



RIVM-RIKILT FRONT OFFICE VOEDSELVEILIGHEID

RISICOBEOORDELING INZAKE DE AANWEZIGHEID VAN AFLATOXINE IN MAIS VERWERKT IN DIERVOEDER BESTEMD VOOR MELKKOEIEN

Risicobeoordeling aangevraagd door:	NVWA-BuRO
Risicobeoordeling opgesteld door:	RIVM
Datum aanvraag:	16-03-2013
Datum risicobeoordeling:	19-07-2013 (eindversie)
Projectnummers:	V/090130

Onderwerp

In februari 2013 werd bekend dat geïmporteerd mais bestemd voor diervoeder verontreinigd is geraakt met aflatoxine B1 (AFB1). De verontreinigde mais is in Nederland vervoe-derd aan melkkoeien alvorens partijen uit de handel zijn genomen. Daardoor is koemelk verontreinigd geraakt met aflatoxine M1 (AFM1, hoofdmetaboliet van AFB1). De NVWA heeft verklaard dat deze verontreinigde melk niet op de markt is gebracht.

Het BuRO van de NVWA heeft het Front Office gevraagd om op basis van fictieve gehalten aan AFB1 in voer en AFM1 in melk te schatten wat de gehalten aan deze verbindingen kunnen zijn in eetbare weefsels als vlees, lever en nier. Bovendien heeft het BuRO ge-vraagd om de bijbehorende risico's voor de volksgezondheid in te schatten. Aangezien tot op heden geen exacte gehalten aan AFM1 en AFB1 bekend zijn is uitgegaan van (over-schrijdingen van) 1, 10 en 100 maal de productnorm van deze verbindingen in melk en voer. Verder is voor de risicoschatting uitgegaan van kortdurende (acute) blootstelling via melk, vlees en lever aangezien de blootstelling van de melkkoeien aan gecontamineerd voer van korte duur was.

Vraagstelling

Door het BuRO zijn op 16 maart onderstaande vragen gesteld:

1. Hoe verloopt het metabolisme van aflatoxine in de koe?
2. Wat zijn de AFB1 en AFM1 concentraties in vlees, lever en nier op het moment dat de blootstelling is gestopt en de melkconcentratie is gedaald naar het niveau van 1, 10 of 100 maal de Europese norm van aflatoxine M1 in melk.
3. Als een koe voer krijgt met AFB1 concentraties op het niveau van 1, 10 of 100 maal de Europese norm, wat kan men dan verwachten aan residuen aflatoxine in melk, vlees, lever en nier van de betreffende koe?
4. Als een koe enkele dagen verontreinigd voer heeft gehad hoe lang duurt het dan, nadat deze koe schoon voer heeft gekregen, om concentraties AFM1 in melk te krij-gen die onder de productnorm in melk liggen?
5. Is er een risico verbonden aan de consumptie van (orgaan)vlees van een koe waar-van de hoeveelheid aflatoxine M1 in melk op 1, 10 of 100 maal de norm ligt?

6. Is er een risico verbonden aan de consumptie van (orgaan)vlees en melk van een dier dat enkele dagen is gevoederd met veevoer met gehalten aan aflatoxine B1 op 1, 10 of 100 maal de Europese veevoedernorm
7. Zijn er andere zaken waar rekening mee moet worden gehouden?

Conclusies

- 1) AFB1 kan op vele manieren worden gemetaboliseerd (Figuur 1). In de koe is AFM1 verreweg de belangrijkste metaboliet die wordt uitgescheiden in de melk. Omdat in de literatuur alleen bruikbare kwantitatieve gegevens over AFB1 en AFM1 in weefsels en in melk voorhanden zijn, zijn de modelberekeningen gebaseerd op het voorkomen van AFB1 en AFM1 in deze matrices.
- 2) Uitgaande van AFM1 residu in melk van 0,05 µg/kg (EU-norm) zijn de corresponderende gemiddelde gehalten aan AFB1 0,0038 (vlees), 0,057 (lever) en 0,011 µg/kg (nier). Overeenkomstige waarden voor AFM1 zijn 0,0094 (vlees), 0,13 (lever) en 1,2 (nieren) µg/kg. De berekende gehalten zijn lineair afhankelijk van het AFB1 gehalte in voer. Een 10- en 100-voudige concentratie AFB1 in voer levert dus respectievelijk een 10- en 100-voudige concentraties op in vlees, lever en nier.
- 3) Uitgaande van voer verontreinigd met gehalten AFB1 van 5 µg/kg (EU-norm) zijn de geschatte gemiddelde steady state gehalten aan AFB1 0,005 (vlees), 0,075 (lever) en 0,015 µg/kg (nier). Overeenkomstige waarden voor AFM1 zijn 0,063 (melk), 0,012 (vlees), 0,16 (lever) en 1,5 (nieren) µg/kg. De berekende gehalten zijn lineair afhankelijk van het AFB1 gehalte in voer. Een 10- en 100-voudige concentratie AFB1 in voer levert dus respectievelijk een 10- en 100-voudige concentraties op in vlees, lever en nier.
- 4) Wanneer een gemiddelde melkkoe gedurende ongeveer 3 dagen verontreinigd voer eet op een niveau van 5, 50 en 500 µg/kg en vervolgens op schoon voer wordt gezet dan duurt het respectievelijk 1, 2 en 4 dagen om gehalten onder de AFM1 norm in melk (= 0,05 µg/kg) te bereiken.
- 5 & 6) Op basis van Nederlandse consumptiegegevens voor melk, vlees en lever (nier wordt niet geconsumeerd) en de geschatte gehalten in deze matrices voor drie verschillende niveaus van verontreinigd voer (5, 50 en 500 µg AFB1/kg) en melk (0,05, 0,5 en 5 µg AFM1/kg) is voor elke situatie de Margin of Exposure (MOE) berekend t.o.v. de dosis met een gering acuut (niet carcinogeen of carcinogeen) effect in dierstudies. Bij meer dan 10 keer overschrijding van de norm voor melk en diervoeder zijn na consumptie van met AFB1 en AFM1 gecontamineerde melk-, rundvlees- en runderleverproducten risico's voor de volksgezondheid niet uit te sluiten.
- 7a) Een model voor de overdracht van aflatoxines (in steady state) van voer naar melk is aangepast om ook schattingen te kunnen maken van de gemiddelde gehalten aan AFB1 en AFM1 in vlees, lever en nier. Omdat deze aanpassing is gebaseerd op experimentele waarnemingen in slechts één koe moeten de met het model berekende vlees-, lever- en niergehalten als indicatief voor de gemiddelde koe beschouwd worden. Om meer inzicht te krijgen in de verdeling en uitscheiding van AFB1 en AFM1 in (orgaan)vlees wordt aanbevolen om een dierproef met melkkoeien uit te voeren.
- 7b) Voor de huidige risicoschatting is uitgegaan van kortdurende (acute) blootstelling via melk, vlees en lever aangezien de blootstelling van de melkkoeien aan gecontamineerd voer incidenteel en van korte duur was. Als er sprake zou zijn geweest van langdurige humane blootstelling aan aflatoxine dan zijn de hier gepresenteerde scenario's en risicoschattingen niet van toepassing, maar zal de chronische inname met een chronisch effect niveau moeten worden vergeleken om een relevante risicoschatting te maken.

Inleiding

Aflatoxines zijn van nature voorkomende toxische secundaire metabolieten die gevormd worden door schimmels van het geslacht *Aspergillus*. Met name *Aspergillus parasiticus* en *Aspergillus flavus* zijn betrokken bij de productie van aflatoxines. Aflatoxines kunnen zowel voor de oogst als tijdens opslag gevormd worden afhankelijk van de temperatuur, vochtigheid en beschikbaarheid van nutriënten. Ze zullen vooral voorkomen in producten geïmporteerd vanuit tropische of subtropische regio's, maar contaminatie van Europese landbouwproducten is ook aangetoond en kan daarom niet worden uitgesloten (EFSA, 2004).

De EFSA opinie uit 2004 betreffende aflatoxine B1 (AFB1) in veevoeder beschrijft een eerdere contaminatie van maïs met aflatoxines waarna aflatoxine in koemelk gemeten werd. Dit betrof maïs afkomstig uit de Po-vlakte in Italië. Onder invloed van hoge temperaturen, droogte en grote schade door insecten kon *Aspergillus flavus* op de maïs groeien en aflatoxines produceren.

Toxicologie

Mens

Inname van hoge doseringen aflatoxine kan resulteren in het ontstaan van acute aflatoxicosis met lever als doelorgaan. Acute aflatoxicosis wordt gekenmerkt door hepatotoxiciteit met, in ernstige gevallen, plots optredend leverfalen. Effecten als hemorrhagische necrose van de lever, proliferatie van de galgang, oedeemvorming en lethargie kunnen daarbij optreden (Williams *et al.* 2004, Fung and Clark, 2004).

Diverse uitbraken van acute aflatoxine intoxicaties zijn gedocumenteerd in India, Thailand en Kenia (Lewis *et al.*, 2005; Krishnamachari *et al.*, 1975a+b; Nyikal *et al.*, 2004). In 2004 heeft zich in Kenia één van de grootste aflatoxicosis uitbraken voorgedaan waarbij met aflatoxine besmette maïs als belangrijkste veroorzaker van de gezondheidseffecten beschouwd werd (Nyikal *et al.*, 2004; Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005). Bij deze uitbraak zijn officieel 317 casussen van acute leverfalen gerapporteerd met 125 overlijdensgevallen (Nyikal *et al.*, 2004).

In de literatuur worden schattingen van de aflatoxine-inname ten tijde van aflatoxicosis uitbraken gerapporteerd. Zo is de aflatoxine-inname bij de uitbraak van aflatoxicosis in West India in 1974 geschat op tenminste 55 µg/kg lg/dag gedurende een onbepaald aantal dagen (FDA, 2013). Bij een uitbraak van aflatoxicosis in Kenia in 1982 is de aflatoxine-inname geschat op tenminste 38 µg/kg lg/dag gedurende een onbepaald aantal dagen (FDA, 2013).

Tevens wordt een casus beschreven van een poging tot zelfmoord door inname van aflatoxine B1. Een 25-jarige laboratorium-medewerkster consumeerde 5,5 mg aflatoxine B1 gedurende een 2-daagse periode (omgerekend naar 12 µg/kg lg/dag) en vervolgens 6 maanden later 35 mg gedurende een 14-daagse periode (omgerekend naar 11 µg/kg lg/dag). Afgezien van voorbijgaande huiduitslag, duizeligheid en hoofdpijn, waren er geen klinische effecten beschreven. Lichamelijk onderzoek en klinisch-chemisch bloedonderzoek (incl. testen voor leverfunctie) gedurende een 14-jaar durende follow-up lieten voorsnog geen afwijkingen zien (Willis *et al.*, 1980; FDA, 2013).

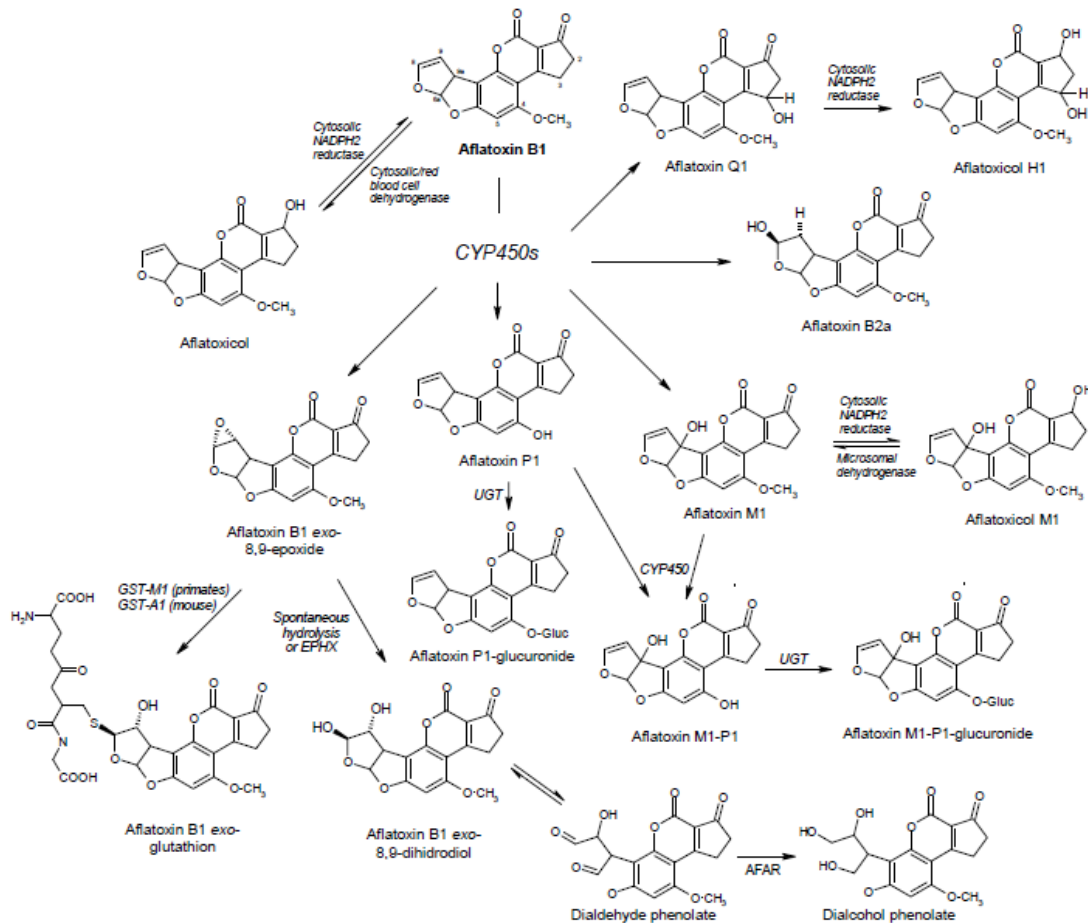
Dier

Herkauwers, waaronder runderen, zijn in het algemeen minder gevoelig voor aflatoxine-intoxicatie dan niet-herkauwers, omdat de aflatoxines voor een deel al worden afgebroken door de flora van de pens. Na blootstelling aan aflatoxines kunnen onder andere de volgende symptomen optreden: anorexia, geelzucht, depressie, gewichtsverlies, bloedingen, ascites en longoedeem. In rundvee treden deze effecten op bij concentraties van 1,5-2,23 mg/kg veevoer.

Tumoren zijn waargenomen in diverse diersoorten waaronder vogels, varkens, schapen en forellen. Op Europese boerderijen zijn geen tumoren beschreven in vee ten gevolge van blootstelling aan met aflatoxine verontreinigd gecontamineerd veevoer (EFSA, 2004).

Metabolisme in het rund

Na inname van gecontamineerd diervoeder wordt een aanzienlijk deel van de aflatoxine B1 al afgebroken in de pens en is daardoor niet voor opname in het lichaam beschikbaar. Het deel dat wel voor opname beschikbaar is wordt na opname in de lever gemetaboliseerd. Hierbij worden diverse metabolieten gevormd (Figuur 1), waaronder endo- en exo-epoxides van AFB1, aflatoxine P1, de hydroxymetabolieten M1 (AFM1), B2a en Q1 en verschillende conjugaten. De endo-epoxide van AFB1 is niet reactief en is niet in Figuur 1 opgenomen. De belangrijkste metaboliet in het rund is de 4-hydroxymetaboliet M1 (AFM1). AFM1 kan o.a. uitgescheiden worden via de melk. De zogenoemde carry-over varieert echter per individueel dier, waarbij de dag tot dag variabiliteit bepaald wordt door factoren zoals voederregime, de individuele metabole capaciteit en de melkproductie (EFSA, 2004).



Figuur 1. Biotransformatie van AFB1 in pluimvee en zoogdieren (inclusief mensen). Niet alle reacties vinden plaats in elke species. Overgenomen uit: Diaz en Murcia, 2011.

Acute toxicologische grenswaarde voor risicobeoordeling.

Er is geen acute reference dose (ARfD) voor aflatoxine beschikbaar. Voor deze risicobeoordeling zijn daarom acute toxiciteitsstudies verzameld en de kritische acute effecten zijn geïdentificeerd. Uit de meest relevante studies zijn een point of departure (PoD) afgeleid voor de risicobeoordeling. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van benchmark dose (BMD) analyse. De PoD zal worden gebruikt om een Margin of Exposure (MOE) ten opzichte van de blootstelling uit te rekenen.

Voor aflatoxine M1 zijn zeer weinig toxiciteitsgegevens beschikbaar. Voor aflatoxine B1 zijn in de literatuur diverse kortdurende (duur: 1-28 dagen) toxiciteitsstudies beschreven met blootstelling via het voer, gavage en intraperitoneaal (voor een volledig overzicht van de gevonden dierstudies zie Bijlage 1). Er wordt aangenomen dat wat betreft acute toxiciteit aflatoxine M1 even potent is als aflatoxine B1.

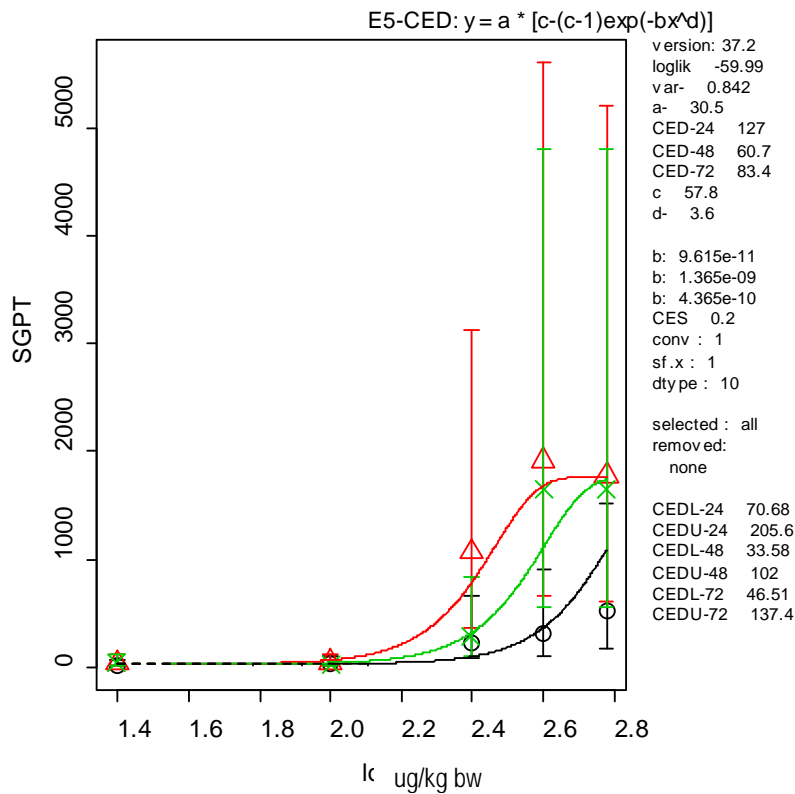
De effecten die in deze studies gezien zijn betreffen veranderingen van klinisch-chemische parameters (m.n. voor levertoxiciteit), histopathologische veranderingen in de lever, immunotoxische, mutagene en ontwikkelingstoxische effecten en mortaliteit. Ook het ontstaan van levertumoren is gezien na een eenmalige of kortdurende blootstelling. De beschikbare studies laten zien dat de lever bij kortdurende blootstelling het doelorgaan is.

De verzamelde studies zijn beoordeeld op kwaliteit van de studie, bruikbaarheid van de data en aanwezigheid van een dosis-respons. Alleen studies met lage doseringen (laagste dosis ≤ 0.1 mg/kg bw) zijn nader beschouwd, aangezien studies met uitsluitend hoge doseringen niet de laagste BMDL kunnen opleveren als er bij lagere doseringen duidelijke effecten werden waargenomen in andere studies. Voorgaande criteria leveren uiteindelijk vijf studies op die zijn geanalyseerd met behulp van BMD analyse. De BMD analyses zijn uitgevoerd met PROAST versie 37.2 volgens de methode zoals beschreven in EFSA (2009). Als Benchmark Response (BMR) zijn de default BMRs voor kwantale en continue eindpunten van respectievelijk 10% (extra risk) en 5% (verandering t.o.v. de achtergrond) gebruikt, met uitzondering van de (continue) biochemische eindpunten waarvoor 20% is gebruikt als BMR. Voor de biochemische eindpunten worden kleine verandering in respons (tot 20%) niet beschouwd als een schadelijke fysiologische respons.

Mehta et al. 1993 (studie nummer 3 in Bijlage 1)

Studie naar acute hepatotoxiciteit van AFB1 in combinatie met verschillende diëten in de rat (F344). De resultaten van de met standaard dieet gevoerde dieren zijn gebruikt. Dieren werden per gavage aan 0; 0,1; 0,25; 0,4 of 0,6 mg/kg lg blootgesteld. Serum biochemie werd geanalyseerd op 24, 48 en 72 uur na blootstelling.

De eindpunten serum glutamaat-oxalaattransaminase (SGOT; ASAT), serum glutamaat-pyruvaat transaminase (SGPT; ALAT), alkalische fosfatase (ALP), totaal bilirubine en glucose zijn geanalyseerd (zie voor de dosis-respons data Bijlage 2). Bij de BMD analyse is het tijdstip van serumanalyse gebruikt als covariaat. De laagste BMDL in deze studie is verkregen met een exponentieel model (E5) en het eindpunt SGPT op tijdstip 48 uur en bedraagt 34 µg/kg lg (Figuur 2). Voor de BMDLs van de overige eindpunten zie Bijlage 3.

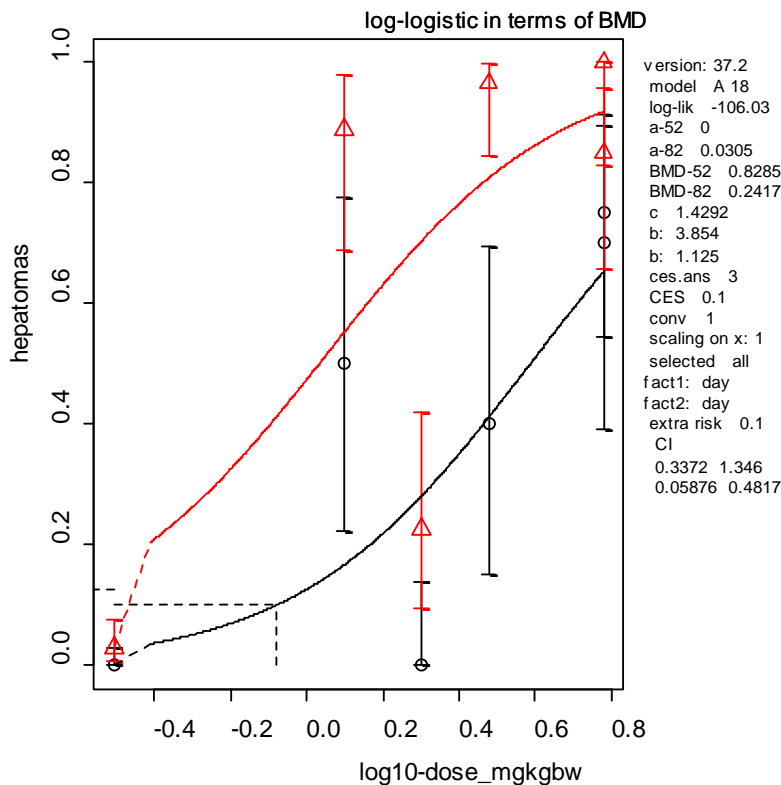


Figuur 2. Dosis respons van serum glutamaat- pyruvaat transaminase (SGPT; ALAT, IU/L serum). Cirkels, driehoeken en kruisjes zijn de serum concentraties na respectievelijk 24, 48 en 72 uur. De laagste BMDL is 34 µg/kg lg.

Vesselinovitch et al., 1972 (studie nummer 15 in Bijlage 1)

AFB1 is toegediend aan jonge C57BL X C3H F muizen voor de evaluatie van de hepatocarcinogeniteit. Eén, 4, of 7 dagen oude dieren werden blootgesteld aan eenmalige of een beperkt aantal (max. 5) i.p. injecties met (gesommeerde) doses van 1.25 tot 6 mg/kg lg. De dieren werden na 52 en 82 weken gescoord op levertumoren (zie voor de dosis-respons data Bijlage 2).

Bij de BMD analyse is het tijdstip van terminatie gebruikt als covariaat. De laagste BMDL in deze studie is verkregen met het log-logistische model op het tijdstip 82 weken en bedraagt 59 µg/kg lg (Figuur 3). Voor de BMDLs van de overige eindpunten zie Bijlage 3.

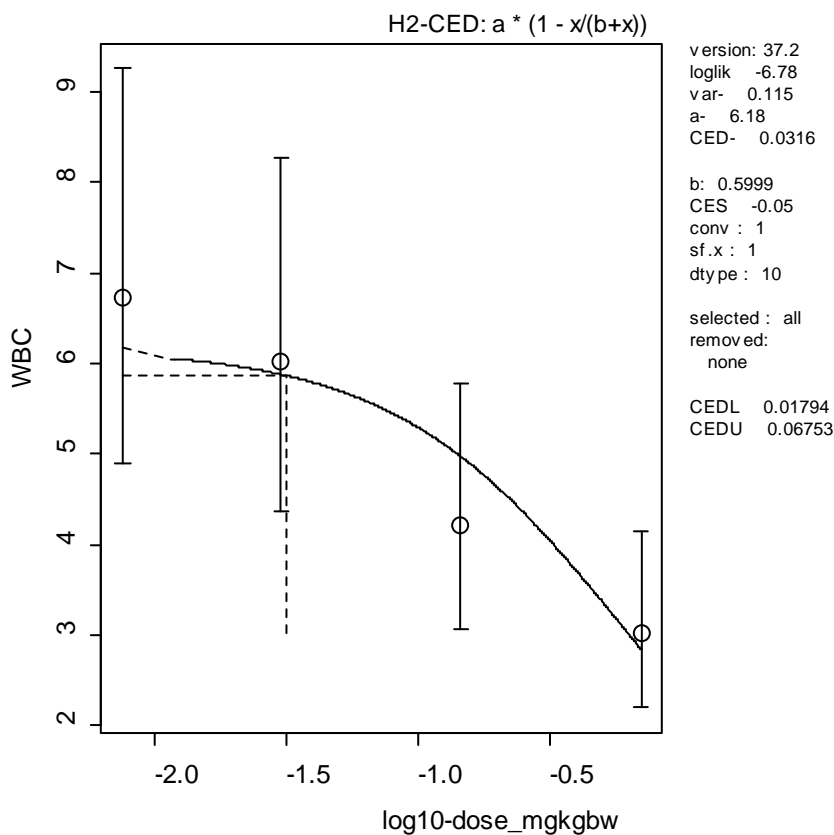


Figuur 3. Dosis respons van de fractie dieren met een hepatoom. Cirkels en driehoeken zijn de incidenties na resp. 52 en 82 weken. De laagste BMDL is 59 µg/kg lg.

Reddy et al., 1987 (studie nummer 18 in Bijlage 1)

AFB1 is toegediend aan CD-1 mannetjes muizen voor de evaluatie van het effect op de immuunfunctie. Dieren werden gedurende 14 dagen om de dag via gavage blootgesteld aan doses van 0; 0,03; 0,145 en 0,70 mg/kg lg. De dieren werden 24 uur na de laatste blootstelling opgeofferd.

Effecten op aantallen rode (RBC) en witte (WBC) bloedcellen zijn geanalyseerd. Verder zijn een aantal immuunparameters geanalyseerd: concentratie lymfocyten in milt, delayed type hypersensitivity response (DTH) delayed type hypersensitivity index (DHI) and antibody plaque-forming cell response (PFC) (zie voor de dosis-respons data Bijlage 2). De laagste BMDL in deze studie is verkregen met het Hill (H2) model en WBC en bedraagt 18 µg/kg lg (Figuur 4). Voor de BMDLs van de overige eindpunten zie Bijlage 3.

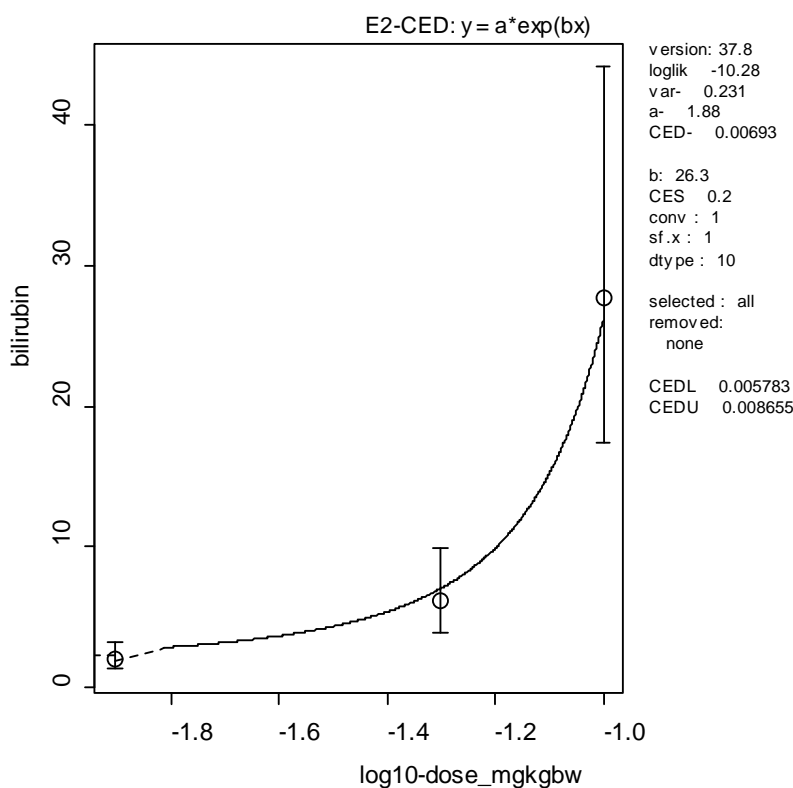


Figuur 4. Dosis respons van het aantal witte bloed cellen (WBC, x 1000 cellen/mm³). De BMDL is 18 µg/kg lg.

Guerre et al., 1996 (studie nummer 21 in Bijlage 1)

Studie naar de acute hepatotoxiciteit en de effecten op metabolisme van AFB1 in konijn (male New Zealand). Dieren werden per gavage aan 0; 0,05; of 0,10 mg/kg lg blootgesteld. De dieren werden 24 uur na de laatste blootstelling opgeofferd.

Effecten op lichaamsgewicht (BW), levergewicht (LW) en plasma concentraties van kalium, bicarbonaat, calcium, creatinine, glucose, urinezuur, triglyceriden, cholesterol, bilirubine, lactaat dehydrogenase (LDH), glutathion S-transferase, alkalische fosfatase (ALP), aspartaat-aminotransferase (ASAT), alanine-aminotransferase (ALAT) zijn geanalyseerd (zie voor de dosis-respons data Bijlage 2). De laagste BMDL in deze studie is verkregen met een exponentieel model (E2) voor het eindpunt plasma bilirubine gehalte en bedraagt 5,8 µg/kg lg (Figuur 5). Voor de BMDLs van de overige eindpunten zie Bijlage 3. Andere parameters voor leverschade hebben BMDLs in dezelfde orde van grootte.

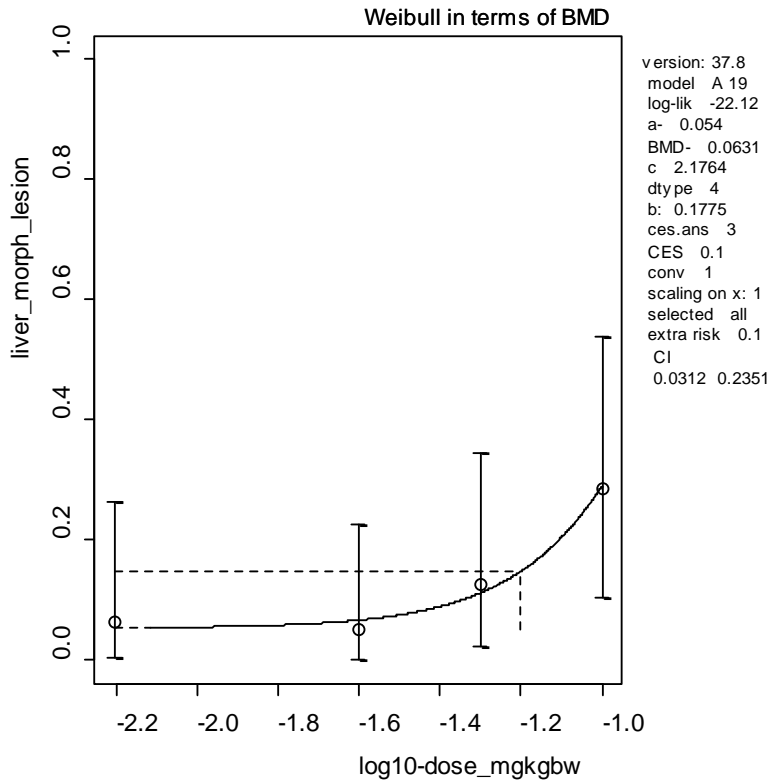


Figuur 5. Dosis respons van plasma bilirubine (µM). De BMDL is 5.8 µg/kg lg.

Wangikar et al., 2005 (studie nummer 27 in Bijlage 1)

In een ontwikkelingstoxiciteitsstudie zijn New Zealand White konijnen (via gavage) blootgesteld aan 0.025, 0.05 en 0.1 mg AFB1/kg lg op dag 6-18 van de dracht.

Het aantal pups met skelet afwijkingen, viscerale afwijkingen en leverlaesies zijn geanalyseerd (zie voor de dosis-respons data Bijlage 2). De laagste BMDL in deze studie is verkregen met een Weibull model voor het eindpunt leverlaesies en bedraagt 31 µg/kg lg (Figuur 6). Voor de BMDLs van de overige eindpunten zie Bijlage 3.



Figuur 6. Dosis respons van de fractie pups met leverlaesies. De BMDL is 31 µg/kg lg.

De laagste BMDL uit bovenstaande studies bedraagt 5,8 µg/kg lg uit de studie van Guerre *et al.* (1996) op basis van 20% toename van plasma bilirubine. Andere parameters voor leverschade (gemeten in de studie van Guerre) hebben BMDLs in dezelfde orde van grootte (zie Bijlage 3).

Aangezien ook carcinogeniteit van AFB1 is gerapporteerd (Vesselinovitch *et al.*; 1972) na kort-durende blootstelling, zal ook dit aspect in the beoordeling worden meegenomen. Hiervoor zal de BMDL van 59 µg/kg lg die uit deze studie werd afgeleid worden gebruikt. Om het risico op het ontwikkelen van tumoren als verwaarloosbaar te kunnen inschatten dient de MoE voor dit effect groter te zijn dan voor de niet-carcinogene effecten. Wel moet worden opgemerkt dat deze BMDL is verkregen uit een i.p. studie. Waarschijnlijk is de absorptiefractie van AFB1 na orale blootstelling lager dan de absorptiefractie na i.p. blootstelling. Hierdoor zal bij orale blootstelling een hogere dosis (dan 59 µg/kg lg) nodig zijn om hetzelfde effect (10% extra risico) te verkrijgen. Dus de orale BMDL voor 10% extra risico op levertumoren is waarschijnlijk groter dan 59 µg/kg lg.

Potentie AFM1 ten opzichte van AFB1

De bovenstaande BMDLs zijn beide afgeleid uit studies met AFB1. Zoals hieronder in het hoofdstuk Blootstelling zal worden beschreven is er echter blootstelling aan AFB1 én AFM1. Deze twee aflatoxine congenen worden verondersteld dezelfde effecten te veroorzaken wat betreft de (acute) niet-carcinogene effecten. Voor de (acute) carcinogene effecten wordt de potentie van AFM1 10 keer lager geacht van de potentie van AFB1 (JECFA, 2001; EFSA, 2004, 2007). Deze lagere potentie wordt in rekening gebracht bij het afleiden van de inname in AFB1 equivalenten.

Blootstelling

Overdracht van voer naar levensmiddelen van dierlijke oorsprong (melkvee)

Melkvee kan worden blootgesteld aan aflatoxines door gecontamineerd voer. De aflatoxines worden opgenomen door de koe en verspreiden zich over het lichaam naar eetbare weefsels en melk. In het geval van melkvee gaat het daarbij om AFB1 en zijn belangrijkste metaboliet AFM1. Van Eijkeren *et al.* (2006) beschrijven een overdrachtsmodel voor AFM1 in melk. Dit model is geschikt om, uitgaande van AFB1 in diervoer, het AFM1 gehalte in melk van de *gemiddelde* koe te voorspellen. Voor de huidige vraagstelling is het model geschikt gemaakt voor de overdracht van AFB1 en AFM1 naar weefsels van de melkkoe (zie Bijlage 4 en 5 voor de onderbouwing van deze uitbreiding en de verificatie van het oorspronkelijke overdrachtsmodel).

Het overdrachtsmodel simuleert de gemiddelde koe (fysiologie, voerinname, melkproductie etc.), cq. gemiddelde melk-, vlees- en orgaanconcentraties. Voor een langdurige blootstellingsschatting is dat voldoende, maar voor een acute blootstellingsschatting is juist ook de variatie in de concentraties van belang. De concentraties verkregen met het huidige overdrachtsmodel resulteren dan ook in een onderschatting of overschatting van de blootstelling als melk of (orgaan)vlees afkomstig van niet-gemiddelde dieren wordt beschouwd.

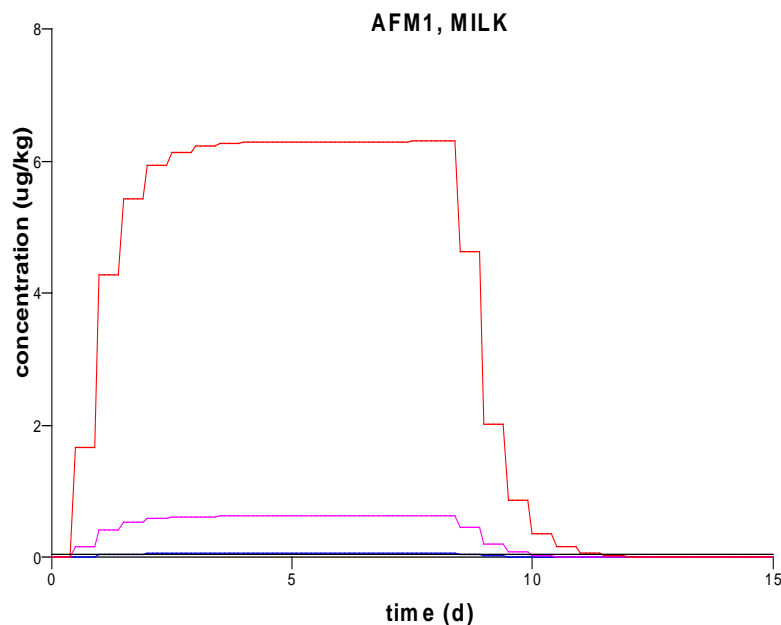
Het overdrachtsmodel is gebaseerd op experimentele observaties van de AFB1/AFM1 verhouding in het koeienlichaam en de distributie van AFB1 en AFM1 over vlees, lever en nieren in slechts één melkgevende koe. Echter, gezien de grote mate van homogeniteit in het (door)fokken van het gebruikte ras (Holstein-Frisian) mag verwacht worden dat de variatie in de kinetiek van AFB1 en AFM1 in dit ras relatief klein is. Daarom kunnen de gebruikte vlees-, lever- en nierconcentraties als indicatief voor gehalten in de gemiddelde melkkoe van dit ras beschouwd worden.

Tot slot dient te worden vermeld dat het model gecalibreerd is op AFB1 concentraties in voer tot 100 µg/kg voer. Hierbij wordt ervan uitgegaan dat in de koe het AFB1 metabolisme tot deze voerconcentratie lineair verloopt. Bij inname van hogere AFB1 concentraties in voer zou het kunnen zijn dat het AFB1 metabolisme van lineariteit af gaat wijken, en het steeds minder efficiënt gaat verlopen. In zo'n situatie zal de (onterechte) aanname van lineariteit leiden tot onderschatting van de AFB1 concentraties in het dier, en een overschatting van de AFM1 concentraties. Of dit effect in melkvee ook daadwerkelijk bij een concentratie van 500 µg/kg voer op kan treden kan uit de beschikbare experimentele echter niet afgeleid worden.

Het model is gebruikt om het tijdverloop van de concentratie van AFM1 te simuleren in melkvee dat gedurende 8 dagen aan voer met een concentratie van 5 (EU-norm), 50 en 500 µg AFB1/kg voer blootgesteld is (zie Figuur 7). De termijn van 8 dagen is gekozen om zeker te zijn dat een stabiel niveau (steady state) bereikt wordt. In overeenstemming met de experimenteel waargenomen overdracht van AFM1 naar melk (Frobisch *et al.*, 1986; Britzi *et al.*, 2013) laat Figuur 7 zien dat de AFM1 melkconcentratie reeds na drie dagen meer dan 95% van de steady state zal bereiken (afgerond 0,06; 0,6 en 6,0 µg/kg). De berekende gehalten zijn lineair afhankelijk van het AFB1 gehalte in voer. Een 10-voudige concentratie AFB1 in voer levert dus 10-voudige concentraties op in melk.

Vergelijkbare simulaties zijn voor AFB1 en AFM1 in vlees, lever en nieren uitgevoerd. Tabel 1 geeft de hierbij horende maximale (steady state) AFB1 en AFM1 concentraties. Hierin is te zien dat de verdeling van AFB1 en AFM1 tussen de weefsels verschilt. Relatief hoge concentraties zijn te vinden in lever en (vooral) nier ten opzichte van vlees.

Figuur 7 laat tevens zien dat de concentratie van AFM1 in melk na het stoppen van de AFB1-blootstelling snel afneemt. Een identieke afname zal naar verwachting in de organen plaatsvinden (hier niet getoond, zie Figuur 2 van Bijlage 4). In het geval van AFB1 wordt zelfs een nog snellere afname verwacht (hier niet getoond, zie Figuur 2 van Bijlage 4). Wanneer een melkkoe gedurende ongeveer 3 dagen verontreinigd voer eet op een niveau van 5, 50 en 500 µg/kg (steady state bereikt) en vervolgens op schoon voer wordt gezet dan duurt het respectievelijk 1, 2 en 4 dagen om de norm in melk (= 0,05 µg/kg) te bereiken (zie Tabel 2).



Figuur 7. Modellsimulatie van het tijdverloop (op de x-as in dagen) van de AFM1 melkconcentratie (y-as) van melkvee dat gedurende 8 dagen aan met AFB1 verontreinigd voer (5, 50 en 500 µg AFB1/kg voer) blootgesteld is (zie ook Bijlage 4, Figuur 1).

Tabel 1. Schatting van de steady state AFM1 en AFB1 concentraties (µg/kg) in melk, vlees, lever en nieren van melkvee dat 8 dagen aan met AFB1 verontreinigd voer blootgesteld is (zie ook Bijlage 4, Tabel 1 en 2).

Voerconcentratie AFB1 (µg/kg)	AFM1 (µg/kg)				AFB1 (µg/kg)		
	Melk	Vlees	Lever	Nieren	Vlees	Lever	Nieren
5	0,063	0,012	0,16	1,5	0,005	0,075	0,015
50	0,63	0,12	1,6	15	0,05	0,75	0,15
500	6,3	1,2	16	150	0,5	7,5	1,5

Tabel 2. Aantal dagen (naar boven afgerond) benodigd om vanuit een steady state situatie in koeien die blootgesteld zijn aan met AFB1 verontreinigd voer, de productnorm van 0.05 µg AFM1/kg in melk te bereiken zie ook Bijlage 4, Tabel 3).

Voerconcentratie AFB1 (µg/kg)	Aantal dagen tot 0,05 µg AFM1/kg melk
5	1
50	2
500	4

De bovenstaande analyse betreft AFM1 en AFB1 concentraties in melk, vlees, lever en nieren gerelateerd aan AFB1 concentraties in diervoer. Andersom is het ook mogelijk om AFM1 en AFB1 concentraties in diervoer, vlees, lever en nieren te relateren aan de concentratie AFM1 in melk na beëindiging van de AFB1 blootstelling. Hier is een AFM1 concentratie in melk aangenomen die gedaald is naar de EU-norm van 0,05 µg/kg, 10x de norm en 100x de norm. In Tabel 3 staan de corresponderende AFM1 en AFB1 concentraties in vlees, lever en nieren.

Tabel 3. Geschatte AFM1 en AFB1 concentraties in vlees, lever en nier op het moment dat de melkconcentratie gedaald is naar de EU-norm (0,05 µg/kg) en 10x en 100x de EU-norm

Melkconcentratie AFM1 (µg/kg)	AFM1 (µg/kg)			AFB1 (µg/kg)		
	vlees	lever	nier	vlees	lever	nier
0,05	0,0094	0,13	1,2	0,0038	0,057	0,011
0,5	0,094	1,3	12	0,038	0,57	0,11
5	0,94	13	120	0,38	5,7	1,1

Merk op dat de concentraties van AFM1 in vlees altijd onder die van melk liggen, terwijl die in de nieren beduidend hoger is. In de lever is dit minder het geval.

Consumptie van melk, vlees en lever

Vanuit de VCP Kinderen en de VCP Basis (2007-2010) zijn consumptiegetallen verkregen (zie Tabel 4) van de dagen waarop de betreffende producten worden geconsumeerd, dwz exclusief de nullen. Hier zal de bovenste 95% betrouwbaarheidsgrens gebruikt worden voor verdere berekeningen. Voor nier zijn er geen consumptiegegevens beschikbaar, daarom zijn deze buiten beschouwing gelaten. In 2008 is nav. onderzoek naar de stapeling van cadmium in rundnieren vastgesteld dat rundnieren in Nederland nauwelijks worden geconsumeerd (NVWA, 2008). Bovendien heeft het Bureau Risicobeoordeling de toenmalige Minister van LNV geadviseerd om nieren van runderen ouder dan twee jaar uit de voedselketen te weren. Het is echter niet mogelijk gebleken om te achterhalen of en wanneer de voorgestelde maatregel is geëffectueerd.

Tabel 4. De mediaan, 95^{ste} percentiel (P95) en de bovenste 95% betrouwbaarheidsgrens van het 95^{ste} percentiel van de consumptiehoeveelheden (in gram) van melk, vlees en lever van rund zoals verkregen uit VCP kinderen en VCP basis. Voor nier zijn er geen consumptiegegevens beschikbaar.

Product	consumptiehoeveelheid (gram)			Aantal consumptiedagen met consumptie van het product (% van totaal)	Totaal aantal consumptiedagen in de VCP
	mediaan	P95	Bovenste 95% betrouwbaarheidsgrens van de P95		
VCP kinderen (2-6 jaar)					
Melk	410	870	890	2543 (99)	2558
Rundvlees	15	80	85	1678 (66)	2558
Runderlever	5,0	15	16	467 (18)	2558
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
Melk	340	960	980	7583 (99)	7638
Rundvlees	36	150	150	4876 (64)	7638
Runderlever	6,4	20	22	584 (8)	7638

Aan de hand van de berekende concentraties AFB1 en AFM1 in weefsels en de bovenstaande bovenste betrouwbaarheidsgrens van de P95 consumpties zijn de volgende innames berekend. Gemiddelde lichaamsgewichten van 20 en 70 kg zijn aangenomen voor de individuen in resp. VCP kinderen en VCP basis. Aangezien deze beoordeling is gebaseerd op fictieve overschrijdingen (1, 10 en 100 maal de productnorm van AFB1 in voer of AFM1 in melk) is een blootstelling aan melk ook meegenomen in de risicoschatting. Zodoende zijn 6 scenario's beschreven waarin is aangenomen dat men aan aflatoxine wordt blootgesteld. In de eerste drie scenario's is men blootgesteld door: (1) één van de drie voedselproducten melk, rundvlees óf runderlever, (2) rundvlees én runderlever, (3) gelijktijdige consumptie van alle drie de voedselproducten melk, rundvlees en runderlever die zijn gecontamineerd nadat de koeien voer hebben gegeten met 5, 50 of 500 µg/kg AFB1 (concentratiedata uit Tabel 1; resultaat in Tabel 5A). In de volgende drie scenario's is men blootgesteld aan: (4) één van de drie voedselproducten melk, rundvlees óf runderlever, (5) rundvlees én runderlever, en (6) gelijktijdige consumptie van alle drie de voedselproducten melk, rundvlees en runderlever met concentraties zoals geschat op het moment dat de concentratie van AFM1 in melk gedaald is tot 1, 10 of 100 keer de EU-norm voor AFM1 in melk (0,05; 0,5 en 5 µg/kg) (concentratiedata uit Tabel 3; resultaat in Tabel 5B).

Tabel 5A. Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname van aflatoxine B1 equivalenten (ng/kg lg/dag) door consumptie van melk, vlees of lever of een combinatie van deze drie producten van melkkoeien die langer dan drie dagen AFB1 verontreinigd voer hebben gegeten.

Voerconcentratie AFB1 (µg/kg)	Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname (ng/kg bw/dag)				
	melk	vlees	lever	vlees & lever	melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
5	2,8	0,073	0,19	0,26	3,1
50	28	0,73	1,9	2,6	31
500	280	7,3	19	26	310
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
5	0,88	0,038	0,072	0,11	0,99
50	8,8	0,38	0,72	1,1	9,9
500	88	3,8	7,2	11	99

Tabel 5B. Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname van aflatoxine B1 equivalenten (ng/kg lg/dag) door consumptie van melk, vlees of lever of een combinatie van deze drie producten. Waarbij de concentraties in vlees en lever van melkvee is genomen op het moment dat de concentratie van AFM1 in melk gedaald is tot 1, 10 of 100 keer de EU-norm voor AFM1 in melk (0,05, 0,5 en 5 µg/kg).

Melkconcentratie AFM1 (µg/kg)	Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname (ng/kg bw/dag)				
	melk	vlees	lever	Vlees & lever	Melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
0,05	2,2	0,056	0,15	0,21	2,4
0,5	22	0,56	1,5	2,1	24
5	220	5,6	15	21	240
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
0,05	0,70	0,029	0,058	0,087	0,79
0,5	7,0	0,29	0,58	0,87	7,9
5	70	2,9	5,8	8,7	79

Voor de bovenstaande inname berekening is uitgegaan van een gelijke potentie van AFB1 en AFM1. Deze innames zullen worden gebruikt voor het afleiden van de MOEs voor niet-carcinogene effecten. De innames zijn ook afgeleid onder de aanname dat de (carcinogene) potentie van AFM1 10 keer minder is dan die van AFB1. De resultaten voor scenario's 1, 2 en 3 staan in Tabel 6A en die van scenario's 4, 5 en 6 in Tabel 6B.

Tabel 6A. Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname van aflatoxine B1 equivalenten (ng/kg lg/dag) door consumptie van melk, vlees of lever of een combinatie van deze drie producten van melkkoeien die langer dan drie dagen AFB1 verontreinigd voer hebben gegeten.

Voerconcentratie AFB1 (µg/kg)	Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname (ng/kg bw/dag)				
	melk	vlees	lever	vlees & lever	melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
5	0,28	0,026	0,074	0,10	0,38
50	2,8	0,26	0,74	1,0	3,8
500	28	2,6	7,4	10	38
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
5	0,088	0,014	0,028	0,042	0,13
50	0,88	0,14	0,28	0,42	1,3
500	8,8	1,4	2,8	4,2	13

Tabel 6B. Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname van aflatoxine B1 equivalenten (ng/kg lg/dag) door consumptie van melk, vlees of lever of een combinatie van deze drie producten. Waarbij de concentraties in vlees en lever van melkvee is genomen op het moment dat de concentratie van AFM1 in melk gedaald is tot 1, 10 of 100 keer de EU-norm voor AFM1 in melk (0,05, 0,5 en 5 µg/kg).

Melkconcentratie AFM1 (µg/kg)	Bovenste 95% betrouwbaarheids grens van P95 inname (ng/kg bw/dag)				
	melk	vlees	lever	Vlees & lever	Melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
0,05	0,22	0,020	0,060	0,077	0,30
0,5	2,2	0,20	0,60	0,77	3,0
5	22	2,0	6,0	7,7	30
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
0,05	0,070	0,010	0,022	0,032	0,10
0,5	0,70	0,10	0,22	0,32	1,0
5	7,0	1,0	2,2	3,2	10

Risico-evaluatie

Op basis van Nederlandse consumptiegegevens voor melk, vlees en lever (nier wordt niet geconsumeerd) en de geschatte gehalten in deze matrices voor drie verschillende niveaus van verontreinigd voer (5, 50 en 500 µg/kg) is voor elke situatie de Margin of Exposure (MOE) berekend. Dit is gedaan op basis van de BMDL verkregen uit een niet-carcinogeen (Tabel 7A) eindpunt en een carcinogeen eindpunt (Tabel 7B). In Tabel 8A en B staan de MOEs die gebaseerd zijn op de concentraties in vlees en lever van melkvee zoals genomen op het moment dat de concentratie van AFM1 in melk gedaald is tot 1, 10 of 100 keer de EU-norm voor AFM1 in melk (0,05; 0,5 en 5 µg/kg).

De MOEs zijn berekend door de twee geselecteerde BMDLs te delen door de bovenste betrouwbaarheidsgrens van de (P95) inname. Voor de MOEs van de niet-carcinogene effecten is de inname gebruikt die onder aanname van gelijke potentie van AFM1 en AFB1 is verkregen (Tabel 5). De lagere carcinogene potentie van AFM1 ten opzichte van AFB1 is in rekening gebracht bij het afleiden van de inname in AFB1 equivalenten (Tabel 6). Deze innames zijn gebruikt voor het afleiden van de MOEs voor de carcinogene effecten.

Tabel 7A. De MOEs op basis van de BMDL (5,8 µg/kg lg) van niet-carcinogene effecten en bij hoge (bovenste betrouwbaarheidsgrens van de P95) consumptie van melk, vlees en/of lever van melkkoeien die langer dan drie dagen AFB1 verontreinigd voer hebben gegeten (Tabel 5A).

Voerconcentratie AFB1 (µg/kg)	MOE				
	melk	vlees	lever	Vlees & lever	Melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
5	2,1x10 ³	7,9 x10 ⁴	3,1x10 ⁴	2,2x10 ⁴	1,9x10 ³
50	2,1x10 ²	7,9x10 ³	3,1x10 ³	2,2x10 ³	1,9x10 ²
500	2,1x10¹	7,9x10 ²	3,1x10 ²	2,2x10 ²	1,9x10¹
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
5	6,6x10 ³	1,5x10 ⁵	8,1x10 ⁴	5,3x10 ⁴	5,8x10 ³
50	6,6x10 ²	1,5x10 ⁴	8,1x10 ³	5,3x10 ³	5,8x10 ²
500	6,6x10¹	1,5x10 ³	8,1x10 ²	5,3x10 ²	5,8x10¹

Tabel 7B. De MOEs op basis van de BMDL (59 µg/kg lg) van carcinogene effecten en bij hoge (bovenste betrouwbaarheidsgrens van de P95) consumptie van melk, vlees en/of lever van melkkoeien die langer dan drie dagen met AFB1 verontreinigd voer hebben gegeten. MOEs die kleiner zijn dan 10.000 zijn vet gedrukt (Tabel 6A).

Voerconcentratie AFB1 (µg/kg)	MOE				
	melk	vlees	lever	Vlees & lever	Melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
5	2,1x10 ⁵	2,3x10 ⁶	8,0x10 ⁵	5,9x10 ⁵	1,6x10 ⁵
50	2,1x10 ⁴	2,3x10 ⁵	8,0x10 ⁴	5,9x10 ⁴	1,6x10 ⁴
500	2,1x10³	2,3x10 ⁴	8,0x10³	5,9x10³	1,6x10³
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
5	6,7x10 ⁵	4,2x10 ⁶	2,1x10 ⁶	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁵
50	6,7x10 ⁴	4,2x10 ⁵	2,1x10 ⁵	1,4x10 ⁵	4,5x10 ⁴
500	6,7x10³	4,2x10 ⁴	2,1x10 ⁴	1,4x10 ⁴	4,5x10³

Tabel 8A. De MOEs op basis van de BMDL (5,8 µg/kg lg) van niet-carcinogene effecten en bij hoge (bovenste betrouwbaarheidsgrens van de P95) consumptie van melk, vlees en/of lever. Waarbij de concentratie in vlees en lever van melkvee is genomen op het moment dat de concentratie van AFM1 in melk gedaald is tot 1, 10 of 100 keer de EU-norm voor AFM1 in melk (0,05, 0,5 en 5 µg/kg) (Tabel 5B).

Melkconcentratie AFM1 (µg/kg)	MOE				
	melk	vlees	lever	Vlees & lever	Melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
0,05	2,6x10 ³	1,0x10 ⁵	3,9x10 ⁴	2,8x10 ⁴	2,4x10 ³
0,5	2,6x10 ²	1,0x10 ⁴	3,9x10 ³	2,8x10 ³	2,4x10 ²
5	2,6x10¹	1,0x10 ³	3,9x10 ²	2,8x10 ²	2,4x10¹
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
0,05	8,3x10 ³	2,0x10 ⁵	1,0x10 ⁵	6,7x10 ⁴	7,3x10 ³
0,5	8,3x10 ²	2,0x10 ⁴	1,0x10 ⁴	6,7x10 ³	7,3x10 ²
5	8,3x10¹	2,0x10 ³	1,0x10 ³	6,7x10 ²	7,3x10¹

Tabel 8B. De MOEs op basis van de BMDL (59 µg/kg lg) van carcinogene effecten en bij hoge (bovenste betrouwbaarheidsgrens van de P95) consumptie van melk, vlees en/of lever. Waarbij de concentratie in vlees en lever van melkvee is genomen op het moment dat de concentratie van AFM1 in melk gedaald is tot 1, 10 of 100 keer de EU-norm voor AFM1 in melk (0,05; 0,5 en 5 µg/kg). MOEs die kleiner zijn dan 10,000 zijn vet gedrukt (Tabel 6B).

Melkconcentratie AFM1 (µg/kg)	MOE				
	melk	vlees	lever	Vlees & lever	Melk, vlees & lever
VCP kinderen (2-6 jaar)					
0,05	2,7x10 ⁵	3,0x10 ⁶	9,8x10 ⁵	7,7x10 ⁵	2,0x10 ⁵
0,5	2,7x10 ⁴	3,0x10 ⁵	9,8x10 ⁴	7,7x10 ⁴	2,0x10 ⁴
5	2,7x10³	3,0x10 ⁴	9,8x10³	7,7x10³	2,0x10³
VCP basis (2007-2010; 7-69 jaar)					
0,05	8,4x10 ⁵	5,9x10 ⁶	2,7x10 ⁶	1,8x10 ⁶	5,9x10 ⁵
0,5	8,4x10 ⁴	5,9x10 ⁵	2,7x10 ⁵	1,8x10 ⁵	5,9x10 ⁴
5	8,4x10³	5,9x10 ⁴	2,7x10 ⁴	1,8x10 ⁴	5,9x10³

Voor de niet-carcinogene effecten wordt een MOE van 100 voldoende geacht op basis van de default assessment factoren van 10 voor interspecies verschillen maal 10 voor intraspecies verschillen. Geen van de MOEs, afgeleid op de BMDL van niet-carcinogene effecten en een blootstelling die correspondeert met een overschrijding van 1 en 10 keer de melk- en voedernorm, is kleiner dan 100. Dus er wordt geen gezondheidsschade verwacht als gevolg van niet-carcinogene effecten bij kortdurende blootstelling aan melk, vlees en/of lever met concentraties die corresponderen met een maximale overschrijding van 10 keer de melk- of voedernorm.

In het geval van een 100 maal overschrijding van de melk- en voedernorm zijn de MOEs bij consumptie van melk kleiner dan 100. Op grond van deze resultaten kan worden geconcludeerd dat bij een kortdurende overschrijding van de productnorm voor aflatoxine in voer of melk met meer dan een factor 10 er een gereede zorg voor het optreden van acute leverschade bestaat.

EFSA acht een MOE van (meer dan) 10.000 als weinig zorgwekkend voor de volksgezondheid in het geval van carcinogenen: *'The Scientific Committee is of the view that in general a MOE of 10,000 or higher, if it is based on the BMDL10 from an animal study, would be of low concern from a public health point of view and might be considered as a low priority for risk management actions'* (EFSA, 2005).

In het geval van een 100 maal overschrijding van de melk- en voedernorm zijn een aantal MOEs kleiner dan 10.000. Van de MOEs die net onder de 10.000 liggen, zoals bijv. 8000 in Tabel 7B en 8400 en 9800 in Tabel 8B, kan worden verondersteld dat ze niet zorgwekkend zijn. De onderliggende BMDL voor kortdurende carcinogeniteit van AFB1 is namelijk gebaseerd op een i.p. studie. Als de berekende MoE-waarden worden gecorrigeerd voor geringere opname na orale blootstelling in vergelijking met i.p. blootstelling zullen de betreffende MOE-waarden waarschijnlijk groter worden dan 10000. Desalniettemin zijn een aantal MOEs dusdanig laag dat ze zelfs na correctie voor absorptie waarschijnlijk niet boven de 10.000 uit komen. Op grond van deze resultaten kan worden geconcludeerd dat bij een kortdurende overschrijding van meer dan 10 keer de norm voor aflatoxine in voer of melk er op termijn een gereede zorg voor het optreden van tumoren bestaat na consumptie van gecontamineerde melk, rundvlees en/of runderlever.

De MOEs die afgeleid zijn van een bepaalde concentratie AFB1 in diervoer (Tabel 7) komen overeen met de MOEs gebaseerd op melkconcentraties AFM1 (Tabel 8). Dit is te verwachten aangezien de gebruikte AFB1 voerconcentraties van 5, 50 en 500 µg/kg resulteren in AFM1 melkconcentraties van respectievelijk 0,06; 0,6 en 6 µg/kg (zie Tabel 1). Deze AFM1 melkconcentraties zijn nagenoeg gelijk aan de gebruikte AFM1 melkconcentraties van 0,05; 0,5 en 5 µg/kg.

Uit Tabel 1 kunnen we dus ook concluderen dat voor de gemiddelde koe de voernorm goed is afgestemd op de melknorm. Dit komt overeen met de bevindingen van van Eijkeren et al (2006).

Conclusie

De berekende MOEs zijn gebaseerd op een realistische hoge schatting van de Nederlandse consumptie van melk, vlees en lever. De aangenomen gehalten van AFB1 en AFM1 in deze matrices werden geschat op basis van drie verschillende niveaus van verontreinigd voer en melk overeenkomstig met 1x, 10x en 100x de EU-norm, namelijk 5, 50 en 500 µg AFB1/kg voer en 0,05, 0,5 en 5 µg AFM1/kg melk. Bij overschrijdingen tot-en-met tien keer de normen van melk en diervoeder zijn de risico's op ongewenste effecten na consumptie van AFB1 en AFM1 gecontamineerde melk-, rundvlees- en runderleverproducten zeer gering. Bij overschrijdingen groter dan 10 keer deze normen is er zorg voor een verhoogde kans op het optreden van acute leverschade en tumoren, zelfs als in aanmerking wordt genomen dat in onderhavige beoordeling slechts sprake was van een incidentele veevoedercontaminatie.

Aanbeveling

De hier gepresenteerde risicoschatting is gebaseerd op overdrachtsmodellering van AFB1 en AFM1 in melkkoeien, humane innamemodellering van verontreinigd dierlijk (orgaan)vlees en melk, en gegevens over de acute toxiciteit van AFB1 en AFM1. Door beperkte informatie vormen de verdeling van AFB1 en AFM1 over weefsels en organen en de uitscheiding uit (orgaan)vlees van melkkoeien de belangrijkste bronnen van onzekerheid. Om deze onzekerheid te beperken wordt een gericht dierexperiment aanbevolen. Voor dit experiment gelden de volgende randvoorwaarden: blootstellingsduur van 5 dagen met daarop volgend een uitwasperiode van 2 dagen. Om zowel de opbouwfase als de uitwasfase van AFB1 en AFM1 in de koe nauwkeurig te kunnen vaststellen, zijn AFB1 en AFM1 analyses in plasma, spier, lever, nier en melk nodig aan het eind van de blootstel-

ling en op 12, 24 en 48 uur na de blootstelling (dus in de uitwasperiode). Per tijdstip zijn 4 dieren nodig waardoor het totaal aantal dieren komt op 16. Eventueel zou overwogen kunnen worden om het onderzoek tot de opbouwfase te beperken (totaal aantal dieren: 4). In dit geval wordt wel zekerheid verkregen over de verdeling van AFB1 en AFM1 in (orgaan)vlees maar niet over de uitscheiding.

Referenties

- Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Gieseke K, Rogers HS, Kieszak S, Njapau H, Schleicher R, McCoy LF, Misore A, DeCock K, Rubin C, Slutsker L (2005) Aflatoxin Investigative Group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ Health Perspect*, 113: 1779-1783.
- Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomom, R., Cuneah, O., Shimshoni, J.A., Soback, S., Ashkenazi, R., Armer, S. and A. Shlosberg (2013) Carry-over of aflatoxin B₁ to Aflatoxin M₁ in high yielding Israeli cows in mid and late lactation. *Toxins*, 5, 173 – 183.
- Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. and H. Hairston (1986) Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain, *J. Food Protec.*, 49, 781 – 785.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* 39, 1-27.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/39.htm>
- EFSA (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. *The EFSA Journal* 282, 1-31.
<http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/282.pdf>
- EFSA (2007) Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal* 446, 1 – 127 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/446.pdf>
- EFSA (2009). Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. *The EFSA Journal* 1150, 1-72.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/s1150.pdf>
- FDA. U.S. Food and Drug Administration
<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm071020.htm> d.d. 28-06-2013
- Fung F, Clark RF (2004) Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *J Toxicol Clin Tox*, 42: 217-234.
- JECFA (2001) Aflatoxin M₁. WHO food additives series 47.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je02.htm>
- Krishnamachari KA, Nagaarajan V, Bhat RV, Tilak TB (1975a) Hepatitis due to aflatoxicosis---an outbreak in Western India. *Lancet* 305: 1061—3.
- Krishnamachari KA, Bhat RV, Nagarajan V, Tilak TB (1975b) Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of Western India. *Ind. J. Med. Res.* 63: 1036-1048.
- Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A, DeCock K, Rubin C, and the Kenya Aflatoxicosis Investigation Group (2005) Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ Health Perspect*, 113: 1763-1767.
- NVWA (2008). Onderzoek naar cadmiumgehalten in rundernieren. Advies van het Bureau Risicobeoordeling aan de Minister van LNV, 6 februari 2008.
<http://www.vwa.nl/onderwerpen/verontreinigingen/dossier/cadmium/nieuwsoverzicht/nieuwsbericht/23069/onderzoek-naar-cadmiumgehalten-in-rundernieren>
- Nyikal N *et al.* (2004) Outbreak of aflatoxin poisoning-Eastern and Central Provinces, Kenya, January-July 2004. *Morb Mortal Wkly Rep* 53: 790-793.

- Van Eijkeren, J.C.H., Bakker, M.I. and M.J. Zeilmaker (2006) A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk, *Food Add. Contam.*, 23(8), 833-838.
- Williams JH, Philips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*, 80: 1106-1122.
- Willis RM, Mulvihill JJ, Hoofnagle JH (1980) Attempted suicide with purified aflatoxin. *Lancet* 1(8179): 1198-1199.

BIJLAGE 1: Overzicht van de kortdurende toxiciteitsstudies met Aflatoxine B1 en M1

In results kolom: **rood** = valt af vanwege een van onderstaande redenen; **groen** = voldoende info om PoD af te leiden

In dose kolom: **groen** = lowest dose <0.1 mg/kg bw anders **rood**. Dit criterium geldt alleen voor niet-carcinogene effecten gezien de grotere MoE die nodig is voor carcinogenen.

1* = poor graph, no data or quantifiable figure

2* = no BMR can be defined

3* = no dose-response

4* = only one dose group & control

5* = poor study, e.g. no control, very small dose range, small (total) # animals

De eerste kolom (study no.) is **rood** als de dosis=rood en/of alle results zijn rood of als

(6*) de blootstellingsduur langer is dan eenmalig én een andere (kortere durende) studie met zelfde eindpunt(en) beschikbaar is.

De studies die uiteindelijk zijn geselecteerd voor BMD analyse zijn **groen**.

Stud y no.	Afla- tox- ine	Species, strain, sex	Exposure du- ration	Dose	Type of study	Results (endpoints with increase/decrease/dose- response)	Reference
1	B1	Rats (F344)	Single exposure	0 – 0.050 – 0.250 – 1 mg/kg bw Oral gavage	Biochemical and histological changes were assessed together with the formation of AFB(1)-lysine adduct (AFB-Lys) and liver foci positive for placental form glutathione S transferase (GST-P(+)).	- BW-gain (1*) - Biochem parameters (a.o. ALT, AST, glucose, total protein, amylase → maar deze normaliseren na 1-3 weken recovery) (5*) - GSTP(+) liver foci and cells(2*) - AFB(1)-lysine adducts (2*)	Qian 2013
2	B1 + M1	rats	Single exposure	Oral: 0 - 0.5 - 1.0 mg/kg bw i.p. : 0.4 – 0.6 – 0.8 – 1.0 – 1.5 mg/kg bw oral + intraperitoneal	Gericht op precursor incorporation in liver nuclear RNA??	- Mortality (i.p. exposure) - Precursor incorporation in liver nuclear RNA (?) (2*) - Morphological changes in liver (not quantitative) (1*)	Pong 1971
3	B1	Rats (F344)	Single exposure Recovery: 24, 48, 72h	0 – 0.100 – 0.250 – 0.400 – 0.600 mg/kg bw Oral gavage	Clin chem + histopath	- clin chem parameters (SGOT, SGPT, ALP, bilirubin, glucose,) - liver histopath changes (1*)	Mehta 1993
4	B1	Rats	Single exposure	0 – 2 – 4 – 8 mg/kg bw (buffalo)	Biochemical and histopatho-	- mortality - BW (3*)	Angsubha-

Study no.	Aflatoxine	Species, strain, sex	Exposure duration	Dose	Type of study	Results (endpoints with increase/decrease/dose-response)	Reference
		(Buffalo and Wistar)	1-week recovery	0 – 2 mg/kg bw (wistar) intra-gastric	logical analyses (liver)	- Clin chem (SGOT, SGPT): effects not consistent - liver lesions (4*)	korn 1990
5	B1	Rats (Fischer) + mastomys?	Single exposure	1 – 2 mg/kg bw (n= 2 rats/dose) intra-gastric	Clin chem + histopath	- clin chem parameters (GOT, GPT, LDH and TBI) (1*) - liver lesions (not quantitative) (1*)	Kumagai 1998
6	B1	Rats (F344)	Single exposure	0 -0.34-0.68-1.02-1.36-2.03-2.71 mg/kg bw oral	Mortality study	- mortality	McKean 2006
7	B1	Rats (F344)	Single exposure	0 – 1.0 – 2.15 – 4.64 – 10.0 – 46.4 mg/kg bw Oral	Mortality study	- mortality	McKean 2006b
8	B1	rats	Single exposure	10 mg/kg Oral?	Mortality study (LD50)	- mortality (1*)	Purchase 1973
9	B1	Rats	Single exposure Recovery until death or max 4 weeks	Dose: ? Intra-gastric and intraperitoneal	Mortality study (LD50)	- mortality (1*) - histopath organ changes in liver (not quantified) (1*)	Butler 1964
10	B1	Rats (F344)	Single exposure	0.025 – 0.125 - 3.0 mg/kg bw Intraperitoneal	Study focussed on c-myc gene expression	- dose-dependent increase in c-myc mRNA levels (age-dependent) (2*)	Larsson 1993
11	B1	Rats (Fischer)	1x (intubation) 5x (intubation) 10x (intubation) 14 dagen (via diet) Incl. groups exposed for >> 18 weken	1x: 5 mg/kg bw (recovery 69 weeks) 5x: 0.080 mg/animal (recovery up to 82 weeks) 10x: 0.040 mg/animal (recovery up to 82 weeks) 14 days: 1 ppm in diet (recovery 82 weeks)	Histopath (liver tumors)	- neoplastic lesions in liver	Wogan 1967
12	B1	Rats (Wistar)	21 days	0-0.720 mg/kg bw	Clin chem, haemological and	- clin chem changes (AST,	Pozzi 2000

Study no.	Aflatoxine	Species, strain, sex	Exposure duration	Dose	Type of study	Results (endpoints with increase/decrease/dose-response)	Reference
				Oral gavage	histopath analysis	<ul style="list-style-type: none"> AP, ALT, GGT, albumin, creatinin, urea, protein) (4*) lesions in liver (vacuolar degeneration, mixed inflammatory infiltrate, disruption of the hepatic trabecular structure, necrosis of the acinar zone II of liver, hyperplasia of biliary ducts and presence of some megalocytes → not quantified.) (1*) 	
13 (6*)	B1	rats	28 days (on alternate days)	0.060 – 0.300 – 0.600 mg/kg bw Oral gavage	immuno-effects	<ul style="list-style-type: none"> BW gain (1*) Proliferative response of T-cells Proliferative response of B-cells Impaired DTH (delayed type of hypersensitivity (DTH) response.) 	Raisuddin 1993
14 (6*)	B1	Rats (F344)	5-weeks	0 – 0.005 – 0.010 – 0.025 – 0.075 mg/kg bw/day Oral gavage	Biochemical and histological changes were assessed together with the formation of AFB(1)-lysine adduct (AFB-Lys) and liver foci positive for placental form glutathione S transferase (GST-P(+)).	<ul style="list-style-type: none"> BW (1*) Clin chem parameters (o.a. AST ALT) Various liver lesions (not quantified) (1*) GSTP(+) liver foci and cells (2*) AFB(1)-lysine adducts (2*) 	Qian 2013
15	B1	Mice (infant)	Single or multiple exposure Recovery until 52- or 82-weeks of age (age at start: 1– 4- 7 days)	1x: 2 – 6 mg/kg bw 3x: 1 – 2 mg/kg bw 5x: 0.25 mg/kg bw intraperitoneal	Histopathology (liver tumors)	<ul style="list-style-type: none"> Hepatomas 	Vesselino-vitch 1972
16	B1	Mice	Single exposure	6 mg/kg bw	Measurement of mutations at	<ul style="list-style-type: none"> Gene mutations in liver (2*, 4*) 	Wattana-

Study no.	Aflatoxine	Species, strain, sex	Exposure duration	Dose	Type of study	Results (endpoints with increase/decrease/dose-response)	Reference
		Female <i>gpt</i> delta C57BL/6J mice (Nohmi <i>et al.</i> , 1996) were crossed with male C3H/HeJ mice to obtain an F1 that was hemizygous for the <i>gpt</i> transgene on chromosome 17.	of 4-days old F1 mice	Intraperitoneal injection	day 24 and day 74		waraporn 2012
17	B1	Mice (C57B 1/6, CBA/J, B 10A and Balb/c)	Single exposure +recovery 24, 72, 168 h	60 mg/kg bw intraperitoneal	Biochemical analysis for renal and hepatic effects, hemolysis, histopathology	- Clin chem parameters (AP) (1*) - Lesions in liver (not quantified) (1*)	Almeida 1997
18	B1	Mice	14 days (on alternate days)	0 – 0.03 – 0.145 – 0.70 mg/kg bw/day Oral gavage	immuno-effects	- Reduced white and red blood cell count - Decrease in T-lymphocytes function and number - Reduced SRBC and LPS - Reduced DTH	Reddy 1987
19 (6*)	B1	Mice (balb/c)	28 days	0 – 0.03 – 0.145 – 0.70 mg/kg bw/day Oral gavage	immuno-effects	- Reduced white blood cell count - Decrease in peripheral lymphocytes number - Inhibition of NK-cell response	Reddy 1989
20 (6*)	B1	Mice (C57BI6)	28 days	0 – 0.03 – 0.15 – 0.750 mg/kg bw/day Oral gavage	immuno-effects	- Decrease in peripheral lymphocytes number - Decreased # antibody producing cells - Decreased IL-2 production	Hatori 1991

Study no.	Aflatoxine	Species, strain, sex	Exposure duration	Dose	Type of study	Results (endpoints with increase/decrease/dose-response)	Reference
21	B1	Rabbit (New Zealand)	5 days	0 – 0.05 – 0.1 mg/kg bw/day Intragastric	General tox (BW organ weight, clin-chem) + hepatotox parameters	- BW gain - Liver weight - Clin chem parameter changes (ALAT, ASAT, AP, GGT, LDH, bilirubin, cholesterol, triglycerides, uric acid, glucose) - Reduced liver enzymes (total liver microsomal cytochrome P450 content, P450-dependent monooxygenase activities, (1*) glutathione S-transferase)	Guerre 1996
22	B1	monkey	Single dose	0 – 0.5 – 1.5 – 4.5 – 13.5 – 40.5 mg/kg bw/day oral	Mortality study	- Mortality	Shank 1971
23	B1	monkey	Single dose	1 – 2 – 3 mg/kg bw oral	Mortality study	- Mortality (5*) - clin chemical changes which point to hepatotoxicity (5*)	Suryanarayana 1971
24	B1	dog	Single dose	0 – 0.1 – 0.25 – 0.5 – 1.0 mg/kg bw intraperitoneal		- clin chem parameters increased (SGOT, LDH, AP) (5*) - hepatic and renal lesions (not quantified) (1*)	Hayes 1977
25	B1	dog	Single dose	ca. 0.5-1 mg/kg bw (oral) Oral and intraperitoneal		- mortality (i.p.) - hepatic lesions (not quantified) (1*)	Newberne 1966
26	B1	Guinea pigs	Single exposure Recovery until death or max 4 weeks	Dose: ? intraperitoneal		- mortality - histopath organ changes in liver (not quantified) (1*)	Butler 1966
27	B1	Rabbit, New Zealand	GD 6-18	0 - 0.025-0.05-0.1 mg/kg bw/day Oral gavage	Developmental tox study	- gross, skeletal and visceral anomalies - pathomorphological lesions	Wangikar 2005
28	B1	Mice	GD 12-13 (for	1. 0 – 15 – 45 – 90 mg/kg bw/day (oral)	1. Developmental tox study (oral en ip-exposure)	1. Reduced BW fetus, malformations (cleft palate, wavy	Roll 1990

Study no.	Aflatoxine	Species, strain, sex	Exposure duration	Dose	Type of study	Results (endpoints with increase/decrease/dose-response)	Reference
		(NMRI) (studie 1 en 2) Chinese hamsters (study 2)	dev-tox study)	2. 0-15- 45 mg/kg bw (i.p.) 3. 0 – 15 – 45 mg/kg bw i.p. 4. 0-12.5-25 mg/kg bw <i>Erg hoge doseringen</i>	2. Dominant lethal assay (ip-exposure) 3. In vivo chromosome aberration analysis	2. ribs, diaphragmatoceles) No mutagenic effects 3. Increased aberrations (1*)	
29	B1	Rats (F344)	3 x4 weeks treatment (with each 4 –week normal diet in between)	0.0– 0.01 – 0.04 - 0.10 – 0.40 – 1.6 ppm (corresponding to 16.4 – 66.4 -- 665.6 – 2452.2 – 4250.3 mg/kg bw/day)	In vivo Hprt-mutation assay	- increased mutant frequency hprt	Morris 1999
30	B1	Rats (sprague-dawley)	3x 48-hourly doses	150 µg/dose/animal intraperitoneal	Study focussed on reproductive organs	- increased levels of sperm GOT, LDH, GPT - no dose-response (single exp dose tested) (4*)	Egbunike 1985

Referenties

- Almeide RMA, Correa B, Xavier JG, Mallozzi MAB, Gambale I, Paula CR. Acute effect of aflatoxin B1 on different inbred mouse strains II. *Mycopathologia* 133: 23-29, 1996
- Angsubhakorn S, Get-Ngern P, Miyamoto M, Bhamarapravati N. A single dose-response effect of aflatoxin B1 on rapid liver cancer induction in two strains of rats. *Int J. Cancer* 46: 664-668, 1990
- Butler WH. Acute toxicity of Aflatoxin B1 in rats. *British Journal of Cancer* 18(4) 756-762, 1964.
- Butler WH. Acute toxicity of aflatoxin B1 in guinea pigs. *J Path Bact* 91: 277-280, 1966.
- Egbunike GN. Sperm maturation and storage in the male rat after acute treatment with aflatoxin B1. *Andrologia* 17(4): 379-382, 1985.
- Guerre P, Eeckhoutte C, Larrieu G, Burgat V, Galtier P. Dose-related effect of aflatoxin B1 on liver drug metabolizing enzymes in rabbit. *Toxicology* 108: 39-48, 1996.
- Hatori Y, Sharma R, Warren RP. Resistance of C57Bl/6 mice to immunosuppressive effects of aflatoxin B1 and relationship with neuroendocrine mechanisms. *Immunopharmacology* 22: 127-136, 1991.
- Hayes AW, Williams WL. Acute toxicity of aflatoxin B1 and rubratoxin B in dogs. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* 1: 59-70, 1977.
- Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Ito Y, Noguchi Y, Yamamoto Y, Ogura A. The fate and acute toxicity of aflatoxin B1 in the mastomys and rat. *Toxicon* 36(1): 179-188, 1998.

- Larson PS, McMahon G, Wogan GN. Modulation of c-myc gene expression in rat livers by aflatoxin B1 exposure and age. *Fundamental and applied toxicology* 20: 316-324, 1994.
- McKean C, Tang L, Tang M, Billam M, Wang Z, Theodorakis CW, Kendall RJ, Wang JS. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology* 44: 868-876, 2006a.
- McKean C, Tang L, Billam M, Tang M, Theodorakis CW, Kendall RJ, Wang JS. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. *J Appl Toxicol* 26: 139-147, 2006b.
- Mehta R, Campbell JS, Laver GW, Stapley R, Mueller R. Acute hepatic response to aflatoxin B1 in rats fed a methyl-deficient, amino acid-defined diet. *Cancer Letters*, 69: 93-106, 1993.
- Morris SM, Aidoo A, Chen JJ, Chou MW, Casciano DA. Aflatoxin B-induced Hprt mutations in splenic lymphocytes of Fischer 344 rats. Results of an intermittent feeding trial. *Mutation research* 423: 33-38, 1999.
- Newberne PM, Russo R, Wogan GN. Acute toxicity of aflatoxin B1 in the dog. *Path Vet* 3: 331-340, 1966.
- Pong RS, Wogan GN. Toxicity and biochemical fine structural effects of synthetic aflatoxins M1 and B1 in rat liver. *J. nat Cancer Inst* 47: 585-592, 1971.
- Pozzi CR, Correa B, Xavier JG, Direito GM, Orsi RB, Matarazzo SV. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. *Mycopathologia* 151: 21-27, 2000.
- Purchase IFH, Steyn M, Gilfillan TC. Metabolism and acute toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Chem Biol Interactions* 7: 283-287, 1973.
- Qian G, Wang F, Tang L, Massey ME, Mitchell NJ, Su J, Williams JH, Phillips TD, Wang JS. Integrative Toxicopathological Evaluation of Aflatoxin B1 Exposure in F344 Rats. *Toxicologic Pathology*, 00: 1-13, 2013
- Raisuddin S, Singh K, Zaidi S, Paul B, Ray P. Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats. *Mycopathologia* 124: 189-194, 1993.
- Reddy RV, Taylor MJ, Sharma RP. Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B1. *Toxicology* 43: 123-132, 1987.
- Reddy RV, Sharma RP. Effects of aflatoxin B1 on murine lymphocytic functions. *Toxicology* 54: 31-44, 1989.
- Roll R, Matthiaschek G, Korte A. Embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 10(1-2): 1-7, 1990.
- Shank RC, Johnsen DO, Tanticharoenyos P, Wooding WL, Bourgeois CH. Acute toxicity of aflatoxin B1 in the Macaque Monkey. *Toxicol Appl Pharmacol* 20: 227-231, 1971.
- Suryanarayana R, Gehring PJ. Acute toxicity of aflatoxin B1 in monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 19: 169-175, 1971.
- Vesselinovitch SD, Mihailovich N, Wogan GN, Lombard LS, Rao KVN. Aflatoxin B1, a hepatocarcinogen in the infant mouse. *Cancer research* 32: 2289-2291, 1972.
- Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N, Sharma AK, Telang AG. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and chemical toxicology* 43: 607-615, 2005.
- Wattanawaraporn R, Woo LL, Belanger C, Chang SC, Adams JE, Trudel L, Bouhenguel JT, Egner PA, Groopman JD, Croy RG, Essigmann JM, Wogan GN. A single neonatal exposure to aflatoxin B1 induces prolonged genetic damage in two loci of mouse liver. *Tox Sci* 128(2): 326-333, 2012.
- Wogan GN, Newberne PM. Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. *Cancer Research* 27(1): 2370-23776, 1967.

Bijlage 2: dosis-respons data van de geselecteerde (zie bijlage 1) eindpunten.

sd = standard deviation

sem = standard error of the mean

ss = sample size

Guerre et al 1996

Dose mgkgbw	Bw day5	Bw sd	liverw	Lw sd	potassium	Pot sd	bicarbonate	Bicar sd	calcium	Cal sd	creatinine	Crea sd	glucose	Gluc sd	uric_acid	ura_sd
0	2.1	0.1	89	14	4.76	0.36	24.4	1	3.32	0.03	67.2	4.5	8.22	0.61	13.2	1.2
0.05	2	0.11	98	18	4.55	0.47	24	2.5	3.25	0.12	73.6	14.3	7.87	0.41	16.2	3.5
0.1	1.8	0.15	115	15	3.95	0.6	21.2	3.2	3	0.7	91.2	8.2	6.42	1.04	26.6	3.9

Guerre et al 1996, gecontinueerd

Dose mgkgbw	triglycerides	Trigly sd	cholesterol	Chol sd	bilirubin	Bili sd	LDH	Ldh sd	Glut transferase	Glutr sd	ALP	Alp sd	ASAT	Asat sd	ALAT	Alat sd	Ss guerre
0	1.09	0.24	1.42	0.22	2	0	181	26	14	1.7	131	18	32.4	6.5	21	9	5
0.05	1.96	1.36	4.13	1.96	7.8	6	247	93	16.2	3.5	130	29	87.2	54.5	51	37	5
0.1	2.61	1.26	6.56	1.33	33.4	22.4	605	240	19.6	4.5	176	60	138	116	149	54	5

Metha *et al* 1993

Dose mg/kgbw	Time*	SGOT	sd_sgot	SGPT	sd_sgpt	ALP	sd_alp	bili	sd_bili	gluc	sd_gluc	ss
0	24	111	159	42	71	197	309	0.181	0.291	156	173	3
0	48	78.4	106	51.8	38.6	165	180	0.236	0.295	143	156	3
0	72	71.7	79.7	48.4	32.6	197	261	0.211	0.29	151	167	3
0.1	24	136	200	72.9	128	144	158	0.17	0.289	143	150	3
0.1	48	127	151	90.5	169	138	149	0.343	0.442	141	157	3
0.1	72	124	188	50.2	81.8	196	228	0.159	0.238	149	163	3
0.25	24	847	1340	435	709	242	312	0.177	0.336	104	117	3
0.25	48	2550	2890	1920	2860	234	257	2.33	2.93	107	117	3
0.25	72	823	1150	523	792	228	251	4.65	5.82	113	122	3
0.4	24	861	1140	532	740	226	274	0.117	0.206	109	122	3
0.4	48	2700	2710	2700	2680	336	366	3.6	4.58	86.7	97.2	3
0.4	72	2520	2850	2310	2280	300	401	5.91	8.17	100	119	3
0.6	24	1340	2110	1090	2000	199	212	0.164	0.263	96.8	111	3
0.6	48	2690	2700	2620	2830	302	341	3.8	5.08	86.9	99.6	3
0.6	72	2700	2710	2490	2840	342	383	11.1	12.6	104	129	3

*covariaat gebruikt voor de analyse van alle eindpunten

Reddy *et al* 1987

dose_mgkgbw	WBC	sem_wbc	ss_wbc	RBC	sem_rbc	ss	lymphocytes	sem_lymph	ss_lymph	DTH	sem_dth	ss_dth
0	7	0.9	5	6.2	0.1	5	9.29	1.5	5	3.8	0.3	5
0.03	6.8	1.6	5	5.6	0.2	5	3.8	0.52	5	3	0.6	5
0.145	4.4	0.6	5	6	0.9	5	4.69	1.35	5	2.5	0.2	5
0.7	3.2	0.5	5	5.7	0.2	5	4.09	0.5	5	2.3	0.3	5

Reddy *et al* 1987, gecontinueerd

dose_mgkgbw	DHI	sem_dhi	ss_dhi	stimulant_dhi*	PFC	sem_PFC	ss_PFC	stimulant_pfc*
0	77.32	15.71	5	LPS	307	59	5	SRBC
0.03	37.35	9.35	5	LPS	214	52	5	SRBC
0.145	50.68	15.55	5	LPS	111	18	5	SRBC
0.7	27.1	13.2	5	LPS	58	20	5	SRBC
0	23.71	4.82	5	PHA	479	74	5	LPS
0.03	13.46	2.92	5	PHA	426	49	5	LPS
0.145	17.59	5.51	5	PHA	401	20	5	LPS
0.7	7.62	3.45	5	PHA	380	25	5	LPS
0	24.04	6.22	5	PWM				
0.03	10.83	2.68	5	PWM				
0.145	16.29	3.74	5	PWM				
0.7	6.32	2.57	5	PWM				
0	8.12	2.29	5	MLC				
0.03	9.38	1.89	5	MLC				
0.145	3.2	0.27	5	MLC				
0.7	4.59	1.82	5	MLC				

*covariaten gebruikt voor de analyse van de eindpunten DHI en PFC

Vesselinovitch *et al* 1972

Dose mg/kg bw	Day*	hepatomas	ss_hepatomas
0	52	100	0
1.25	52	10	5
2	52	20	0
3	52	10	4
6	52	10	7
6	52	20	15
0	82	100	3
1.25	82	18	16
2	82	22	5
3	82	29	28
6	82	16	16
6	82	20	17

*covariaat gebruikt voor de analyse van alle eindpunten

Wangikar *et al* 2005

dose_mgkgbw	skel_anomal	skel_ss	visc_anomal	visc_ss	liver_morph_lesion	liver_lesion_ss
0	0	8	0	16	1	16
0.025	1	9	0	19	1	19
0.05	1	9	0	16	2	16
0.1	2	7	2	14	4	14

Referenties

Zie referentielijst bij bijlage 1

Bijlage 3: Benchmark dose analyse resultaten van acute AFB1 studies

In de onderstaande tabel staan per geselecteerd studie en eindpunt de toegepaste modellen, de BMR en de onder- en bovengrenzen van het betrouwbaarheidsinterval van de BMD (resp. BMDL en BMDU). In het geval van gebruik van covariaten (zie EFSA 2009) staan die genoemd in de kolom 'level'.

Een eindpunt of model wordt als niet informatief beschouwd als (1) de ratio BMDU/BMDL groter is dan 10 of (2) de BMDL een factor 10 onder de laagste dosis ligt. In deze gevallen, aangegeven in kolom 'data quality', zit er onvoldoende informatie in de data om een betrouwbare uitspraak te doen over de BMD (bij gekozen BMR).

Verder is er nog gecontroleerd of binnen een eindpunt de hoogste BMDL en laagste BMDL (van verschillende geaccepteerde modellen) niet meer dan één orde van grootte verschillen (EFSA 2009), maar dit is nergens het geval als de eindpunten/modellen met een data-kwaliteitsscore van 1 of 2 buiten beschouwing worden gelaten.

Per studie is de laagst verkregen BMDL **vet** gedrukt. Daarbij zijn de eindpunten/modellen met een data-kwaliteitsscore van 1 of 2 buiten beschouwing worden gelaten.

Reference	Lowest dose (mg/kg bw [dy])	endpoint	model	BMR (% of % ER)	BMDL (mg/kg bw)	BMDU (mg/kg bw)	level	Data quality
Mehta	0.1	SGOT	E5	+20	0.04019	0.1754		
			H5	+20	0.04297	0.1698		
		SGPT	E5	+20	0.03358	0.102	48 Recovery (h)	
			H5	+20	0.03558	0.1064	48	
		bilirubine	E5	+20	0.03878	0.1636	72	
			H5	+20	0.0386	0.1592	72	
		glucose	E2	-20	0.126	5.328		1
			H2	-20	0.07722	4.183		1
Vesselinovitch 1972	1.25	hepatomas	two-stage	10	0.1653	0.258	82 Recovery (wk)	
			log-logist	10	0.05876	0.4817	82	
			Weibull	10	0.02586	0.3476	82	1

Reference	Lowest dose (mg/kg bw [dy])	endpoint	model	BMR (% of % ER)	BMDL (mg/kg bw)	BMDU (mg/kg bw)	level	Data quality
			log-prob	10	0.05931	0.477	82	
			gamma	10	0.01408	0.3836	82	1
			E3-	10	0.008447	0.1927	82	1,2
			H2-	10	0.1695	0.2964	82	
Reddy 1987	0.03	WBC	E2	-5	0.03433	0.09112		
			H2	-5	0.01794	0.06753		
		RBC	M1					
		lymphocytes	E5	-5	0	0.02247		1
			H5	-5	0	Infinitive		1
		DTH	E5	-5	0	0.03677		1
			H5	-5	0	0.04363		1
		DHI	E2	-20	0.1212	0.2117		
			H2	-20	0.06042	0.1485		
		PFC	E5	-20	0.000162	0.114		1
			H5	-20	0.0008836	0.1279		1
Guerre 1996	0.05	BW	E2	-5	0.02328	0.0554		
			H2	-5	0.02154	0.05529		
		LW	E2	+5	0.01176	0.04631		
			H2	+5	0.01397	0.04656		
		potassium	E2	-20	0.07217	0.2757		
			H2	-20	0.0701	0.3082		
		bicarbonate	E2	-20	0.08589	0.5294		
			H2	-20	0.08562	0.6123		
		calcium	M1					
		creatinine	E2	+20	0.04192	0.1058		
			H2	+20	0.04678	0.1014		
		glucose	E2	-20	0.06026	0.1545		
			H2	-20	0.05731	0.1705		

Reference	Lowest dose (mg/kg bw [dy])	endpoint	model	BMR (% of % ER)	BMDL (mg/kg bw)	BMDU (mg/kg bw)	level	Data quality
		Uric acid	E2	+20	0.02098	0.03511		
			H2	+20	0.02853	0.03916		
		triglycerides	E2	+20	0.01464	0.05384		
			H2	+20	0.02379	0.06001		
		cholesterol	E2	+20	0.008803	0.0199		
			H2	+20	0.01946	0.02915		
		bilirubin	E2	+20	0.005783	0.008655		
			H2	+20	0.01764	0.0196		
		LDH	E2	+20	0.01222	0.02291		
			H2	+20	0.02144	0.02838		
		Glutathione S-transferase	E2	+20	0.03599	0.1406		
			H2	+20	0.04191	0.1352		
		ALP	M1					
		ASAT	E2	+20	0.01042	0.02794		
			H2	+20	0.02089	0.03975		
		ALAT	E2	+20	0.007375	0.01222		
			H2	+20	0.01845	0.02174		
Wangikar 2005	0.025	Skeletal anomalies	M1					
		Visceral anomalies	two-stage	10	0.0511	0.838		1
			log-logist	10	0.0842	0.168		
			Weibull	10	0.0869	0.173		
			log-prob	10	0.0721	0.176		
			gamma	10	0.0742	0.171		
			Logistic	10	0.076	0.133		
			E2-	10	0.0724	0.14		
			H2-	10	0.0576	0.25		

Reference	Lowest dose (mg/kg bw [dy])	endpoint	model	BMR (% of % ER)	BMDL (mg/kg bw)	BMDU (mg/kg bw)	level	Data quality
		Liver lesions	two-stage	10	0.02303	0.3849		1
			log-logist	10	0.02322	0.2346		1
			Weibull	10	0.0312	0.2351		
			log-prob	10	0.01994	0.2372		1
			gamma	10	0.02022	0.225		1
			Logistic	10	0.04052	0.1848		
			E2	10	0.03779	0.1949		
			H1-M1	10				

Referenties

Zie referentielijst bij bijlage 1

Bijlage 4: A kinetic model for the carry-over of aflatoxin B1 from feed to cow's milk, meat, liver and kidney

Basic model structure

In dairy cattle Aflatoxin B1 (AFB₁) is partially metabolised to Aflatoxin M1 (AFM₁) (Kuilman *et al.*, 1998; 2000), with the latter being excreted to milk. In milk AFM₁ levels reach a "steady state" level already 2-3 day after the start of AFB₁ exposure via feed. To describe the relationship between AFB₁ in feed and "steady state" AFM₁ levels in milk van Eijkeren *et al.* (2006) applied a simple kinetic model for these compounds in dairy cows. The structure of this model, which is shown in Figure 1, allows for the uptake of AFB₁ from feed, its removal from the body by conversion to AFM₁ or any other clearance route (lumped excretion of AFB₁ metabolites other than AFM₁ via the urine and/or faeces) and the removal of AFM₁ from the body by excretion into milk or any other clearance route (lumped excretion of AFM₁ metabolites via the urine and/or feces),

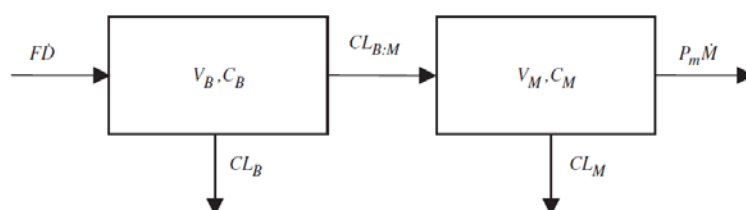


Figure 1. Kinetic model of the carry-over of AFB₁ to AFM₁. A fraction F of the daily dose \dot{D} enters the system across the gut wall. AFB₁ is cleared by excretion and biotransformation to toxicologically non-interesting metabolites (clearance CL_B) and to AFM₁ (clearance $CL_{B:M}$). AFM₁ is cleared by biotransformation to non-interesting metabolites or by excretion through toxicologically non-interesting pathways (clearance CL_M) or by excretion through milk ($P_m \dot{M}$), that has a milk/plasma partition coefficient P_m and a daily production of \dot{M} . Plasma concentrations of AFB₁ (C_B) and AFM₁ (C_M) are the amounts of AFB₁ and AFM₁ divided by their distribution volume (V_B and V_M , respectively).

The model shown in Figure 1 contains 5 unknown prime model parameters, which in the case of "steady state" kinetics can be condensed to 2 lumped parameters. These 2 parameters could be calibrated on the "steady state" kinetics of AFM₁ in milk, resulting in a carry-over equation relating the amount of AFB₁ in feed and its corresponding "steady state" AFM₁ level in milk. This "steady state" concentration ($C_{m,ss}$) is given by:

$$C_{m,ss} = \frac{\alpha \cdot \dot{D}}{\beta + W_m} \quad (0)$$

with \dot{D} the daily AFB₁ feed intake (amount/day) and W_m the daily milk production (kg/day).

The parameters α and β are the lumped parameters, i.e. combinations of the underlying 5 prime kinetic model parameters (for details, see van Eijkeren *et al.*, 2006).

From this model one can derive the Carry-Over Rate (COR) of AFB₁ in feed to AFM₁ in milk to be:

$$COR = \frac{\alpha \cdot W_m}{\beta + W_m} \quad (0)$$

In concordance with literature data the model predicts the AFM₁ concentration in milk, $C_{m,ss}$, to depend not only on the daily AFB₁ feed intake but also on the daily milk production. Furthermore, the COR only depends on the daily milk production. In the current model the COR has a maximum of 0.032. This maximum was obtained by fitting the model to an AFB₁ carry-over experiment in dairy cattle with a daily milk production ranging from 15 to 35 kg/day.

Model extension

The above mentioned model does not explicitly cover the internal AFB₁/AFM₁ kinetics, i.e. the distribution of the chemicals in animal tissues and its pre-steady state characteristics. To adapt the model for this purpose inevitably needs the quantification of the 5 prime model parameters underlying the "steady state" carry-over model. In addition information on the distribution of AFB₁ and AFM₁ in the cow's body is needed (partition coefficients). The steps leading to this quantification are as follows.

The model of van Eijkeren *et al.* basically describes the change of the amount of AFB₁ and AFM₁ in the cow's body in terms of two coupled differential equations:

$$\begin{aligned}\frac{dB}{dt} &= F \cdot D - (k_B + k_{B:M}) \cdot B \\ \frac{dM}{dt} &= k_{B:M} \cdot B - (k_M + k_{M:m}) \cdot M\end{aligned}\quad (0)$$

Here, B is the amount of AFB₁, M the amount of AFM₁, F is the fraction of AFB₁ absorbed across the gut wall, D is the daily dose of AFB₁, k_B the elimination rate of AFB₁ through other pathways than to AFM₁, $k_{B:M}$ is the metabolism rate of AFB₁ to AFM₁, k_M is the elimination rate of AFM₁ through other routes than to milk and $k_{M:m}$ is the milk clearance rate.

Total elimination rates are denoted as

$$\lambda_B = k_B + k_{B:M} \quad \text{and} \quad \lambda_M = k_M + k_{M:m} \quad (0)$$

The instantaneous milk concentration excreted into the udder times the milk production per time unit equals the elimination of AFM₁ through milk:

$$W_m \cdot C_m = k_{M:m} \cdot M \quad (0)$$

From this relation, the amount of AFM₁ in the body follows to be

$$M = \frac{W_m C_m}{k_{M:m}} \quad (0)$$

Straightforward analysis shows that the carry-over rate in "steady state" is

$$COR = \frac{W_m C_m}{D} = F \cdot \frac{k_{B:M}}{\lambda_B} \cdot \frac{k_{M:m}}{\lambda_M} \quad (0)$$

Substituting equation (5) in (4),

$$M = \frac{COR \cdot D}{k_{M:m}} = \frac{COR}{k_{M:m}} \cdot I_{B,feed} \cdot C_{B,feed} \quad (0)$$

Here, we have introduced the daily dose of AFB₁ as the product of the daily intake (kg) of the feed component containing aflatoxin and the concentration of AFB₁ in that component.

In (van Eijkeren *et al.*, 2006) the COR for AFB₁ from feed to milk depends on the daily milk production rate \dot{M} , according to $COR = \frac{0.032 \cdot \dot{M}}{17 + \dot{M}}$. In concordance with the literature a milk production rate of 35 l/day then gives a COR of 0.022

The corresponding steady amount of AFB₁ in the body is

$$B = \frac{\lambda_M}{k_{B:M}} M \quad (0)$$

Data in Stubblefield *et al.* (1983) on distribution of AFB₁ and AFM₁ (**in one lactating cow**) indicate, considering muscle weight to be about 40% of total weight, that the amount of AFB₁ in the body is about 0.4 times the amount of AFM₁. This result is obtained after 3 days of exposure to AFB₁ and 1 day after last third dose. Because of the latter, this ratio need not reflect the ratio at steady state.

Straightforward analysis shows that the instantaneous kinetics of AFM₁ in milk is

$$C_m(t) = \frac{k_{M:m}}{\lambda_M} \cdot \frac{k_{B:M}}{\lambda_B} \cdot \frac{FD}{W_m} \times \left(1 - e^{-\lambda_M t} - \frac{\lambda_M}{\lambda_M - \lambda_B} (e^{-\lambda_B t} - e^{-\lambda_M t}) \right) \quad (0)$$

In practice, observable milk concentration is determined by the integral of this expression over the time span between two milkings divided by the time span duration. Fitting the observable milk concentration to data in Frobish *et al.* (1986) (see Annex 1, two milkings, 12 hours milking interval in cows which have been exposed for 8 days to AFB₁), one finds:

$$\lambda_M = 1.7, \lambda_B = 17 \quad (0)$$

This parameter combination was found excellent in describing the time pattern of the excretion of AFM₁ in milk in a model verification study (see Annex 2).

Summarizing,

Given that (equation (7)) $B/M = \lambda_M / k_{B:M} = 0.4$ (Stubblefield *et al.* (1983)) it follows that the AFM₁ yield rate

$$k_{B:M} = \frac{\lambda_M}{0.4} \quad \& \quad k_{B:M} \leq \lambda_B \quad (0)$$

Given the COR (equation (5)) and substituting equation (9), one obtains

$$COR = \frac{F \cdot k_{M:m}}{0.4 \cdot \lambda_B} \quad \& \quad k_{B:M} \leq \lambda_B \quad \& \quad k_{M:m} \leq \lambda_M \quad (0)$$

Consequently (equation(9)) $k_{B:M} = 4.25$ and

$$F \cdot k_{M:m} = 6.8 \times COR \quad \& \quad k_{M:m} \leq 1.7 \quad (0)$$

Given the $COR = 0.022$ (van Eijkeren *et al.*, 2006, derived from Frobish *et al.* (1986)), it follows that

$$F \cdot k_{M:m} = 0.15 \quad \& \quad k_{M:m} \leq 1.7 \quad (0)$$

So,

$$\begin{aligned} 0.15 &\leq k_{M:m} \leq 1.7 \\ &\& \\ 1 &\geq F \geq 0.09 \end{aligned} \quad (0)$$

From Hoogenboom *et al.* (2001) (table 2) it is estimated that at most 40% AFB₁ is taken up across the gut wall. So, the assumed values are:

$$F = 0.4, \quad k_{M:m} = 0.375 \quad (0)$$

Given $I_{B,feed} = 20$ kg, $C_{B,feed} = 5, 50$ or 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the EU AFB₁ feed limit and the 10- and 100-fold of it, $W_m = 35$ kg/day and $COR = 0.022$, one can derive the residues in milk and the amounts of AFB₁ and AFM₁ in the body. See Table 1.

Table 1. Steady-state AFM₁ concentrations in milk, amounts in the body and AFB₁ amounts in the body given a daily feeding regimen of contaminated feed at the limit, 10-fold the limit and 100-fold the limit in feed.

$C_{B,feed}$ $\mu\text{g}/\text{kg}$	C_m $\mu\text{g}/\text{kg}$	M μg	B μg
5	0.063	5.9	2.4
50	0.63	59	24
500	6.3	590	240

Given the amounts of AFB₁ and AFM₁ in the body and blood:tissue partition coefficients of these substances, one could derive the concentration in edible tissues, like meat, liver and kidney, once partition coefficients and dairy cows relative tissue weights are known.

In Stubblefield *et al.* (1983) it appears that the concentration in eliminating tissues (liver, kidney, gallbladder, bile and mammary gland) concentrations of both AFB₁ and AFM₁ are relatively high in comparison with concentrations in the other reported tissues. Concentrations in parts of muscle are similar to those in the non-eliminating tissues. As relative weights of the eliminating tissues are rather small, we shall assume that both compounds are equally distributed over the body. Moreover, we shall assume a cow's live weight to be 640 kg, with a weight of 140 kg for gastrointestinal content + milk + urine, resulting in a clean weight of 500 kg. From Stubblefield *et al.* (1983) Tables 1 and 2, one can derive AFB₁ partition, *i.e.* the concentration ratio between liver and muscle to be about 15 and to be about 2.9 for kidney. For AFM₁ these values are 13.4 and 125, respectively¹. From the assumption on distribution and the tissue:muscle partition coefficients, concentrations in these edible tissues, corresponding to Table 1 are found in Table 2.

¹ The used experimental observations refer to a "non steady-state" situation with respect to the distribution of AFB₁ and AFM₁ between muscle tissue and the liver and the kidney. In general using such data may lead to the erroneous estimation of so-called partition coefficients. However, as shown in Appendix 2 just in the case of AFB₁ and AFM₁ in dairy cattle this effect was found negligible.

Table 2. Estimated AFM₁ and AFB₁ concentrations in edible tissues corresponding to Table 1.

$C_{B,feed}$ µg/kg	AFM ₁			AFB ₁		
	meat	liver	kidney	meat	liver	kidney
5	0.012	0.16	1.5	0.005	0.075	0.015
50	0.12	1.6	15	0.05	0.75	0.15
500	1.2	16	150	0.5	7.5	1.5

Figure 1 shows the concentration-time curves for milk, Figure 2 (left panels) for AFM₁ concentrations in meat, liver and kidney and (right panels) for AFB₁ concentrations in meat, liver and kidney. Each figure also plots the AFM₁ limit for milk (0.05 µg/kg feed), but this line is not always visible.

Table 3 shows the expected time for milk and edible tissues to reach the limit for milk.

Table 3. Number of days (rounded up) to reach the limits for AFM₁ in milk (0.05 µg/kg) and for AFB₁ in meat, liver and kidney. For AFB₁ this limit is reached always within a day.

$C_{B,feed}$ µg/kg	AFM ₁	AFB ₁		
	milk	meat	liver	kidney
5	1	0	1	0
50	2	0	1	1
500	4	1	1	1

Model extrapolation

The calculated levels in milk, meat, liver and kidney as shown in Tables 1 and 2 refer to dairy cows which have a daily milk production of 35 kg/day, with corresponding COR of 0.022.

However, as the COR depends on the daily milk production (see also Masoero *et al.*, 2007; Signorini *et al.*, 2011; Britzi *et al.*, 2013) it may be expected that animals with a high milk production, i.e. 40-50 kg/day, will show higher tissue levels in comparison with the values shown in Tables 1 and 2. In general the available studies indicate a COR of 0.010 – 0.025 for a milk production level of 20-30 kg/day and 0.025 – 0.070 for a milk production of 40-50 kg/day.

As the AFM₁ concentration in milk scales with $\frac{COR}{W_m}$ a milk production of 50 kg/day and

corresponding COR of 0.070 would lead to an increase of the milk concentration by a factor of $(0.070/0.022)/(50/35) = 2.2$.

As the amount of AFB₁ and AFM₁ in the body linearly scale with the COR, increasing the milk production from 35 kg/day to 50 kg/day would lead to an increase of the amount of these compounds in the body by a factor of $0.070/0.022 = 3.2$.

Experimental studies which may be used for additional model verification

With regard to the absorption fraction of AFB₁ from feed and the internal AFB₁/AFM₁ kinetics (amount the cow's body and the distribution over the organs) no additional information which can be used for the refinement of the model calibration is available.

Additional studies which may be used for the verification of the model's ability to simulate the carry-over of AFB₁ in feed to AFM₁ in milk are:

Diaz, D.E., Winston, M. H., Blackwelder, J.T., Eve, J.A. , Hopkins, B.A., Anderson, K.A., Jones, F.T., and L. W. Whitlow (2004) Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin

M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed, *Mycopathologica*, 157, 233-241.

Fremy, J.M. and P. Quillardet (1985) The carry-over of Aflatoxin B1 into milk of cows fed ammoniated rations: Use of a HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety, *Food Add. Contam.*, 2(3), 201-207.

Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G. and D. Diaz (2007) Carry over of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts, *Animal*, 1(9), 1344-1350.

Polan, C.E., Hayes, J.R. and T.C. Campbell (1974) Consumption and fate of Aflatoxin B1 by lactating cows, *J. Agric. Food Chem.*, 22(4), 635-638.

Polonelli, L., Giovati, L., Magliani, W., Conti, S., Sforza, S., Calabretta, S., Casoli, C., Ronzi, P., Grilli, E., Gallo, A., Masoero, F. and G. Piva (2011) Vaccination of Lactating Dairy Cows for the Prevention of Aflatoxin B1 Carry Over in Milk, *PLOS One*, 6(10), e26777.

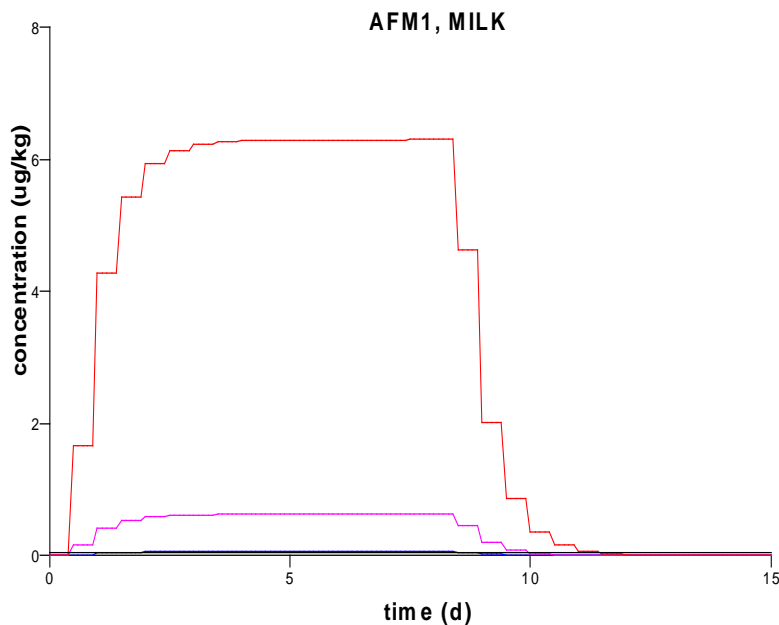


Figure 1. AFM₁ concentration in milk, given exposure to AFB₁-contaminated feed during 8 days.

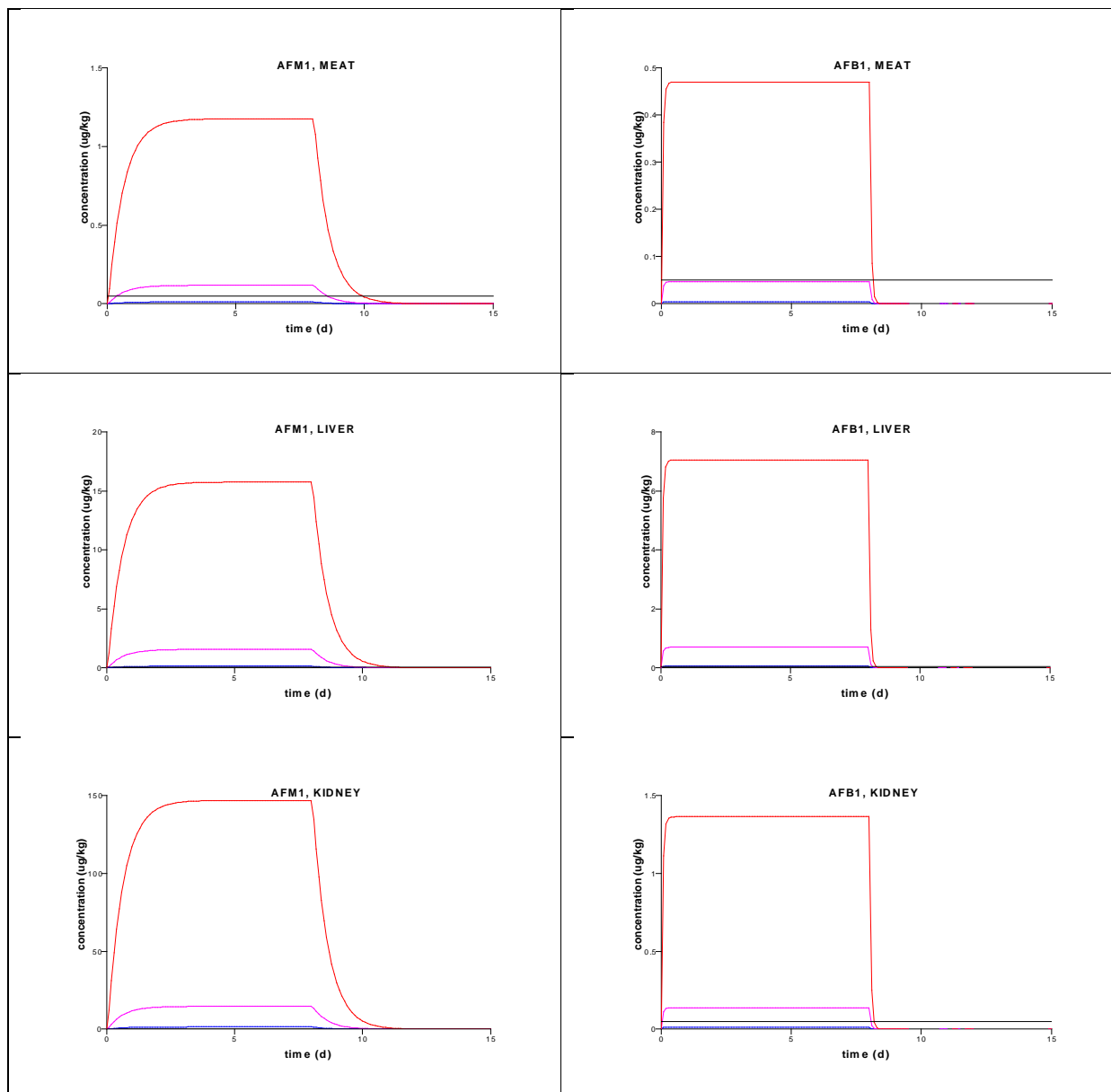


Figure 2. Left: AFM₁ concentration in meat (upper panel), liver (middle panel) and kidney (lower panel), given exposure to AFB₁-contaminated feed during 8 days. Right: The same for AFB₁. Note that the elimination rate of AFB₁ is a tenfold of that for AFM₁.

Annex 1: Calibration of Frobish *et al.* (1986)

In Frobish *et al.* (1986) dairy cattle was exposed for a period of 8 days to AFB1 contaminated feed (20, 48 and 104 ppb). After this period the exposure was stopped and milk was allowed to decrease to an AFM1 level of 0.5 µg/l.

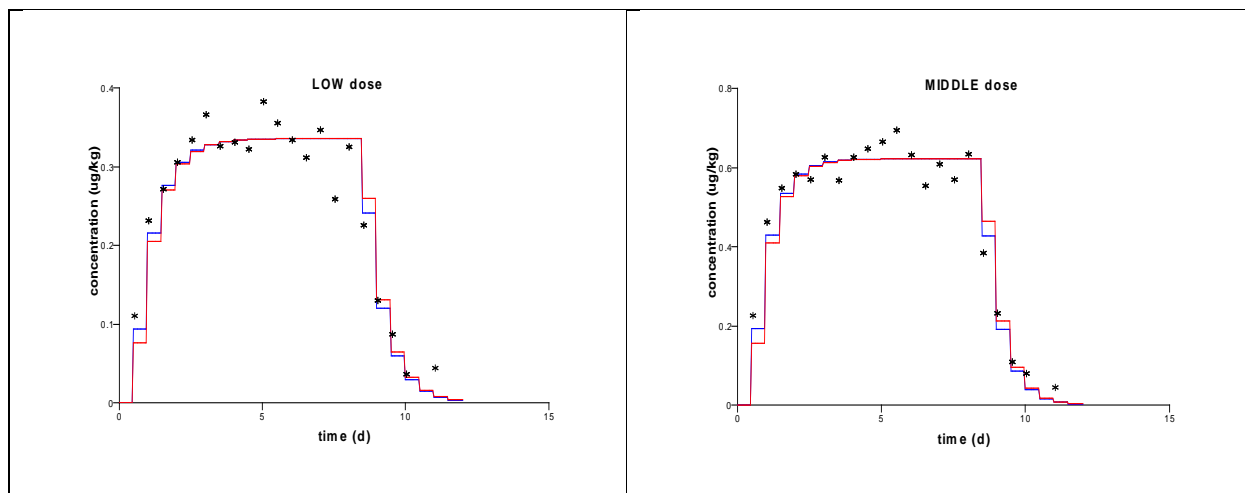
Equation (8) (see main text) was fitted to the milk data of this experiment (see Figures below), resulting in the following estimations for the (lumped) parameters λ_M and λ_B :

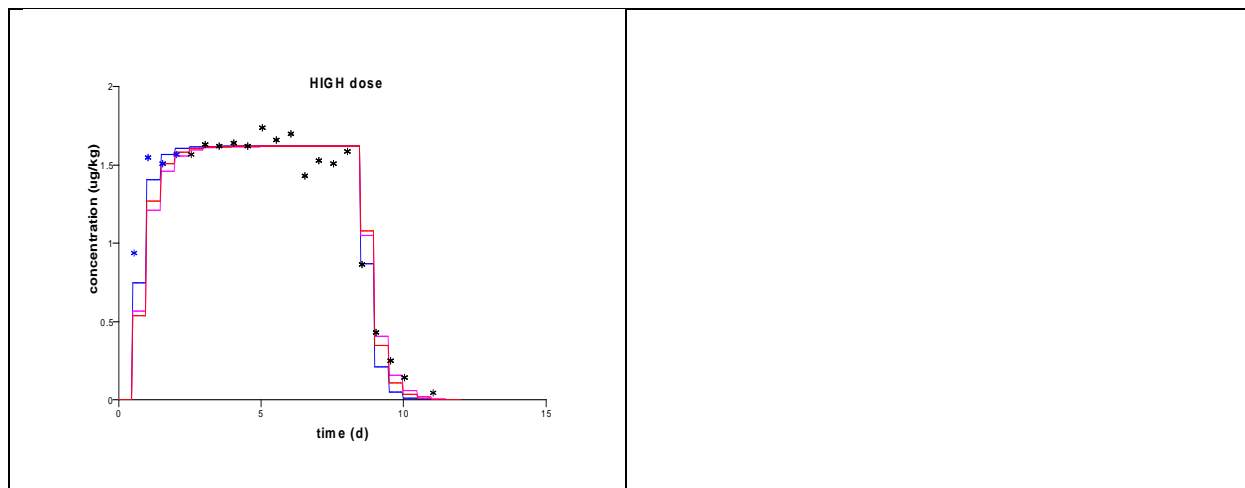
	λ_M (-/h)	λ_B (-/h)	C_{max} (µg/kg)
20 ppb	0.0583 (± 0.0058)	45 (± 280 \cancel{M})	0.336 (± 0.007)
48 ppb	0.0666 (± 0.0002)	132 (± 1 \cancel{M})	0.623 (± 0.010)
104 ppb ^A	0.117 (± 0.001)	2300 (± 70000 \cancel{M})	1.62 (± 0.03)
	0.0791 (± 0.0001)	22 (± 57 \cancel{M})	1.60 (± 0.02)

A: second line, fit to parameters excluding first four data

As can be seen λ_M could well be estimated for each of the feed levels. The geometric mean 0.0720 of 0.0583, 0.0666 and 0.0962 was chosen as value for λ_M representing this parameter in the Frobisch experiment, 0.0720 (-/h) is equivalent to 1.7 (-/d) (uncertainty range: 1.4 (-/d) to 2.3 (-/d)).

In the case of the λ_B the data did not allow for a meaningful calibration. However, together with a value of 1.7 (-/d) for λ_M a value of 17 (-/d) for λ_B was found to optimally describe the data of all three dose levels. This parameter combination was found excellent in describing the time pattern of the excretion of AFM1 in milk in a model verification study (see Annex 2).





Low and middle dose:

Blue lines: with parameters as in the table

Red: fixing $\lambda_B = 17$;

High dose:

Blue line: with parameters as in the table, upper line

Pink line: with parameters as in the table, lower line; data omitted from fitting are in blue symbols. Note that the "blue-line-model" best represents these data and that the "pink-line-model" best fits the four data at the end of the experiment

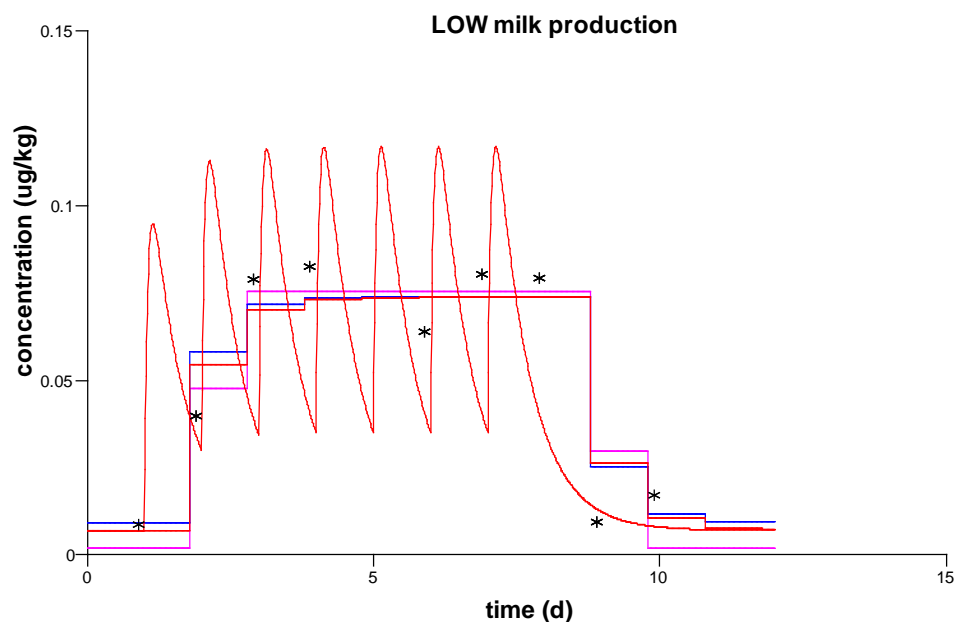
Red line: compromis model, taking $\lambda_M = 0.0962$ (geometric mean) and $\lambda_B = 17$

Annex 2: Verification on Britzi *et al.* (2013)

In Britzi *et al.* (2013) mid- and late-lactation cows were exposed to AFB1 containing feed for 7 days, followed by a depuration period of 2 days.

Equation (8) (see main text) was fitted to the milk data of this experiment assuming either a continuous dosing regime or a daily bolus dosing (see Figures below). Clearly, a daily bolus dosing regime resulted in a superior model fit to the data, with optimal values for the parameters λ_M and λ_B **not being distinguishable** from the parameter values which were found optimal in describing the data of the Frobish study, i.e.

$$\lambda_M = 1.7, \lambda_B = 17.$$



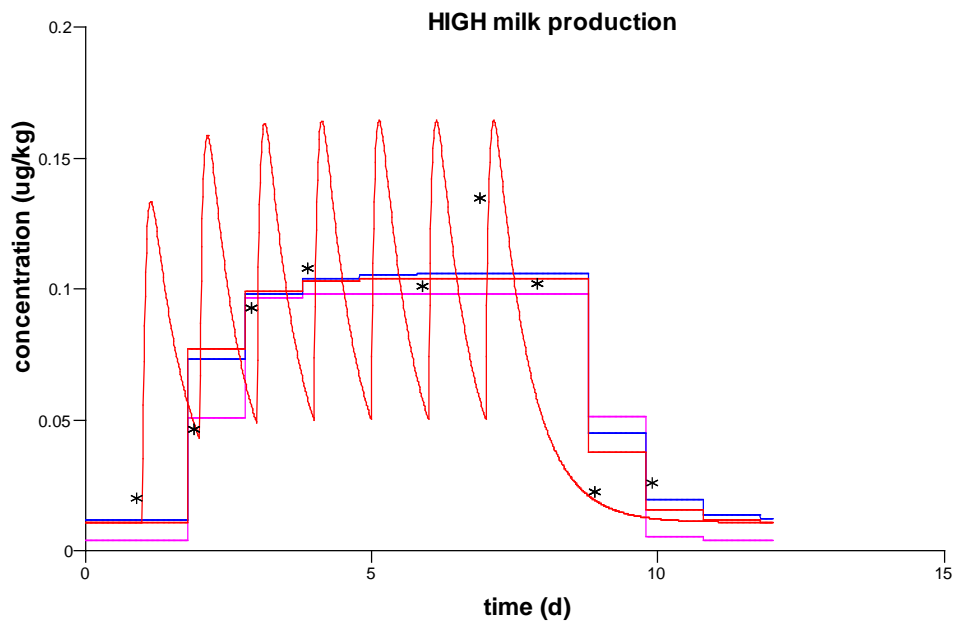
Pink: assuming continuous dosing regimen; loglikelihood LLF = 28.25;
 $\lambda_M = 9.7 (\pm 6.7), \lambda_B = 15 (\pm 13)$, note the great uncertainty ranges

Blue: assuming daily bolus dosing; loglikelihood LLF = 28.88;
 $\lambda_M = 1.91 (\pm 0.01), \lambda_B = 18.3 (\pm 0.1)$

Red step function: assuming daily bolus dosing; loglikelihood LLF = 28.85;
fixed values $\lambda_M = 1.7, \lambda_B = 17$;

Red continuous: corresponding instantaneous milk concentration; last milking of three daily milkings at every instant that the decreasing continuous function crosses a vertical of the step function

Note that neither the blue nor the pink line show a significant better modeling approach with respect to the red line modeling approach.



Pink: assuming continuous dosing regimen; loglikelihood LLF = 23.64;
 $\lambda_M = 3.8 (\pm 2.4), \lambda_B = 22 (\pm 27)$, note the great uncertainty ranges

Blue: assuming daily bolus dosing; loglikelihood LLF = 24.72;
 $\lambda_M = 1.42 (\pm 0.22), \lambda_B = 19.8 (\pm 0.1)$

Red step function: assuming daily bolus dosing; loglikelihood LLF = 24.27;
 fixed values $\lambda_M = 1.7, \lambda_B = 17$;

Red continuous: corresponding instantaneous milk concentration; last milking of three daily milkings at every instant that the decreasing continuous function crosses a vertical of the step function

Neither the blue nor the pink line show a significant better modeling approach with respect to the red line modeling approach.

References

- Allcroft, R., Roberts, B.A. and M.K. Lloyd (1968) Excretion of aflatoxin in a lactating cow, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 6, 619 – 625.
- Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J.A., Soback, S., Ashkenazi, R., Armer, S and A. Shlosberg (2013) Carry-over of Aflatoxin B1 to Aflatoxin M1 in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation, *Toxins*, 5, 173-183.
- Diaz, D.E., Winston, M. H., Blackwelder, J.T., Eve, J.A. , Hopkins, B.A., Anderson, K.A., Jones, F.T., and L. W. Whitlow (2004) Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed, *Mycopathologica*, 157, 233-241.
- Fremy, J.M. and P. Quillardet (1985) The carry-over of Aflatoxin B1 into milk of cows fed ammoniated rations: Use of a HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety, *Food Add. Contam.*, 2(3), 201-207.
- Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. and H. Hairston (1986) Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain, *J. Food Protection*, 49, 781-785.
- Hoogenboom, L.A.P., Tulliez, J., Gautier, J.-P., Coker, R.D., Melcion, J.-P., Nagler, M.J., Polman, Th.H.G. and J. Delort-Laval (2001) Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows, *Food Add. Contam.*, 18,(1), 47-58.
- Kissell, L., Davidson, S., Hopkins, B.A., Smith, G.W. and L.W. Whitlow (2012) Effect of experimental feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets, *J. Animal Phys. Animal Nutr.*, DOI: 10.1111/j.1439-0396.2012.01311.x.
- Kuilman, M.E.M., Maas, R.F.M., Judah, D.J. and J. Fink-Gremmels (1998) Bovine hepatic metabolism of Aflatoxin B1, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2707-2713.
- Kuilman, M.E.M., Maas, R.F.M. and J. Fink-Gremmels (2000) Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of Aflatoxin B1 in bovine hepatocytes, *Toxicology In Vitro*, 14, 321-327.
- Lafont, P., Lafont, J., Mousset, S. and C. Frayssinet (1980) Étude de la contamination du lait de vache lors de l'ingestion de faibles quantités d'aflatoxine, *Ann. Nutr. Alim.*, 34, 699 – 708.
- Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva¹, G. and D. Diaz (2007) Carry over of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts, *Animal*, 1(9),1344–1350.
- Masri, M.S., Garcia, V.C. and J.R. Page (1969) The aflatoxin M content of milk of cows fed known amounts of aflatoxin, *The Veterinary Record*, 84(6), 146-147.
- Polan, C.E., Hayes, J.R. and T.C. Campbell (1974) Consumption and fate of Aflatoxin B1 by lactating cows, *J. Agric. Food Chem.*, 22(4), 635-638.
- Polonelli, L., Giovati, L., Magliani, W., Conti, S., Sforza, S., Calabretta, S., Casoli, C., Ronzi, P., Grilli, E., Gallo, A., Masoero, F. and G. Piva (2011) Vaccination of Lactating Dairy Cows for the Prevention of Aflatoxin B1 Carry Over in Milk, *PLOS One*, 6(10), e26777.
- Queiroz, O.C.M., Han, J.H., Staples, C.R. and A.T. Adesogan (2012) Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed on an aflatoxin B1-contaminate diet, *J. Dairy Sci.*, 95, 5901-5908.
- Signorini, M.L. ,Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., Zapata de Basílico, M.L., Basílico , J.C. and M. Pisani (2012) Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina, *Food Chem. Toxicol.*, 50, 250-257.
- Stubblefield, R.D., Pier, A.C., Richard, J.L. and O.L. Shotwell (1983) Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B1, *Am. J. Vet. Res.*, 44, (9), 1750 – 1752.
- Van Eijkeren, J.C.H., Bakker, M.I. and M.J. Zeilmaker (2006) A simple steady-state model for the carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk, *Food Add. Contam.* 23, 833-838.

Bijlage 5: Calculation of partition coefficients for AFB1 and AFM1 in dairy cattle under "non-steady state" conditions

From Chen & Gross (1979) we know that the apparent tissue: blood/plasma partition of an eliminating organ in steady state and during the terminal elimination phase are given by

$$P_{app,ss} = \frac{Q}{Q+CL} \cdot P, \quad P_{app,term} = \frac{Q}{Q+CL-\lambda V} \cdot P \quad (0)$$

respectively. Here, Q, CL, V and P are the concerning organ's blood flow, intrinsic clearance, volume and tissue: blood/plasma partition coefficient and λ is the exponential terminal elimination rate.

Note that these are the real partition coefficients during these phases in the sense of ratio between tissue and blood or plasma. So, if one wants to use partition coefficients from observations during these phases for PBPK modeling, one should take

$$P = \frac{Q+CL}{Q} \cdot P_{app,ss}, \quad P = \frac{Q+CL-\lambda V}{Q} \cdot P_{app,term} \quad (0)$$

respectively. The resulting PBPK model automatically will result in modeled tissue and blood/plasma concentrations with the apparent ratios.

The estimated partition coefficients in Stubblefield (1983) are assumed to be apparent partition coefficients during the terminal phase and are really representative of the tissue distributions of AFB₁ and AFM₁ during that phase. However, the tissue distribution presented in the advice is tacitly assumed to be the distribution during steady state. From eq. (0) it follows that

$$P_{app,ss} = \frac{Q+CL-\lambda V}{Q+CL} \cdot P_{app,term} \quad (0)$$

From Derks *et al.* (1993; 1994) the blood flow through liver is about 4×10^4 L/day (corresponding cardiac output is about 60 L/min for a lactating cow) and the liver's volume is about 8.5 L. Given the terminal phase exponential elimination for AFB₁ and AFM₁ phase to be 17 and 1.7 -/day, it appears that correcting for the terminal phase clearance (λV) is negligible, independent of the intrinsic clearance value.

References

- Chen, H.S.G and J. F. Gross (1979) Estimation of Tissue-to-Plasma Partition Coefficients Used in Physiological Pharmacokinetic Models, *J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 7(1), 117-125.
- Derks, H.G.J.M, Berende, P.L.M., Everts, H., Olling, M., Liem, A.K.D and A.P.J.M. de Jong (1993) A physiological pharmacokinetic model for 2,3,7,8-TCDD in the cow, RIVM report 643810.001 (in Dutch).
- Derks, H.G.J.M, Berende, P.L.M., Everts, H., Olling, M., Liem, A.K.D and A.P.J.M. de Jong (1994) Pharmacokinetic modeling of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and furans (PCDFs) in cows, *Chemosphere*, 28, (4), 711-715.
- Stubblefield, R.D., Pier, A.C., Richard, J.L. and O.L. Shotwell (1983) Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B₁, *Am. J. Vet. Res.*, 44, (9), 1750 – 1752.