevalentie voor *M. gallisepticum* bedroeg 2,3% (95% CI: 0,6-8%) voor de legkipbedrijven en 7,8% (95% CI: 4-14,7%) voor de vleeskipbedrijven. In totaal waren 0,9% (95% CI: 0,7-1,2%) van de legkippen en 2,7% (95% CI: 1,9-3,8%) van de vleeskippen positief. De binnenbedrijfsprevalentie bedroeg 39,2% (95% CI: 30,9-48,1%) voor legkipbedrijven en 34,4% (95% CI: 25,6-44,3%) voor vleeskipbedrijven. Van de vleeskipbedrijven was 26,5% (95% CI: 18,9-35,8%) positief voor *M. synoviae* en van het totaal aantal stalen van vleeskipbedrijven was 12,9% (95% CI: 11,1-14,9%) *M. synoviae*-positief. De binnenbedrijfsprevalentie bedroeg 48,8% (95% CI: 43,4-54,2%). Bij kalkoenen testte geen enkel bloedstaal positief op de aanwezigheid van antistoffen tegen *M. gallisepticum* en *M. meleagridis*. Isolatie uitgevoerd op longweefsel van de positieve legkip- en vleeskipbedrijven was onsuccesvol.

Zesenvijftig hobbykwekers van raskippen waren bereid mee te werken. Er werden telkens bloedstalen van maximaal 10 kippen genomen. Eenenveertig eigenaars hadden kippen die positief testten op *M. gallisepticum* na analyse met ELISA, wat neerkomt op een seroprevalentie van 73,2% (95% CI: 60,4-83%). Van het totaal aantal stalen was 36,7% (95% CI: 32,5-41,2%) positief. De prevalentie binnen positieve tomen was 48,8% (95% CI: 43,6-54,1%). Daarnaast werd ook getest op antistoffen tegen *M. synoviae*. Vierenvijftig van de 56 eigenaars hadden positieve kippen op hun terrein wat resulteert in een prevalentie van 96,4% (95%CI: 87,9-99%) en van het totaal aantal stalen testte 76,3% (95%CI: 72,2-80%) positief. Binnen positieve tomen werd een prevalentie vastgesteld van 78% (95%CI: 73,9-81,6%). Op één locatie kon *M. gallisepticum* succesvol geïsoleerd worden bij hobbykippen. Bij 56 hobbyduiven werd bloed genomen maar geen enkele duif testte positief. Verder werd er bloed en tracheaswabs genomen van

197 vogels uit 7 verschillende vogelopvangcentra en 100 wildlevende vogels (enkel swabs) geschoten tijdens het jachtseizoen. Eén houtduif (jacht) testte positief met PCR op *M. gallisepticum,* en 3 houtduiven en 1 kraai testten positief op *M. synoviae*. Van de 197 bloedstalen genomen in de vogelopvangcentra testten 4 stalen positief met ELISA op antistoffen tegen *M. gallisepticum* (2 reigers, 1 eend en 1 ekster). Van elke vogel werden tevens 2 tracheaswabs genomen, één voor PCR en één voor isolatie. Isolatie op deze stalen was niet succesvol. Daarnaast werden ook 192 serumstalen van kraaien en ganzen uit collecties van de afdeling aviaire virologie te CODA getest op aanwezigheid van antistoffen tegen *M. gallisepticum*. Deze stalen waren allemaal negatief.

In juli 2014 was er een uitbraak bij 4 moederdierbedrijven, verbonden aan eenzelfde broeierij. Ongeveer een maand na het introduceren van traprijpe hanen in 4 moederdierbedrijven vertoonden de kippen respiratoire symptomen. Na uitvoerige analyses (RPA, ELISA, autopsie en bacteriologie) werden andere infectieuze oorzaken uitgesloten. Door de trage seroconversie bij *Mycoplasma* infecties werd de diagnose initieel gemist. Door het gebruik van RT-PCR kon de diagnose bevestigd worden en werden negatieve tomen van de betrokken moederdierbedrijven verder opgevolgd met RPA, ELISA en RT-PCR om spreiding op te volgen. Door analyse van de gegevens van de 3 diagnostische testen konden de spreidingsparameters van *M. gallisepticum* aan de hand van simulaties van verschillende infectieuze periodes ($1/\alpha$) berekend worden. Voor elke test bleek de reproductieratio *R0* groter dan 1 wat betekent dat een infectie met *M. gallisepticum* zich zal uitbreiden in de populatie. Voor RT-PCR stelden we wel vast dat de spreidingsparameter β beduidend kleiner was dan die voor RPA en ELISA wat toch bevestigt dat men met het gebruik van een snelle test zoals RT-PCR de kans op verspreiding kan verminderen.

Twee *M. gallisepticum* stammen werden succesvol geïsoleerd tijdens de uitbraak op 2 verschillende moederdierbedrijven. Tijdens een andere uitbraak begin 2015 werd nog een stam uit stalen van een moederdierbedrijf geïsoleerd. Deze stammen werden samen met de stam geïsoleerd uit hobbypluimvee getypeerd na identificatie dmv MALDI-TOF MS en 16S sequencing, tegelijk met een oude veldstam van het CODA, een stam van de universiteit van Liverpool en 2 referentiestammen. PFGE toonde aan dat de diversiteit van de geteste stammen niet zo groot was, maar dit is te verklaren door de oorsprong van de verschillende stalen. Verschillende onder hen zijn epidemiologisch geclusterd. Er waren 3 duidelijke groepen die deze epidemiologische clustering vertegenwoordigen. Uit de resulaten bleek dat PFGE in staat is om stammen (stam R6) die tot eenzelfde uitbraak behoren (clonaal verwant/identiek), aan te tonen. Daartegenover staat evenwel dat stammen R2-CC (MycoBe22) en R3-BC, ook van eenzelfde uitbraak maar van een verschillend bedrijf tot een andere cluster behoren. Visuele inspectie geeft aan dat de recentere stammen, deze van de uitbraken en de hobbykip, verschillend zijn van de oudere stammen. Heranalyse van de gel zou een oplossing kunnen brengen.

In samenwerking met ANSES werden dezelfde stammen ook gesequeneerd. Om de verwantschappen tussen de stammen te bepalen werden eerst de zones van minstens 40,000 basen bepaald waarvan de sequenties voor alle gesequeneerde kiemen aanwezig waren. Er werd ook rekening gehouden met de aanwezigheid van 'silent SNPs' in deze zones. Deze sequenties werden in ClustalW geanalyseerd. Met UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) bleek dat de gesequeneerde referentiestam samenclustert met twee oudere stammen, enerzijds een oude veldstam van het CODA (1982) en anderzijds een oudere stam uit de collectie van de Universiteit van Liverpool (MG-B10-96). De andere cluster bevat duidelijk meer stammen en kan onderverdeeld worden in twee subclusters. De eerste subcluster bevat twee stammen, enerzijds

een stam van een uitbraak bij moederdieren in 2015 en anderzijds een stam van een hobbykip geïsoleerd in 2014. De stammen van de andere cluster zijn van eenzelfde uitbraak in 2014. De stam van de hobbykip is dus duidelijk verwant met de stammen die we zien bij uitbraken in België. Dit is een mogelijk indicatie dat er een spill-over van de hobbysector is naar het bedrijfspluimvee. Er dienen evenwel nog meerdere stammen geanalyseerd te worden om dit te bevestigen.

RF 13/6271 ANTIVIRES

Werkingsmechanisme en barrière tot resistentie van antivirale middelen tegen het mond- en klauwzeervirus en het klassieke en Afrikaanse varkenspestvirus

Coördinator:
Dr. David Lefebvre (CODA-CERVA)
Promotoren:
Dr. Kris De Clercq (CODA-CERVA)
Dr. Marylène Tignon (CODA-CERVA)
Prof. Johan Neyts (KU Leuven)
Dr. Nesya Goris (KU Leuven)
Onderzoekers:
Dr. Annebel De Vleeschauwer (CODA-CERVA)
MSc. Ilse De Leeuw (CODA-CERVA)
Dr. Robert Vrancken (Aratana Therapeutics NV)

Toelage: € 240.000
Periode: 1/1/2014 - 31/12/2015 (24 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het ANTIVIRES-project beoogde een antwoord te geven op significante vragen omtrent veiligheid en de mogelijke ontwikkeling van resistentie van het mond- en klauwzeervirus (MKZV), het klassieke varkenspestvirus (KVPV) en het Afrikaanse varkenspestvirus (AVPV) tegen selectieve remmers van de virale replicatie. Dit project bouwde verder op de kennis die werd verworven tijdens het eerdere project van Contractueel Onderzoek getiteld "Ontwikkeling van selectieve inhibitoren van het klassieke varkenspest en het mond- en klauwzeervirus ter aanvulling van het bestaande controlebeleid" (RF 08/6203).

Tijdens het eerste jaar van het ANTIVIRES-project werden resistente serotype O en A MKZ-virussen uitgeselecteerd door sequentiële passage in celculturen in aanwezigheid van sub-optimale en toenemende concentraties van krachtige, pan-serotype remmers behorende tot twee verschillende antivirale compoundklassen. De antivirale middelen van beide compoundklassen bleken hoofdzakelijk actief te zijn in het begin van de virale replicatiecyclus. Voor twee andere antivirale compoundklassen bleek het niet mogelijk te zijn om resistente virussen uit te selecteren. Tijdens het tweede projectjaar werd de moleculaire target van beide eerstgenoemde antivirale compoundklassen geïdentificeerd d.m.v. next-generation sequencing.
Omwille van de uitstekende orale bio-beschikbaarheid en de goede antivirale activiteit *in vitro* werd tijdens het eerste projectjaar een activiteitsstudie uitgevoerd voor één bepaalde antivirale compoundklasse in muizen. Er werd echter geen antivirale activiteit vastgesteld. Voor twee andere compoundklassen werden nieuwe analoge moleculen ontworpen en gesynthetiseerd. Dit resulteerde in een verbeterde wateroplosbaarheid doch de serumconcentraties in muizen bleken nog steeds vrij laag, waardoor er met deze twee compoundklassen nog geen antivirale activiteitsstudies in muizen werden uitgevoerd.

Tijdens het eerste jaar van het ANTIVIRES-project werden stalen onderzocht van varkens die in het voorgaande RF 08/6203-project met KVPV geïnfecteerd werden en gedurende 4 weken behandeld werden met een ontwikkelingskandidaat. We konden geen verschil

vaststellen in de *in vitro* gevoeligheid voor het antivirale middel van virusisolaten afkomstig van behandelde varkens en van niet-behandelde varkens (fenotypische analyse) en concludeerden dat de kans op het ontwikkelen van resistentie bij het correct inzetten van deze klasse van antivirale middelen klein tot onbestaand lijkt. Tijdens het tweede projectjaar werd nagegaan of behandeling met de ontwikkelingskandidaat al dan niet aanleiding geeft tot het uitselecteren van nucleotidesequenties die geassocieerd worden met resistentie in het doelwitgen (genotypische analyse). Omwille van technische beperkingen in het aanrijken van de hoeveelheid genetisch materiaal kon het virale genoom echter onvoldoende geanalyseerd worden met de next-generation sequencing techniek. De analyse van het doelwitgen d.m.v. een "klassiek" sequeneringsprotocol werd na afloop van het ANTIVIRES-project verdergezet.

Tijdens het ANTIVIRES-project werden verschillende celcultuurmethoden geëvalueerd voor het standaardiseren van een antivirale test voor AVPV. Initieel leverden bepaalde cellijnen veelbelovende resultaten op maar uiteindelijk bleken de virustiters van bepaalde veldstammen van AVPV toch te variabel te zijn om een gestandaardiseerde test op continue cellijnen te ontwikkelen voor veldstammen. Daarom werd verkozen om verder te werken met de gestandaardiseerde *in vitro* test met een celcultuur-geadapteerde AVPV-stam op continue cellijnen en met veldisolaten op primaire witte bloedcellen van het varken. In tegenstelling tot voor MKZV konden er geen antiviraal-resistente AVPV-virussen worden uitgeselecteerd *in vitro*. Teneinde een AVPV infectiemodel te ontwikkelen in kleine proefdieren werden drie verschillende infectie-experimenten uitgevoerd met verschillende types van muizen. Geen van deze experimenten bleek echter succesvol. Voorlopig kunnen we de antivirale activiteit van AVPV-remmers *in vivo* dus enkel evalueren in varkens.

RT 14/06 EQIAVEC 1

Recensement des vecteurs potentiels d'anémie infectieuse équine (AIE) en Belgique, étude de leur période d'activité, des facteurs influençant celle-ci et mesures de protection

Coordinator :
Prof. Bertrand Losson (ULiège)
Promoteurs :
Prof. Maxime Madder (ITG)
Prof. Frédéric Francis (ULiège)
Chercheurs :
Dr Laetitia Lempereur (ULiège)
Mme Charlotte Sohier (ITG)

Subside : € 250.000
Période : 1/6/2014 - 29/2/2016 (21 mois)

Résultats des recherches

L'anémie infectieuse équine (AIE) est une maladie cosmopolite caractérisée par une infection persistante chez les chevaux infectés. Le virus de l'AIE utilise des vecteurs mécaniques hématophages (essentiellement les tabanidés et *Stomoxis calcitrans*) pour assurer sa transmission. Récemment plusieurs foyers d'AIE ont été signalés en Belgique (provinces de Liège et Anvers) après l'importation de chevaux. Le manque de connaissances concernant la transmission vectorielle de l'AIE en Belgique est un obstacle à la mise en place de mesures de contrôle adaptées et à l'amélioration des protocoles existants.

La première étude visait à comparer l'efficience de différents pièges à insectes en vue de sélectionner à la fois le plus efficient mais aussi le plus pratique pour les études ultérieures. Les Tabanidae et Muscidae furent collectés via des pièges de type Nzi ou H installés sur une même prairie au Sart Tilman. Le piège Nzi a montré une meilleure efficience vis-à-vis des Tabanidae, le piège H a permis de collecter une plus grande variété de Tabanidae et un plus grand nombre de Muscidae. Par conséquent ce dernier modèle a été retenu pour les travaux ultérieurs car il était en outre moins cher et son assemblage plus facile et plus rapide.

Une deuxième étude a alors été mise en place en vue de vérifier si l'attractivité du piège pouvait être augmentée via l'usage de composés chimiques. Deux pièges H furent placés sur la même prairie au Sart Tilman avec en alternative 4 récipients contenant du 1-Octen-3ol (octénol). La présence de cette molécule a augmenté le taux de capture pour les Tabanidés et les Muscidés. Néanmoins, ce composé ne fut pas utilisé systématiquement par la suite mais uniquement dans le cadre de l'étude « capture-relâcher » pour augmenter le nombre d'individus disponibles.

Par après, des pièges H furent, durant les saisons 2014 et 2015, placés en pâture à proximité de chevaux et ceci à différents endroits de Belgique correspondant à différents types de biotope. Au total, 385 Tabanidae et 6366 Muscidae furent capturés à partir de 10 pièges H du 16/07 au 31/10/2014. Durant la saison 2015, 5623 Tabanidae et 1480 Muscidae furent récoltés à partir de 9 pièges et du 06/03 au 29/09.
Trois genres de Muscidae, chacun représenté par une seule espèce, furent identifiés. *S.*

calcitrans était le plus abondante au niveau de tous les pièges. L'activité a débuté le 20 avril et s'est terminée le 17 novembre. Le nombre de Muscidae a chuté au cours de la saison 2015.
Cinq genres de Tabanidae furent observés (*Haematopota*, *Chrysops*, *Hybomitra*, *Tabanus*, *Heptotoma*) totalisant 16 espèces déjà décrites en Belgique. *Haematopota* était le genre le plus représenté dans tous les pièges. L'activité a débuté le 18 mai avec un pic d'activité en juin-juillet et s'est terminée le 17 novembre.

Les facteurs climatiques semblent jouer un rôle important sur l'émergence des vecteurs et leur pic d'activité. Ils jouent aussi sur la diversité des espèces et par conséquent sur leur densité apparente.
Les vecteurs furent aussi capturés via des panneaux collants noirs placés à l'intérieur de différents manèges situés en Belgique et ceci du 15/07/2014 au 27/10/2014. Le nombre de Muscidae capturés de cette manière a augmenté au cours de l'été pour décroître à la fin du mois d'octobre. Les Tabanidae ne furent capturés via ce système qu'à Saint Léger avec une nette diminution au cours de l'été. Aucun Tabanidae ou Muscidae ne fut observé à l'intérieur des manèges situés en Flandre.
Ce même dispositif de capture fut maintenu à Chênée (S10) durant l'hiver jusqu'au 29 juin 2015 en vue d'évaluer la persistance et l'émergence des vecteurs potentiels à l'intérieur d'un manège. La dernière mouche piqueuse fut observée le 16 décembre 2014 et la première émergence eut lieu le 15 juin 2015.

Six expériences visant à la collecte directe sur chevaux de Tabanidae furent réalisées durant l'été 2014 (05/08-03/09) au Sart Tilman et 9 essais durant l'été 2015 (30/06-06/08) au même endroit et à Grand Leez en vue d'évaluer le taux de morsure sous différentes conditions. Le nombre de tabanidés se posant sur un cheval placé alternativement à l'ombre et au soleil fut enregistré durant des périodes d'une heure. Ces essais ont démontré que les chiffres enregistrés étaient plus élevés lors d'un maintien au soleil excepté en cas de températures extrêmes. Le taux de morsure par minute fut évalué au soleil et à l'ombre dans différentes localités ; il allait de 0 à 3,5 tabanidés/min.

Une expérience de capture-relâcher a été exécutée en vue d'évaluer les distances sur lesquelles les Tabanidae/Muscidae à jeun ou partiellement gorgés pouvaient voyager afin de trouver un nouvel hôte. Sept essais au total furent réalisés entre le 11/06 et le 26/08/2015. Un total de 2104 *Haematopota* spp. et 5396 *S. calcitrans* furent collectés directement sur des chevaux durant l'été 2015. Une partie des insectes fut maintenue en présence d'une solution sucrée tandis que les autres lots furent partiellement gorgés *in vitro* via le système Hémotek™. Les insectes à jeun ou partiellement gorgés furent marqués avec différentes couleurs et relâchés à des distances croissante d'un cheval jouant le rôle d'appât et entouré d'une ceinture de pièges H.
S. calcitrans furent relâchés sur des distances allant de 25 à 400 m **; pour** *Haematopota spp*. les distances allaient de 50 à 250 m.
Au total, 67 S. calcitrans et 17 *Haematopota* ssp. furent recapturés (taux de recapture allant de 0 à 5%). Pour *S. calcitrans* la distance maximale parcourue était de 150m et 300 pour les mouches partiellement gorgées ou à jeun respectivement. *Haematopota* spp. a parcouru une distance maximale de 100 et 200 m chez les insectes partiellement nourris ou à jeun respectivement. Une régression logistique fut appliqué à ces données en vue de modéliser et extrapoler les résultats. Comme nous étions en présence d'évènements rares (p proche de 0) nous avons utilisé la méthode de Firth dite « penalized likelihood method »

Le modèle a montré pour *S. calcitrans* qu'une mouche non gorgée a une probabilité de 7 pour mille de recapture à 300m ; pour une mouche partiellement nourrie cette probabilité s'applique à 150 m. La probabilité de capture pour un *Haematopota* spp. à jeun à 200m est inférieure à 2 pour mille. Les données disponibles pour ce genre de Tabanidae n'ont pas permis de calculer cette donnée pour les mouches partiellement gorgées.
Globalement la probabilité de recapture et la distance maximale parcourue étaient plus élevées chez les insectes à jeun.

RF 15/6295 PEDetect

Validatie van diagnostische testen voor de detectie en monitoring van het porciene epidemische diarree virus in België

Coördinator:
Prof. Hans Nauwynck (UGent)
Promotor:
Ir. Brigitte Cay (CODA-CERVA)
Onderzoekers:
Dr. Isaura Christiaens (UGent)
Dr. Marylène Tignon (CODA-CERVA)

Toelage: € 149.000
Periode: 1/10/15 - 30/9/2016 (12 maanden)

Onderzoeksresutaten

Het porciene epidemische diarree virus (PEDV) is een intestinaal coronavirus dat aanleiding geeft tot waterige diarree en braken bij varkens. In de jaren '70 werd PEDV voor het eerst gedetecteerd in Europa (inclusief België), maar de impact van deze infecties bleef beperkt tot een aantal kleinschalige uitbraken. Vanaf de jaren '90 verdween PEDV uit Europa (met uitzondering van Italië), maar bleef endemisch aanwezig in Azië. In tegenstelling tot deze historische infecties, werden vanaf 2010 grootschalige uitbraken gemeld in China en vanaf 2013 ook in andere Aziatische landen en in Noord- en Zuid-Amerika, waar PEDV al enorme economische schade heeft aangericht door massale biggensterfte en gewichtsverlies bij mestvarkens. In 2014 werden PEDV infecties ook gemeld in Duitsland en Oekraïne, en sinds januari 2015 werd het virus door het Laboratorium voor Virologie en Dialab voor het eerst opnieuw gedetecteerd op verschillende geografische locaties in België. Om het virus te monitoren en onder controle te houden, moeten we beschikken over betrouwbare en gevalideerde diagnostische testen. Het is echter onduidelijk welke stammen (Amerikaanse? Aziatische? Nieuwe varianten? Verscheidene varianten?) in België circuleren en of de reeds beschikbare moleculaire en serologische diagnostische testen bijgevolg ook geschikt zijn om alle infecties in ons land met grote zekerheid te detecteren. Bovendien is het niet te voorspellen wat de impact zal zijn van deze PEDV infecties in België omdat, ondanks de genetische verschillen tussen oude en nieuwe stammen, niet geweten is of er ook een verschil is in virulentie/infectieverloop. Het PEDetect project beoogde dan ook een antwoord te bieden op deze vragen.

In WP.1 was de doelstelling om een continue cellijn te ontwikkelen die gebruikt kan worden voor de groei van PEDV. Dit zou ons een tool geven om de pathogenese en replicatie van PEDV meer in detail te bestuderen. Alhoewel we succesvol waren in het tot stand brengen van een systeem voor de groei van primaire epitheliale cellen van het ileum en colon, was het niet mogelijk om een productieve infectie te bekomen in deze cellen. Om deze reden hebben we dan ook gebruik gemaakt van celcultuur-geadapteerd virus en Vero-cellen voor de optimalisatie van de serumneutralisatie test. We slaagden erin om een neutralisatie assay op te stellen, en gebruikten deze test om een beperkte set van stalen te analyseren. Doordat deze test zeer arbeidsintensief is, besloten we om niet alle stalen te analyseren. Met onze assay kon slechts een lage titer aan neutraliserende antistoffen gedetecteerd worden. De oorzaak hiervoor ligt wellicht bij de lage sensitiviteit van onze test en meer optimalisatie is dan ook aangewezen

alvorens de test gebruikt kan worden voor routine diagnostiek.

In WP.2 werd een panel van fecale en bloedstalen aangemaakt door experimentele inoculatie van biggen met PEDV. Op verschillende tijdstippen na infectie werden stalen genomen en klinische symptomen werden opgevolgd. Initieel wilden we de vergelijking maken tussen infectie met een recente Belgische stam (2015) en de oude prototype PEDV-stam (1977), maar we slaagden er niet in een infectie tot stand te brengen met de recente stam. Een eerdere studie van Lohse *et al*. (2016), waarin eveneens een recente stam werd gebruikt, gaf reeds gelijkaardige resultaten. Antilichaamtiters en fecale uitscheiding werden een eerste maal bepaald aan de hand van *in house* assays. Vervolgens werden de stalen in WP.3 gebruikt voor de validatie van verschillende commerciële testen.

In WP.3 evalueerden we verschillende diagnostische testen voor hun capaciteit om PEDV te detecteren in feces en serum. Verschillende PCR-methoden en serologische testen werden geëvalueerd en de intrinsieke eigenschappen werden bepaald aan de hand van een collectie stalen afkomstig van enerzijds de experimentele infectie en anderzijds vanuit het veld.
Voor PEDV-detectie via PCR zijn er verscheidene methodes beschikbaar. Eerst werd de lineariteit, efficiëntie en detectielimiet bepaald aan de hand van een standaard RNA, dat werd geëxtraheerd uit een PEDV CV777 virusstock. De real-time (Taqman) PCR-assay toonde de beste analytische sensitiviteit, met een detectielimiet kleiner dan 1 TCID50 en 10^E3 genoom kopieën per µl. In een tweede deel werd de diagnostische sensitiviteit van de verschillende PCR-methoden bepaald. Opnieuw scoorden de real-time (Taqman) PCR-assays sterk met een excellente diagnostische sensitiviteit op 2 panels van stalen afkomstig van enerzijds een experimentele infectie en anderzijds van het veld (Canada). Voor de detectie van antilichamen gericht tegen PEDV testten we enerzijds een *in house* test (IPMA – UGent), een IFA, en verschillende commerciële ELISA-kits. Vergeleken met de IPMA, had de IFA een verminderde sensitiviteit, wat van belang kan zijn wanneer stalen een lagere hoeveelheid aan PEDV antilichamen bevatten. Gebruik makend van een set van veldstalen, stelden we vast dat de IPMA-methode de meest sensitieve methode is voor detectie van PEDV-infectie bij varkens. In geselecteerde en veldstalen vertoonde de Biovet ELISA-kit goede detectieresultaten, maar daarnaast ook een niet verwaarloosbaar aantal aan vals positieve resultaten (negatief in IPMA plus onduidelijk in IFA). Van de twee ELISA-kits scoorde de Biovet ELISA-kit het beste. De IFA-assay zou een alternatief kunnen vormen voor de detectie van PEDV-antilichamen, maar enerzijds is de sensitiviteit van de methode lager dan deze van de IPMA en anderzijds is de methode duur, zeer tijdrovend en niet eenvoudig toepasbaar voor routinescreening.

Uiteindelijk werd de seroprevalentie van PEDV in België nagegaan startend vanaf 2014, voor de eerste uitbraak van PEDV, tot aan eind 2015. Een totaal van 780 stalen werden getest met de IPMA en/of ELISA en/of IFA. Resultaten toonden aan dat de seroprevalentie tussen 2014 en 2015 van nul naar 25,3 percent is gestegen. Dit bevestigt de circulatie en het opnieuw aanwezig zijn van PEDV in België.

Politique sanitaire des végétaux
Plantengezondheidsbeleid

RT 12/08 MONOCHAMUS 1

Étude des populations de *Monochamus* spp. présentes en Belgique en vue d'évaluer leur aptitude à propager le nématode du pin et de développer une stratégie de lutte préventive

Coordinateur :
Prof. Jean-Claude Grégoire (ULB)
Promoteurs :
Dr. Kristiaan Van Laecke (ILVO)
Prof. Martine Maes (ILVO)
Chercheurs :
Dr. Celia Boone (ULB)
Dr. Nick Berkvens (ILVO)
Ir. Hans Casteels (ILVO)
Prof. Nicole Viaene (ILVO)

Subside : € 300.000
Période : 1/1/2013 - 31/12/2015 (36 mois)

Résultats des recherches

L'étude MONOCHAMUS a été menée sur cinq points principaux.

1. La mise au point, le déploiement et l'exploitation d'un réseau de pièges de surveillance (*Monochamus* indigènes et exotiques) basé sur des attractifs de synthèse. Les pièges étaient localisé sur le réseau de surveillance de l'AFSCA et à d'autres points en forêt, près des principales scieries, des ports, des importateurs de bois et d'écorce de pin, des pépinières, des importateurs de matériaux en palettes ...
2. L'établissement d'un réseau de «public awareness» (réseau citoyen), qui constituait un prototype également utilisable pour d'autres organismes de quarantaine, et qui s'appuyait au départ sur des réseaux déjà existants (p. ex. www.waarnemingen.be / www.observations.be) et, plus tard, sur les administrations gestionnaires de la forêt, les administrations communales, les organisations professionnelles, les réseaux scolaires.
3. Le développement d'une procédure de récolte, de comptage et d'identification en routine des insectes et des nématodes transportés par les insectes piégés.
4. Sur base des acquis des points précédents, la mise au point d'une évaluation globale du statut phytosanitaire des *Monochamus* spp. indigènes en Belgique et des risques représentés par les *Monochamus* spp. exotiques. Au-delà des résultats de la surveillance mise en place aux points 1. et 2., cette évaluation s'appuyait sur les modèles climatiques et les modèles de dispersion (nématode et vecteurs) élaborés dans le cadre du projet européen REPHRAME et sur les cartes de distribution existantes relatives aux principales espèces de *Monochamus* spp. exotiques, complétés par des essais propres en moulins de vol et tunnel de vol.
5. Proposition d'un plan d'échantillonnage annuel, et d'un plan d'intervention d'urgence pour les autorités phytosanitaires belges.

Une campagne complète d'information du public a été entreprise sur l'ensemble du pays. Les partenaires du projet ont rejoint le groupe de travail d'alerte précoce développé par l'ANB, l'INBO, Natuurpunt, Aves et Natagora. Toutes les espèces envahissantes constituant un risque pour la Belgique sont mises en évidence et de l'information

est rendue accessible au public via les sections «espèces envahissantes» des sites «waarnemingen.be» et «observations.be». Une fiche technique sur *Monochamus* spp. a été créée en néerlandais et en français et est disponible sur ces sites. Une collaboration a été établie avec l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique (IRSNB/KBIN/RBINS) afin d'identifier les insectes et de contribuer aux sites web en y signalant les captures éventuelles. Différents media, institutions et associations ont été contactées, et des articles ont été publiés dans Knack.be, de Tijd.be, species.be, "verrekijker" de VMM, "ongewervelden.flits" de Natuurpunt, les newsletters de Bos+, Vilt, Velt, les systèmes d'avertissement du PCS et de Phegea.org.

Un réseau de *Crosstraps* téflonées (Econex: Murcie, Espagne) appâtées avec l›attractif *Galloprotect Pack* (SEDQ: Barcelone, Espagne) a été établi dans des peuplements de pins et des zones d'importation à risques partout en Belgique (Flandre: 39; Bruxelles: 4; Wallonie: 36; AFSCA: 10) pendant la saison de vol. En 2013, un total de 6 *Monochamus* adultes (5 *M. galloprovincialis*, 1 *M. sartor*) ont été capturés, la plupart près de la frontière néerlandaise. Aucun nématode n'a été détecté après une inspection menée suivant les prescriptions du protocole EPPO. En 2014, 1 *M. galloprovincialis* a été capturé; aucun nématode n›a été détecté. Diverses autres espèces de Cerambycidae ont été identifiées, parmi lesquelles les plus fréquentes ont été *Arhopalus rusticus*, *Spondylis buprestoides* et *Rhagium inquisitor*. Une collection de référence des Cerambycidae et insectes associés sera maintenue à l'IRSNB.

L'efficacité de différents modèles de pièges et de différentes combinaisons d'attractifs visant à capturer des *Monochamus* spp. a été testée. En outre, l'effet du positionnement en hauteur des pièges a été testé, et l'efficacité des pièges et attractifs européens a été validée aux USA, au Canada et en Chine vis-à-vis des espèces nord-américaines et asiatiques du genre *Monochamus*. La méthode de capture «sous liquide» basée sur l'utilisation de monoéthylène glycol (MEG) dans les récipients collecteurs a été testée en ce qui concerne son impact sur la détection et l'identification de *Bursaphelenchus xylophilus.* Un plan d'échantillonnage annuel a été proposé, et différents scenarii ont été développés en vue de l'établissement d'un plan d'intervention d'urgence.

RF 12/6264 DEVIRGENCY

Detectie van lage besmettingsdichtheden, kennis van virulentiegroepen en generatietijd van aardappelcysten (*Globodera* spp.) als tools voor inperking van aardappelmoeheid

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotoren:
Dr. Martine Gadenne (CARAH)
Dr. Jean Pierre Destain (CRA-W)
Dr. Bruno Gobin (PCA)
Dr. Mia Demeulemeester (Inagro)
Onderzoekers:
Prof. Nicole Viaene (ILVO)
Prof. Wim Wesemael (ILVO)
Dr. Déborah Lanterbecq (CARAH)
Dr. Michel De Proft (CRA-W)
Ir. Marc Goeminne (PCA)
Ir. Kürt Demeulemeester (Inagro)

Toelage: € 350.400
Periode: 1/1/2013 - 31/12/2015 (36 maanden)

Onderzoeksresultaten

In WP1 werd nagegaan of het bemonsteren van restaarde evenwaardig is aan veldbemonstering voor detectie van aardappelcysten in een veld. Bemonstering van aarde die meekomt met het geoogst product na de teelt is uitvoerbaar door de teler of aardappelverwerker en leverde inderdaad betrouwbare informatie op qua detectie van cysten in het corresponderend perceel, zelfs per teeltstrook. Dit zowel bij lage als bij hogere besmettingsniveaus, na de teelt van een vatbaar of resistent ras. Bij resistente rassen waren de aantallen cysten wel lager dan via veldbemonstering. Correcte traceerbaarheid is hierbij echter cruciaal (bijv. GPS, tracking). Het verzamelen van de aanhangende grond aan knollen (door afborstelen) was niet beter dan het nemen van restaarde en meer arbeidsintensief. Deze relatief gemakkelijk manier van monsters nemen kan telers ertoe aan zetten om vlugger de toestand van hun veld inzake aaltjesbesmetting op te volgen en daarna de juiste maatregelen in te zetten.

De evaluatie van de virulentie van 16 Belgische *Globodera rostochiensis* populaties (WP2) toonde aan dat deze behoren tot het pathotype Ro1/Ro4, het meest voorkomende pathotype in Europa en gemakkelijk te beheersen gezien het grote aanbod Ro1/4-resistente aardappelrassen. De vermeerdering van cysten uit 21 *G. pallida* populaties varieerde van heel laag tot bijna zo hoog als de virulente referentiepopulatie Chavorney. Een 4-tal populaties die goed vermeerderden op de partieel resistente rassen Santé of Innovator worden best opgevolgd. Het is niet heel duidelijk of de hoge virulentie teweeg gebracht werd door het herhaald vermeerderen van de cysten in potten, voorafgaand aan de virulentietoets. Daarom is het aanbevolen om de populatiedynamiek (aantallen, soort cysten) verder op te volgen in de corresponderende velden gedurende opeenvolgende aardappelteelten.

Nieuwgevormde cysten konden worden onderscheiden van oude cysten op basis van

hun dichtheid en hun totale inhoud, niet op basis van kleur (WP3). Bij extractie met de Seinhorstkan bleek dat het verzamelen van de cysten uit de onderste opening van de Seinhorstkan voldoende was om via inhoudsbepaling nieuwe cysten te detecteren (dus onnodig alle cysten via opening bovenaan de kan te verzamelen). Sommige cysten die zonken bleken echter toch lege cysten te zijn. Het is daarom niet voldoende om enkel het zinken/drijven-onderscheid als criterium voor de aanwezigheid van nieuwe cysten te hanteren, inhoudsbepaling blijft noodzakelijk. Vraag is vanaf welke inhoud een cyste als nieuw gevormd kan worden beschouwd. De vergelijking tussen begin- en eindpopulatie na een teelt is arbeidsintensief en de hier voorgestelde techniek kan een alternatief zijn om nieuwgevormde cysten vlug op te sporen.

Het opvolgen van de generatieduur van *G. rostochiensis* en *G. pallida* om na te gaan of cysten kunnen gevormd worden voor 20 juni (WP4), werd uitgevoerd in potproeven in de groeikamer, in microplots en in het veld. Er werd aangetoond dat er inderdaad cysten worden gevormd voor deze datum (22 mei tot 15 juni, afhankelijk van de proef). Jaarlijks telen in besmette velden is dus niet goed, ook al worden de knollen vroeg geoogst: de populatie cysten neemt toe, reeds voor 20 juni. Dit was het geval voor *G. pallida* en *G. rostochiensis*, de geteste populaties en ongeacht het (vatbare) aardappelras. Een aanpassing van de regelgeving hierover is dus aanbevolen.

RT 13/05 HARMVECT 1

Risico voor de veiligheid van de voedselketen op introductie van schadelijke insecten en ziekte overdragende vectoren via het internationaal verkeer

Coördinator:
Prof. Dirk Berkvens (ITG)
Promotoren:
Prof. Maxime Madder (ITG)
Dr. Tanguy Marcotty (ITG)
Dr. Kristiaan Van Laecke (ILVO)
Prof. Martine Maes (ILVO)
Onderzoekers:
MSc. Famke Jansen (ITG)
Dr. Nick Berkvens (ILVO)
Ir. Hans Casteels (ILVO)

Toelage: € 250.000
Periode: 1/11/2013 - 31/10/2016 (36 maanden)

Onderzoeksresultaten

Gedurende het eerste jaar heeft HarmVect in de eerste plaats gegevens verzameld, die gebruikt werden bij het uitwerken van het generische model. Gedurende het tweede en het derde jaar werd het model ontwikkeld, vertrekkende vanuit een nieuwe invalshoek.

a. **Werkpakket 1**: een inventaris van de gekende potentiële introductiekanalen, een inventaris van de functionele eigenschappen die belangrijk zijn voor de succesvolle introductie alsmede de ecologische parameters die een rol kunnen spelen bij de invasie/vestiging van invasieve arthropoden en een overzicht van de ontwikkelde detectie/preventie/controletechnieken/methoden/systemen werden opgesteld.

b. **Werkpakket 2**: de Belgische territoriale introductiepunten van derde landen en EU lidstaten werden opgelijst. De gemiddelde invoer van levende dieren, planten, groenten en fruit werden berekend. De aantallen passagiersverplaatsingen werden bekomen en voor specifieke risicogoederen werden de transportgegevens verzameld. De uitvoerige beschrijving van de levenscyclus (inclusief functionele eigenschappen), gastheerspectrum, natuurlijke vijanden, verspreiding, insleep-historiek, risico's voor volksgezondheid en voedselveiligheid, insleepkanalen, controle en monitoring en Europese interceptie gegevens van de tien doelorganismen werd aangemaakt. Het Belgische leger kan geen informatie verschaffen betreffende terugkerend militair vervoer. De gemiddelde klimaatgegevens over de laatste tien jaar werden bekomen via de Global Climate Data website (www.worldclim.org). Via het FAVV werden de perceelgegevens bekomen die informatie bevatten over het landgebruik in België.

c. **Werkpakket 3**: het model, inclusief de gebruikersinterface, werd opgesteld. Definities van termen gebruikt in het model werden nauwkeurig uitgewerkt. De beschrijving en opsomming van de modelparameters werden opgelijst en gedetailleerd uitgewerkt voor de 10 modelsoorten: *Aedes albopictus, Culicoides imicola, Anopheles gambiae, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Dermacentor reticulatus, Tuta absoluta, Bemisia tabaci, Thrips palmi, Drosophila suzukii* en *Tephritidae* spp.

d. **Werkpakket 4**: een generisch model om risicokaarten te creëren voor het insleepvermogen van schadelijke invasieve arthropoden tot België werd ontwikkeld met de bibliotheek Shiny in RStudio©. Deze software laat toe een interface op te bouwen welke gebruiksvriendelijk en informatief is voor de gebruiker. Via de verschillende onderdelen van de interface worden alle betrokken insleepkanalen opgedeeld tot hun kleinst mogelijke individuele segmenten.
In een eerste deel van het model moet aangeduid worden in welke landen de desbetreffende arthropode aanwezig is en welke goederen geassocieerd worden met de arthropode (bv. Lucky bamboo voor *Aedes albopictus*, tomaten voor *Tuta absoluta*).

In een volgende stap worden de functionele kenmerken van het organisme, die een invloed kunnen hebben op de overleving tijdens het transport, ingevuld. Vanuit deze gegevens worden 3 tabellen gegenereerd:

- als eerste ontstaat er een trade-tabel, waarin voor elk aangegeven verhandeld goed per land de volgende waardes ingevuld moeten worden door de gebruiker:
  de "infestation rate" in het land van oorsprong, de hoeveelheid van het verhandeld goed dat per jaar België binnenkomt en een verdeelsleutel voor de insleeproutes langs dewelke het verhandelde goed België binnenkomt (lucht, zee, spoorweg, autostrade, waterweg en post) met hun bijhorende detectiekans
- een tweede tabel die gegenereerd wordt, is de transfer-tabel, waarin dezelfde waarden ingevuld moeten worden voor toerisme, commuting en military
- in de derde tabel wordt van elk verhandeld goed, inclusief non-host cargo, toerisme, commuting en military, gevraagd om de karakteristieken van de pathway in te vullen (minimum temperatuur, maximum temperatuur, minimum relatieve vochtigheid, maximum relatieve vochtigheid en lichtregime) voor de verschillende insleeproutes.

Om de gebruiksvriendelijkheid en werkbaarheid van het model goed te laten verlopen wordt de structuur van elk van de drie tabellen (en de hierna volgende tabellen) automatisch gegenereerd en opgeslagen als .txt file. Hierdoor kan te allen tijde verder aan de casus gewerkt worden of kunnen bepaalde "insleep"situaties gemakkelijk gesimuleerd worden door snel enkele waarden in de tabellen aan te passen. Voor het invullen van de tabellen wordt aangeraden de files in Excel te openen en hierin te werken.

In een volgende stap worden de drie aangemaakte tabellen automatisch ingeladen in het programma en worden de "propagule pressures", indicatoren voor het insleeprisico, berekend voor de trade en transfer insleepkanalen tot België, alsook de propagule pressure per verhandeld goed voor de verschillende insleeproutes. Deze laatste propagule pressures worden vervolgens verder verdeeld via in te geven en door het model automatisch gegenereerde verdeelsleutels van de verhandelde goederen voor alle "points of entry" (POE) van België. Deze POE zijn alle luchthavens, havens, binnenhavens, verdeelcentra van de post, treinstations waar treinen vanuit het buitenland aankomen en grensposten waar autostrades België binnenkomen. De finale propagule pressures worden per geografsche eenheid (gemeente) gesommeerd en deze gesommeerde waarden worden gevisualiseerd op de POE insleep-risico kaart voor België. Deze POE kaart kan aangemaakt worden voor de luchthavens, de havens, de binnenhavens, de verdeelcentra, de treinstations, de autostrades of elke mogelijke combinatie hiervan. In dit model wordt dus rekening gehouden met insleep via elk mogelijk segment van elk bestaand introductiekanaal gekwantificeerd als een risico-index, dewelke bepaald wordt door een combinatie van de grootte van de transportstroom, de karakteristieken van de insleeproute en de functionele eigenschappen van de arthropode. Indien nodig,

kan via het onderdeel "Import" ingegeven worden hoeveel arthropoden ingevoerd worden in België voor bv. wetenschappelijk onderzoek of biologische bestrijding. Het tabblad "Natural spread" laat toe dat arthropoden met gevestigde populaties op een relatief korte afstand van België en met een groot verspreidingsvermogen, op eigen kracht België kunnen bereiken en een risico kunnen vormen. Beide gegevens worden als tabellen opgeslagen onder .txt format. Indien deze files aangemaakt werden, worden deze automatisch toegevoegd aan de berekeningen voor de POE kaart. Vanuit de POE hotspots is een verdere verspreiding van de geïnfesteerde transportkanalen doorheen België mogelijk, bv. via containers die niet aan de POE geopend worden wegens het ontbreken van phytosanitaire controles of goederen verhandeld binnen de EU. Daarom werd het nodig geacht bijkomend een "points of appearance" (POA) insleep-risico kaart op te stellen. Op deze kaart worden de daadwerkelijke plaatsen waar de invasieve arthropode vrijkomt in België geïllustreerd met de bijhorende risico-index d.m.v. een door de gebruiker in te voeren verdeelsleutel. De verdeling gebeurt volgens een combinatie van bevolkingsdichtheid (bv. verspreiding van *Ae. albopictus* via toerisme) en specifieke gemeentes belangrijk voor de arthropode (bv. vroegmarkt in Brussel voor plantschadelijke arthropoden of gemeentes waar bandenbedrijven gesitueerd zijn voor *Ae. albopictus*). Vanuit deze POA (welke eveneens POE kunnen zijn) kan in het model een verdere migratie van de arthropode gesimuleerd en in kaart gebracht worden door de natuurlijke verspreidingsfunctie in het model aan te geven. Indien de arthropode verspreid kan worden via auto- en vrachtwagenverkeer, kunnen ook gegevens over autostrades en rustplaatsen toegevoegd worden. Om na te gaan of de arthropode zich ook zou kunnen vestigen in de gemeentes waar hij volgens de POA kaart kan opduiken, worden 3 vestigingskaarten aangemaakt. Als eerste wordt automatisch een klimaatgeschiktheidskaart gegenereerd a.d.h.v de ingegeven functionele traits van de arthropode en de klimaatgegevens. Hierna kan een gastheerdistributiekaart aangemaakt worden met behulp van de gegevens over perceelgebruik. Ook kan aangegeven worden of de mens een geschikte gastheer is voor de arthropode in kwestie. Als laatste kan een beschutte omgevingskaart aangemaakt worden, die aangeeft in welke gemeentes de arthropode binnenshuis zou kunnen overleven, bv. in serres.

Deze drie kaarten worden gecombineerd met de POA kaart om een uiteindelijke risico kaart te verkrijgen. De insleepkaarten tonen de meest geschikte locaties voor de implementatie van monitorings- en bestrijdingssystemen. Waar het oorspronkelijk de bedoeling was om via waarschijnlijkheidsverdelingen over de onderscheidene inputs een probabiliteitskaart te genereren voor het insleeprisico, werd zeer snel duidelijk dat de onzekerheden zo groot waren dat het resultaat uiteindelijk meestal een random kaart (uniform of Poisson) zou worden. Daarom werd besloten om de gebruiker toe te laten om op eenvoudige wijze één of meerdere parameters te laten variëren en aldus via scenario-analyse het resultaat visueel te evalueren. De insleep-risico kaarten tonen aan dat de hoogste detectiekans nog steeds in de meeste gevallen ligt aan de POE en dat de beheersmaatregelen daar best geconcentreerd worden. Deze vaststelling is gedeeltelijk te wijten aan de grotere onzekerheid die bestaat voor de intra-België verdeling van de potentieel besmette goederen; hieromtrent bestaan momenteel weinig betrouwbare gegevens. Het genereren van deze informatie is een belangrijke stap in het gericht opstellen van beheerssystemen voor besmette goederen bij intra-Europese handel, aangezien deze laatste ontsnapt aan POE interventies. Het model toont eveneens aan dat manipulatie van abiotische factoren tijdens transport de overlevingskansen van de invasieve arthropoden sterk kunnen verminderen (bv. opnieuw invoeren van sub-zero temperaturen in de vrachtruimte van vliegtuigen). Tevens is gebleken dat (waar mogelijk) een herinvoering of uitbreiding van quarantaine voorzieningen en/of verhoging van de inspectiecapaciteit in de POE een meer dan lineair effect tot gevolg heeft. Naar het

voorbeeld van verscheidene andere Europese lidstaten dient overwogen te worden om een geïntegreerd systeem van monitoring/bewaking te ontwikkelen. Hierbij worden actieve en passieve gegevensverzameling gecombineerd met een quasicontinue analyse/visualisatie alsmede een terugstroom van informatie en sensibilisering.

e. **Werkpakket 5**: de ontwikkelde code, inclusief een gebruikersmanual wordt beschikbaar gesteld voor geïnteresseerde partijen na toestemming van FOD VVVL. Twee workshops werden georganiseerd op het FAVV (29/09/2016 en 05/10/2016). Tijdens deze sessies werd de tool uitgelegd en aangeleerd aan de FAVV experten, met het doel kritische feedback te krijgen en de bruikbaarheid van de tool te toetsen. Bij de laatste werd bovendien gepolst waar, op welke manier en met welke betrouwbaarheid data kunnen verzameld worden (binnen de FAVV instanties) om het model te voeden.

De verwezenlijkingen van het project werden voorgesteld op de tweejaarlijkse ESOVE (European Society for Vector Ecology) conferentie in Lissabon (03 - 07/10/2016) en op de Joint EFSA-EPPO Workshop: "Modelling in Plant Health - how can models support risk assessment of plant pests and decision-making?" gehouden in Parma (12 - 14/12/2016). Bijkomend werd het model voorgesteld tijdens de tiende "EFSA Scientific Network on Risk Assessment in Plant Health" sessie in Brussel (24/05/2016) en de EC BTSF Workshop on New and Emerging Risks in Plant Health in Grange (05 - 07/07/2016).

RT 13/06 POWADIS 1

Evaluatie van de risico's van de introductie en de verspreiding van de wratziekte (*Synchytrium endobioticum*) in België en aanbevelingen voor bestrijdingsmaatregelen

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotor:
Dr. Mia Demeulemeester (Inagro)
Onderzoekers:
Dr. Kurt Heungens (ILVO)
Ir. Kürt Demeulemeester (Inagro)

Toelage: € 172.307
Periode: 1/9/2013 - 29/2/2016 (30 maanden)

Onderzoeksresultaten

Wratziekte bij de aardappel is een ernstige quarantaine ziekte die wordt veroorzaakt door de schimmel *Synchytrium endobioticum*. In België werd de aanwezigheid van wratziekte nog niet bevestigd. Tot 2011/2012 werd de ziekte vastgesteld op minstens 50 km van de Belgische grens, maar door een nieuwe vondst in Nederland (Bergeijk) op slechts 5 km van de Belgische grens is het gevaar voor insleep in België aanzienlijk verhoogd.
Naar aanleiding van deze evolutie werden in het POWADIS project drie objectieven geformuleerd. Een eerste was om het risico voor insleep in België beter te kunnen inschatten en beheersopties te onderzoeken.
Een tweede was om over gevalideerde protocollen te beschikken om

- **de pathogeen zo efficiënt mogelijk op te kunnen sporen in grond en aardappelknollen,**
- *S. endobioticum* **te kunnen karakteriseren qua pathotype (zowel via biotoets als via een moleculaire methode) en**
- **resistentietoetsen te kunnen uitvoeren op specifieke aardappelrassen.**

Een derde en laatste objectief was om de status in de risicozone grondiger te gaan bepalen en om optimale maatregelen voor afbakening en inperking te ontwikkelen.

Met betrekking tot het eerste objectief besluiten we dat de belangrijkste risicofactor voor insleep in België de gecontamineerde grond is die via landbouwwerktuigen die langs beide kanten van de grens actief zijn, verspreid kan worden. De regio Postel/Lommel/Mol is een risicozone, maar het is niet mogelijk om een goed beeld te krijgen van de bewegingen van landbouwvoertuigen tussen besmette Nederlandse percelen en België waardoor het moeilijk is om in te schatten in welke mate de kans verhoogd is. Het risico van andere insleeproutes (o.a. via besmet pootgoed) is kleiner, en is niet hoger voor bepaalde regio's. Mocht er toch insleep zijn in België dan is de kans op vestiging zeer reëel in gans België omwille van de geschikte klimaatomstandigheden en bodemcondities en de aanwezigheid van vatbare rassen zoals Bintje, vooral dan in Limburg, Waals Brabant en Henegouwen. Indien de pathogeen zou inslepen in België dan zou verdere verspreiding voornamelijk kunnen gebeuren met pootgoed en met besmette grond, maar bij het in voege treden van de wettelijke inperkingsmaatregelen is de kans daartoe ook beperkt. Deze verplichte maatregelen omvatten het instellen

van een bufferzone met daarin het verplicht gebruik van resistente rassen tegen het betreffend pathotype. Extra maatregelen zoals het instellen van een uitgebreider veiligheidszone worden aangeraden. Maatregelen om de wintersporen in de grond af te doden lijken niet haalbaar of zijn weinig doeltreffend, behalve mogelijks het gebruik van een chitinerijk bodemadditief.

Het tweede objectief omvatte het evalueren van een aantal technieken voor detectie en karakterisering van *S. endobioticum*. Het opsporen in aardappelweefsel via microscopische en moleculaire methoden staat op punt en dit werd onder andere aangetoond in een internationale *test performance study* (TPS) in ILVO. De technieken werden ook aangewend om definitief aan te tonen dat een Belgisch aardappelstaal met wratten eigenlijk enkel *pseudowarts* betrof (een fysiologische afwijking).
Voor het opsporen van *S. endobioticum* in grond werd een zeer goede methode uitgewerkt die bestaat uit extraheren van de duursporen (winter-sporangia) uit de grond met de zonale centrifuge, en kwantificering van die sporen via DNA extractie met de Mobio Soil Extraction kit en een qPCR assay van Smith *et al.* (2014). Deze methode bleek specifiek, toepasbaar op verschillende types grond, kwantificeerbaar in een bereik van 2 tot 2000 wintersporangia, toepasbaar op relatief grote stalen (100 g grond), herhaalbaar (lage variatie) en gevoelig (tot 0,02 duursporen per gram grond). Ondertussen werd de methode ook met succes toegepast op natuurlijk geïnfecteerde grond (uit Denemarken).
Met betrekking tot de karakterisering van isolaten, en specifiek de pathotypering, bleek de biotoetsmethode volgens Glynne-Lemmerzahl arbeids- en tijdsintensief en vereist ze een aanzienlijk niveau van expertise en het in stand houden van een collectie referentie-isolaten. Een meer geschikte screeningstest voor de bepaling van de gevoeligheid van aardappelrassen voor specifieke pathotypes zou kunnen bestaan uit de methode van Browning and Darling. Deze methode combineert een aantal van de voordelen van de Glynne-Lemmerzahl en de Spieckerman methodes en zou geschikt kunnen zijn voor implementatie in België. Preliminaire testen waren echter niet succesvol, ondanks herhaalde pogingen en aantoonbare kieming van de duursporen. Daardoor werden ook verder geen aardappelrassen getest. Voor de bepaling van het pathotype is de qPCR methode specifiek voor de detectie van pathotype 1 echter wél toepasbaar. Deze test is eenvoudig en veel sneller dan de biotoetsen. Validatie gebeurde via succesvolle deelname aan een internationale TPS. Ondertussen werden ook bijkomende moleculaire merkers gepubliceerd, weliswaar nog niet voor alle pathotypes.

Het derde en laatste objectief betrof in eerste instantie de evaluatie van surveymethodes om de status in de risicozone beter te kunnen opvolgen. Een survey via controle van symptomen op knollen is het meest relevant maar is logistiek moeilijk. Daarnaast kunnen grondstalen geanalyseerd worden op aanwezigheid van duursporen. Dit werd in samenwerking met het FAVV ook effectief uitgevoerd: de geoptimaliseerde methode (en een vroegere versie er van) werd in 2015 toegepast op 41 grondstalen en in 2016 op 50 grondstalen uit de Belgische risicozone nabij het Nederlandse Bergeijk. Er werd geen *S. endobioticum* vastgesteld. Het is aangewezen deze surveys te focussen op percelen met een verhoogd risico. Dit blijkt in de praktijk echter moeilijk haalbaar.
Ook maatregelen voor het afbakenen en inperken werden bekeken. Voor het demarkeren van de besmetting moeten grondstalen geanalyseerd worden van de betreffende en omringende percelen. De methode hiervoor is nu dus beschikbaar en een voorstel voor de manier van staalname werd geformuleerd. Wettelijke maatregelen voor inperking en een voorstel voor bijkomende maatregelen werden voornamelijk onder het eerste objectief opgesomd.

RT 13/07 NEMASPREAD 1

Onderzoek naar quarantaine nematoden in nevenstromen: risico op verspreiding en mogelijkheden tot preventie

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotor:
Dhr. Romain Cools (Belgapom/Vegebe)
Onderzoeker:
Prof. Wim Wesemael (ILVO)

Toelage: € 199.999
Periode: 1/1/2014 - 31/12/2015 (24 maanden)

Onderzoeksresultaten

De aardappelcystenematoden *Globodera rostochiensis* en *G. pallida* en de wortelknobbelnematoden *Meloidogyne chitwoodi* en *M. fallax* zijn quarantaineorganismen binnen de EU. In België zijn aardappelcysten aanwezig in regio's die belangrijk zijn voor de aardappelteelt. Dit geldt ook voor *M. chitwoodi* en *M. fallax* in zowel aardappel- als groentenregio's. De verspreiding van *M. chitwoodi* en *M. fallax* is echter nog beperkt. Passieve verspreiding met besmette grond, (afval)water en geïnfecteerde plantendelen vormen een risico. Om dit risico beter te kunnen inschatten en efficiënte maatregelen te ontwikkelen om het te beperken, werd onderzocht in welke mate quarantainenematoden aanwezig zijn in nevenstromen van aardappel- en groentenverwerking, hoelang quarantainenematoden kunnen overleven in waswater en restaarde en welke behandelingsmethoden van afvalstromen afdoende zijn om quarantainenematoden te doden.

Een beperkte survey bij aardappel- en groentenverwerkers toonde aan dat quarantainenematoden aanwezig kunnen zijn in de afvalstromen. Voor de verdere verspreiding vormt vooral de restaarde een gevaar, te meer omdat *Globodera* spp. en *M. chitwoodi* en *M. fallax* langere tijd kunnen overleven zonder waardplant. Zeef- en sorteergrond wordt in de mate van het mogelijke terug meegegeven met de teler. In de praktijk is het onmogelijk te garanderen dat de teler enkel eigen grond terug meekrijgt.

Wanneer eipakketjes van *M. chitwoodi* en *M. fallax* na 24 weken bewaring in vochtige grond werden geïncubeerd in water bij 20°C bleek de overleving van zowel de eerste als tweede generatie hoog te zijn. In uitdrogende grond was de overleving van eipakketjes beperkt vanaf 12 weken. Inundatie had een duidelijk effect op de overleving van *G. rostochiensis*, *M. chitwoodi* en *M. fallax*. Dit effect kon worden versneld en versterkt door de toevoeging van verse en gestoomde aardappelschillen en het groene gedeelte van prei. Wanneer zowel *Globodera* als *M. chitwoodi* en *M. fallax* aanwezig zijn in restaarde dient 6 weken te worden geïnundeerd om meer dan 99% doding te verkrijgen op voorwaarde dat voldoende organisch materiaal met de grond wordt gemengd. Indien enkel *Globodera* aanwezig zijn kan dit worden verkort tot 4 weken. Behandeling van water met chloor (6-15%) was effectief om J2 van *M. chitwoodi* en *M fallax* te doden. Voor eitjes beschermd in een eipakketje en cysten van *G. pallida* en *G. rostochiensis* was 30' in chloor niet voldoende. Tijdens de hittebehandelingen bleek dat *M. chitwoodi* en *M. fallax* beter overleven dan eipakketjes in vergelijking met infectieuze J2 en dit

zowel in water als in grond. Minimum 60°C gedurende 60′ was noodzakelijk om *M. chitwoodi* en *M. fallax* te doden. UV-behandeling gedurende 30′ bleek afdoende om J2 van *M. fallax* en *M. chitwoodi* te doden in helder water. Voor eipakketjes was de UV-behandeling niet effectief.

Telen op percelen die vrij zijn van quarantainenematoden en het verminderen van de grondtarra bij de oogst kunnen verspreiding helpen voorkomen. Preventieve bemonstering van percelen wordt echter belemmerd door de meldingsplicht en de maatregelen die worden opgelegd bij aanwezigheid van quarantainenematoden. Dit is vooral voor *M. chitwoodi* en *M. fallax* het geval. Bestaande zuiveringsinstallaties en afvalverwerking zoals vergisting en bezinkingsbekkens bieden reeds een oplossing. Regelmatige controle van de processen moet uitsluiten dat besmettingen alsnog op landbouwpercelen terecht komen. Bij de verwerkende industrie is de bereidwilligheid om mee te werken aan praktische en economisch haalbare oplossingen zeker aanwezig.

RT 13/08 STATUSQ 1

Fytosanitaire status van schadelijke organismen voor planten en plantaardige producten in België

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotor:
Prof. Dany Bylemans (pcfruit vzw)
Dr. Bernard Watillon (CRA-W)
Onderzoekers:
Prof. Nicole Viaene (ILVO)
Dr. Kris De Jonghe (ILVO)
Ir. Hans Casteels (ILVO)
Dr. Tim Beliën (pcfruit vzw)
Mevr. Gertie Peusens (pcfruit vzw)
Ir. Christiane Fassotte (CRA-W)
Ir. Stephan Steyer (CRA-W)

Toelage: € 299.079
Periode: 1/1/2014 - 31/12/2015 (24 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het project STATUSQ genereerde gegevens over het voorkomen binnen België van een reeks schadelijke organismen met een quarantaine- of alert status. Er werden 4 virussen, 3 nematoden en 4 insecten bestudeerd met mogelijks belangrijke impact in, afhankelijk van het organisme, de teelt van palmen, groenten, sierplanten in kas, in druiventeelt en walnoten. Deze informatie kan aangeven of een PRA gewenst is en tevens een beslissing over de nodige controlemaatregelen ondersteunen. Voor de verschillende organismen werd op basis van de beschikbare literatuur en een survey de status weergegeven. Voor bepaalde organismen werd beperkt aanvullend onderzoek voorzien, met als doel enkele belangrijke geïdentificeerde lacunes in instrumentarium of kennis op te vullen.

De bestudeerde virussen zijn het *Arabic mosaic virus* (ArMV), *Tomato black ring virus* (TBRV) en het *Little cherry virus* (LChV 1 en 2). De virussen ArMV en TBRV zijn beide nematoden-overdraagbaar en hebben een vrij gelijkaardig waardplantenbereik. De kleinkersigheidsziekte, veroorzaakt door LChV 1&2, is een gevreesde ziekte in de kersenteelt. Alle virussen zijn aanwezig in Europa en zijn ook in België gemeld, maar hun exacte status was voorheen niet gekend.

Twee van de 3 nematoden zijn de sterk verwante *Ditylenchus dipsaci* en *D. destructor* die een zeer gelijkaardige uitgebreide waardplantenreeks hebben. Ze werden nog zelden gesignaleerd en hun huidige verspreiding was onbekend. Diverse moleculaire methoden om beide soorten te onderscheiden zijn beschreven, maar dienden geëvalueerd te worden. De derde nematode is de warmteminnende *Radopholus similis*, ongevaarlijk voor de Belgische landbouw, behalve voor sierteelt in kas. In EU verband is dit wel een belangrijke nematode voor mediterrane teelten. Er waren geen gegevens over de status in ons land.

De palmmot *Paysandisia archon* kan voor problemen zorgen in de teelt van palmen; de katoenuil *Spodoptera littoralis* kan problematisch zijn in de groenteteelt en sierteelt in kas. *Viteus vitifoliae* en *Rhagoletis completa* kunnen na insleep mogelijks een bedreiging vormen voor respectievelijk de druiventeelt en de walnoten in ons land.

WP 1. Virussen (Arabic mosaic virus, Tomato black ring virus en Little cherry virus)
Er werd een overzicht gemaakt van de belangrijkste detectiemethoden voor ArMV, TBRV en beide Little cherry virussen1 &2. De meest relevante testen werden in het labo geverifieerd en enkel voor beide LChV testen was een aanpassing voor de beschikbare testen noodzakelijk. Een aangepast extractieprotocol voor *Prunus* plantenmateriaal, gevolgd door de endpoint RT-PCR methode van Bajet et al. (2008; detectie van LChV1) en de real-time PCR methode van Jelkmann et al. (2008 ; detectie van LChV2) werden gebruikt als standaard analysemethoden in het project.

In de literatuur kwam hop naar voor als een belangrijke waardplant voor ArMV. Echter, in de hopteelt in België werd in de 1060 geanalyseerde monsters geen ArMV aangetroffen. Ook in druif (969 monsters) waren alle testen negatief. Zowel TBRV als ArMV werden in het geheel niet aangetroffen op ons grondgebied.

Voor de LChV virussen werd een uitgebreide survey verricht, zowel in Vlaanderen als in Wallonië. De staalnames focusten vooral op de provincies Limburg en Vlaams-Brabant (waar ook het overgrote deel van de commerciële kersenteelt plaatsvindt), maar er waren ook staalnames in de provincies Antwerpen, Luik, Henegouwen, Oost- en West-Vlaanderen. Beide LChV virussen 1&2 werden heel wijdverspreid aangetroffen in de regio van de commerciële kersenteelt (Limburg, Vlaams-Brabant). Er werd ook een oproep gedaan om kersenstalen uit privétuinen binnen te brengen voor analyse, en ook laanbomen en andere Prunus bomen in openbare ruimten werden bemonsterd. Ook in deze stalen werden beide virussen regelmatig aangetroffen. De survey was voor een groot deel gebaseerd op symptomen waardoor het moeilijk is om percentages aantastingsgraad weer te geven. Van beide virussen werd LChV2 het meest aangetroffen in de monsters. Ook LChV1 komt echter algemeen en in hoge mate voor in onze kersenteelt. Beide virussen zijn in alle bemonsterde provincies ruim verspreid aanwezig. In totaal werden voor STATUSQ bijna 900 monsters in de commerciële kersenteelt geanalyseerd. Verder werden nog eens 209 monsters in bomen buiten de commerciële teelt (laanbomen, privétuinen), waarvan 173 sier-*Prunus* bomen bemonsterd en getest.

Conclusie over de status van TBRV en ArMV in België: afwezig.

Conclusie over de status van LChV1&2 in België: algemeen verspreid, gevestigd.

WP 2. Nematoden (Ditylenchus dipsaci, D. destructor en Radopholus similis)
Het stengelaaltje *Ditylenchus dipsaci* en het destructoraaltje *D. destructor* zijn beide quarantaine-organismen. Er werden informatiefiches over de aaltjes gestuurd aan organisaties en individuen, vnl. groothandelaars en telers van diverse waardplanten. De daaropvolgende survey (430 stalen) op 35 bedrijven (biet, aardappel, prei, aardbei, bloembollen, wortel) leverde enkele positieve gevallen op voor *D. dispaci.* Het stengelaaltje werd aangetroffen in suikerbiet (2 plaatsen), in de sierplanten Phlox en Astrantia (1 bedrijf) en in tulp (1 veld). Identificatie gebeurde zowel morfologisch als moleculair (met soort-specifieke PCR en sequenering), rekening houdend met de twee onlangs beschreven nieuwe soorten, nl. *D. gigas* en *D. weischeri*, die vroeger als *D. dipsaci* werden aanzien. De bevindingen bevestigen de status van deze aaltjes in de EU die beschreven wordt als sporadisch aanwezig, maar potentieel heel schadelijk wegens

groot aantal waardplanten. Hun import en verspreiding, vnl. via zaden, blijft dus best gemonitord.

Conclusie over de status van *D. dipsaci*: aanwezig, en status *D. destructor*: afwezig.

Radopholus similis, het wortelnecroseaaltje, staat ook op de EU-quarantainelijst wegens zijn grote schadepotentieel voor citrus en banaan. In België kan dit tropisch aaltje in de sierteelt de wortelgroei beperken van o.a. palm, banaan, Calathea en citrus. Aangetaste planten kunnen bijdragen in de verspreiding van de nematode via aangetaste wortels en grond. In de survey, uitgevoerd bij 7 bedrijven, werden 82 grond- en wortelstalen genomen, maar is de nematode niet vastgesteld.

In het labo werden de mogelijkheden voor moleculaire identificatie van *R. similis* onderzocht. Hiervoor verzamelden we 10 populaties uit 5 landen (Uganda, Tanzania, Costa Rica, USA, Nederland). DNA-barcoding via de procedure in Q-Bank en via GenBank gaf geen goede resultaten omdat de aanbevolen primers (COI-gen, ITS regio) niet ideaal bleken, alsook ook door de slechte kwaliteit van het nematoden-DNA. Ook waren niet alle *R. similis* sequenties opgenomen in QBank en Genbank. Een niet-gepubliceerde, commercieel verkrijgbare soort-specifieke qPCR kit gaf enkele vals negatieve en vals positieve (*R. duriophilus)* resultaten. Er is voor *R. similis* dus nog geen ideale moleculaire identificatiemethode. De nematode is echter geïntercepteerd in de EU in stekken van sierplanten en blijkt in Australië een probleem bij import met gember.

Conclusie over de status van *R. similis* in België: afwezig.

WP 3. Insecten voorkomend in kasteelten: palmmot en katoenuil
De palmmot *Paysandisia archon* werd voor de aanvang van het project reeds in België vastgesteld; zowel in Hamme (2011) als in Beveren (2012) (http://waarnemingen.be/soort/view/26897). Om de status van deze mot te verifiëren werd in 2014/2015 een survey uitgevoerd op een aantal relevante palmbedrijven. Dit gebeurde door regelmatige visuele controles, ook door het ophangen van geelgekleurde kleefplaten en sensibilisering van de bedrijfsleiders en medewerkers. Ook het bedrijf in Beveren waar in 2012 twee adulten werden gedetecteerd werd intensief opgevolgd. Tijdens de survey werden geen nieuwe adulten van de palmmot vastgesteld. Ook amateurentomologen stelden geen nieuwe palmmotten vast in hun lichtvallen (http://waarnemingen.be en http://www.phegea.org/Checklists/Lepidoptera/LepMain.htm). Er werden ook geen andere stadia van het insect of typische schadebeelden op de opgevolgde bedrijven gedetecteerd.

Conclusie over de status van *Paysandisa archon*: afwezig.

De katoenuil *Spodoptera littoralis* werd tot 2014 niet vastgesteld in België. Om de status van deze mot te bepalen werden in 2014 en 2015 een aantal bedrijven geselecteerd voor opvolging. In 2014 waren dit bedrijven, waar vooral sla, aardbei, paprika, tomaat, of een combinatie van deze gewassen werd geteeld. In 2015 werd de monitoring verder uitgebreid met naast waarnemingen in tomaat, paprika en sla ook waarnemingen in chrysanten, rozen en suikerbieten. Voor de opvolging werd gebruik gemaakt van feromoonvallen, daarnaast werden ook visuele controles uitgevoerd in het gewas op de aanwezigheid van vraatschade en rupsen. Tijdens de surveyperiode werden geen rupsen of andere stadia van de katoenuil en ook geen vraatschade vastgesteld, ook niet door amateurentomologen (http://waarnemingen.be en http://www.phegea.org/Checklists/Lepidoptera/LepMain.htm).

Conclusie over de status van *Spodoptera littoralis*: afwezig.

WP4. Insecten voorkomend op fruitplanten (Viteus vitifoliae, Rhagoletis completa)
De druifluis *Daktulosphaira* (=*Viteus*) *vitifoliae* komt voor onder 2 vormen, een bladvoedende vorm (gallicolae genaamd) en een wortelvoedende (radicolae). Verschillende rassen en onderstammen vertonen een grote verscheidenheid in tolerantie ten opzichte van één of beide vormen, zodat een louter visuele inspectie van de bladeren van de druivelaars geen betrouwbare detectiemethode is. In eerste instantie werd samen met een informatiefiche eveneens een invulformulier met vragen omtrent schadebeeld en voorkomen van de druifluis aan meer dan 450 druiventelers (professioneel en amateur) in Vlaanderen en Wallonië bezorgd. In enkele gevallen werd via het invulformulier de mogelijke aanwezigheid van de druifluis gesuggereerd. Deze percelen werden in de periode 2014/2015 grondig gecontroleerd, niet alleen naar bladschade toe, maar ook met controle van de wortels; er werd geen schade van de druifluis opgemerkt.

Conclusie over de status van *Viteus vitifoliae*: afwezig.

De survey naar *Rhagoletis completa* werd in 2014/2015 voor het overgrote deel in Wallonië uitgevoerd, waarbij in 2015 geopteerd werd om de meest zuidelijke regio (Henegouwen, Namen, Luxemburg) te monitoren, omdat de vruchtvlieg reeds eerder in Frankrijk werd gedetecteerd. Daarnaast werden ook diverse provincies in Vlaanderen opgevolgd. Voornamelijk particuliere tuinen, maar ook natuurgebieden en productieplaatsen van walnoten (provincie Namen) werden gemonitord. Voor de detectie van de adulten werd de Tephri-Trap val opgehangen en regelmatig gecontroleerd. Tevens werden op een aantal locaties ook noten bemonsterd en gecontroleerd op de aanwezigheid van *R. completa* larven. Recente vaststelling van *R. completa* in Nederland bij de Belgische-Nederlandse grens (2015) laat vermoeden dat deze vlieg in de nabije toekomst wel op Belgisch grondgebied kan optreden.

Conclusie over de status van *Rhagoletis completa*: afwezig.

RT 14/07 DEPITRIM 1

Detectie, bestrijdingsmaatregelen en impactstudie voor *Epitrix* in België

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotoren:
Dr. Jean-Pierre Jansen (CRA-W)
Prof. Patrick De Clercq (UGent)
Dr. Bruno Gobin (PCA)
Onderzoekers:
Dr. Negin Ebrahimi (ILVO)
Ir. Hans Casteels (ILVO)
Dr. Nick Berkvens (ILVO)
Mme Sandrine Chavalle (CRA-W)
M. Gilles San Martin (CRA-W)
Ir. Marc Goeminne (PCA)

Toelage: € 250.000
Periode: 1/1/2015 - 31/12/2016 (24 maanden)

Onderzoeksresultaten

WP 1: Literatuurstudie en monitoring van inheemse en exotische Epitrix-soorten in België
De bestaande literatuur rond de morfologische en moleculaire identificatieprotocollen, en de biologische en ecologische karakteristieken van de verschillende *Epitrix*-soorten werd beoordeeld en samengevat.
In de periode 2015-2016 werd in België een uitgebreide monitoring opgezet om de aanwezigheid (voorkomen, fenologie, waardplantenreeks) van de verschillende *Epitrix*-soorten en verwante aardvlooien in ons land in kaart te brengen, met speciale aandacht voor de uitheemse *Epitrix*-soorten. Zowel in Wallonië (14) als in Vlaanderen (46) werden een aantal locaties intensief opgevolgd, enerzijds door het inventariseren van de vangsten uit de Rothamsted 12m-zuigvallen, maar ook door veldwaarnemingen op verschillende sites: afvalhopen, afvalaardappelen, aardappelvelden, akkerranden rond aardappelpercelen met wilde Solanaceae onkruiden, niet-aardappelpercelen besmet met nachtschadeachtige onkruiden en aardappelopslag, en meer specifieke locaties met andere Solanaceae (sierplanten (Surfinia), *Solanum dulcamara*, *Datura stramonium* en *Atropa belladonna*), *Persicaria maculosa*, *Plantago major* en *Chenopodium album*.
Gedurende de monitoring gespreid over twee jaren werden alleen de inheemse *E. pubescens* en *E. atropae* vastgesteld in België, evenwel zonder schadesymptomen op aardappelen. Er werden geen exotische *Epitrix*-soorten vastgesteld. *E. pubescens* en *E. atropae* waren telkens aanwezig op hun typische waardplanten respectievelijk *S. nigrum* en *A. belladonna*. Ondanks de intensieve monitoring werd geen enkele van deze kevers in aardappelvelden vastgesteld, en ook niet op afvalhopen en aardappelopslag. De andere 6 aardvlosoorten die tot de Alticini behoren werden op Solanaceae vastgesteld. De dominantste soorten waren *Longitarsus* en *Aphthona*, in mindere mate werden *Psylliodes*, *Phyllotreta*, *Chaetocnema* en *Altica*-soorten gedetecteerd. Naast de aardvlooien werden ook andere arthropoden waaronder Oribatida, Phalacridae, Elateridae en Coleoptera, vastgesteld op *S. nigrum* in het veld.
Voor de veldwaarnemers werd een eenvoudige identificatiesleutel opgesteld om de

"Alticini lookalikes" te kunnen identificeren die bij de monitoring worden vastgesteld. Deze identificatiesleutel maakt gebruik van een beperkt aantal morfologische kenmerken (antennen, poten en dekschilden) die gemakkelijk met een stereomicroscoop te observeren zijn.
In 2015 was het, omwille van de bestaande officiële maatregelen bij vaststelling van exotische *Epitrix*-soorten, niet mogelijk om tussen de projectpartners, het FAVV en de aardappelverpakkers afspraken te maken om waarnemingen te doen op de ingevoerde aardappelen uit risicogebieden in Spanje en Portugal. In 2016 werden tussen het FAVV, de projectpartners en de deelnemende aardappelverpakkers wel duidelijke afspraken gemaakt, waarbij op basis van een beslissingsschema de modaliteiten werden vastgelegd in het geval exotische *Epitrix*-soorten zouden vastgesteld worden in de bedrijven die aardappels importeren. Vier importeurs verleenden hun medewerking aan het project; de waarnemingen werden uitgevoerd op twee locaties van deze importeurs in Vlaanderen. Beide importeren primeuraardappelen uit Spanje van half mei tot half juli. Op beide locaties werden aardappelknollen vastgesteld met de typische schadesymptomen veroorzaakt door *Epitrix*. Deze vaststellingen wijzen erop dat aardappelknollen worden geïmporteerd uit regio's waar exotische *Epitrix*-soorten aanwezig zijn en dat het mogelijk is om de aangetaste loten te detecteren door visuele observaties op de gewassen aardappelknollen.

WP2: Ontwikkeling van morfologische en moleculaire diagnostische protocollen voor inheemse en exotische Epitrix-soorten
Zowel de inheemse als exotische *Epitrix*-soorten werden met behulp van verschillende identificatiesleutels op basis van morfologische kenmerken geïdentificeerd, waaronder het genitaal apparaat van beide geslachten. De morfologische identificatie blijkt wel heel tijdrovend te zijn en vereist ook goed opgeleid personeel. Bovendien kan het larvenstadium van *Epitrix* niet gemakkelijk morfologisch geïdentificeerd worden. Om onderscheid te kunnen maken tussen de verschillende *Epitrix* soorten en andere sterk morfologisch gelijkende kevers werd een diagnostische identificatiefiche opgesteld met de voornaamste morfologische kenmerken geïllustreerd aan de hand van figuren.
Gezien de problemen die optraden bij de morfologische identificatie werden de soorten die in eerste instantie morfologisch werden geïdentificeerd (*E. pubescens*, *E. atropae*, *E. similaris*, *E. tuberis*, *E. hirtipennis*, *E. fuscula* en een Peruviaanse onbekende *Epitrix*-soort) ook gebruikt om een moleculair diagnostisch protocol uit te testen gebaseerd op het PCR-RFLP protocol ontwikkeld door Germain et al. (2013). Gebruik makend van de BioEdit software, werden de restrictie-enzymen *AluI* en S*au3aI* geselecteerd om onderscheid te maken tussen de verschillende *Epitrix*-soorten. *AluI* knipt de sequenties tot zodanige DNA-profielen dat verschillende patronen ontstaan op een agarosegel. Het tweede restrictie-enzym S*au3aI* was echter niet in staat om de inheemse *Epitrix* te differentiëren van de exotische soorten. Het gebruik van het *AluI* restrictie-enzym in onze ontwikkelde PCR-RFLP werd succesvol gevalideerd voor zowel larven als popstadia van *E. pubescens*, met een zelfde patroon voor de adulten van deze soort. Spijtig genoeg konden we geen larven en popstadia van exotische *Epitrix*-soorten bekomen om de methode verder uit te testen. Bij het uitvoeren van een PCR-RFLP gaat *AluI* geen DNA profiel laten zien voor de verschillende lookalikes.

WP 3: Onderzoek naar de biologie van de inheemse Epitrix-soorten
De biologie van *E. pubescens* werd bestudeerd in het laboratorium van het CRA-W en UGent. In 2015 werden door het CRA-W 34 adulten van *E. pubescens* verzameld in het veld en in kooien geplaatst voorzien van *S. nigrum* als voedsel. Vier tot zes weken later werden 256 nieuwe adulten bekomen. Einde juli werd, met een mix van adulten verzameld in het veld en met adulten uit de vorige kweek, een tweede kweek

van *E. pubescens* opgestart met *S. nigrum* en aardappelplanten in kooien. Alhoewel vraatschade op de planten werd vastgesteld werden geen nieuwe adulten bekomen. In 2016 werden kooien voorzien van aardappelplanten of *S. nigrum*, elk voorzien van 20 *Epitrix* adulten die in het veld werden verzameld einde juni/begin juli. We stelden vast dat *E. pubescens* zich niet vermenigvuldigde op aardappel, de adulten waren in staat om enkele weken te overleven op aardappel, maar er werd geen schade op de bladeren vastgesteld. Op *S. nigrum* nam de populatie wel toe met een factor 17.7; dit toont aan dat deze plantensoort de voornaamste waardplant is voor deze *Epitrix*-soort.
Op de UGent en ILVO werden jonge *S. nigrum*, *D. stramonium* en aardappelplanten blootgesteld aan *E. pubescens* adulten die verzameld werden in het veld. Voor *E. pubescens* werd één generatie bekomen op *S. nigrum*, maar deze soort plant zich niet voort op aardappel, er werd trouwens ook geen schade vastgesteld. Ook de kweek van *E. pubescens* op *D. stramonium* lukte niet. Alhoewel vraatschade werd vastgesteld stierven de adulten na 1 week. *D. stramonium* blijkt te kunnen fungeren als een tijdelijke alternatieve waardplant, maar *E. pubescens* is niet in staat om zijn cyclus hierop te voltooien. *Epitrix*-eitjes werden verzameld in kweekkooien met *S. nigrum* en bij 6 verschillende temperaturen (10, 15, 17, 20, 23 en 25°C) gehouden met als doel de ontwikkeling en de overleving van *E. pubescens* op deze plant te bestuderen. Het hoogste percentage ontloken larven (85%) werd waargenomen bij 23°C. De ontloken larven voeden zich op de wortels gedurende 12-18 dagen. Nadien ontwikkelden ze tot het popstadium; het popstadium duurde 4 tot 10 dagen. Van het totaal aantal ontloken eitjes ontwikkelde 75% tot adulten. De gemiddelde ontwikkelingsduur was 35 dagen. Zoals verwacht hebben lagere temperaturen een vertraging of zelfs een verhindering van de volledige ontwikkeling van *E. pubescens* tot gevolg; een vermindering in temperatuur doet de lengte van de totale ontwikkelingsperiode toenemen.

WP 4: Evaluatie van het vestigingspotentieel van de exotische Epitrix-soorten
De monitoring die tijdens het project werd uitgevoerd over gans België toont aan dat er geen exotische *Epitrix*-soorten voorkomen of gevestigd zijn; alleen de inheemse *E. pubescens* en *E. atropae* werden gevonden. De monitoring die werd uitgevoerd bij een aantal Belgische aardappelimporteurs toonde aan dat er een laag risico is op insleep van niet-inheemse *Epitrix*-soorten in België via aardappelknollen met herkomst Spanje. Op basis van deze informatie en de informatie bekomen uit de PRA voor *Epitrix* (EPPO, VK en Nederland); werd een beoordeling gemaakt voor de insleep- en vestigingsmogelijkheden van de uitheemse *Epitrix*-soorten in België. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de HarmVect tool. Introductie- en vestigings-risicokaarten werden aangemaakt voor *E. cucumeris, E. similaris, E. papa, E. tuberis, E. subcrinita* en *E. hirtipennis*.

WP 5: Aanbevelingen met betrekking tot de (fytosanitaire) controle van plantschadelijke Epitrix-soorten en compensatie door het solidariteitsfonds aardappelen (KB 5/12/2004)
Er werden beslissingsdocumenten opgesteld om aanbevelingen te doen naar de verschillende eindgebruikers voor de aanpak van *Epitrix*-soorten, met name voor de aardappelhandelaars en de FAVV-inspecteurs. Deze documenten bevatten informatie over de levenscyclus, de insleepmogelijkheden, de morfologische identificatie van de verschillende *Epitrix*-soorten en de lookalikes, schadebeelden en controlemaatregelen.
Er werd tevens een lijst van gewasbeschermingsmiddelen opgesteld die ingezet kunnen worden bij een *Epitrix*-vaststelling of uitbraak. Deze lijst werd samengesteld op basis van informatie uit de VS en Canada, en na overleg met de collega's uit het Euphresco EPITRIX project. Aangezien de coloradokever en de verschillende *Epitrix*-soorten tot de familie van de Chrysomelidae behoren worden de meeste producten die gebruikt worden voor de bestrijding van de coloradokever, waaronder bladbehandelingen (voornamelijk met pyrethroïden) en systemische insecticiden gebruikt bij het planten (hoofdzakelijk

neonicotinoïden), als efficiënt beschouwd voor de controle van *Epitrix*-adulten. Er is echter geen informatie beschikbaar in welke mate de insecticiden die aangewend worden tegen de larven van de coloradokever werkzaam zijn tegen de *Epitrix*-larven. Bovendien is het ook niet geweten in hoeverre deze insecticiden verenigbaar zijn met de bestaande IPM methoden die in Belgische aardappelvelden worden aangewend (selectie van producten, aantal behandelingen, eisen i.v.m. veiligheid voor mens en milieu, neveneffecten voor nuttige insecten en natuurlijke vijanden, enz.). Daarnaast zijn er andere insecticiden op de Europese markt die de coloradokever effectief bestrijden en mogelijks ook efficiënt zijn voor de bestrijding van de Amerikaanse *Epitrix*-soorten, zoals bv. chlorantraniliprole, azadirachtine en spinosad. Ook biologische bestrijdingsmiddelen zijn misschien mogelijk, zoals parasitaire Hymenoptera die actief zijn in de teelt van koolzaad.

Bijkomend werden op vraag van het FAVV kleinschalige experimenten uitgevoerd om na te gaan in hoeverre de onderdompeling van de kevers in water een invloed had op de overleving van de *Epitrix*-adulten. Deze experimenten werden uitgevoerd om na te gaan in welke mate met deze maatregel het risico op insleep van *Epitrix* via ingevoerde aardappelknollen en aanhangende grond kan verminderd worden. Onderdompeling bleek enkel effect te hebben op de afdoding na toevoeging van detergent zodat de oppervlaktespanning verlaagt en de kevers verdrinken.

Tevens werden ook de argumenten besproken waarom we de opname van de uitheemse *Epitrix*-soorten aanbevelen in de lijst van schadelijke organismen die in aanmerking komen voor een financiële vergoeding in het kader van het solidariteitsfonds aardappelen (KB 5/12/2004).

RF 14/6290 FYLIBER

Onderzoek van de aanwezigheid van fytoplasma's en de bacterie *Candidatus* Liberibacter solanacearum in de aardappel- en wortelteelt met optimalisatie en implementatie van moleculaire diagnostiek

Coördinator:
Prof. Martine Maes (ILVO)
Promotor:
Dr. Mia Demeulemeester (Inagro)
Onderzoekers:
Dr. Kris De Jonghe (ILVO)
Ir. Kürt Demeulemeester (Inagro)
Ir. Danny Callens (Inagro)
Dhr. Bart Declercq (Inagro)
Ir. Veerle De Blauwer (Inagro)

Toelage: € 149.000
Periode: 1/4/2015 - 30/9/2016 (18 maanden)

Onderzoeksresultaten

De belangrijkste reden voor de betoelaging van dit projectvoorstel was de bezorgdheid over de mogelijke introductie en verspreiding van aardappelfytoplasma's en de bacterie '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' (CaLso) in aardappel en wortel in België. In de EPPO-regio zijn er alsmaar meer signalen en meldingen (Finland, Noorwegen, Frankrijk, Zweden, Spanje, Duitsland, Oostenrijk, Verenigd Koninkrijk) dat ofwel de vector/ vectoren, ofwel de pathogeen, ofwel beide worden aangetroffen en dat er ook schade wordt toegebracht in de voornoemde teelten.
Het doel van dit project was de fytosanitaire betekenis van deze schadelijke organismen in België vast te stellen, met als oogpunt snel te kunnen optreden als het risico voor aardappel en wortel reëel aanwezig is. Verder was het doel ook basisinformatie aan te brengen over diagnostische instrumenten, survey en schadepotentieel om een onderbouwd draagvlak te creëren voor het fytosanitair beleid en om te anticiperen op uitgebreider onderzoek met een breder consortium.

De onderzoeksvragen die in dit project behandeld werden, zijn:
1. wat is de status van fytoplasma ziekten, CaLso en hun vectoren in de aardappelteelt?
2. wat is de status van fytoplasma ziekten, CaLso en hun vectoren in de wortelteelt?
3. bestaat er genetische diversiteit in de populaties die implicaties heeft voor de huidige diagnostische instrumenten?
4. kan de validatie van de diagnostische testen door succesvolle deelname aan interlaboratoriumvergelijking leiden tot de implementatie van een kwalitatief hoogstaande test in functie van beleid en sector?
5. zijn er mogelijk andere cultuurplanten dan aardappel en wortel van belang (bijv. selder) op basis van gekende alternatieve waardplanten van de vectoren (bijv. *Trioza apicalis* en *Bactericera cockerelli* voor Liberibacter)?
6. vormt de aanwezigheid van bladvlooien en (dwerg)cicaden een risico voor de introductie en uitbreiding van '*Ca*. Liberibacter' en fytoplasmaziekten in aardappel en wortel ?

Algemeen kan gesteld worden dat geen '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' werd aangetroffen in aardappel en wortel op het Belgisch grondgebied. De survey die werd uitgevoerd in beide teelten toonde wel een algemene verspreiding van het aster yellows fytoplasma (AY: '*Candidatus* Phytoplasma asteris') aan in onze wortelteelt. Het richt er ook wijdverspreid behoorlijk wat schade aan. Bijkomende informatie (aandeel virusaantastingen, stresssymptomen, kwaliteitsverliezen rechtstreeks aan het fytoplasma gerelateerd) is nodig om de economisch impact van deze ziekte in wortel beter te kunnen inschatten (via cijfers te kunnen ondersteunen). Dit aster yellows fytoplasma werd ook in aardappel, zij het veel beperkter dan in wortel, aangetroffen op een aantal locaties. In aardappel ging het bovendien telkens om slechts enkele planten, terwijl in wortel de aantasting veel meer verspreid voorkomt.

Er zijn heel wat verschillende insectensoorten (behorende tot de groep van de Auchenorrhyncha) aanwezig in de aardappel- en wortelteelt die mogelijk een rol spelen in de verspreiding van fytoplasma ziekten, ook AY.

Bladvlooien (*Trioza* spp., *Bactericera* spp.), de vectoren van '*Ca*. Liberibacter solanacearum' werden niet aangetroffen en lijken dus geen probleem te vormen in onze wortel- en aardappelteelt.

Sécurité des aliments
Voedselveiligheid

RF 11/6241 CAMPYTRACE

Kwantificatie en moleculaire differentiatie van *Campylobacter* in de productieketen van braadkippen om interventies te definiëren met als doel een daling in het aantal humane campylobacteriosen te bekomen

Coördinator:
Prof. Lieven De Zutter (UGent)
Promotor:
Prof. Mieke Uyttendaele (UGent)
Dr. Katelijne Dierick (WIV-ISP)
Onderzoekers:
Dr. Tomasz Seliwiorstow (UGent)
Ir. Alexandra Duarte (UGent, WIV-ISP)

Toelage: € 400.000
Periode: 1/1/2012 - 31/3/2016 (51 maanden)

Onderzoeksresultaten

In het CAMPYTRACE project werd een snelle kwantitatieve PCR (qPCR) methode ontwikkeld voor de telling van *Campylobacter* in kippenvleesproducten, waarbij gebruik werd gemaakt van propidium monoazide (PMA) om een onderscheid te kunnen maken tussen levende en dode cellen. De detectielimiet van de methode is 50 kve/g en de geoptimaliseerde condities werden gevalideerd in natuurlijk besmette kippenkarkassen.

Voorts werd in dit project *Campylobacter* gekwantificeerd tijdens het slacht- en versnijdingsproces. De bekomen resultaten geven aan dat er een grote variatie bestaat in de *Campylobacter* tellingen op vleeskippenkarkassen binnen en tussen batches bij de slacht van *Campylobacter* positieve tomen.
Er werden echter geen significante verschillen waargenomen tussen slachthuizen voor de *Campylobacter* tellingen op gekoelde karkassen.
Ook karkassen van een *Campylobacter* negatieve toom die onmiddellijk na een *Campylobacter* positieve toom wordt geslacht, kunnen met gelijkaardige aantallen besmet zijn als die van de *Campylobacter* positieve toom. Deze kruisbesmetting vermindert in de loop van de tijd, maar trager dan eerder werd ingeschat. Er werd daarnaast waargenomen dat het versnijdingsproces bijdraagt tot de verhoogde bacteriële belasting van kippenvlees en tot de hoge kruisbesmetting tussen batches.

Het project voorzag ook in de diepgaande karakterisatie van *C. jejuni* and *C. coli* geïsoleerd uit verschillende vleeskipkarkassen. Dit gebeurde door vergelijking van verschillende typeringsmethodes *:* multilocus sequence typering (MLST), flagellin gene A restriction fragment length polymorphism typering (*flaA*-RFLP), antimicrobiële resistentie profilering (AMRp), aan/afwezigheid van 5 veronderstelde virulentiegenen; en, enkel voor *C. jejuni*, bepaling van de lipo-oligosaccharide (LOS) klasse, individueel en in combinatie.
MLST gecombineerd met *flaA*-RFLP was de typeringsmethode die het meeste onderscheid toeliet voor zowel *C. jejuni* als *C. coli*, en is tegelijk eenvoudig en haalbaar voor monitoring van *Campylobacter* op kippenkarkassen en –vlees op korte termijn.

Deze zelfde typeringsmethodes werden gebruikt om de relatie na te gaan tussen de *C. jejuni* isolaten uit kippenvlees en van humane gevallen gedetecteerd in Brusselse hospitalen van 2011 tot 2013.
Door het gebruik van *flaA*-RFLP, sequentietypering en clonale complexen werd het duidelijk dat bepaalde types die aanwezig waren op de vleeskipkarkassen ook aanwezig waren in patiënten. Andere types, die enkel gevonden werden in mensen, hebben waarschijnlijk een andere oorsprong.
De combinatie van MLST met *flaA*-RFLP of AMR profilering liet respectievelijk toe om 17 en 12 chronologisch gerelateerde vleeskip-patiënt overeenkomsten te vinden. Door de gegevens van MLST met die van *flaA*RFLP typering of AMR profilering te combineren, is monitoring op korte termijn mogelijk, evenals toepassing voor het detecteren van uitbraken.

Dezelfde typeringsmethodes werden gecombineerd met het oog op een zo diepgaand mogelijke karakterisatie van de *C. jejuni* en *C. coli* isolaten bekomen over de slachtlijn gedurende twee (slechts één in slachthuis C) bezoeken in vijf slachthuizen: A (A1, A2), B (B1, B2), C (C1), D (D1, D2) and E (E1, E2), zodat de besmetting over de slachtlijn beoordeeld kon worden en de verschillen tussen de slachthuizen.
De besmetting met *C. jejuni* en *C. coli* in de verschillende vleeskippentomen was gerelateerd aan de toom. De meest frequent aanwezige stammen werden steeds gedetecteerd in de caeca en/of het duodenum. De diversiteit van *C. jejuni* en *C. coli* werd groter over de slachtlijn en nieuwe stammen werden gedetecteerd op de karkassen na evisceratie en na koeling, hetgeen kan wijzen op kruisbesmetting vanuit eerdere tomen op het punt van de evisceratie, of op een betere overlevingscapaciteit van bepaalde stammen ten opzichte van de stress geassocieerd met het slachtproces. Het is echter ook mogelijk dat de diversiteit groter is binnen een toom dan gedetecteerd wordt, omdat in de toegepaste methode het enkel de meest prevalente *Campylobacter* stam wordt gedetecteerd na de tellingen.

De besmetting in de vleesverwerkende bedrijven met *C. jejuni* en *C. coli* geïsoleerd uit kippenvlees bemonsterd in de verschillende stadia van het versnijdingsproces werd beoordeeld met *flaA*–RFLP typering.
De omgeving van het vleesverwerkend bedrijf is een vector voor *Campylobacter* transmissie van besmette karkassen naar filets of versneden vlees. *Campylobacter* besmetting wordt doorgegeven naar negatieve karkassen en versneden vlees vanuit eerdere, positieve batches.
Het feit dat sommige *flaA* types gevonden op filetstalen niet meer werden teruggevonden op andere stalen verzameld gedurende een bepaalde dag kan erop wijzen dat *Campylobacter* de nacht kan overleven in de omgeving van vleesverwerkende bedrijven. In landen zoals België, met bij benadering één derde van de vleeskippentomen positief voor *Campylobacter*, is het aannemelijk dat een negatieve toom onmiddellijk na een positieve toom wordt verwerkt.

Op basis van de gegevens verzameld in dit project werden bepaalde slachtproces- en toomgerelateerde karakteristieken geïdentificeerd als risicofactoren geassocieerd met *Campylobacter* tellingen op vleeskippenkarkassen. De aan het licht gekomen risicofactoren zijn onder andere: uitwendig besmettingsniveau van de kippen, niveau van caecale colonisatie, transport- en wachttijd van de vogels en verschillende technische aspecten (type van aflaadsysteem, type van verdoving, temperatuur van het broeiwater, performantie van de plukmachine, cloaca-uitsnijder en het evisceratieproces).

De verzamelde gegevens over de tellingen van *Campylobacter* op vleeskippenkarkassen op het einde van de slachtlijn, werden ook gebruikt voor de evaluatie van risicogebaseerde microbiologische criteria (MC) voor *Campylobacter* op kippenvlees. Door de toepassing van QMRA (quantitative microbial risk assesment), voorspellen de risicogebaseerde microbiologische criteria het effect van het instellen van MC op de volksgezondheid.
Met als basis MC met de volgende parameters: aantal stalen (n) = 5; kritische concentratie van bacteriën (m) = 1000; aantal geanalyseerde stalen die de kritische concentratie van bacteriën overschrijdt (c) = 0, zouden bij benadering 60% van de *Campylobacter* positieve vleeskippentomen geslacht in België niet overeenstemmen met zulke MC.
Aan de andere kant zou het toepassen van dergelijke MC een groot voordeel bieden: er zou een reductie met meer dan 85% waargenomen worden van het risico voor de volksgezondheid indien alle vermarkte tomen tegemoet zouden komen aan de MC gebaseerd op n = 5; m = 1000; c = 0.

RF 11/6242 UGM-MONITOR

Développement d'une plateforme de biologie moléculaire et d'une base de données (évaluation des risques) destinées à la détection dans l'alimentation des organismes génétiquement modifiés non-autorisés (UGM) en Europe

Coordinateur :
Dr. Nancy Roosens (WIV-ISP)
Promoteurs :
Dr. Philippe Herman (WIV-ISP)
Prof. Marc De Loose (ILVO)
Dr. Gilbert Berben (CRA-W)
Chercheurs :
Dr. Marie-Alice Fraiture (WIV-ISP, ILVO et UGent)
Ir. Frédéric Debode (CRA-W)
M. Eric Janssen (CRA-W)
Dr. Isabel Taverniers (ILVO)

Subside : € 400.000
Période : 1/5/2012 - 30/4/2016 (48 mois)

Résultats des recherches

La mise sur le marché européen (EU) et le contrôle des organismes génétiquement modifiés (OGMs) dans l'alimentation sont soumis à la législation EU (Reg. EC no. 1829/2003; Reg. EC no. 1830/2003). Le nombre et la diversité des OGMs commercialisés dans le monde ont et continuent à augmenter de façon significative (Stein & Rodriguez-Cerezo, 2009, James 2016). De plus, les OGMs alimentaires commercialisés étaient précédemment développés principalement par des firmes Américaines et EU qui ont un intérêt à faire la demande d'autorisation de leur produit pour leur exportation sur le marché EU. Cependant, depuis 2015, plus de la moitié des OGMs commercialisés proviennent de centres technologiques nationaux asiatiques et sont destinés à la consommation locale (Stein & Rodriguez-Cerezo, 2009, James 2015). Pour la majorité de ces OGMs, aucune demande d'autorisation pour le marché EU n'est soumise. Ainsi, la fréquence d'OGM non-autorisés (UGMs) sur le marché EU, due à leur présence accidentelle dans les importations vers l'EU, risque d'être significativement augmentée. Dans ce contexte, les autorités compétentes belges et les industries alimentaires ont besoin de laboratoires possédant des outils performants pour détecter les nouveaux UGMs et disposer rapidement de données concernant leurs risques potentiels pour la santé humaine lors de leur détection dans une matrice alimentaire. Le projet UGMMONITOR a été sélectionné pour subvention par la recherche contractuelle du Service Publique Fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement afin de donner les moyens d'intervenir précocement et adéquatement dans la détection des UGMs. Ce projet, terminé en avril 2016, a permis d'aboutir à une approche intégrée pour la détection des UGMs dans l'alimentation et à la création d'une base de données utile pour l'évaluation du risque pour la santé. Les résultats sont décrits de manière plus détaillés ci-dessous.

1. Construction d'une base de données pour faciliter une évaluation des risques potentiels des UGMs pour la santé humaine
Un inventaire des riz transgéniques décrits dans la littérature, réalisé sur un total de 1095 publications peer-reviewed, a montré que la majorité des recherches visant à développer

des riz génétiquement modifiés (GM) sont réalisées en Asie, et plus particulièrement en Chine. Bien que ces riz GM soient essentiellement développés en laboratoire, un cinquième d'entre eux ont fait l'objet d'un essai en champ. Au niveau de l'information génétique, une grande diversité de traits est observée. Même si la résistance aux insectes et la tolérance aux herbicides sont toujours d'actualité, de plus en plus de riz transgéniques sont développés afin d'acquérir de nouvelles propriétés telles que principalement la résistance aux stress abiotiques (salinité, sécheresse, froid,...). Parmi les vecteurs de transformation, la famille de vecteur pCAMBIA a été identifiée comme fréquemment utilisée (634 riz GM). Concernant la caractérisation moléculaire ces riz GM sont classés sur base de la classification des «Knowledge Level» (KL) en fonction du niveau de connaissance de la séquence de l'insert sur une échelle de 1 (pleinement caractérisé) à 4 (inconnu). Cette classification a été proposée en 2011 par un groupe de travail de l' « European Network of GMO Laboratories » (ENGL) pour les OGMs non autorisés. La majorité des riz répertoriés dans le projet UGMMONITOR répondent au KL-3 principalement en raison de la présence de l'élément p35S et/ou tNOS. Un « proof-of-concept » de base de données a été réalisé. La base de données est divisée en 3 menus :

1. Recipient Organism : les informations concernant les organismes receveurs.
2. Genetic elements : les informations relatives aux éléments transgéniques utilisés pour construire l'OGM.
3. Modified organism : les informations sur les OGMs sur base des données introduites dans les 2 menus précédents.

Ces informations peuvent être analysées et présentées sous forme de rapport afin de visualiser l'ensemble des organismes receveurs, les éléments génétiques et les OGMs en fonctions des éléments génétiques qui ont été introduits. De plus, un lien direct vers le Food and Feed Rapid Alert System (RASFF) est également disponible. Ces résultats ont été publiés dans Fraiture *et al.*, 2016b,c.

2. Développement de méthodologies "Hightech" pour identifier la séquence de jonction « transgène – génome hôte » et évaluation de la sensibilité de ces méthodes

2.1. DNA walking & NGS

Une approche intégrée, permettant aux laboratoires de contrôle de détecter les UGMs en EU, a été développée dans ce projet. Cette approche intégrée est réalisée en deux étapes successives. Tout d'abord, la présence éventuelle de l'OGM non-autorisé est évaluée par l'usage de la technologie qPCR SYBR®Green ciblant le terminateur 35S (t35S) pCAMBIA (voir point 1) présent uniquement dans les OGM non-autorisé en EU. Ensuite, sa présence est confirmée via la caractérisation de la jonction entre la cassette transgénique et le génome de l'hôte. À cette fin, une stratégie de DNA walking (marche chromosomique) a été appliquée à l'aide d'une première amorce spécifique au point d'ancrage suivie par deux semi-nested PCR utilisant des amorces aussi spécifiques au point d'ancrage. Ces amorces ont été spécialement conçues pour être à la fois utilisée pour le criblage (détection de l'OGM) et le DNA walking (obtention de la séquence de la jonction caractéristique à l'OGM). Dans le but de détecter un plus grand nombre d'OGMs, cette stratégie a également été adaptée pour cibler aussi les éléments p35S et tNOS qui sont fréquemment présents dans les plantes transgéniques (plus de 90% des UGMs) (voir point 1). Les méthodes ci-dessus ont été évaluées avec succès en fonctions de la qualité et de la quantité de l'ADN ciblé (jusque 10 HGEs (génome haploïde équivalent)) ainsi que la détection de l'ADN ciblé mélangé avec des ADN non-cible. Cette stratégie de « DNA walking » a été améliorée en termes de simplicité de procédure, de « throughput » (débit) et de sensibilité, en utilisant la technologie NGS (Next Generation Sequencing) de Pacific Bioscience®, au lieu de la technologie Sanger, pour l'étape de séquençage.

Compte tenu de sa spécificité, sensibilité et fiabilité, l'approche proposée est un outil de détection clé, facilement applicable dans les laboratoires de contrôle. Ces résultats ont été publiés dans Fraiture et al., 2014, 2015a,b, 2016c, 2017a.

2.2. Stratégies de séquençage à haut débit

Différentes stratégies de séquençage à haut débit ont été évaluées. D'une part, la plateforme Illumina HiSeq a été combinée à un enrichissement en amont des séquences d'intérêt par la technique SeqCapEZ de Roche Diagnostics/Nimblegen, permettant de travailler sur des produits en mélange. Les séquences d'intérêt choisies pour l'enrichissement concernent des séquences d'éléments structurels (promoteurs, terminateurs et gènes). Cependant, les résultats escomptés n'ont pas été obtenus, ce qui nécessite une répétition du test. D'autre part, une stratégie de séquençage complet du génome (WGS), c'est-à-dire sans sélection au préalable de séquences d'intérêts, a été testée avec la technologie Illumina HiSeq. Pour l'évaluation de la faisabilité liée à une telle approche, un modèle statistique a été développé pour estimer le nombre de « reads » nécessaires afin de pouvoir détecter au moins une séquence transgénique d'intérêt au sein d'un génome complet. Cette étude a aussi permis de montrer qu'actuellement l'analyse d'échantillons avec de faibles teneurs en OGMs ou avec des espèces présentant un génome complexe n'est pas envisageable. Ces résultats ont été publiés dans Willems et al., 2016, Fraiture et al., 2016c.

2.3. Pyroséquençage

Le pyroséquençage analytique de la technologie PyroMark Q24 est une technique qui permet de déterminer, pour 24 échantillons par run, la séquence d'un amplicon de +/- 100 paires de bases en 2 heures. Les amorces utilisées visent une portion du gène *cry* permettant d'amplifier les gènes *cry*1Ab et *cry*1Ac qui sont présent dans nombre de constructions transgéniques. Le pyroséquençage permet d'apporter une information complémentaire par la séquence qui dans certains cas peut se révéler discriminante. Afin de limiter le coût d'utilisation, une application statistique a été développée dans le but d'utiliser uniquement la quantité de produit nécessaire à la couverture de l'amplicon. Cette technologie a également été appliquée aux organismes donneurs tels que CAMV permettant de présenter des divergences en fonction de la souche en présence. La sensibilité de cette approche a aussi été évaluée avec succès. Le risque d'erreur est cependant accru pour de très faibles concentrations, notamment aux endroits où les bases sont répétées, car l'appareil n'arrive pas toujours à évaluer correctement le nombre de répétitions. Ces résultats ont été publiés dans Debode et al., 2017a.

3. Développement d'une stratégie générale pour valider/rejeter la présence d'UGM à partir d'analyses de criblage en real-time PCR

Afin de renforcer la stratégie qPCR de criblage utilisée par les laboratoires de contrôle, de nouveaux marqueurs qPCR de criblage ont été développés pour permettre de mieux appréhender la nature d'un signal ne pouvant être expliqué par la présence d'OGMs autorisés. Ces méthodes visent différentes cibles :

i) un marqueur qPCR spécifique aux UGMs ciblant t35S pCAMBIA de la cassette transgénique de la famille de vecteur pCAMBIA ;

ii) des marqueurs permettant de compléter le panel des marqueurs utilisés pour le screening afin de couvrir l'ensemble des OGMs autorisés tels que le marqueur gat-pin, ciblant une construction spécifique présente dans un OGM autorisé (soja 356043) et deux OGMs non-autorisés (maïs 98140 et colza 73496), deux méthodes et une méthode consensus pour la détection du gène EPSPS afin de couvrir les variations de sa séquence, ainsi qu'une pentaplex event-specific ciblant à la fois

un OGM autorisé (coton GHB614) et quatre OGMs non-autorisés (soja 305423, soja BPS-CV127-9, soja MON87708 et maïs DAS40278-9) ;

iii) un marqueur d'espèce appelé tpinII ciblant le terminateur pinII spécifique à la pomme de terre ;

iv) des marqueurs visant les organismes donneurs, dont CaMV, permettant de déterminer si le signal obtenu est attribué à la présence de l'élément ciblé se situant dans une cassette transgénique ou à la présence de l'organisme d'où provient cet élément. Ces résultats ont été publiés dans Fraiture et al., 2014, 2016c, Broeders et al., 2015, Debode et al., 2017b,d,e.

4. Développement d'outils moléculaires de routine pour détecter les OGMs dans les animaux

4.1. Préparation des échantillons : mise au point et évaluation de la méthode d'extraction d'ADN génomique de poisson

Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN ont été testés ave du tissu frais de poisson et des produits de consommation à base de poisson. La quantité et la qualité de l'ADN extraits a été ensuite testés. Toutes les méthodes d'extraction testées ont donné des résultats très satisfaisant.

4.2. Développement de méthodes de criblage pour détecter le saumon transgénique

Des échantillons de poissons transgéniques (saumon « CRAE-MPO » et poissons ornementaux « Glofish ») disponibles ont été utilisés. De plus, une séquence artificielle a été créée sur base de la séquence du brevet du saumon transgénique AquAdvantage de la firme Aquabounty dont le matériel n'était pas disponible lors de l'étude. Sur cette base, deux méthodes qPCR spécifiques à la construction du saumon AquAdvantage ont ainsi été développées et validés. Une méthode qPCR spécifique au saumon transgénique « CRAE-MPO » a aussi été développée et validée. Par rapport à une cible endogène «salmonidé», une cible publiée dans la littérature ainsi qu'une cible développée dans ce projet ont été éprouvées et présentent des performances similaires. Pour les « Glofish », des méthodes qPCR ont été développés sur base de leur couleur fluorescente (rouge, jaune et vert). Ces méthodes de détection ont déjà été mises à contribution en collaboration avec le Service Public Fédéral Santé Publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement pour identifier des lots de poissons suspicieux au service des douanes de l'aéroport de Zaventem. Ces résultats ont été publiés dans Debode et al., 2017c.

5. Evaluation et implémentation des stratégies et des méthodes dans une analyse de semi-routine pour les UGMs

5.1. Evaluation et implémentation en semi-routine des méthodes high-tech développées

L'ensemble des méthodes high-tech développées au cours de ce projet (voir point 2) ont été évaluées et comparées en termes d'applicabilité à différents types de matrices alimentaires, de sensibilité, de temps nécessaire pour l'obtention de résultats, de la main d'œuvre demandée (travail pratique et analytique) et de coûts.

5.2. Arbre de décision pour utiliser les méthodes de criblages de façon rationnelle pour la détection des UGMs

Les méthodes de criblage développées au cours de ce projet (voir points 3 et 4) ont été intégrées aux marqueurs de screening actuellement utilisés en routine afin de couvrir l'ensemble des OGM autorisés et LLP et de discriminer certains d'entre eux. Certains des marqueurs de criblage développés permettent de déterminer spécifiquement la

présence d'OGM non-autorisés et d'organismes naturels. Enfin, des « sets d'amorces » à utiliser pour couvrir de façon rationnelle les OGM non-autorisés ont été proposés.

5.3. Intégration de l'ensemble des outils développés pour une stratégie efficace de détection des UGMs

L'ensemble des outils développés dans le cadre du projet UGMMONITOR ont été intégrés aux outils utilisés actuellement (principalement la PCR en temps réel) dans une stratégie générale pour une détection efficace des UGM par les laboratoires de contrôles. Cette stratégie mentionne les éléments clés à prendre en considération en fonction de l'échantillon et des résultats obtenus pour augmenter au maximum la capacité des laboratoires à pouvoir confirmer la présence d'un OGM non-autorisé dans un échantillon suspect. Pour faciliter la compréhension de cette stratégie et l'illustrer, celle-ci a été appliquée sur des cas d'étude d'échantillons pouvant communément être rencontrés en analyse de routine des OGMs. Ces résultats ont été publiés dans Fraiture et al, 2015c, 2016a,c, 2017b.

RF 11/6243 PEPTIDO-GENOMIQUE

Approches peptidomique et génomique à la détection et à l'identification des composants protéiques d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente

Coordinateur :
Dr. Sergio Mauro (CRA-W)
Promoteurs :
Prof. Martine Raes (UNamur)
Dr. Gilbert Berben (CRA-W)
Dr. Philippe Delahaut (CER Groupe)
Chercheurs :
Dr. Hélène Marbaix, (UNamur)
Dr. Olivier Fumière (CRA-W)

Subside : € 345.840
Période : 1/2/2012 - 31/1/2016 (48 mois)

Résultats des recherches

Les farines animales ont été largement utilisées dans l'alimentation du bétail pour leur apport en énergie, protéines, minéraux, graisses ... Cependant, l'apparition de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), plus communément appelée « maladie de la vache folle », a conduit à une série de mesures législatives concernant l'utilisation de ces farines animales afin de limiter l'expansion de l'ESB. En effet, il s'est avéré que la transmission la plus probable de cette maladie était liée à l'utilisation de farines animales contaminées par une protéine prion dans l'alimentation des bovins. Suite à une diminution des cas d'animaux infectés grâce à ces interdictions, la Commission Européenne réfléchit sur de potentiels assouplissements de la législation.

Diverses méthodes de détection et d'identification des Protéines Animales Transformées (PATs) existent à ce jour : la microscopie optique et la « Polymerase Chain Reaction » (les deux méthodes officielles), les méthodes proches infrarouges et les méthodes immunologiques. Cependant, ces méthodes présentent des limitations et l'assouplissement de la législation requiert le développement de nouvelles méthodes analytiques afin de déterminer l'origine exacte des PATs.

C'est pourquoi une approche peptidomique a été développée afin de définir l'origine taxonomique et tissulaire des PATs. Nous avons mis au point une méthode de spectrométrie de masse afin de déterminer l'espèce et la source (légale ou pas) des PATs : une extraction protéique au TCA - acétone suivie d'une étape de « clean-up », une digestion trypsique de 5 heures (avec un ratio trypsine/protéines de 1/20) et des analyses MS/MS sans *a priori* à l'aide d'un Q-TOF. Nous avons ainsi pu identifier un certain nombre de peptides biomarqueurs spécifiques d'espèces (pour le bœuf, le porc, le mouton et la volaille), représentatifs de ces farines animales. Parmi ceux-ci, 3 peptides bovins et 4 peptides porcins ont été sélectionnés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin et pour le développement d'une technique de spectrométrie de masse de routine de détection des PATs. La transposition de la technique sans *a priori* à une technique de routine à l'aide d'un triple quadrupôle a été démontrée par la détection des 7 peptides marqueurs dans des échantillons de PATs en seulement 20 minutes. Des farines de porc ainsi qu'un aliment végétal ont été contaminés par des farines bovines

à raison de 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 %. La limite de détection actuelle est de 2 % de contamination bovine. Une approche statistique non supervisée de type PCA (Principal Component Analysis) sur ces échantillons s'est révélée très puissante, fournissant une empreinte globale des échantillons de PATs à partir de milliers de données MS, ce qui a permis la discrimination entre différentes espèces, la distinction entre une farine porcine contaminée avec 0,1 % de bovin et cette même farine non contaminée, la confirmation des peptides marqueurs précédemment identifiés et la détermination de nouveaux peptides spécifiques. Ces différentes approches peptidomiques (sans *a priori*, ciblée et statistique) apportent des réponses aux limitations des méthodes actuelles et pourraient être considérées comme méthodes analytiques puissantes de seconde ligne pour des contre-analyses lorsqu'il y a un doute sur certains échantillons.

RT 12/10 ALTPOLYCARB

Studie van de eventuele migratierisico's van materialen die in contact komen met levensmiddelen voor kinderen jonger dan 3 jaar

Coördinator:
Ir. Joris Van Loco (WIV-ISP)
Promotoren:
Dr. Fabien Bolle (WIV-ISP)
Prof. Luc Verschaeve (WIV-ISP)
Prof. Marie-Louise Scippo (ULiège)
Prof. Adrian Covaci (UAntwerpen)
Prof. Mark Elskens (VUB)
Dr. Karin Vandermeiren (CODA-CERVA)
Onderzoekers:
Dhr. Matthias Onghena (UAntwerpen)
Mme Coraline Simon (ULiège)
Dr. Heidi Demaegdt (CODA-CERVA)
Dr. Marie-Noëlle Baude (WIV-ISP)
Dr. Birgit Mertens (WIV-ISP)
Dr. Els Van Hoeck (WIV-ISP)
Mevr. Tara Vandermarken (VUB)
Dr. Kersten Van Langenhove (VUB)

Toelage: € 399.859
Periode: 1/11/2012 - 13/02/2016 (40 maanden)

Onderzoeksresultaten

Bisfenol A (BPA) wordt gebruikt als monomeer voor de productie van polycarbonaat (PC) polymeren en epoxyharsen. Aangezien BPA hormoonverstorende eigenschappen bezit, werd het gebruik ervan verboden bij de productie van PC gebruikt voor babyflessen. Als gevolg van dit verbod werden alternatieve materialen gebruikt voor de vervaardiging van materialen en voorwerpen bestemd voor zuigelingen en jonge kinderen, zoals polypropyleen (PP), polyethersulfon (PES), polyamide (PA), Tritan™ of silicone. In het huidige onderzoeksproject werden de potentiële migratierisico's verbonden aan het gebruik van deze alternatieve materialen onderzocht aan de hand van een geïntegreerde aanpak die zowel analytische als toxicologische technieken combineert.

In werkpakket 1 werd een marktstudie uitgevoerd om de gebruikte alternatieve materialen voor PC te identificeren. Artikelen gebruikt als 'food contact materials' (FCMs) voor zuigelingen en jonge kinderen werden in kaart gebracht via een marktonderzoek in babywinkels, supermarkten en apotheken. Vierentwintig soorten babyflessen van verschillende fabrikanten werden aangetroffen. De materialen die gebruikt werden voor de fabricatie waren, gerangschikt volgens marktaandeel, PP, glas, PES, PA, Tritan™ en siliconen. Kopjes, fopspenen, eetgerei en andere FCMs voor kinderen jonger dan 3 jaar werden ook bestudeerd. De polymeren die gebruikt werden voor de productie van laatstgenoemde items konden in de meeste gevallen niet worden geïdentificeerd. Door het gebrek aan informatie voor de andere categorieën van FCMs dan babyflessen en het grote belang van deze laatste voor zuigelingenvoeding, werden de migratie-experimenten gestart met een selectie van 24 representatieve babyflesjes (werkpakket

2). Aangezien migratie van organische componenten (zoals monomeren, additieven, NIAS,...) niet wordt verwacht uit glazen babyflessen, werd dit materiaal niet opgenomen in deze studie. Het gebruik van simulanten ter vervanging van voeding bij het uitvoeren van migratie-experimenten is voorgeschreven in de wetgeving. Als simulant voor melk wordt simulant D1 (een mengsel van water en EtOH (50:50, v/v)) aanbevolen. De migratiecondities worden eveneens beschreven in de wetgeving. In de huidige studie werden de flesjes gedurende 10 min met kokend water gesteriliseerd waarna drie consecutieve migraties met simulant D1 werden uitgevoerd gedurende 2 uur bij 70 °C.

Vervolgens werd de chemische identificatie van de migranten in het melksimulant uitgevoerd (werkpakket 3). Om de extractie van de migranten uit het simulant te verbeteren, werd eerst een vloeistof-vloeistof extractie (LLE) geoptimaliseerd. Een mengsel van EtOAc-n-hexaan (1:1) werd geselecteerd voor de stalen. De geoptimaliseerde methode werd toegepast om de mogelijke vrijstelling van ongekende chemicaliën uit PP, PES, PA, Tritan™ en siliconen babyflessen te bestuderen. Voor de identificatie van de migrerende componenten werden Wiley® en NIST® massaspectrabibliotheken gebruikt. Hoewel de waargenomen concentraties vrij laag waren, werden verschillende verbindingen, zoals alkanen, ftalaten, amiden, enz. geïdentificeerd. Nadien werden niet-geïdentificeerde pieken verder onderzocht met geavanceerde massaspectrometrische technieken, zoals GC-(EI)TOF-MS en GC-(APCI)QTOF-MS, om de structuur van deze onbekende verbindingen op te helderen. Vervolgens werden dezelfde extracten geanalyseerd met LC-MS-QTOF onder MS^E modus. Aan de hand van deze methoden kon de structuur van een aantal bijkomende verbindingen worden bepaald.

Parallel met het identificatieproces werden de genotoxiciteit en hormonale activiteit van de geïdentificeerde migranten geëvalueerd met behulp van een batterij *in vitro* testen (werkpakket 4). Acht bio-assays, gebaseerd op genetisch gemodificeerde cellijnen, werden gebruikt voor de studie van de endocriene activiteit van migrerende stoffen. Het betrof 7 nucleaire receptoren: de estrogen (2 bio-assays, ER1 en ER2), de androgen (AR), de progesteron (PR), de glucocorticoide (GR), de thyroide (TR), de peroxisoom geactiveerde proliferator (PPARγ) en de aromatische hydrocarbon receptor (AhR). Van de 65 geteste stoffen op de 8 bio-assays, waren er slechts 12 die via geen enkele receptor activiteit vertoonde. De meest agonistische en antagonistische activiteit werd respectievelijk gevonden op de ER (29 van de 35 stoffen) en PPARγ (20 van de 35 stoffen). Er werd geen agonistische activiteit gevonden op de AR, GR en PR met deze stoffen. Een hoofdcomponentenanalyse van de data gecollecteerd tijdens de screening, toonde aan dat verschillende stoffen zowel agonistische als antagonistische activiteit vertoonden, echter wel niet op dezelfde receptor. Van de 53 actieve stoffen, werden er 9 geselecteerd voor verder onderzoek. De karakterisatie van de dosis-respons curves voor deze stoffen, toonde aan dat de meest potente stof verschillend was voor elke receptor. Tenslotte werd in een casus de biologische activiteit van een representatief mengsel van 2 babyflesjes geëvalueerd op de receptoren. Uit de resultaten bleek dat bepaalde mengsels een sterker effect vertoonden dan was verwacht volgens het concentratie-additie model. Aangezien de experimenten niet voldoende werden herhaald om het 95% confidentie-interval te bepalen voor alle receptoren, moet dit verder worden onderzocht.
De genotoxiciteit van de stoffen opgenomen in Annex I van de wetgeving werden in deze studie niet onderzocht, vermits deze reeds eerder werden geëvalueerd. Geen van de overblijvende 48 stoffen konden ondubbelzinnig geïdentificeerd worden als genotoxisch. Evenwel kon genotoxiciteit niet worden uitgesloten. Al deze stoffen vragen dus om verder onderzoek naar hun genotoxisch potentieel, doch de prioriteit en het type analyse om deze data te bekomen verschilt.

In werkpakket 5 werd de LLE methode, ontwikkeld in werkpakket 3, geoptimaliseerd voor een beperkt aantal migranten die werden geselecteerd op basis van de resultaten van de screening/scoring van de toxiciteit (werkpakket 4) en de semi-kwantitatieve concentraties die werden bepaald in werkpakket 3. Monitoring en kwantificering van deze verbindingen werd uitgevoerd met behulp van GC en LC-QqQ-MS, waarbij verschillende parameters werden gevalideerd (gevoeligheid, selectiviteit, lineariteit, nauwkeurigheid, precisie, recoveries en matrixeffecten). Analyse van de 3e migratie-oplossing die werd verkregen na toepassing van de standaardmigratiecondities (3 migraties, 2 uur bij 70 °C) op de babyflessen (die moeten voldoen aan de wettelijke EU migratielimieten), toonde aan dat uit sommige babyflessen componenten migreerden die niet opgenomen zijn in de 'positieve' lijst van de Europese Verordening 10/2011 en dit in concentraties groter dan 10 µg kg^{-1}. Voor alle gedetecteerde verbindingen waarvoor de Europese Verordening 10/2011 een specifieke migratielimiet (SML) oplegt, zoals benzofenon (600 µg kg^{-1}, gedetecteerd tot 97 µg kg^{-1}), waren de concentraties in de migratie-oplossingen lager dan de respectievelijke SML-waarde.

Nadien werd in werkpakket 5 het effect van een aantal "reële gebruiksomstandigheden" op het profiel van de verschillende migranten geëvalueerd aan de hand van duurtesten en vergeleken met zowel een referentiebehandeling (30 min bij 40°C) als met de standaard EU "repetitieve gebruiksomstandigheden" (3 migraties, 2 uur bij 70°C). In de extracten van de experimenten waarbij de invloed van de microgolfoven werd geëvalueerd, werd een lichte toename van de concentratie van de migranten waargenomen. Bovendien werd ook een verlengde vrijgave van de gemonitorde verbindingen gedetecteerd terwijl deze migranten beduidend sneller verdwenen in het referentie-experiment. De vaatwasserbehandeling resulteerde ook in een lichte toename van een aantal van de doelcomponenten, terwijl andere migranten lagere concentraties vertoonden dan in het referentie-experiment. Dit was waarschijnlijk te wijten aan het feit dat deze componenten al gedeeltelijk verwijderd werden gedurende het 'was'-proces. Stoomsterilisatie resulteerde in een snelle verwijdering van de gemonitorde verbindingen en de waargenomen concentraties waren lager dan of gelijkaardig aan de waarden na de referentiebehandeling. De tendens die werd waargenomen voor de stoomsterilisatie toont aan dat deze behandeling het voordeel biedt dat residuele chemicaliën die nog in het polymeer aanwezig zijn kunnen worden geëlimineerd. Een initiële verwijdering van de chemicaliën werd ook waargenomen bij de kooksterilisatie. Voor de siliconen fles werd er echter voor bepaalde migranten een verhoogde vrijgave vastgesteld. Bijgevolg lijkt de kooksterilisatie niet geschikt voor dit materiaal. Voor alle duurtesten werd een neerwaartse tendens van de gemeten concentraties waargenomen doorheen de opeenvolgende cycli. Hoewel dezelfde componenten werden gedetecteerd in de duurtesten als in het experiment voor repetitief gebruik zoals voorgeschreven in de Europese Wetgeving waren de gemeten concentraties significant hoger. Het experiment voor repetitief gebruik lijkt daarom de werkelijke migratie van babyflessen onder reële gebruiksomstandigheden te overschatten. Er moet echter rekening worden gehouden met het feit dat alle duurtesten afzonderlijk werden uitgevoerd, en dat een combinatie van de behandelingen zou kunnen leiden tot een hogere vrijgave.

Vervolgens werd de blootstelling van kinderen aan de migranten ingeschat en een voorlopige risicoanalyse van de geïdentificeerde stoffen werd uitgevoerd (werkpakket 6). Voor de risicoanalyse werd een onderscheid gemaakt tussen de migranten aanwezig in Annex I van de Europese verordening 10/2011 en de niet-opgelijste stoffen (bijv. niet intentioneel toegevoegde stoffen (NIAS)). Voor de opgelijste stoffen werden de concentraties in de migratie-oplossingen vergeleken met hun specifieke migratielimieten

(SML) (indien van toepassing). De migratie van deze stoffen bleek lager te zijn dan de SML. Voor de niet-opgelijste stoffen, dient de impact geëvalueerd te worden op basis van internationaal erkende principes voor risicoanalyse (Art. 19 van de Europese verordening 10/2011), zoals o.a. het concept 'Threshold of Toxicological Concern' (TTC). De geschatte blootstelling van een aantal niet-opgelijste componenten overschreed de drempelwaarde bepaald door het TTC-concept. Voor slechts 7 babyflesjes waren de blootstellingswaarden van alle stoffen beneden de TTC-drempels. Voor de stoffen die de drempelwaarde overschreden werd een meer diepgaande risicoanalyse uitgevoerd op basis van verzamelde gegevens uit de database van het Europees Agentschap voor chemische stoffen (ECHA), *in silico* programma's (o.a. Toxtree en Derek Nexus™) en *in vitro* screening studies met de Vitotox®-test. Op basis van deze analyse bleven drie babyflessen zorgwekkend door de aanwezigheid van 2,6-di-t-butylbenzoquinone, 2butoxyethylacetaat en 4-fenylbenzofenon.
De TTC-benadering houdt echter geen rekening met eventuele hormoonverstorende effecten van de stoffen. Aangezien het gebruik van BPA in PC babyflesjes werd verboden op basis van zijn hormoonverstorende eigenschappen, werden alle stoffen (al dan niet opgelijst in Annex I van de Europese verordening 10/2011) ook geëvalueerd op hormoonverstorende activiteit door het gebruik van verschillende bestaande lijsten van (vermoedelijke) hormoonverstorende chemicaliën (dwz EU prioriteitenlijst voor hormoonverstoorders, TEDX-lijst en SIN-lijst). De stoffen p-t-octylfenol en dibutylftalaat werden teruggevonden in categorie 1 van de EU prioriteitslijst, wat betekent dat er sprake is van hormoonverstoring in minstens één diersoort in dierstudies uitgevoerd met intacte levende dieren. Op basis van deze informatie werden drie babyflessen geklasseerd als zorgwekkend.

Tenslotte werden de resultaten van de voorafgaande risicoanalyse volgens het TTC concept gecombineerd met de risicoanalyse op basis van hormoonverstorende activiteit. Bijgevolg bleven vijf babyflessen van zorgwekkende kwaliteit en moeten deze verder worden onderzocht.

RF 12/6260 THYREOMERK

Biomerker benadering als alternatieve methode voor het opsporen van residuen van exogeen toegediende thyreostatica bij nutsdieren in het kader van het controleprogramma

Coördinator:
Prof. Lynn Vanhaecke (UGent)
Promotoren:
Dr. Julie Vanden Bussche (UGent)
Dr. Philippe Delahaut (CER-Groupe)
Onderzoekers:
Dr. Michel Dubois (CER-Groupe)
Dr. Jella Wauters (UGent)
Dr. Lieven Van Meulebroek (UGent)

Toelage: € 353.194
Periode: 1/2/2013 - 31/1/2016 (36 maanden)

Onderzoeksresultaten

Thyreostatica, die illegaal kunnen worden toegediend aan nutsdieren in het kader van de vetmesterij, zijn onder meer door hun teratogene en carcinogene effecten verboden in de Europese Unie. In 2006 werd echter het 'natuurlijk' voorkomen van het synthetische thiouracil (TU) in de urine van runderen voor het eerst beschreven, waardoor de link tussen het voorkomen in de urine en het illegaal gebruik in vraag werd gesteld en een semi-endogene status van TU werd verondersteld. Er werd bevestigd dat TU gevormd kan worden uit voeder afkomstig van Brassicaceae. Als reactie hierop werd door de EURL een 'recommended concentration' van 10 µg L^{-1} uitgevaardigd (o.a. in urine en schildklier) aangezien de mogelijke concentratie endogene sporen zich steeds tussen 1 en 10 µg L^{-1} leek te situeren. Recent werden echter in verschillende Europese lidstaten residuen van thyreostatica teruggevonden in urine van nutsdieren aan concentraties tussen 10 en 100 µg L^{-1}. Het is echter onduidelijk of dergelijke concentraties eveneens toegeschreven kunnen worden aan een endogene oorsprong. Dit onderzoek beoogde op deze vraag een antwoord te geven. Ten eerste diende er een statistisch onderbouwde drempelwaarde gerapporteerd te worden, die de classificatie endogeen versus synthetisch moet toelaten bij TU positieve urinestalen (WP1). Ten tweede moest via een *in vivo* onderzoek gescreend worden in welke mate residuen van TU in urine, schildklierweefsel en vlees terug te vinden zijn bij runderen, die werden onderworpen aan een Brassicaceae-rijk dieet of een synthetische TU behandeling, en in welke mate deze runderen hiervan directe invloeden ondervinden op hun gezondheid (WP2 + 3). Tenslotte zou getracht worden één of meerdere urinaire biomerkers te identificeren op basis waarvan in de toekomst een eenduidig onderscheid gemaakt kan worden tussen TU van endogene en synthetische oorsprong (WP4).

Tijdens het eerste jaar van dit onderzoek werden van verschillende Europese lidstaten (Nederland, Frankrijk, Verenigd Koninkrijk, Polen, Noorwegen en België) data (2010-2012) verzameld van de waargenomen urinaire TU gehaltes bij runderen (n=3894), kleine herkauwers (n=85) en varkens (n=654). Op basis daarvan werden beschrijvende statistieken berekend, waarvan vooral het 95% en 99% percentiel van belang zijn bij de suggestieve definitie van een nieuwe Europese drempelwaarde. De 95% en 99% percentielen voor runderen, kleine herkauwers en varkens bedragen respectievelijk 8,1

en 18,2 µg L^{-1} (of ppb), 7,3 µg L^{-1} (geen 99% percentiel) en 7,4 en 13,5 **µg L^{-1}**. Hierbij lijkt een nieuwe 'recommended concentration' van 30 µg L^{-1} voor runderen aangewezen. De respectievelijke datasets werden tevens diepgaander statistisch bestudeerd rekening houdend met subpopulaties o.a. gebaseerd op land van oorsprong, geslacht en leeftijd.

Een piloot *in vivo* studie werd tevens uitgevoerd, met het oog op het definiëren van optimale studiecondities (WP2 + 3). Uit deze proef (uitgevoerd op 2 kalveren en 2 koeien, onderworpen aan een cross-over design) werd onder andere duidelijk dat voor urinestalen gestabiliseerd door pH-aanpassing en toevoeging van EDTA significant hogere TU gehaltes bepaald werden. Daarnaast werd duidelijk dat een variërende urinedichtheid vermoedelijk interfereerde met de resultaten. TU gehaltes stegen enkel significant bij synthetische TU toediening, met de hoogste gehaltes bij de avondstaalname (als de behandeling 's ochtend na staalname plaatsvond) en bij kalveren (een zelfde dosis als bij koeien; dagelijks 1 g TU). Algemeen bleek de duur van de acclimatisatieperiode en van de raapzaadschroot-behandeling niet te volstaan.

In het tweede jaar van dit onderzoek werd de effectieve *in vivo* studie uitgewerkt en uitgevoerd. Daarvan werden de *in vivo* stalen onderworpen aan de 'targeted' analyse voor de bepaling van TU en de schildklierhormonen. Bij deze *in vivo* proef werden in urinestalen van runderen en kalveren die niet behandeld werden met synthetisch TU, gehaltes van TU aangetroffen die de 'recommended concentration' van 10 µg L^{-1} ruim overschreden (zelfs bij controledieren). Op basis van deze studie zijn er echter geen aanwijzingen dat dergelijke gehaltes een potentieel gezondheidsrisico zouden inhouden voor de mens vermits geen TU gedetecteerd kan worden in de eetbare matrices van alle betrokken dieren. De studie toonde evenwel een duidelijke impact op de gezondheid van de dieren, in het bijzonder na synthetische TU behandeling, aangezien het normale schildklierhormonenprofiel in serum danig werd verstoord en verhoogde TU residuen werden waargenomen in het schildklierweefsel van de betreffende proefdieren op het einde van de studie.

Tijdens het derde en laatste jaar richtte het onderzoek zich op de karakterisatie van potentiële merkers, indicatief voor TU behandeling. Hiertoe werd eerst een analytische screeningsmethode ontwikkeld, die zich in grote mate baseerde op de studie van Vanden Bussche *et al*. (2010). Deze methode was in staat om thyreostatica, thyroïdhormonen en oxazolidine-thiones op een accurate en reproduceerbare te detecteren en kwantificeren, en daarenboven een hoge coverage van het urinaire metaboloom te realiseren. Deze methode werd gebruikt voor de analyse van stalen afkomstig van de *in vivo* proef. Een strategie van multivariate data-analyse toonde aan dat aan de hand van de metabolische fingerprints een duidelijk onderscheid gemaakt kon worden tussen TU behandelde dieren en controledieren, en dit zowel voor de kalveren als koeien. In totaal werden hierbij respectievelijk 18 en 31 metabolieten als potentiële biomerkers weerhouden. Verdere evaluatie van deze kandidaatmerkers baseerde zich op hun prevalentie in de stalen van de dieren, die het raapzaadschroot-aangerijkte dieet kregen toegediend (vereist specificiteit ≥ 80%). Daarnaast werd ook een correlatiestudie (Kendall's > 0,5) uitgevoerd, waarbij naar een metabolische link met TU werd gezocht. Op die manier werd het aantal potentiële merkers verder gereduceerd tot 11 voor de kalveren en 18 voor de koeien. Deze metabolieten worden sowieso heel wat waarde toegedicht in het vaststellen of bevestigen van een lopende TU behandeling, waarbij gedetecteerde urinaire TU concentraties relatief hoog zijn. Opdat de merkers ook nuttig zouden zijn in het onderscheiden van endogene en exogene TU werd onderzocht of de merkers ook bij lage exogene TU-concentraties detecteerbaar zijn. Hiertoe werd gebruik gemaakt van de data van de washout periode en werd een staal-verdunningsproef uitgevoerd. Uiteindelijk

werden voor de koeien en kalveren respectievelijk 4 en 2 merkers weerhouden. Detectie van deze merkers wordt als mogelijk verwacht bij exogene TU concentraties < 5 $\mu g\ L^{-1}$. Door de aanwezigheid van endogene TU concentraties in alle stalen wordt een accurate bepaling van deze TU concentraties evenwel sterk bemoeilijkt. Identificatie en validatie van deze merkers vormen de toekomstige stappen om de implementatie van deze merkers in het de nationale residu-controleplannen effectief te kunnen onderbouwen.

RF 12/6261 ALTER

Alternaria mycotoxinen in levensmiddelen: Voorkomen en invloed van voedselverwerking

Coördinator:
Prof. Sarah De Saeger (UGent)
Promotoren:
Prof. Lynn Vanhaecke (UGent)
Prof. Anita Van Landschoot (UGent)
Onderzoekers:
Dr. Jeroen Walravens (UGent)
Dr. José Diana Di Mavungu (UGent)

Toelage: € 349.728
Periode: 1/2/2013 - 31/1/2016 (36 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het ALTER project heeft als doelstelling het voorkomen van (gemodificeerde) *Alternaria* mycotoxinen in verscheidene levensmiddelen beschikbaar op de Belgische markt in kaart te brengen. Tevens wordt de invloed van voedselverwerking op de *Alternaria* toxineconcentraties nagegaan, met name tijdens het bierproductieproces en de productie van tomaat-gebaseerde levensmiddelen (concentraat). Hiertoe is er nood aan gevalideerde LC-MS/MS methoden voor de simultane bepaling van vrije en gemodificeerde *Alternaria* toxinen in verschillende matrices, met name graanproducten (rijst, havermout), groenten- en vruchtensappen, tomaat-(producten), (grondstoffen en tussenproducten van) bier, linzen en oliehoudende producten. Deze levensmiddelen werden geselecteerd op basis van de beschikbare informatie m.b.t het voorkomen van *Alternaria* toxinen. De incidentiegegevens die via dit project verzameld werden, zijn noodzakelijk én beleidsondersteunend, en kunnen bijdragen tot de uitvoering van een adequate risicoanalyse op Europees niveau (EFSA).

Vooreerst werden de noodzakelijke referentiestandaarden van de *Alternaria* toxinen alternariol (AOH), alternariol methyl ether (AME), tenuazonic acid (TA), tentoxin (TEN), altenuene (ALT) en altertoxin-I (ATX-I) aangekocht of verkregen. Tevens werden dankzij internationale samenwerkingsverbanden enerzijds referentiestandaarden van de gesulfateerde en geglycosyleerde conjugaten van AOH en AME (AOH3S, AME3S, AOH3G, AME3G) en anderzijds isotoop gelabelde interne standaarden ($[^{2}H_{4}]$-AME en $[^{13}C_{6}{}^{15}N]$-TA) verkregen. Vervolgens werden UPLC-MS/MS methoden voor de simultane bepaling van 10 (gemodificeerde) *Alternaria* toxinen ontwikkeld gebruik makend van een Waters Acquity UPLC-systeem enerzijds gekoppeld aan een Quattro Premier XE en anderzijds aan een Xevo TQ-S massaspectrometer (Waters, Milford, MA, VS). Eerst werden voor beide MS toestellen de MS/MS instrumentele parameters voor alle componenten geoptimaliseerd via directe infusie van een tune oplossing. Chromatografische scheiding met behulp van een Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.8 µm, 2.1 x 100 mm) kolom en optimalisatie van de vloeisnelheid (0.4 $ml.min^{-1}$), samenstelling van de mobiele fase (A: [ultrapuur water/azijnzuur (99:1, v/v)]; B: [acetonitrile/azijnzuur (99:1, v/v)]) en gradiënt elutie leidden tot een UPLC-methode met een totale looptijd van slechts 7 minuten. Daaropvolgend werden extractie-, opzuiverings- en LC-MS/MS methodologieën voor de simultane bepaling van 10 (gemodificeerde) *Alternaria* toxinen

in de voornoemde matrices ontwikkeld en gevalideerd aan de hand van een in-house ontwikkeld methodevalidatie protocol. Prestatiecriteria voor de validatie-parameters specificiteit, detectielimiet, kwantificatielimiet, relatieve terugvinding, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en uitgebreide meetonzekerheid dienden in overeenstemming te zijn met Europese Verordening 401/2006/EC, Europees Besluit 2002/657/EC en *ICH harmonized guidelines*.
Aansluitend werd een survey verspreid over 7 staalnamemomenten (elke 5 maanden gedurende 2,5 jaar) uitgevoerd. Na de analyse van alle stalen uit staalnamemomenten 1 tot 4 werd een evaluatie- en heroriënteringsmoment ingepland. Omwille van een totale afwezigheid van (geconjugeerde) *Alternaria* toxinen in appel- en wortelsap werd beslist deze levensmiddelen te vervangen door meer stalen (meer verschillende merken) van tomaatproducten, zonnebloemolie en sesamolie. In totaal werden 344 stalen verdeeld over 12 verschillende levensmiddelen geanalyseerd. Uit de resultaten blijkt de hoge prevalentie van zowel AOH (<LOQ-41.6 $\mu g.kg^{-1}$), AME (<LOQ-11.6 $\mu g.kg^{-1}$), TA (7.7-876.4 $\mu g.kg^{-1}$) en in mindere mate ALT (<LOQ-62.0 $\mu g.kg^{-1}$) in de commerciële tomaatproducten. Voorts werden vrij hoge concentraties AOH (<LOQ-122.3 $\mu g.kg^{-1}$) teruggevonden in sesamzaden, terwijl AME frequent in zowel sesamzaden (<LOQ-155.7 $\mu g.kg^{-1}$) als -olie (<LOQ-64.4 $\mu g.kg^{-1}$) gedetecteerd werd. In het algemeen kan gesteld worden dat de distributie en het gehalte van de contaminatie met *Alternaria* toxinen binnen deze survey in goede overeenstemming is met eerder gerapporteerde data. Voorts werd binnen deze survey voor de eerste maal ooit het voorkomen van gemodificeerde *Alternaria* toxinen (sulfaten van AOH en AME) gerapporteerd, met name in tomaatproducten en sesamzaden.

Vervolgens werd zowel een deterministische als probabilistische blootstellingsinschatting uitgevoerd voor AOH, AME en TA, *Alternaria* toxinen waarvoor een *threshold of toxicological concern* (TTC) waarde voorhanden is. De bekomen concentratiedata werd gecombineerd met consumptiegegevens, enerzijds afkomstig van de nationale voedselconsumptiepeiling (volwassen populatie, VCP 2004), en anderzijds verzameld via een zelf ontwikkelde *food frequency questionnaire* (FFQ, goedgekeurd door het Ethisch Comité van het UZ Gent [EC/2015/0449]). Het doel van deze FFQ was te peilen naar de consumptie van voornoemde levensmiddelen binnen het ALTER project bij een specifieke doelgroep, met name volwassen vegetariërs (n=242). De resultaten van zowel de deterministische als probabilistische blootstellingsinschatting bevestigen dat AOH en AME een potentieel risico betekenen voor de volksgezondheid, voornamelijk ten gevolge van blootstelling door consumptie van tomaat-gebaseerde levensmiddelen. Bijkomend werd een scenario-analyse, gebaseerd op een hypothetisch dieet, uitgevoerd, en de resultaten bevestigen de bevindingen van de blootstellingsinschatting voor AOH en AME. De uitgevoerde scenario-analyse toonde echter ook aan dat blootstelling aan TA via de voeding in bepaalde gevallen de opgelegde TTC-waarde kan overschrijden, en aldus ook een potentieel risico inhoudt voor de volksgezondheid.

Wat betreft de invloed van het tomaatverwerkingsproces op het *Alternaria* toxinegehalte, werd uitgaande van natuurlijk gecontamineerd startmateriaal, dat zichtbaar schimmelgroei en verrotting vertoonde, de productie van tomatenconcentraat op laboschaal in vijfvoud uitgevoerd. Uit de resultaten blijkt dat de concentratie van de aanwezige *Alternaria* toxinen doorheen het productie-proces toeneemt. Echter, wanneer de relatieve hoeveelheid toxine uitgezet wordt in functie van de staalname ("massatransfer" benadering), blijkt er nauwelijks verschil te zijn in toxinegehalte in het vermalen tomatensap en het geconcentreerde eindproduct, wat wijst op stabiliteit van *Alternaria* toxinen tijdens het tomaatverwerkingsproces. Wat betreft de industriële case studies werden deze vervangen door de kwantitatieve LC-MS/MS analyse van een

selectie van de stalen verzameld in het kader van het Europese VEG-i-TRADE project (EU 7th Framework programme, 2010-2014). Binnen dit project werden in industriële tomaatverwerkende bedrijven gevestigd in Spanje en Portugal stalen doorheen het productieproces van tomaat tot concentraat verzameld. De resultaten tonen eveneens de stabiliteit aan van *Alternaria* toxinen tijdens het industriële productieproces.

Betreffende de studieopzet rond de invloed van het bierproductieproces op het *Alternaria* toxinegehalte, werd initieel gecontamineerde vermoute gerst bekomen via artificiële contaminatie tijdens het moutproces. Uitgaande van gecontamineerd startmateriaal werden drie proefbrouwerij-experimenten doorlopen. Op basis van de "massa transfer" benadering kan gesteld worden dat, niettegenstaande een initiële toename en daaropvolgende daling tijdens de eerste fasen van het brouwproces, de hoeveelheid toxine in het afgewerkte bier nauwelijks lager is dan de initiële hoeveelheid in het gecontamineerde startmateriaal. Tot slot werden drie industriële case studies uitgevoerd, en de bekomen resultaten bevestigen de bevindingen van de proefbrouwerij-experimenten, met name dat een goede kwaliteit van de grondstoffen noodzakelijk is om een toxinevrij eindproduct te bekomen.

Aangaande de identificatie van onbekende *Alternaria* toxinemetabolieten en -conjugaten, werden initieel de fragmentatie pathways van *Alternaria* toxinen waarvoor referentiestandaarden beschikbaar zijn, opgehelderd. Analyse van relevante (hoog gecontamineerde) stalen uit de survey/WP3 m.b.v. HRMS resulteerde in de bevestiging van de aanwezigheid van een aantal onbekende componenten.

RT 14/08 APESTICON 1

Développement d'une procédure d'évaluation des risques associée à l'utilisation des appareils d'application des produits phytopharmaceutiques dans le cadre de l'article 8 de la Directive 2009/128 et développement de protocoles de contrôles spécifiques adaptés

Coordinateur :
Dr. Philippe Druart (CRA-W)
Promoteur :
Dr. Lieve Herman (ILVO)
Chercheurs :
Dr. Bruno Huyghebaert (CRA-W)
Mme Marie Stas (CRA-W)
Dr. David Nuyttens (ILVO)
Dr. Ingrid Zwertvaegher (ILVO)
Dhr. Johan Declercq (ILVO)
Dhr. Donald Dekeyser (ILVO)

Subside : € 100.000
Période : 1/5/2015 - 31/10/2016 (18 mois)

Résultats des recherches

La Directive de l'Union européenne EU 2009/128/EC sur l'utilisation durable des pesticides impose aux Etats Membres (EM) de s'assurer que tous les Equipements d'Application de Pesticides (EAP) en utilisation professionnelle fassent l'objet d'inspections à intervalles réguliers (Article 8.1 et 8.2). L'Article 8.3 de la Directive permet d'y déroger sur base d'une évaluation des risques (ER) pour la santé humaine et l'environnement, et d'une évaluation du niveau d'utilisation du matériel.
Le projet APESTICON a pour objectifs de développer un protocole d'ER et de répondre aux exigences de la Directive 2009/128/EC. Les objectifs sont de développer et de valider un protocole d'ER, de l'appliquer aux EAP utilisés en Belgique, de développer des protocoles d'inspection pour les EAP utilisés qui ne font ni l'objet d'exemption ni l'objet d'inspection jusqu'à présent.
Une enquête internationale a été conduite comme étude préliminaire. Le but est de mieux comprendre la situation actuelle en ce qui concerne l'implémentation de la Directive EU 2009/128/EC et les aspects relatifs à l'inspection des EAP. Les résultats de l'enquête montrent une grande variabilité des situations d'inspection des EAP parmi les différents EM. Ils indiquent aussi qu'à la fin de l'année 2016, pratiquement aucun Etat Membre n'aura implémenté la Directive européenne.

Dans le WP1, les différents types d'EAP utilisés en Belgique ont été inventoriés sur base d'une revue de la littérature, d'une recherche internet et d'une enquête nationale. Au total, 29 types d'EAP ont été identifiés et décrits.

Dans le WP2, des inventaires de protocoles d'inspection et d'équipement de tests existants ont été réalisés sur base d'une revue de la littérature, d'une recherche internet et d'une enquête auprès d'experts des différents EM. Au total, 21 différents types d'équipements de test ont été inventoriés et décrits.

Dans le WP3, une revue de la littérature sur les méthodes existantes d'ER a été réalisée. Certaines méthodes ont été sélectionnées. Des points spécifiques en ont été retenus pour être utilisés dans le développement de l'ER. Enfin, les applications du système par logique floue ont été inventoriées. Selon notre analyse, cette méthode n'est pas pertinemment adaptable aux objectifs d'APESTICON. Le concept de 'jugement d'expert' sera tout de même retenu pour le projet.
Dans le WP4, un protocole d'ER a été développé. La méthode d'ER proposée est basée sur des inputs factuels et techniques autant que sur des jugements d'experts. L'ER est réalisé en calculant le risque « avant inspection » (machine présentant des défauts techniques supérieurs au niveau de tolérance de l'inspection) et « après inspection » (les défauts supérieurs au niveau de tolérance de l'inspection sont réparés). L'objectif est d'évaluer la potentielle réduction du risque engendrée par l'inspection. Le risque est calculé avec l'occurrence de défauts techniques et avec leurs gravités d'impact. Une échelle d'utilisation de chaque PAE a été définie au niveau belge. Le risque total de l'application de pesticides peut être évalué grâce à l'ajout de la part humaine du risque sur la part technique.

Dans le WP5, la méthode d'ER a été validée. La valeur du risque et la valeur de réduction de risque a été évaluée pour la santé humaine et l'environnement, à différentes échelles, sur des équipements déjà inspectés. La méthode a dévoilé des résultats satisfaisants en ce qui concerne les valeurs de risque et de réduction de risque.

Dans le WP6, l'ER a été appliqué aux PAE types décrits à la Tâche 1.3 de ce projet. Les valeurs de risque et de réduction de risque sont disponibles à l'échelle du défaut, à l'échelle de la machine et à l'échelle de la Belgique pour l'opérateur, pour le consommateur et pour l'environnement. Le risque calculé inclut celui des paramètres défectueux « defects only » ou bien les risques de paramètres défectueux et de paramètres correctes « defects+residual risk ».

Dans le WP7, de nouveaux protocoles d'inspection ont été développés. Une table créée dans le WP4 liste tous les défauts potentiels des EAP. Elle est une bonne référence pour le développement de nouveaux protocoles d'inspection. Sur base des résultats du WP6, les autorités devront décider des EAP qui seront exempts d'inspection. Hormis ceux qui existent déjà, de nouveaux protocoles d'inspection ont été développés pour les pulvérisateurs à lance et à pistolet, les thermo-nébuliseurs (thermiques et électriques), et pour les atomiseurs à froids.

RT 14/09 ZENDONCONVERT 1

Onderzoek naar het conversieprofiel van gemaskeerd deoxynivalenol en zearalenone in het gastro-intestinaal stelsel van het varken en de mens

Coördinator:
Prof. Sarah De Saeger (UGent)
Promotoren:
Prof. Siska Croubels (UGent)
Prof. Geert Haesaert (UGent)
Dr. Alfons Callebaut (CODA-CERVA)
Dr. Bart Huybrechts (CODA-CERVA)
Prof. Lynn Vanhaecke (UGent)
Prof. Kris Audenaert (UGent)
Onderzoekers:
Dr. Marthe De Boevre (UGent)
Dr. Nathan Broekaert (UGent)
Dr. Siegrid De Baere (UGent)
Dr. Lieselot Hemeryck (UGent)

Toelage: € 200.000
Periode: 1/1/2014 - 30/9/2016 (24 maanden)

Onderzoeksresultaten

Het project ZENDONCONVERT had als doel een antwoord te bieden op volgende onderzoeksvragen:

1. In welke mate wordt zearalenone, α-zearalenol of β-zearalenol vrijgegeven tijdens het verteringsproces uit zearalenone-14-glucoside, zearalenone-14-sulfaat, α-zearalenol-14-glucoside en β-zearalenol-14-glucoside, frequent voorkomende gemaskeerde derivaten in graangebaseerde voeding en voeder?
2. In welke mate wordt deoxynivalenol vrijgegeven tijdens het verteringsproces uit deoxynivalenol-3-glucoside, een frequent voorkomende gemaskeerd derivaat in graangebaseerde voeding en voeder?
3. In welke mate zijn er conversies van zearalenone naar α-zearalenol en β-zearalenol tijdens het verteringsproces, en van α-zearalenol en β-zearalenol naar zearalenone?
4. Hoe verloopt de toxicokinetiek van (gemodificeerde) derivaten van zowel deoxynivalenol als zearalenone?
5. Kunnen de bekomen *in vitro* en *in vivo* resultaten gerelateerd en geëxtrapoleerd worden aan de tolereerbare dagelijkse inname (TDI) van zowel deoxynivalenol als zearalenone?

Tijdens deze studie werden deze vragen beantwoord aan de hand van varkens- en humane modellen van het gastro-intestinaal stelsel (*in vitro* en *in vivo*).

Het project had tot doel om inzicht te krijgen rond het conversieprofiel van bepaalde gemodificeerde *Fusarium* mycotoxinen naar vrije mycotoxinen tijdens de vertering, meer bepaald deoxynivalenol (DON) en zearalenone (ZEN). De conversie van ZEN tijdens de vertering naar zijn fase I metabolieten α-zearalenol (α-ZEL) en β-zearalenol (β-ZEL) werd eveneens onderzocht, en biedt verder een basis om het toxicokinetisch profiel van ZEN te onderzoeken. Het onderzoek heeft zich gefocust op DON, ZEN en zijn (gemodificeerde)

vormen deoxynivalenol-3-glucoside (DON-3G), α-ZEL, β-ZEL, zearalenone-14-glucoside (ZEN-14G), zearalenone-14-sulfate (ZEN-14S), α-zearalenol-14-glucoside (α-ZEL-14G) en β-zearalenol-14-glucoside (β-ZEL-14G). Deze mycotoxinen zijn ontegensprekelijk veel voorkomende contaminanten in graangebaseerde voeding en voeder.

De consumptie van vrije mycotoxinen DON en ZEN geven aanleiding tot een variëteit aan klinische symptomen zoals gastro-intestinale manifestaties, degeneratie van het immuunsysteem, zenuwstelsel en reproductiesysteem en een oestrogene activiteit bij zowel mens als dier. Recente rapporten tonen aan dat ZEN en α-ZEL een gelijke cytotoxiciteit en genotoxiciteit vertonen, en dat ze beide meer cyto- en genotoxisch zijn dan β-ZEL. Alsook werd bepaald dat α-ZEL een grotere affiniteit (in vergelijking met ZEN) heeft voor oestrogeenreceptoren wat bijgevolg aanleiding geeft tot een verhoogde oestrogene activiteit (Ayed *et al.*, 2011). Gemodificeerde mycotoxinen kunnen een bedreiging zijn voor zowel dieren als mensen daar ze mogelijks in het verteringsstelsel kunnen gehydrolyseerd worden naar de vrije mycotoxinen. Hierdoor bestaat het risico dat een onverwacht hoge toxiciteit kan vastgesteld worden. Om deze reden is het van cruciaal belang dat de dispositie en kinetiek van zowel vrije als gemodificeerde mycotoxinen in zoogdieren wordt ontrafeld zodat data rond het voorkomen in voeding en voeder, en andere biomonitoringsresultaten correct kunnen geïnterpreteerd worden.

Behaalde resultaten
Uitgaande van de bekomen resultaten van het tweejarig project kan het consortium volgende conclusies aanhalen.

Alle referentiestandaarden van de (gemodificeerde) mycotoxinen waren beschikbaar in de benodigde hoeveelheden: DON-3G werd bekomen via een samenwerkingsovereenkomst met BOKU, Oostenrijk (DON-3G), via isolatie van *F. graminearum* gecontamineerde rijst (ZEN-14S), via chemische synthese (ZEN-14G, α-ZEL-14G, β-ZEL-14G).

Om de ideale condities voor de ZEN-14S productie te bekomen, werd de *F. graminearum* fungus gecultiveerd op rijst. Het experiment toonde aan dat bij een incubatie van 28 dagen, bij een temperatuur van 27°C met een vochtigheidsgraad van 35%, de hoogste productie voor ZEN-14S werd bekomen. De behaalde hoeveelheid ZEN-14S was 5 mg per 50 g rijst. In een tweede fase werd bovenstaande methodologie gebruikt ter opschaling: 10 kg rijst werd geïncubeerd gedurende 28 dagen bij 27°C met een veldisolaat van *F. graminearum* bij een vochtigheidsgraad van 35%. Echter, enkel analytische µg van ZEN-14S konden worden bekomen. Om deze reden werd geopteerd om ZEN-14S te synthetiseren volgens Liu *et al*. (2004) met enkele modificaties aan het protocol. Uitgaande van 300 mg startmateriaal aan ZEN werd, met een rendement van 76%, 230 mg ZEN-14S bekomen.
ZEN-14G werd gesynthetiseerd volgens een klassieke, geoptimaliseerde Königs-Knorr reactie zoals beschreven in Zill *et al*. (1989) met enkele modificaties aan het protocol. Gebruik makende van bovenstaand protocol werd 170 mg ZEN-14G (>95%) bekomen.
α-ZEL-14G en β-ZEL-14G werden bekomen door de reductie van ZEN-14G met behulp van $NaBH_4$. De reactieopbrengst werd berekend op 94% (β-ZEL-14G (35.98%) en 58% (α-ZEL-14G). Uiteindelijk werd 20 mg α-ZEL-14G (>99%) en β-ZEL-14G (>96%) bekomen. Alsook werd een grote hoeveelheid ZEN-14,16-di-glucoside als bijproduct bekomen.

De biosynthese via de transformatie van *F. graminearum* behelsde het volledige project, doch dit was geen restrictie daar voldoende hoeveelheden standaarden werden bekomen met de hierboven beschreven strategieën. Deze strategie, waarbij een mycotoxine wordt geproduceerd door een fungus en automatisch wordt geconverteerd

tot een gemodificeerde vorm is –volgens de mening van het consortium- een pioniers-aanpak die enorm zal geapprecieerd worden door de internationale wetenschappelijke wereld. Deze strategie kan ook toegepast worden op andere toxinen.

Zowel een targeted als een non-targeted approach werd gevolgd om de te verwachten output te verkrijgen. Meer details omtrent de techniek en methodiek worden in het eindverslag gegeven. Er konden echter enkel analytische µg van DON-3G worden bekomen. De methodiek rond de biosynthese via transformatie van *F. graminearum* is een innovatieve techniek en dient nog verder te worden onderzocht.
In het eerste deel van WP2 werden de metabolische pathways van alle componenten geanalyseerd. Zowel humane als rat levermicrosoom trials werden uitgevoerd op de mycotoxinemetabolieten; uitgaande van de resultaten werd duidelijk dat vele metabolieten werden gevonden, en gedurende de trials werden eveneens nieuwe metabolieten voor het eerst geïdentificeerd. In een tweede deel van WP2 werden zowel humane als varkensmodellen aangewend om de *in vitro* verteringssimulatie te onderzoeken. Primaire targets waren DON, DON-3G, ZEN, α-ZEL, β-ZEL, ZEN-14G en ZEN-14S.
Een snelle hydrolyse van DON-3G naar DON werd aangetoond in de dikke darm (86 ± 8% tot 20 ± 8%), en een volledige hydrolyse van DON-3G werd bekomen na een incubatieperiode van 72 uur (2 ± 3%) (humane trial).
De incubatie van ZEN-14G toonde aan dat ZEN-14G niet volledig werd teruggevonden na maag-digestie (27 ± 4%), terwijl een daling van de ZEN-14G concentratie tot 17 ± 5% werd aangetoond in de dunne darm. Andere katabolieten zoals α-ZEL en β-ZEL werden slechts teruggevonden in een range van 3 tot 6%. Andere katabolieten konden niet geïdentificeerd worden. Ter conclusie: ZEN-14G wordt gehydrolyseerd in de dunne/dikke darm, en een volledige hydrolyse van ZEN-14G wordt aangetoond na een incubatie van 72 uur (5 ± 3%).
De incubatie van ZEN-14S toonde aan dat slechts 20% ZEN werd teruggevonden in de maag, en slechts 38 ± 6% werd teruggevonden in de dikke darm na 72 uur. ZEN kon dus niet volledig worden teruggevonden na complete digestie (38%). ZEN-14S werd quasi volledig teruggevonden (95 ± 6%) na de maagverteringsstap, terwijl een daling tot 20 ± 8% werd bekomen in de dunne darm. ZEN-14S wordt dus snel gehydrolyseerd, doch er konden geen degradatieproducten worden geïdentificeerd. α-ZEL en β-ZEL werden teruggevonden in een range van 7% tot 10%. Geen enkele andere kataboliet kon worden geïdentificeerd.

De meeste van de bekomen resultaten van de *in vitro* trial zijn gelijkaardig aan deze gevonden door Dall'Erta *et al.* (2013). Het moet evenwel benadrukt worden dat deze *in vitro*-experimenten geen *real-life* simulaties zijn. Om deze reden werd in WP3 een volledige *in vivo* toxicokinetische studie van (gemodificeerde) mycotoxinen in varkens opgenomen.

Via een cross-over design met wash-outs werden verschillende groepen van dieren behandeld met het beoogde (gemodificeerde) mycotoxine. Kort samengevat werd vastgesteld dat na PO-toediening van DON-3G enkel DON werd teruggevonden, wat er op wijst dat er een complete presystemische hydrolyse optreedt van de geabsorbeerde fractie van DON-3G. Analyse van de fase II metabolieten tonen aan dat DON-biotransformatie duidelijk enkel glucuronidatie behelst. *In vitro* studies hebben duidelijk aangegeven dat DON-3G minder toxisch is dan DON. De *in vivo* hydrolyse naar DON in varkens toont duidelijk een sterke daling van DON-3G, maar tegelijk een niet te verwaarlozen toxicologisch risico van DON-3G. Twee fase II-glucuroniden, namelijk DON-3GlcA en DON-15GlcA werden teruggevonden in de urine, en kleine hoeveelheden

van DOM-1 werden gedetecteerd. Deze resultaten zijn volstrekt in lijn met de resultaten bekomen uit de plasma-analysen waarbij werd aangetoond dat glucuroniden dienen te worden beschouwd als biomerkers voor blootstelling voor DON.

Het vrije mycotoxine ZEN werd gedetecteerd na IV ZEN-14G toediening, wat aantoont dat een systemisch hydrolyse van ZEN optreedt. Gelijkaardig aan de ZEN PO toediening, werd er geen ZEN gedetecteerd na PO toediening van ZEN-14G. Een systemische hydrolyse van 20% werd bekomen voor ZEN-14G naar ZEN. Geen ZEN werd, in tegenstelling tot de resultaten van de ZEN-14G trial, gedetecteerd noch na IV noch na PO toediening van ZEN-14S. Dit resultaat bewijst dat noch presystemische noch systemische hydrolyse naar ZEN optreedt vanuit ZEN-14S. Alsook, als gevolg, werden er geen fase I (α-ZEL) en fase II (α-ZEL-glucuronide en ZEN-glucuronide) metabolieten gedetecteerd. Dit fenomeen duidt hoogstwaarschijnlijk een component-specifieke conversie van ZEN-14S in het varken aan.

Alle resultaten kwamen goed overeen met de resultaten die werden bekomen in plasma. Deze tonen aan dat:

1. de fase II metaboliet ZEN-14-glucuronide een correcte biomerker voor bloostelling in varkens is;
2. er partiële hydrolyse van α-ZEL en β-ZEL naar ZEN optreedt;
3. er geen *in vivo* conversie tussen α-ZEL en β-ZEL optreedt;
4. er partiële hydrolyse van ZEN-14G naar ZEN optreedt;
5. er partiële fase I biotransformatie van ZEN naar α-ZEL, en niet naar β-ZEL optreedt.

Het laatste punt biedt een plausibele uitleg voor het feit dat varkens het meest gevoelige species zijn voor ZEN toxiciteit.

Uitgaande van de resultaten bekomen uit de verschillende projecten rond gemodificeerde mycotoxinen kan het consortium concluderen dat vele onderzoeksvragen zijn opgelost en resultaten werden bevestigd.

EFSA heeft onlangs enkele aanbevelingen gepubliceerd waarbij ervoor wordt gepleit om meer data te verzamelen rond het voorkomen van gemodificeerde ZEN mycotoxinen in voeding en meer data moeten worden bekomen rond het toxicokinetische profiel van de gemodificeerde vormen van ZEN. Ook wordt het gebruik van de potentiefactoren voor ZEN aangekaart waarbij wordt gesteld dat deze niet aanvaardbaar zijn of bruikbaar zijn in routinelaboratoria. Om deze reden is het van cruciaal belang dat meer inzicht wordt verworven rond het voorkomen van mogelijke ZEN-metabolieten, waarbij we ons enkel dienen te focussen op de meest relevante ZEN-mycotoxinen.

RF 14/6285 PERCHLOREM

Studie en remediëring van perchloraat in de teelt van bladgewassen onder glas

Coördinator:
Dhr. Raf De Vis (Proefstation voor de Groenteteelt)
Promotoren:
Dr. Mia Demeulemeester (Inagro)
Dr. Carine De Clercq (Primoris)

Toelage: € 225.000
Periode: 1/12/2014 - 31/5/2016 (18 maanden)

Onderzoeksresultaten

Vóór de start van het project kon perchloraat in meststoffen niet nauwkeurig geanalyseerd worden. Primoris heeft een analysetechniek ontwikkeld en gevalideerd. In het project werd een protocol opgemaakt: via extractie met acetonitrile/water wordt perchloraat geëxtraheerd. Na centrifugatie en verdunning, wordt de analyse uitgevoerd via LC-MS/MS. De performantie van de ontwikkelde methode is in overeenstemming met de SANCO-guidelines. De methode wordt ter accreditatie aangeboden met een rapportagelimiet van 0,05 ppm.

Er werd een interlaboratoriumtest voor de analyse van perchloraat in meststoffen uitgevoerd. Het bedrijf FAPAS/FERA heeft stalen aangemaakt met 1, 20 en 50 ppm perchloraat in het meststofstaal. Van elke concentratie (meststof A 1 ppm, meststof B 20 ppm en meststof C 50 ppm) werd een staal opgestuurd naar tien deelnemende labo's, verdeeld binnen Europa. De homogeniteit van de stalen, gemeten door Primoris, bleek uitstekend te zijn. Van de tien deelnemende labo's zijn er vijf die over heel de lijn betrouwbare resultaten produceren, de andere vijf vertonen een of meer resultaten die als onbetrouwbaar dienen te worden beschouwd.

De accumulatie van perchloraat in bodem en gewas bij toedienen van verschillende gehaltes aan perchloraat in de meststoffen werd nagegaan. Hiervoor werden op twee verschillende proefcentra vijf opeenvolgende teelten kropsla geteeld. In die vijf opeenvolgende teelten werd gewerkt met een onbehandeld object (0 ppm), 50, 100 en 200 ppm perchloraat in de meststoffen.

Conclusies van de accumulatieproef voor het gewas kropsla:

- De perchloraatopname in het vermarktbaar deel is hoger bij oogst in de maanden april-mei, daarna daalt het weer: bij toenemende daglengte (toenemende verdamping, wortelgroei, watergift) naar het einde van de teelt toe, wordt meer perchloraat opgenomen.
- Inagro moet volgens de behoefte van de plant meer meststoffen toedienen: na vijf opeenvolgende teelten werd 52 kg meststoffen per are toegediend en op PSKW was dit 28,5 kg per are. De grond van PSKW is rijker aan humus, nitraat, kalium, enz. waardoor telkens minder meststoffen per teelt toegevoegd worden. Het gevolg is dat Inagro hogere perchloraatwaarden meet. Mogelijks zijn de verschillen in perchloraatconcentratie ook te verklaren door een verschil in stralingssom, kropgewicht en grondsoort.
- Na vijf teelten kropsla met 50 ppm perchloraat in de meststoffen blijft

het perchloraatgehalte in het vermarktbaar deel steeds < 1 ppm (huidige Intracommunautaire handelsnorm)
- Na vijf teelten kropsla met 100 ppm perchloraat in de meststoffen wordt de norm van 1 ppm overschreden (op beide proefcentra in teelt 3, bij oogst 15 april en 4 mei)
- In het 0-object worden lage waarden perchloraat in het gewas gemeten. Mogelijke verklaringen zijn:
    - Bij de aanvang van de proef was minder dan 0,010 ppm in de bodem 0-30 cm aanwezig in het 0-object (detectielimiet 2014-2015). Ook verder in de proef werd in het 0-object < 0,01 ppm gemeten. In de berekeningen/grafieken werden deze waarden tot 0,0 ppm herleid. In een extra proef (2016 met detectielimiet 0,005 ppm in de bodem) werd aangetoond dat de gewassen ook nog perchloraat opnemen bij < 0,010 ppm in de bodem. Bij waarden tussen 0,005 en 0,01 ppm wordt ook nog perchloraat opgenomen door het gewas (zie extra proef WP 2.8).
    - Op PSKW was tevens bij de start van de proef in de diepere 30-60 cm laag een hoeveelheid perchloraat aanwezig die niet meer uitspoelbaar was, namelijk 0,019 ppm.
    - Door drift of diffusie kan mogelijks ook wat perchloraat in het 0-object terecht gekomen zijn, maar we achten die kans klein.

Conclusies van de accumulatieproef voor perchloraat in de grond:
- De hoogste waarden in de bodem 0-30 cm bedraagt 0,0768 ppm (Inagro) en 0,0413 ppm (PSKW).
- Perchloraat migreert amper naar de 30-60 laag.

Belangrijke nota: Vanaf januari 2016 kan de analyse van perchloraat in de bodem tot op 0,005 ppm gebeuren (5 ppb). Waarden tot 0,005 ppm leiden nog steeds tot een opname door het gewas.

De gegevens van deze proef werden gebruikt als input voor het input-output model (WP 2.6). Met het opgestelde model kan men een simulatie uitvoeren voor elke gewenste perchloraatgift. Vanaf het derde teeltjaar (vanaf teeltnummer 11) begint de toename in perchloraatgehalte in de bodem en de vermarktbare sla duidelijk af te vlakken om uiteindelijk een evenwichtspunt te bereiken. Met een gemiddeld gebruik van 10 kg/are meststoffen per teelt, zal bij 50 ppm in de meststoffen de huidige norm van 1 ppm in de kropsla overschreden worden na acht teelten. Verder valt af te leiden uit het voorspelmodel dat de communautaire handelsnorm van 1 ppm in de vermarktbare sla gemiddeld niet wordt overschreden na acht (of meer) teelten bij 50 ppm perchloraat in de meststoffen als het gemiddelde meststoffenverbruik van alle teelten beperkt blijft tot 8 kg/are/teelt (dus bijv. tot in totaal 40 kg/are per vijf opéénvolgende teelten). Echter om 95% van de kroppen onder de handelsnorm te houden bij een standaarddeviatie van 30% is een lagere bemesting van maximaal 4,9 kg/are/teelt noodzakelijk.
De teruggevonden hoeveelheid perchloraat is volgens het model sterk afhankelijk van de teeltperiode met een piek in de lenteteelt.
Het model heeft zijn beperkingen. Aangezien alleen data aanwezig zijn onder bepaalde condities (0-200 ppm perchloraat, zandleem en specifiek klimaat) is het moeilijk te voorspellen of het model ook voldoende accuraat is in andere condities.

Heeft watergift en nitraat in de bodem een invloed op de perchloraatopname?
Een eerste belangrijke eindconclusie is dat het gewas spinazie meer perchloraat (mg) opneemt per kg gewas dan rucola en rucola neemt meer op dan kropsla

wanneer opgekweekt bij een vergelijkbare hoeveelheid perchloraat in de bodem. De perchloraatconcentratie in spinazie was 2,15 tot 3,23 keer hoger dan de perchloraatconcentratie in kropsla. De perchloraatconcentratie in rucola was 2 tot 2,5 keer hoger dan de perchloraatconcentratie in kropsla. Veldsla neemt meer mg perchloraat op per kg gewas dan kropsla. De perchloraatconcentratie in veldsla was 2,27 tot 3,65 keer hoger dan de perchloraatconcentratie in kropsla. Dit betekent dat spinazie, rucola en veldsla meer perchloraat opnemen dan kropsla.

Invloed van watergift:

- Spinazie nat telen betekent een hoger perchloraatgehalte.

Invloed van N-gift:

- Spinazie: meer nitraat toedienen leidt tot lager perchloraatgehalte.
- Ook voor kropsla werd dit waargenomen: meer nitraat toedienen betekent een lager perchloraatgehalte. Hoe natter er geteeld wordt, hoe groter het remmende effect van nitraat op de opname van perchloraat.

Invloed van oogstdatum op perchloraatgehalte in gewas:

Kropsla: op beide proefcentra wordt er een maximum bereikt, waarna het perchloraatgehalte weer lichtjes daalt (geen statistisch significant verschil).

Spinazie:

- Er wordt een maximum bereikt, waarna het perchloraatgehalte weer lichtjes daalt (geen statistisch significant verschil).
- Jong blad bevat minder perchloraat dan oud blad.

Rucola: geen invloed te merken

Veldsla:

- Hoe zwaarder het gewas, hoe lager het perchloraatgehalte (statistisch verschillend)
- Opname bleef stijgen, maar door gewichtstoename van gewas werd perchloraat meer verdund.

De variatie van het perchloraatgehalte in het gewas en de bodem binnen éénzelfde teelteenheid werd nagegaan:

De variatie binnen één teelteenheid (één serre die in één keer bemest wordt) werd op twee praktijkbedrijven bepaald waarbij een eerste serre opgedeeld werd in 27 vakken en een tweede serre in 24 vakken. In de eerste serre (West-Vlaanderen) was de hoeveelheid perchloraat zowel in het gewas kropsla als in de bodem Normaal verdeeld. Gemiddeld zat er 0,203 ppm perchloraat in het gewas en met de data van de steekproef kan men voorpellen dat 95,4% van alle sla tussen 0,07 en 0,337 ppm perchloraat zal bevatten (= het gemiddelde +/- 2× de standaarddeviatie). In de serre van de provincie Antwerpen was de hoeveelheid perchloraat in het gewas niet Normaal, maar Exponentieel verdeeld. Gemiddeld zat er 0,118 ppm perchloraat in het gewas en met de data van de steekproef kan men voorspellen dat 95,4% van alle sla tussen 0,023 en 0,388 ppm perchloraat zal bevatten.

In deze serres werd, met acht herhalingen (staalname in 7 vakken van de serre en 1 vak van de accumulatieproef), de crop-to-crop variabiliteit bepaald. De variabiliteit per vak gaat van minimaal 17% tot maximaal 53% met een gemiddelde variabiliteit van 30% standaarddeviatie. In hoeverre deze variabiliteit Normaal verdeeld is, kan uit het beperkte aantal stalen/kroppen per vak niet afgeleid worden. De bijdrage van de analysevariabiliteit is hierbij verwaarloosbaar. Wanneer toch een Normaalverdeling ondersteld wordt, dan zou het verschil tussen de laagste concentratie in een krop en de hoogste concentratie in een krop (voor 95% van de populatie) een factor 4 bedragen (gebaseerd op een % standaarddeviatie van 30%). Dit geeft het belang aan van een goede staalname om tot een bruikbaar cijfer te komen bij de evaluatie van perchloraat in een partij kropsla.

Daarnaast werd ook de variatie binnen één eenheid (één pallet) meststoffen bepaald. In oude stock van meststoffen, namelijk meststof 1 van productiejaar 2012 en meststof 2 opgezakt in 2011, werden verschillende gehalten aan perchloraat gemeten. Meststof 1: De gemiddelde waarde is 30,5 ppm. 95% van de stalen bevindt zich tussen 26,27 en 34,76 ppm (8,5 ppm verschil). Bij meststof 2 bedraagt het gemiddelde 554,5 ppm. 95% van de stalen bevindt zich tussen 443 en 666 ppm (223 ppm verschil).

Gewasbeschermingsmiddelen, gietwater behandeld met biociden, bodemontsmettingsproducten, bladvoeding en grondwater werden gecontroleerd als mogelijke bronnen van perchloraat: binnen dit project werden geen andere bronnen van perchloraat gevonden.

Verdeling van perchloraat in de plant:

1. De concentratie in de wortel bedraagt slechts ongeveer 10 % van de concentratie in de vermarktbare krop. De buitenste ombladeren (die normaal niet weerhouden worden) bevatten een dubbele concentratie van wat in de krop terug te vinden is.
2. De concentratie in de pit van de slakrop is beduidend lager dan de concentratie in de buitenste bladgroep: gemiddeld slechts 30% tov de buitenste bladgroep.
3. De concentratie perchloraat in de bladnerf is beduidend lager dan de concentratie in het bladmoes: slechts 41% tov de concentratie in het bladmoes.

Invloed van culinaire bewerkingen op het perchloraatgehalte:

- Noch het wassen van de sla, noch het wassen van de spinazie levert een duidelijke wijziging in het gehalte van perchloraat in het gewassen product op. De observeerbare variabiliteit is waarschijnlijk te wijten aan de variabiliteit binnen het staal, gecombineerd met bijkomende variabiliteit door overblijven van kleine hoeveelheden waswater.
- Het blancheren van spinazie zorgt wel voor een significante daling van de concentratie perchloraat.
- Deze verwijdering van het perchloraat uit de spinazie werd bijkomend bewezen door analyse van het waswater. Blijkt dat ongeveer 30% van het aanwezige perchloraat door blancheren overgaat in het kookwater. Dit is verklaarbaar door de zeer grote water-oplosbaarheid van perchloraat.

service public fédéral
SANTE PUBLIQUE,
SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE
ET ENVIRONNEMENT

federale overheidsdienst
VOLKSGEZONDHEID,
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN
EN LEEFMILIEU

Contact:
Dominique Vandekerchove
Services du Président
Cellule Recherche contractuelle
Tel : 02 524 90 91
mail : recherche.contractuelle@sante.belgique.be
www.health.belgium.be/recherchecontractuelle

Dominique Vandekerchove
Diensten van de Voorzitter
Cel Contractueel Onderzoek
Tel: 02 524 90 91
mail: contractueel.onderzoek@gezondheid.belgie.be
www.health.belgium.be/contractueelonderzoek

V.U. / Ed. Resp. : Tom Auwers. Place Victor Hortaplein, 40/10, 1060 - Brussel/Bruxelles | Grafisch ontwerp
Conception graphique : Thierry Sauvenière | D/2017/2196/35